

# **TESE DE DOUTORADO**

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

**“Mapeamento topológico virtual de neurônios  
proporcional às atividades eletrofisiológicas  
em matrizes de microeletrodos”**

**ALUNO: Eduardo Rafael Llapa Rodríguez**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. José Hiroki Saito**

**São Carlos  
Dezembro/2015**

**CAIXA POSTAL 676  
FONE/FAX: (16) 3351-8233  
13565-905 - SÃO CARLOS - SP  
BRASIL**

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

**MAPEAMENTO TOPOLÓGICO VIRTUAL DE  
NEURÔNIOS PROPORCIONAL ÀS ATIVIDADES  
ELETROFISIOLÓGICAS EM MATRIZES DE  
MICROELETRODOS**

**EDUARDO RAFAEL LLAPA RODRÍGUEZ**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ HIROKI SAITO**

São Carlos - SP  
Dezembro/2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

**MAPEAMENTO TOPOLÓGICO VIRTUAL DE  
NEURÔNIOS PROPORCIONAL ÀS ATIVIDADES  
ELETROFISIOLÓGICAS EM MATRIZES DE  
MICROELETRODOS**

**EDUARDO RAFAEL LLAPA RODRÍGUEZ**

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

Orientador: Prof. Dr. José Hiroki Saito

São Carlos - SP  
Dezembro/2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696m      Rodríguez, Eduardo Rafael Llapa  
                 Mapeamento topológico virtual de neurônios  
                 proporcional às atividades eletrofisiológicas em  
                 matrizes de microeletrodos / Eduardo Rafael Llapa  
                 Rodríguez. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
                 139 p.

                 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
                 Carlos, 2015.

                 1. Matriz de microeletrodos. 2. Sinais  
                 eletrofisiológicos. 3. Culturas de neurônios in-vitro.  
                 4. ICA. 5. Mapeamento topológico de neurônios. I.  
                 Título.



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eduardo Rafael Llapa Rodríguez, realizada em 15/12/2015:

---

Prof. Dr. José Hiroki Saito  
UFSCar

---

Prof. Dr. Emerson Carlos Pedrino  
UFSCar

---

Prof. Dr. Ricardo José Ferrari  
UFSCar

---

Prof. Dr. João Batista Destro Filho  
UFU

---

Prof. Dr. Luiz Otavio Murta Junior  
USP

# AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Hiroki Saito, pela confiança, apoio e companhia durante todo o doutorado. Por me direcionar nesse desafio e durante todos esses anos lapidar meu conhecimento, guiar as minhas descobertas e sempre estar muito próximo, ensinando, incentivando, questionando e sendo um exemplo de pessoa, profissional e principalmente de ética. Agradeço aos avaliadores desta tese pela crítica e opiniões para esta pesquisa, além de mostrarem novos caminhos. Agradeço especialmente aos meus pais, Samuel e Isabel, minha irmã, Eliana, meu cunhado Carlos e o meu sobrinho Thiago, pelo apoio, carinho e preocupação. Por estarem sempre pendentes das minhas ações e por contribuírem muito para que o dia da defesa chegasse. Agradeço ao meu pequeno Théo, que com a sua chegada trouxe emoções e sentimentos que nunca senti, sendo sempre a minha motivação de crescimento. À minha esposa Renata, por todo o amor, parceria, amizade, cuidados, compreensão e apoio incondicional, sendo a pessoa que completa o meu dia-dia e a minha vida. Aos meus avós Manuel e Cristina, ao Alexandre, Sandra, Dona María e à toda a minha família, pelo carinho e apoio durante esta etapa da minha vida acadêmica. Aos amigos e colegas do Departamento de Computação, pela amizade e pelos momentos de descontração, essenciais para recarregar as energias durante os anos de São Carlos. Registro aqui um agradecimento aos meus professores do DC-UFSCar, pelos ensinamentos, conselhos, discussões teóricas e práticas e ensinamentos que são hoje parte da minha formação. Estendo meus agradecimentos aos funcionários do Departamento de Computação da UFSCar, em especial à Cristina. Finalmente, agradeço à CAPES (CAPES/DC) pelo apoio financeiro para a realização deste doutorado.

# RESUMO

Esta tese combina processamento de imagens e sinais, para a obtenção de uma distribuição virtual de neurônios em Matrizes de microeletrodos (Microelectrode Array, MEA), dispositivos projetados para o registro de sinais eletrofisiológicos de culturas de células neuronais, *in-vitro*, de forma não-invasiva. Na análise dos sinais eletrofisiológicos é de interesse o conhecimento da distribuição topológica das células ao longo dos microeletrodos, porém, nem sempre as imagens fotográficas das culturas são disponíveis. O presente trabalho apresenta uma metodologia de obtenção da distribuição topológica estatística dos neurônios numa cultura *in-vitro*, a partir dos sinais eletrofisiológicos. Para o cálculo estatístico do número de neurônios nessa distribuição topológica, é feito o uso da técnica de ICA (*Independent Component Analysis*), para obter os sinais relativos aos neurônios mais próximos para cada microeletrodo. Assumindo-se a hipótese de que as atividades eletrofisiológicas espontâneas dos neurônios, *spikes* e *bursts*, sejam diretamente proporcionais ao número de neurônios, realiza-se a contagem do número de *spikes* ou o número de *bursts*, e atribui-se o número de neurônios para cada microeletrodo, proporcionalmente à quantidade dessas atividades. Para a validação da proposta, foi utilizado um experimento, Experimento 371, realizado na Universidade de Gênova, Itália, em que foram registrados os sinais eletrofisiológicos ao longo de 46 DIVs (Dias *In-Vitro*), obtendo amostras de 20 minutos de registros para os 25, 29, 32, 36, 39, 43 e 46 DIVs, e um conjunto de imagens fotográficas da cultura no 38 DIV. Considerando-se que o número de neurônios associados a cada microeletrodo na imagem fotográfica no 38 DIV é proporcional à atividade eletrofisiológica espontânea dos neurônios, num registro realizado no 39 DIV, um dia após as fotos, foi feita uma regra de determinação do número virtual de neurônios em função das atividades eletrofisiológicas espontâneas medidas, denominada de calibração. O erro relativo à distância da atividade dos neurônios em relação à quantidade de neurônios na imagem fotográfica, e a atividade dos neurônios em função do registro de sinais eletrofisiológicos é calculado para comparação e validação. Dessa forma são construídos os mapas topológicos virtuais de neurônios proporcionais às atividades eletrofisiológicas medidas no 39 DIV, em função da quantidade de *spikes* e de *bursts*. O mapa obtido pela contagem de *spikes* se aproxima mais da distribuição real de neurônios vista na imagem fotográfica, do que o mapa obtido em função da contagem de *bursts*. No estudo de variância de atividades em função da contagem de *spikes* e *bursts* durante os 20 minutos de medidas num DIV, e constata-se que as atividades em contagem *spikes* é mais estável que em contagem de *bursts*.

**Palavras-chave:** matriz de microeletrodos, sinais eletrofisiológicos, culturas de neurônios *in-vitro*, ICA, mapeamento topológico de neurônios, análise quantitativa, imagem.

# ABSTRACT

This thesis combines image and signal processing to obtain virtual neuron distribution maps in a Microelectrode Array (MEA), which are devices designed for non-invasive electrophysiological signal recording for in vitro cultures of neuron cells. In the electrophysiological signal analysis, it is of interest the knowledge of the topological distribution of the cells along the MEA microelectrodes, but, usually the photographic images of the cell culture are not available. This doctoral work presents an approach to obtain the statistical topologic distribution of the neurons of an in vitro cell culture, denoted virtual distribution of neurons, from the electrophysiological signals. To certify that the statistical computation of the neuron counting is associated to each MEA microelectrode, it is used the ICA (Independent Component Analysis) technique, for the separation of the neuron signals distributed throughout the MEA area, to obtain for each microelectrode, only the signals from its adjacent neurons. Assuming the hypothesis that the spontaneous neuron activities, spikes and bursts, are directly proportional to the neuron counting, it is realized the spike counting and burst counting, and it is assigned for each microelectrode, a number of neurons proportional to that numbers of activities. For the validation of the proposal, as well as for calibration of the system, to obtain the estimated number of neurons, it was used an experiment denoted 371, realized in Genoa University, Italy, in which it was recorded electrophysiological signals in 46 DIVs (*Days In-Vitro*), obtaining 20 minutes of recording in 25, 29, 32, 36, 39, 43, and 46 DIVs, and a set of photographic images in 38 DIV. Assuming that microelectrode neuron counting in the 38 DIV photographic image is proportional to the 39 DIV spontaneous electrophysiological activity signal recording, one day after the imaging, it was determined the neuron counting as function of the spontaneous electrophysiological activities recording, in a process denoted as calibration of the virtual number of neurons. The distance error from the neuron activities as function of the neuron counting in photographic image and in function of the recorded electrophysiological signals was calculated and compared for validation. In this way, it was possible to construct virtual topologic maps of neurons, proportional to the electrophysiological activities measured in 39 DIV, as a function of the spike and the burst countings. Comparing these two virtual maps, the spike counting virtual map was more close to the real neuron distributions viewed at the photographic image of 38 DIV. Also, the variance of the spike and burst counting along the 20 min of electrophysiological recording in a DIV, was calculated, and noted that the spike counting is more stable than burst counting.

**Keywords:** microelectrode array, eletrofisiological signals, *in-vitro* neuron culture, ICA, topological neuron mapping, quantitative analysis, image.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Sistema de realimentação de estímulos usando culturas de neurônios corticais no MEA. Figura adaptada de POTTER <i>et al.</i> (2006). .....	20
Figura 1.2 – Diagrama ilustrativo de um neurônio.....	24
Figura 1.3 – Diagrama ilustrativo de uma rede de neurônios, interligados por sinapses. ....	25
Figura 1.4 – Ilustração de uma sinapse. ....	25
Figura 1.5 – Evolução do potencial de ação no tempo.....	26
Figura 1.6 – O limiar do spike é calculado como um múltiplo do desvio padrão da atividade basal. ....	27
Figura 1.7 – Registro de um único canal é mostrado (à esq.), com ampliação ( <i>zoom</i> ) do trecho apontado pela seta, à direita. Figura obtida de (WAGENAAR, 2005). ....	28
Figura 1.8 – Esquema mostrando ISI (Intervalo entre spikes) e IBI (Intevalo entre bursts). Figura obtida de (WAGENAAR, 2005). ....	28
Figura 1.9 – Esquema mostrando estimulação e registro da atividade elétrica em fatias de tecido com MEA. Adaptação de Rutten (RUTTEN, 2001). ....	29
Figura 3.1 – Diagrama da metodologia proposta caracterizando a análise e o processamento da atividade eletrofisiológica em uma cultura <i>in-vitro</i> ....	51
Figura 3.2 – Ilustração da configuração dos microeletrodos da MEA padrão de 59 microeletrodos: (a) imagem fotográfica da região central da MEA; (b) identificação dos microeletrodos. ....	52
Figura 3.3 – Exemplo de um mapa de atividades dos neurônios. ....	53
Figura 3.4 – Diagrama da metodologia de processamento de imagens no registro fotográfico da cultura <i>in-vitro</i> para a obtenção do mapa de contagem dos neurônios.....	55
Figura 3.5 – Exemplo de um mapa de contagem de neurônios. ....	57
Figura 3.6 – Diagrama da metodologia de calibração para a obtenção do mapa de distribuição virtual dos neurônios. ....	58
Figura 3.7 – Exemplo de um mapa de distribuição virtual de neurônios. ....	59
Figura 3.8 – Diagrama de blocos de estimação dos componentes independentes usando ICA.....	62

Figura 3.9 – Aplicação do sistema de mistura usando a matriz A e do sistema de separação, usando a matriz W. Adaptado de (FERREIRA, 2002). .....	63
Figura 3.10 – Aplicação da técnica ICA ao problema SCF, onde os diagramas das 2 colunas primeiras mostram os sinais no domínio do tempo e da terceira coluna as concretizações conjuntas. Nos diagramas da linha superior observam-se duas componentes independentes $S_1$ e $S_2$ ; da linha intermediária, as duas observações $X_1$ e $X_2$ , onde as concretizações formam um paralelograma de arestas, paralelas às retas definidas pelas colunas da matriz A; e na linha inferior, as componentes estimadas $\hat{S}_1$ e $\hat{S}_2$ . Adaptado de Ferreira (Ferreira, 2002).....	67
Figura 3.11 – Detecção de spikes no experimento 371, DIV 39, num registro de 20 minutos.....	77
Figura 3.12 – Seis imagens que compõem uma imagem completa da cultura 371. .	79
Figura 3.13 – (a) imagem completa da cultura, (b) imagem dos microeletrodos, (c) imagem completa dos neurônios e (d) imagem completa dos microeletrodos e os neurônios. ....	81
Figura 4.1 – (a) seis imagens de diferentes regiões de grupos de microeletrodos; (b) imagem da cultura 371, resultante do processo de registro das seis imagens.....	84
Figura 4.2 – Visualização simultânea de registros eletrofisiológicos de 59 microeletrodos ativos, correspondentes a 5 minutos, obtido no experimento do DIV 25.....	86
Figura 4.3 – Registro realizado pelo microeletrodo 25 para o experimento DIV 25, nos mesmos 5 minutos, correspondentes à Figura 4.2.....	86
Figura 4.4 – Ilustração da aplicação do ICA – (Superior) sinais num intervalo de 5 min.; (inferior) resultados de ICA em segmentos de 1 min.....	87
Figura 4.5 – Mapa de atividades neuronais em função da contagem média de <i>spikes</i> para DIV 39. ....	89
Figura 4.6 – Mapa de atividades neuronais em função da contagem média de <i>bursts</i> para DIV 39. ....	91
Figura 4.7 – Processamento do registro fotográfico. (a) identificação dos neurônios, (b) delineamento da região de atuação de cada microeletrodo.....	93
Figura 4.8 – Mapa de contagem de neurônios, para a imagem fotográfica 38 DIV...	94
Figura 4.9 – Comparação do mapa de contagem de neurônios do DIV 38 com o mapa de atividades em spikes do DIV 39. ....	95
Figura 4.10 – Comparação do mapa de contagem de neurônios do DIV 38 e do mapa de atividades, obtidos proporcionalmente aos bursts registrados. ....	96

Figura 4.11 – Mapa da distribuição virtual dos neurônios em função da contagem de spikes. ....	98
Figura 4.12 – Mapa da distribuição virtual dos neurônios em função da contagem de bursts. ....	98
Figura 4.13 – Ilustração dos registros eletrofisiológicos vinculados aos experimentos, organizados por DIVs, sendo que cada DIV contém 4 registros de 5 minutos. Cada um desses 4 registros está sendo identificado por algarismos romanos de I a IV. ....	99
Figura 4.14 – Gráfico da distância Euclidiana do vetor de contagem de neurônios real (DIV 38) e virtual, DIVs 25 a 46, para spikes e bursts. ....	101
Figura 4.15 – Diagrama da contagem de spikes no primeiro segmento do 25DIV-I. ....	102
Figura 4.16 – Diagrama da contagem de <i>bursts</i> no primeiro segmento do 25DIV-I. ....	102
Figura 4.17 – Instabilidade das classes, ao longo do período de 20 minutos, no microeletrodo 21, considerando o número de <i>spikes</i> e de <i>bursts</i> no DIV 25. ....	103
Figura 4.18 – Comportamento do microeletrodo 21, em função do número de <i>spikes</i> e de <i>bursts</i> nos 20 minutos do 25 DIV. (a) número de <i>spikes</i> ; e (b) número de <i>bursts</i> . ....	106
Figura 4.19 – Contagem de <i>spikes</i> e <i>bursts</i> para o microeletrodo 21, nos experimentos do 29 DIV: (a) número de <i>spikes</i> ; (b) número de <i>bursts</i> . ....	106
Figura 4.20 – Contagem de <i>spikes</i> e <i>bursts</i> para o microeletrodo 21, nos experimentos do 32 DIV: (a) número de <i>spikes</i> ; (b) número de <i>bursts</i> . ....	107
Figura 4.21 – Contagem de <i>spikes</i> e <i>bursts</i> para o microeletrodo 21, nos experimentos do 36 DIV: (a) número de <i>spikes</i> ; (b) número de <i>bursts</i> . ....	107
Figura 4.22 – Contagem de <i>spikes</i> e <i>bursts</i> para o microeletrodo 21, nos experimentos do 43 DIV: (a) número de <i>spikes</i> ; (b) número de <i>bursts</i> . ....	107
Figura 4.23 – Contagem de <i>spikes</i> e <i>bursts</i> para o microeletrodo 21, nos experimentos do 46 DIV: (a) número de <i>spikes</i> ; (b) número de <i>bursts</i> . ....	108
Figura 4.24 – Ilustração da classe dominante por DIVs, em cores, sendo cor verde (classe A), cor amarela (classe B) e cor azul (classe C); e o cálculo da variância para cada microeletrodo, mostrado internamente às células, considerando-se a contagem de <i>spikes</i> , para: (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV. ....	108
Figura 4.25 – Ilustração da classe dominante por DIVs, em cores, sendo cor verde (classe A), cor amarela (classe B) e cor azul (classe C); e o cálculo da variância para cada microeletrodo, mostrado internamente às células, ....	

considerando-se a contagem de <i>bursts</i> , para: (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV. ....	109
Figura 4.26 – Microeletrodo 21, quanto a variância nos diferentes DIVs ( 25DIV, 29DIV, 32DIV, 36DIV, 43DIV e 46DIV): (a) para <i>spikes</i> e (b) para <i>bursts</i> . ....	110
Figura C.1 – Mapeamento de atividade neural, com círculos concêntricos aos microeletrodos, e raios proporcionais à quantificação de <i>spikes</i> : (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV. ....	138
Figura C.2 – Mapeamento de atividade neural, com círculos concêntricos aos microeletrodos, e raios proporcionais à quantificação de <i>bursts</i> : (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV. ....	139

# LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Pesquisas sobre a MEA durante os 30 primeiros anos .....	47
Tabela 2.2 – Pesquisas durante os 15 anos mais recentes. ....	47
Tabela 4.1 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 39 DIV.....	88
Tabela 4.2 – Contagem de <i>bursts</i> por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 39 DIV.....	90
Tabela 4.3 – Contagem de neurônios por microeletrodo na imagem da cultura no DIV 38. ....	93
Tabela 4.4 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 25 DIV.....	104
Tabela 4.5 – Contagem de <i>bursts</i> por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 25 DIV.....	105
Tabela A.1 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 25 DIV. ....	123
Tabela A.2 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 29 DIV. ....	124
Tabela A.3 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 32 DIV .....	125
Tabela A.4 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 36 DIV. ....	126
Tabela A.5 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 39 DIV .....	127
Tabela A.6 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 43 DIV .....	128
Tabela A.7 – Contagem de <i>spikes</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 46 DIV. ....	129
Tabela B.1 – Contagem de <i>bursts</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 25 DIV. ....	130
Tabela B.2 – Contagem de <i>bursts</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 29 DIV. ....	131
Tabela B.3 – Contagem de <i>bursts</i> por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 32 DIV. ....	132

Tabela B.4 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 36 DIV.....	133
Tabela B.5 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 39 DIV.....	134
Tabela B.6 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 43 DIV.....	135
Tabela B.7 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 46 DIV.....	136

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- MEA** – Micro-Electrode Array (Matriz de Microeletrodos)
- CCD** – Charge-Coupled Device (Dispositivo de Carga Acoplada)
- ISI** – Interspike Interval (Intervalo Entre Spikes)
- IBI** – Interburst Interval (Intervalo Entre Bursts)
- DIV** – Day In Vitro (Dia Em Vitro)
- ICA** – Independent Component Analysis (Análise de Componentes Independentes)
- FET** – Fiel Effect Transistors (Transistor de Efeito de Campo)
- CNT** – Carbon Nano Tube (Nanotubos de Carbono)
- PCA** – Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Contexto.....	17
1.2 Medidas Eletrofisiológicas.....	23
1.2.1 Spikes e Bursts.....	26
1.2.2 Aspectos Físicos em Gravações e Estímulos na MEA.....	29
1.3 Objetivos.....	30
1.4 Motivação.....	31
1.5 Principais Contribuições.....	32
1.6 Organização do Trabalho.....	32
1.7 Considerações Finais.....	33
<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>34</b>
2.1 Pesquisas envolvendo matrizes de microeletrodos.....	34
2.2 Síntese e Discussões.....	46
2.3 Considerações Finais.....	48
<b>CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1 Considerações Iniciais.....	49
3.2 Metodologia para a Obtenção do Mapa de Atividades dos Neurônios.....	50
3.2.1 Obtenção da atividade eletrofisiológica da cultura.....	51
3.2.2 Processamento dos segmentos usando ICA.....	52
3.2.3 Detecção e quantificação da atividade extracelular.....	52
3.2.4 Mapa de atividades dos neurônios.....	53
3.3 Metodologia para a Obtenção do Mapa de Contagem de Neurônios.....	55
3.3.1 O Pré-processamento.....	56
3.3.2 Identificação de neurônios e microeletrodos.....	56
3.3.3 Construção do Mapa de Contagem de Neurônios.....	56
3.4 Metodologia para a Construção do Mapa de Distribuição Virtual de Neurônios.....	58
3.5 A Análise de Componentes Independentes.....	60
3.5.1 Modelo estatístico e definição.....	60
3.5.2 Ambiguidades do modelo.....	63

3.5.3 Separação cega de fontes.....	65
3.5.4 Técnicas de obtenção de ICA .....	67
3.6 Processamento de Imagens.....	71
3.6.1 Filtragem pela mediana .....	72
3.6.2 Filtragem por suavização Gaussiana .....	72
3.6.3 Normalização de histograma.....	72
3.6.4 Separação da imagem de fundo .....	73
3.6.5 O método de Otsu para separação da imagem de fundo.....	74
3.6.6 Filtragem morfológica.....	75
3.6.7 As transformadas <i>Top-Hat</i> e <i>Bottom-Hat</i> .....	75
3.6.8 A transformada <i>watershed</i> .....	76
3.7 Cultura de neurônios 371 .....	76
3.7.1 Identificação da distribuição dos neurônios no arranjo de microeletrodos. ....	78
3.7.2 Segmentação de neurônios.....	78
3.7.3 Registro de imagens.....	79
3.7.4 Determinação dos neurônios e posições dos microeletrodos .....	81
3.8 Considerações Finais.....	82
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E VALIDAÇÃO.....</b>	<b>83</b>
4.1 Considerações Iniciais.....	83
4.1.1 Registros eletrofisiológicos.....	83
4.1.2 Registros fotográficos.....	84
4.2 Registros eletrofisiológicos.....	85
4.2.1 Processamento dos segmentos usando ICA.....	87
4.3 Obtenção do mapa de atividades neuronais do 39 DIV .....	88
4.4 Construção do Mapa de Contagem de Neurônios na Imagem Fotográfica do DIV 38 .....	92
4.4.1 Definição de regiões por adjacência de microeletrodos na imagem fotográfica .....	92
4.4.2 Número de neurônios por microeletrodo na imagem fotográfica.....	93
4.5 Comparação do mapa de contagem dos neurônios do DIV38 com o mapa de atividades do DIV 39 .....	94
4.5.1 Comparação em função da contagem de <i>spikes</i> .....	95
4.5.2 Comparação em função da contagem de <i>bursts</i> .....	96

4.6 Obtenção do mapa de distribuição virtual dos neurônios do 39 DIV .....	97
4.7 Construção do mapa de atividades dos neurônios para os 25, 29, 32, 36, 43 e 46 DIVs .....	99
4.7.1 Detecção e quantificação da atividade dos neurônios .....	100
4.8 Agrupamento por <i>K-means</i> e análise dos segmentos de sinais eletrofisiológicos .....	101
4.9 Considerações Finais .....	111
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>112</b>
5.1 Contribuições e Limitações .....	113
5.2 Trabalhos Futuros .....	113
<b>CAPÍTULO 6 - BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>114</b>
Apêndice A – Tabelas de contagem de spikes.....	123
Apêndice B – Tabelas de contagem de bursts .....	130
Apêndice C – Figura do mapeamento das atividades em função da contagem de spikes e bursts para os 25, 29, 32, 36, 43 e 46 DIVs. ....	137

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

*Neste capítulo descreve-se o contexto no qual este trabalho encontra-se inserido, os objetivos e a motivação que direcionaram a pesquisa proposta. Também são descritas as principais contribuições, e finalmente, descreve-se a organização do presente trabalho.*

### 1.1 Contexto

A Matriz de Microeletrodos (MEA, *Micro-Electrode Array*) planar é uma interface, para a cultura de neurônios e registro de sinais eletrofisiológicos, usada para o estudo da neurodinâmica envolvendo a atividade de neurônios, de cérebros de animais como rato Wistar (POTTER, 2001), (MAROM e SHAHAF, 2002), (MORIN, TAKAMURA e TAMIYA, 2005), (STEGENGA e LE FEBER, 2008), efeitos de drogas, como para epilepsia (BOIDO e FARISELLO, 2010), e a análise de reações farmacológicas (EGERT e HÄMMERLE, 2002), (STETT e EGERT, 2003). É um dispositivo que acompanha constantemente variados projetos de pesquisa no campo da neurofisiologia, permitindo melhorar o conhecimento da eletrofisiologia e o processamento de informação das redes neurais. Caracteriza-se principalmente pelo registro simultâneo de atividade extracelular de um grande número de neurônios sendo que o sinal de um neurônio pode ser detectado por múltiplos microeletrodos, bem como um microeletrodo pode captar sinais de vários neurônios.

MEA foi desenvolvida pioneiramente por Thomas e colaboradores em 1972, quando uma matriz de duas linhas de 15 eletrodos de ouro, separadas por 100  $\mu\text{m}$ , construídas sobre um substrato de vidro, foi usada para a cultura de células

---

neurônios de gânglios de raiz dorsal de ratos (THOMAS, 1972). O primeiro trabalho sobre neurônios dissociados foi reportado por Jerome Pine em 1980 (PINE, 1980), usando uma MEA com 16 eletrodos, medindo 10  $\mu\text{m}$  de largura, em linhas paralelas, distanciadas 250  $\mu\text{m}$  entre si. Pine registrou atividades neuronais de gânglios cervicais de ratos em cultura de 3 semanas, após o desenvolvimento substancial de interconexões. Os sinais capturados foram da ordem de 50 mV, com razão sinal-ruído de 5 a 15:1. Foram comprovados que os eletrodos poderiam ser usados para estimulações elétricas, com pulsos de 0.5 V de amplitude e 1 ms de duração. Após trabalhos de (GROSS, 1991) tornou-se uma ferramenta importante para investigar interações dependentes do tempo entre neurônios. Dois principais fatores fazem com que MEAs sejam ferramentas valiosas em aplicações farmacológicas: primeiro, não é invasiva, e portanto, permite registros de longa duração; e segundo, realiza registros de múltiplas posições (CHIAPPALONE, 2003).

Diversos trabalhos tem sido desenvolvidos sobre MEA, como o de Jimbo e colaboradores (JIMBO, 2000), que estudaram a dinâmica de culturas corticais de alta densidade e descobriram que um único estímulo pode produzir uma sequência de pulsos em curto intervalo de tempo (*bursts*) em todos os microeletrodos. Num outro estudo do Laboratório de Meister, foi descoberto que grupos de até 7 células ganglionares disparam sincronamente e tais grupos representam mais de 50% de todos os registros de pulsos (*spikes*) da retina (SCHNITZER, 2003).

Existem atualmente, vários sistemas comerciais de MEAs, sendo o principal fabricante a Multi Channel Systems (MCS) de Reutlingen, Alemanha (MULTICHANNEL SYSTEMS, 2015), que disponibiliza o sistema completo MEA60 de amplificação e aquisição de dados, usando uma MEA conhecida como MEA Padrão, de 60 microeletrodos, sendo 59 para registro de sinais e 1 para referência.

A MEA padrão contém um dispositivo em forma de anel, semelhante a uma placa de Petri, com microeletrodos embutidos no substrato e conectados eletricamente nos pinos contidos nas bordas laterais. Para os registros eletrofisiológicos, a MEA é acoplada a um soquete que conecta os pinos das bordas a um sistema de gravação e estimulação (POTTER, 2001), (MORIN, TAKAMURA e TAMIYA, 2005). Os microeletrodos permitem monitorar a atividade eletrofisiológica em uma cultura de neurônios por períodos que podem chegar até um ano de registro (POTTER, 2001), (POTTER e DEMARSE, 2001), (MORIN, TAKAMURA e TAMIYA, 2005). Adicionalmente, os mesmos microeletrodos podem ser utilizados na

estimulação elétrica dos neurônios, criando, assim, uma conexão de duas vias entre a rede neural cultivada e o sistema computacional (POTTER, 2001).

O conjunto básico de experimentação do sistema MEA inclui, além da interface MEA, circuitos eletrônicos para a amplificação do sinal, dispositivos de suporte à vida das células cultivadas, uma placa de aquisição de sinais, e um computador com *software* de processamento de sinais e registro de dados (MORIN, TAKAMURA e TAMIYA, 2005). Adicionalmente, podem ser incluídos um sistema gerador de sinais para a estimulação da cultura, além de um microscópio óptico invertido acoplado a uma câmera baseada em sensores CCD ou fotomultiplicadores (GROSS e RHOADES, 1995), (CHIAPPALONE e VATO, 2003), (CHIAPPALONE e BOVE, 2006). Na Figura 1.1 é ilustrada a configuração básica do sistema MEA60.



**Figura 1.1 – Configuração básica do sistema MEA.**

Na Figura.1.1 são mostradas as seguintes partes do sistema MEA60:

(a) - à extrema esquerda, uma MEA, com destaque à região central ampliada dos microeletrodos. Os microeletrodos são expostos à cultura de células e se localizam nas extremidades de cada trilha. As trilhas são isoladas eletricamente, de tal forma que os sinais captados pelos microeletrodos possam ser conduzidos até os pinos das bordas, ligados ao sistema de amplificação;

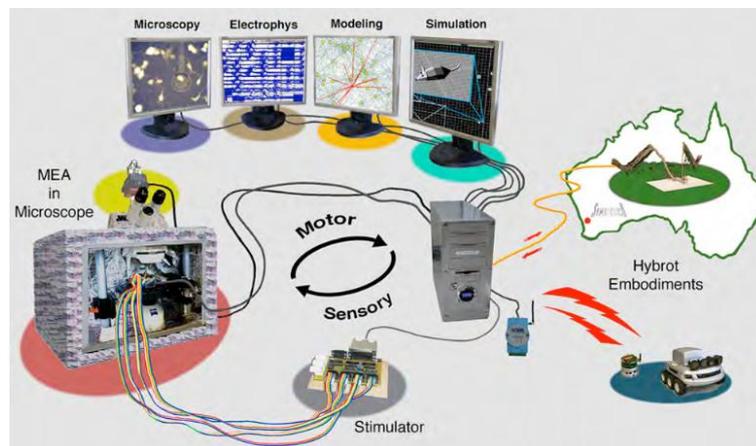
(b) - é visto um amplificador de sinais eletrofisiológicos, com a MEA encapsulada internamente;

(c) - um dispositivo controlador de temperatura que deve atuar sobre o conjunto de MEA e amplificador;

(d) - um dispositivo de aquisição de sinais que recebe os sinais do amplificador e os converte em sinais digitais para serem enviados ao computador; e

(e) - extrema direita, um computador para armazenamento dos dados e processamento.

Em um experimento, Potter (POTTER, WAGENAAR e DEMARSE, 2006), ao realizar a análise da dinâmica morfológica de neurônios, observou que a cultura de neurônios, uma vez fora do seu corpo hospedeiro, é incapaz de apresentar algum tipo de comportamento, sendo inevitável o uso de um mecanismo capaz de simular um corpo hospedeiro que possibilite à cultura de receber estímulos de um ambiente externo, real ou simulado. Nesse sentido, a utilização do sistema MEA, devido às suas características, torna-se muito útil nos estudos de culturas *in-vitro*, permitindo a viabilização da interação da cultura com ambientes tanto reais como simulados, como por exemplo, mediante o controle de um animal simulado (Animat) em um ambiente virtual (Figura 1.2) (POTTER, WAGENAAR e DEMARSE, 2006), ou até mesmo a manipulação de robôs (NOVELLINO e D'ANGELO, 2007), (BAKKUM e GAMBLIN, 2007).



**Figura 1.2 – Sistema de realimentação de estímulos usando culturas de neurônios corticais no MEA. Figura adaptada de POTTER *et al.* (2006).**

Na ilustração da Figura 1.2, a cultura fica interagindo com o ambiente virtual (Simulação Animat) e o ambiente real (*Hybrot*), sendo registrados os seus sinais eletrofisiológicos, além de se realizar a estimulação. Adicionalmente as mudanças morfológicas são também registradas mediante o uso de um microscópio.

Analisando a configuração da interface MEA, esta é composta de um conjunto de microeletrodos, com tamanho aproximado de uma célula (entre 10 e 100  $\mu\text{m}$ ), arranjados ao longo da placa de cultura (POTTER, 2001). O substrato é geralmente

---

feito de vidro, e as trilhas feitas de ouro ou material transparente semicondutor ITO (óxido de índium-estanho – em inglês *índium-tin oxide*), que transmitem os sinais dos microeletrodos para o sistema de gravação/estimulação e vice-versa (POTTER, 2001).

Os microeletrodos da interface MEA precisam ser biocompatíveis, duráveis, e possuir uma impedância razoavelmente baixa (menor do que 500 kΩ em 1 kHz) para que seja possível detectar sinais extracelulares pequenos (de 10 até 100 microvolts) (POTTER, 2001). A superfície da placa da cultura da MEA, incluindo as trilhas dos microeletrodos, deve ser recoberta com material isolante biocompatível (geralmente poliamida, nitrito de silício ou óxido de silício) que previne curtos circuitos com o meio e permite a adesão das células (POTTER, 2001).

Algumas variações no uso do sistema MEA permitiram, além dos estudos realizados em culturas dissociadas (POTTER e DEMARSE, 2001), (POTTER, WAGENAAR e DEMARSE, 2006), a análise da atividade elétrica em fatias bidimensionais do córtex, fornecendo modelos mais realísticos de estudo, sendo mantidas as características estruturais quase intactas, porém apresentando um tempo de vida muito menor do que o observado em culturas dissociadas. Assim, para estudos com necessidades de observação através de longos períodos de tempo, o modelo de culturas dissociadas é considerado ideal (HALES, ROLSTON e POTTER, 2010). Quanto ao impacto da estimulação elétrica em culturas dissociadas, as mesmas ficam restritas às áreas observáveis (elétrica ou visualmente), o que permite maior controle dos experimentos, o que não acontece na experimentação com fatias de tecido cerebral (HALES, ROLSTON e POTTER, 2010).

Ao compararmos a experimentação com culturas *in-vivo*, também observam-se vantagens quanto a manipulação e estudos do seu comportamento. No caso das culturas de neurônios dissociados, observa-se que a capacidade do desenvolvimento de conexões sinápticas é mantido intato, ou seja, as sinapses continuam a se desenvolver como se as células ainda pertencessem a um corpo, e exibem uma rica variedade de padrões de atividade elétrica distribuída, o que permite realizar estudos de fenômenos realísticos mesmo estando fora do hospedeiro natural. Além disso, os sistemas *in-vitro*, como o sistema MEA, são muito mais acessíveis ao imageamento por microscopia óptica e manipulação farmacológica do que sistemas *in-vivo*, permitindo registros por imagens de forma

---

mais detalhada (POTTER, 2001), (POTTER, WAGENAAR e DEMARSE, 2006), (HALES, ROLSTON e POTTER, 2010).

No meio científico, além da MEA planar usada para culturas de neurônios *in-vitro*, podemos encontrar variados modelos de interface MEA desenvolvidos para interesses específicos (LITT e D'ALESSANDRO, 2003). Por exemplo, em aplicações *in-vivo* encontram-se na forma de implantes neurais permitindo o reestabelecimento do controle das funções de algum tecido danificado do sistema nervoso (MAHER e PINE, 1999), além de ser considerada uma das peças fundamentais no desenvolvimento da interface homem-máquina (BMI, *Brain Machine Interface*). As BMIs podem ser utilizadas na restauração do controle motor em pacientes impossibilitados da movimentação de membros devido a injúrias na espinha dorsal ou problemas congênitos.

Entre os implantes neurais disponíveis para uso clínico encontram-se os dispositivos para restauração e aprimoramento da memória (BERGER e HAMPSON, 2011), e os dispositivos de estimulação profunda do cérebro (DBS, *Deep Brain Stimulation*) usados no tratamento de doenças como Parkinson (BREIT, SCHULZ e BENABID, 2004) e epilepsia. Os sinais, por sua vez, são processados em tempo real por algoritmos executados em um dispositivo computacional e utilizados para o controle da prótese. Estímulos para a realimentação sensorial são gerados pela prótese e, após o processamento pelo sistema computacional, são levados até o cérebro por meio do próprio implante (WARWICK e GASSON, 2003), (SCHWARTZ, 2004), (LEBEDEV e NICOLELIS, 2006).

Dentre uma variação da MEA padrão, podemos citar o modelo ThinMEA, com o substrato transparente para facilitar o imageamento da cultura, com 180  $\mu\text{m}$  de espessura, muito menor que a apresentada pela MEA padrão, de 1 mm. Essa característica permite que a interface MEA seja imageada de distâncias de trabalho muito pequenas (da ordem de algumas centenas de micrômetros) (FEJTL e STETT, 2006).

A respeito das características do modelo de MEA planar, para culturas *in-vitro*, esta interface possui uma boa resolução espacial, apresentando distâncias de 100 a 200  $\mu\text{m}$  entre microeletrodos, porém, apresenta uma área de gravação relativamente pequena para determinados tipos de experimentos como, por exemplo, estudos relacionados à velocidade de propagação dos sinais eletrofisiológicos por longas distâncias (FEJTL e STETT, 2006). Nesse sentido, para

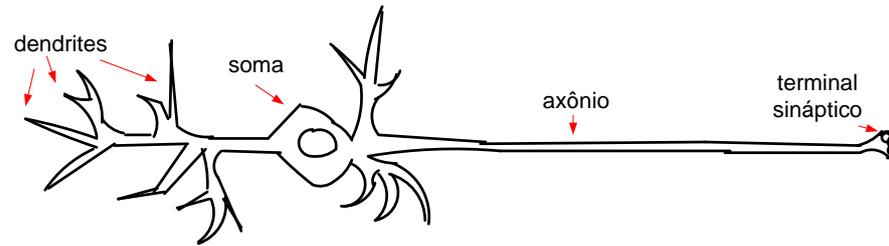
---

aumentar a área de gravação da MEA e ao mesmo tempo manter a resolução espacial, foi proposto um modelo de MEA de alta densidade (High-Density MEA). Este modelo é composto por 256 microeletrodos organizados em uma matriz quadrada. Os microeletrodos na região central possuem um espaçamento de 100 $\mu$ m, enquanto os microeletrodos na periferia estão distantes 200  $\mu$ m uns dos outros (FEJTL e STETT, 2006).

Em geral, podemos inferir que o desenvolvimento dos diferentes modelos de MEA encontrados na atualidade é resultado das necessidades dos pesquisadores em arranjar, de maneira mais apropriada, o interfaceamento entre os dispositivos eletrônicos e o material biológico de estudo, seja este *in-vivo* ou *in-vitro*, mantendo o cuidado de conseguir uma apropriada área de gravação e de resolução espacial que garantam os requisitos mínimos de observação para a análise.

## 1.2 Medidas Eletrofisiológicas

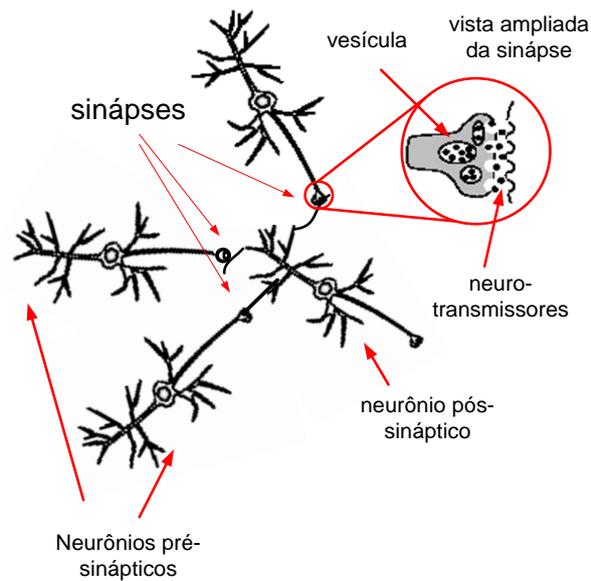
A célula mais comumente estudada na eletrofisiologia dos animais é o neurônio (Figura 1.3), que tem a função de gerar fluxos nervosos (LENT, 2001), que correspondem aos sinais elétricos conhecidos como potenciais de ação (*Action Potentials, APs*). Esses sinais são gerados espontaneamente, no neurônio considerado, ou em consequência de sinais de outros neurônios, denominados pré-sinápticos. Os sinais de neurônios pré-sinápticos, ao atingirem a extremidade de seu axônio, denominada de sinapse, provocam a abertura de canais iônicos no neurônio considerado, também denominado de neurônio pós-sináptico, permitindo a introdução ou a saída de íons, nos seus dendrites. Essa movimentação de íons, e consequente mudança na concentração de íons no corpo celular, acaba resultando numa alteração no potencial do neurônio, o que é chamada de despolarização. Quando o corpo celular acumular uma quantidade de íons acima de um limiar (*threshold*), dispara um potencial de ação, que é conduzido pelo axônio até o terminal sináptico, onde ocorre um novo processo de sinapse.



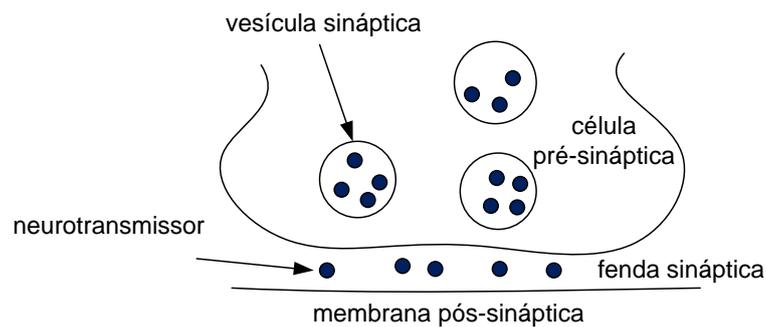
**Figura 1.3 – Diagrama ilustrativo de um neurônio.**

Na Figura 1.4 ilustra-se um conjunto de neurônios interligados por sinapses. Os neurônios que transmitem os potenciais de ação são chamados de neurônios pré-sinápticos e o neurônio que recebe o efeito desses potenciais, neurônio pós-sináptico. A sinapse consiste na conexão entre os neurônios, e conforme destaque na Figura 1.4, e detalhado na Figura 1.5, o terminal sináptico do axônio contém vesículas onde são contidos os neurotransmissores. Esses neurotransmissores são liberados pelas vesículas que se abrem em função da chegada do potencial de ação. Os neurotransmissores liberados atuam de forma a facilitar a abertura dos canais iônicos que situam na dendrite do neurônio pós-sináptico. Os canais iônicos abertos permitem a entrada de íons específicos a esses canais, que ficam na fenda sináptica, espaço entre o terminal sináptico do neurônio pré-sináptico e a dendrite do neurônio pós-sináptico.

Os potenciais de ação podem ser registrados por microeletrodos posicionados internamente ou externamente às células. Quando as correntes extracelulares forem registradas para um conjunto de neurônios, temos múltiplos potenciais de ação nos sinais registrados, também conhecidos como trem de pulsos (*spike train*, em inglês). Alternadamente, se um eletrodo estiver interno a um neurônio, podemos medir diretamente o potencial de membrana da célula.



**Figura 1.4 – Diagrama ilustrativo de uma rede de neurônios, interligados por sinapses.**



**Figura 1.5 – Ilustração de uma sinapse.**

Na Figura 1.6 é mostrado um potencial de ação típico de um neurônio, onde na coordenada horizontal temos o tempo, e na coordenada vertical é vista a variação do potencial elétrico, em mV, ao longo da membrana no axônio, resultante dos fenômenos bioquímicos.

Inicialmente, o neurônio fica em repouso com o potencial em torno de  $-60$  mV, indicado na figura como  $t_1$ . No início do processo do potencial de ação, os íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) entram pela membrana da célula e elevam o potencial até aproximadamente  $+40$  mV; fenômeno denominado de despolarização, indicado por  $t_2$ . Em seguida, os íons de potássio ( $\text{K}^+$ ) que ficam internamente à célula saem através da membrana, polarizando novamente a membrana, até um nível de potencial em torno de  $-80$  mV, indicado por  $t_3$ .

Como normalmente os íons de potássio devem ficar internamente às células, e os íons de sódio externamente, um mecanismo denominado bomba de íons, faz o bombeamento dos íons de potássio para dentro das células, ao mesmo tempo do bombeamento dos íons de sódio para fora, indicado por  $t_4$ . Ao final, o potencial de membrana volta ao nível de repouso inicial,  $t_5$ .

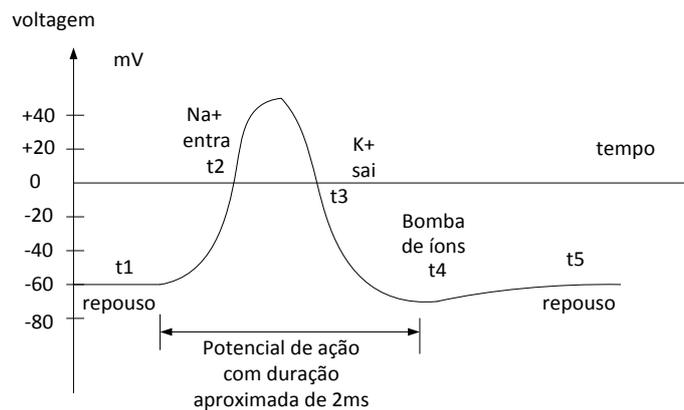


Figura 1.6 – Evolução do potencial de ação no tempo.

### 1.2.1 Spikes e Bursts

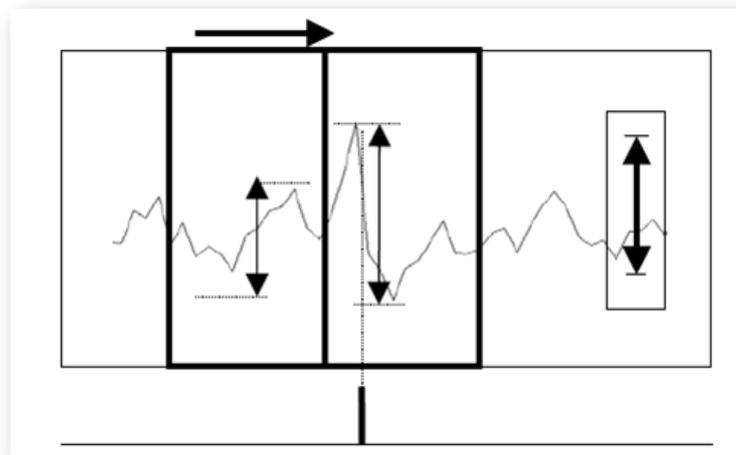
*Spikes* são denominações dos sinais resultantes de potenciais de ação de neurônios e grupos de neurônios. Um sinal elétrico gravado a partir da MEA possui picos e outra parte sem atividade elétrica denominada ruído biológico.

Os *softwares* de aquisição e registro de dados calculam o desvio padrão do ruído biológico da atividade basal da cultura. Para detectar um *spike* é preciso estabelecer um limiar que é calculado como sendo um múltiplo do desvio padrão, conforme ilustrado graficamente na Figura 1.7. É dessa forma que os softwares de computador que fazem o registro da atividade elétrica da MEA detectam *spikes* (RODRIGUEZ, 2012).

Um *burst* é uma sequência de 5 a 10 *spikes* cuja duração é calculada como sendo a soma de todos os intervalos entre *spikes* contidos no mesmo. Como cada *burst* é caracterizado por um certo número de *spikes*, os *softwares* de registro de dados permitem definir um número mínimo de *spikes* pertencentes a um *burst*.

Decorre da definição que *spikes* de um mesmo *burst* encontram-se muito próximos entre si.

Os *softwares* permitem também definir espaçamento temporal mínimo para considerar se o *spike* é pertencente ao *burst* ou não. Esse intervalo de separação entre os *bursts* também pode ser definido pelo usuário nos *softwares* de registro. Intervalos entre *bursts* tem duração mínima de 100 ms tipicamente, podendo variar segundo o tipo de cultura de neurônios (RODRIGUEZ, 2012).



**Figura 1.7 – O limiar do spike é calculado como um múltiplo do desvio padrão da atividade basal.**

Quanto aos *spikes*, os seguintes parâmetros são importantes para o estudo dos sinais registrados em MEA (MARTINÓIA, 2004): (a) número total de *spikes*; (b) quantidade de *spikes* que formam *bursts*; (c) porcentagem de *spikes* aleatórios; e (d) frequência média de *spikes* em um *burst* (*spikes*/segundo). Por outro lado, quanto aos *bursts*, são importantes: (a) taxa média de *bursts* (*bursts*/minuto); (b) número total de *bursts*; (c) média de *spikes* por *bursts*; (d) duração dos *bursts* (ms); (e) intervalo entre *bursts* (segundos).

A Figura 1.8 mostra uma janela correspondente a um único canal do sinal registrado em MEA padrão, na qual os *spikes* estão marcados com um "+". Os *softwares* devem ter a propriedade de projetar trechos da janela em "zoom" (ampliação) para melhor estudo dos intervalos e amplitudes dos *spikes*, conforme mostrado na parte destacada à direita.

A detecção dos *spikes* (reconhecimento destes em meio ao registros) é de suma importância para a análise dos dados. Dessa forma, o janelamento deve ser pequeno o suficiente para cobrir toda a extensão de um *spike*. A detecção errada de *spikes* leva a dados inválidos ao final da análise. Na figura 1.9 definimos: (a) ISI, Intervalo entre *spikes* consecutivos; (b) IBI, Intervalo entre dois *bursts* consecutivos.

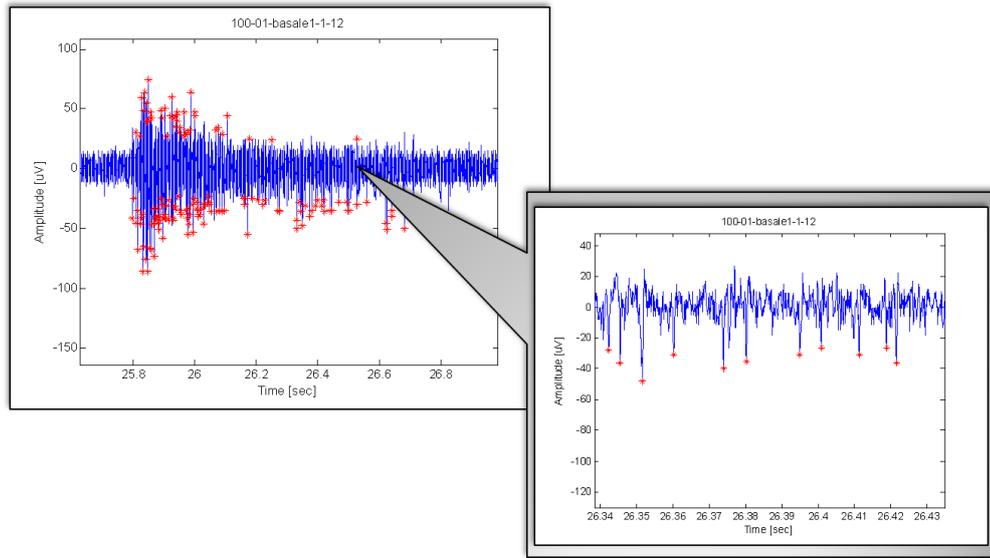


Figura 1.8 – Registro de um único canal é mostrado (à esq.), com ampliação (zoom) do trecho apontado pela seta, à direita. Figura obtida de (WAGENAAR, 2005).

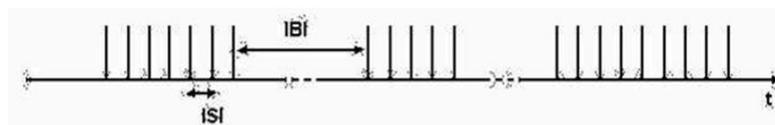
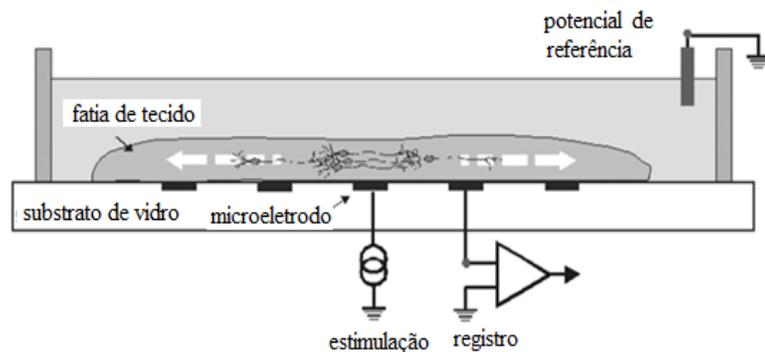


Figura 1.9 – Esquema mostrando ISI (Intervalo entre *spikes*) e IBI (Intervalo entre *bursts*). Figura obtida de (WAGENAAR, 2005).

Os softwares de aquisição e registro de dados devem ser capazes de identificar e medir ISI e IBI nos sinais registrados. A importância em estudar os *spikes* é que a informação está contida nos *spikes* e no atraso entre dois *spikes* consecutivos. Também existe informação relevante no intervalo de tempo entre os *bursts*.

## 1.2.2 Aspectos Físicos em Gravações e Estímulos na MEA

A MEA atua como uma interface bioeletrônica do mundo biológico com o eletrônico e vice-versa. As células neurais em tecidos (fatias) ou dissociadas são colocadas sobre um circuito elétrico (RUTTEN, 2001). Os eletrodos da MEA são também usados para estimulação elétrica extracelular *in-vitro*, aplicando pulsos controlados de tensão ou corrente nos eletrodos. Pode-se medir e registrar através do computador a resposta ao estímulo elétrico ou, então, o sinal elétrico espontâneo gerado pelas células. A distribuição espacial da tensão elétrica sobre uma camada de tecido condutor acima da superfície dos microeletrodos da MEA é registrada em relação ao eletrodo de referência localizado na solução de perfusão, conforme mostra a Figura 1.10, onde uma fatia de tecido se encontra em processo de medição.



**Figura 1.10 – Esquema mostrando estimulação e registro da atividade elétrica em fatias de tecido com MEA. Adaptação de Rutten (RUTTEN, 2001).**

É importante citar que os microeletrodos possuem tamanho reduzido (diâmetro máximo de 30 $\mu$ m) e cada microeletrodo pode medir, efetivamente, sinais de um único neurônio ou no máximo algumas células. Os axônios sozinhos não conseguem cobrir significativamente a área de um eletrodo, portanto uma boa parte do corpo celular do neurônio precisa estar em contato com a superfície do microeletrodo. Na verdade, não é necessário que os eletrodos efetivamente se liguem aos neurônios, mas sim que estejam bem próximos desses, pois o acoplamento é capacitivo (BLUM, 2007) bastando estar a uma pequena distância para se conseguir uma baixa impedância, pelo aumento da capacitância ser

---

inversamente proporcional à distância. A atividade originada pelo tecido pode ser gravada com alta resolução espacial (com um grande número de eletrodos numa pequena área) e temporal (gravações efetuadas em pequenos intervalos de tempo entre si), o que gera uma enorme quantidade de dados e exige grandes espaços de armazenamento em computador (STETT, 2003). Uma quantidade significativa de microeletrodos pode permanecer inativa na cultura, dependendo da forma como ela se desenvolve (ZIEGLER, 2000). Por outro lado, um único eletrodo pode gravar sinais oriundos de vários neurônios e tais sinais precisam ser identificados e classificados (RODRIGUEZ, 2012). Um dos objetivos de gravações usando microeletrodos é identificar as interações entre os neurônios e sua modulação, em resposta a algum estímulo. Alguns pesquisadores procuram a função de transferência da rede de neurônios, tentando buscar um modelo que se aproxima de um circuito elétrico puro (MARTINÓIA, 2004).

### 1.3 Objetivos

O objetivo principal desta tese é a obtenção do mapeamento de atividades de neurônios em MEA, a partir dos sinais eletrofisiológicos registrados, proporcional ao número de *spikes* ou *bursts*, que se supõe ser proporcional ao número de neurônios responsáveis pelas atividades. Uma análise conjunta da imagem fotográfica de uma cultura de neurônios dissociados *in-vitro*, em MEA, de embrião de ratos Wistar, e dos sinais eletrofisiológicos registrados, permite obter a partir do mapeamento de atividades, a distribuição topológica virtual dos neurônios.

Fazendo uso dos sinais registrados ao longo dos DIVs (Dias In Vitro) 25, 29, 33, 39, 43 e 46, e uma imagem fotográfica da cultura, de neurônios hipocampais *in-vitro*, no DIV 38, de um experimento realizado na Universidade de Gênova, Itália, identificam-se os seguintes objetivos específicos: (1) uso da técnica ICA (*Independent Component Analysis*) para a separação dos sinais de cada microeletrodo da MEA, como sendo exclusivos dos seus neurônios adjacentes; 2) obtenção de dados estatísticos de contagem de *spikes* e de *bursts*, para que caracterizem as atividades dos neurônios, que resulta num mapa de atividades associados aos microeletrodos,

---

que presume-se ser proporcional à distribuição topológica dos neurônios; 3) obtenção da contagem de neurônios adjacentes a cada microeletrodo da MEA, baseada na imagem fotográfica da cultura, obtida no DIV 38; e 4) estudo da evolução topológica da cultura de neurônios dissociados *in-vitro* ao longo dos dias, em função dos mapas de atividades eletrofisiológicas.

## 1.4 Motivação

Numa cultura de neurônios dissociados *in-vitro*, existem necessidades de manutenção da cultura, como o controle da temperatura, umidade, pH, cuidados contra infecções e nutrientes. Por essas razões, não é comum o uso de obtenção de imagens fotográficas, ao longo de toda a cultura.

Considerando-se essa carência de registros gráficos em culturas de neurônios *in-vitro*, em MEA, e a importância da informação topológica da distribuição dos neurônios, quando se analisa os sinais eletrofisiológicos registrados, a abordagem proposta permite solucionar em parte essa falta.

Adicionalmente, com a utilização da metodologia, espera-se reduzir o tempo de manipulação da cultura, garantindo, assim, a eficiência do uso do tempo investido pelo profissional, além das despesas econômicas envolvidas. Os cuidados para reduzir os problemas de deterioração da cultura, evitando, por exemplo, o imageamento, garantem um aumento da vida útil da cultura, melhorando a exploração e realização de experimentos.

Finalmente, oferece-se a possibilidade de visualizar os mapeamentos topológicos de culturas neuronais a partir de registros de sinais eletrofisiológicos de experimentos já desenvolvidos, considerando-se que uma importante porcentagem dos registros de sinais eletrofisiológicos realizados pelos grupos de pesquisa em MEA, não apresentam registros gráficos para o estudo da evolução da cultura através dos DIVs de estudo.

---

## 1.5 Principais Contribuições

As principais contribuições deste trabalho são resumidas em:

1. Desenvolvimento de uma metodologia para a caracterização topológica de culturas de neurônios a partir do mapa de atividades obtido do processamento de sinais eletrofisiológicos com o objetivo de possibilitar o auxílio na análise quantitativa e comportamental de neurônios;
2. Proposta de aplicação do algoritmo de Análise de Componentes Independentes (*Independent Component Analysis*, ICA) para a separação dos sinais registrados em MEA, em sinais exclusivos dos neurônios adjacentes aos respectivos microeletrodos;
3. Análise da variância das atividades eletrofisiológicas de cultura de neurônios dissociados de embrião de ratos Wistar, ao longo dos 20 minutos de registro, em função dos *spikes* e *bursts*.

## 1.6 Organização do Trabalho

A presente tese foi estruturada em cinco capítulos, sendo que cada capítulo foi organizado mediante o esquema a seguir:

- No Capítulo 1 é apresentada a introdução ao tema, os objetivos do trabalho, as motivações, as principais contribuições, e a descrição dos capítulos.
- No Capítulo 2 é abordada a pesquisa bibliográfica na literatura sobre trabalhos usando tecnologia de MEA em culturas de neurônios.
- No Capítulo 3 é descrita a metodologia proposta no trabalho de tese, e as técnicas utilizadas na implementação dos algoritmos nos métodos propostos.
- No Capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos durante a experimentação com a metodologia proposta.

- Finalmente, no Capítulo 5 são apresentadas as conclusões, identificando as vantagens e desvantagens da metodologia proposta, as contribuições e os possíveis trabalhos futuros.
- As referências bibliográficas e apêndices são apresentados na sequência.

## **1.7 Considerações Finais**

Neste capítulo foi apresentada uma introdução sobre o trabalho de tese, fazendo uma descrição do contexto em que a mesma se insere. Foram apresentados os objetivos, motivações, principais contribuições e a estrutura dos capítulos. No capítulo seguinte, será desenvolvida uma revisão bibliográfica sobre os principais trabalhos envolvendo culturas in vitro em matrizes de microeletrodos.

# Capítulo 2

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

*Neste capítulo encontra-se a revisão bibliográfica sobre os principais trabalhos na área deste trabalho de doutorado. São apresentadas as principais pesquisas na Seção 2.1, e uma síntese na Seção 2.2. Finalmente, apresenta-se as considerações finais (Seção 2.3).*

### 2.1 Pesquisas envolvendo matrizes de microeletrodos

Em 1972, Thomas et al. publicaram o primeiro artigo descrevendo um arranjo plano de microeletrodos para uso em registro de células cultivadas (THOMAS, 1972). A matriz de microeletrodos, que foi denominado arranjo de multieletrodos, tinha duas linhas de 15 eletrodos cada, espaçadas de 100  $\mu\text{m}$ , e tinha a pretensão de realizar experimentos com neurônios de raiz dorsal cultivados. O arranjo foi construído sobre vidro, com eletrodos de ouro e trilhas sobre uma camada adesiva isolada de *photoresist*. Os eletrodos eram cobertos com *platinum black* para redução de impedância da conexão com o meio da cultura e tinham um formato quadrado de 7  $\mu\text{m}$  de lado. Métodos padrões de fotolitografia foram usados para a construção. Os experimentos iniciais de registros de neurônios de gânglios de raiz dorsal de pintos (*chick*) não foram bem sucedidos devido a existência de camada de células gliares sobre a qual os neurônios cresceram, isolando-os dos microeletrodos. Mudando para miócitos dissociados de pintos, foi possível registrar sinais robustos de 20 a 1000 microvolts, após os miócitos formarem uma camada de contração confluyente sobre os eletrodos.

---

Cinco anos após, em 1977, Guenter Gross e colaboradores (GROSS, 1977) propuseram um arranjo de microeletrodos, sem o conhecimento dos trabalhos prévios de Thomas. Os microeletrodos eram de ouro, com 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em arranjo de 36 elementos, espaçados de 100  $\mu\text{m}$ . Os testes reportados registraram em gânglios de cobras sobre os microeletrodos, potenciais de ação individuais de amplitudes de até 3 mV, dependente do tamanho das células.

O primeiro registro bem sucedido de neurônios dissociados individuais foi reportado por Jerome Pine em 1980 (PINE, 1980), usando arranjos de microeletrodos em duas linhas paralelas de 16 eletrodos de ouro, platinizados e isolados com dióxido de silício. Os microeletrodos eram em forma quadrada de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de lado e 250  $\mu\text{m}$  de distância entre eles. Embora replicando os trabalhos de seus antecessores, o autor diz que os desconhecia enquanto desenvolvia o arranjo e fazia as medições. Os neurônios ganglionares cervicais de ratos usados nos experimentos foram crescidos de uma a três semanas em cultura, e formaram ricas redes de interconexões. Eles foram crescidos sobre um substrato de colágeno fibroso de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de espessura. 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 microeletrodos, mas tipicamente 25  $\mu\text{m}$  distantes. Os sinais foram na média de 50  $\mu\text{V}$ , com razão sinal ruído de 5 a 15:1. Foi verificado que os microeletrodos poderiam ser usados para estimulação com um pulso de voltagem de 0.5 V e duração de 1 ms. É importante a questão se os resultados eram compatíveis com os esperados de propriedades neuronais. É possível mostrar que para um dreno (*sink*) de corrente pontual, ou fora de um dreno esférico, uma voltagem é gerada igual a  $I\rho/4\pi\tau$ , onde I é a corrente,  $\rho$  é a resistividade do meio, e  $\tau$  é a distância do centro do dreno de corrente. Acredita-se que tipicamente um potencial de ação de um neurônio é ativado por um fluxo de corrente no *axon hillock*. A uma distância de 25  $\mu\text{m}$ , uma corrente de 16 nanoamperes, no pico do potencial de ação, deve produzir um sinal de 50  $\mu\text{V}$  como o observado. Esses sinais são também similares aos observados *in vivo*, mesmo um tanto menores devido ao meio da cultura ter menor resistividade que o cérebro.

Seguindo os trabalhos anteriores, Gross usou o seu arranjo para registrar de culturas de células dissociadas da medula espinhal em 1982. Foram obtidos bons registros de sinais obtidos de atividades espontâneas, que mostraram muito

---

dependentes da temperatura abaixo de 30° C, decrescendo rapidamente a um pequeno valor a temperatura ambiente. *Bursts* periódicos e aperiódicos de atividades foram verificados. Esses experimentos foram relatados por Droge (DROGE, 1986).

Em 1981, Jobling et al. reportaram um trabalho (JOBLING, 1981) com uma MEA de 9 microeletrodos em que os mesmos eram portas de transistores FET (*Field Effect Transistors*). Eles demonstraram a sua eficiência em registrar sinais de fatias de hipocampo, com uma boa razão sinal ruído, enquanto estimulavam a fatia com um eletrodo de estimulação convencional.

Wheeler e Novak (WHEELER, 1986) construíram uma MEA exclusiva para as necessidades de análise de atividades de fatias de hipocampus realizando a análise de densidade de corrente de potenciais de campo. Foram construídos 32 microeletrodos em arranjo de 8x4, com 20 µm de diâmetro e 200 µm de distância., usando técnicas de fabricação convencionais, isolamento de *polyimide* e platinização. Os dados da MEA foram usados para calcular uma distribuição de fonte de corrente em detalhes. Adicionando *picrotoxin* à fatia de hipocampo eles puderam criar regiões epiléticas e fazer a análise para inferir as fontes e drenos de corrente.

Em 1989, Meister et al. usou a MEA de 61 microeletrodos desenvolvida no laboratório de Jerome Pine para estudar atividades de retina de salamandra (MEISTER, 1994). As camadas de células ganglionares da retina estiveram em contato com o arranjo de microeletrodos e os fotorreceptores foram iluminados por cima por padrões de luz gerados por uma tela de tubo de raios catódicos, CRT (*Cathode Ray Tube*). Foi possível verificar sinais extracelulares muito limpos. A retina permaneceu saudável por muitas horas.

Em 1991, Fromherz e colaboradores investigaram o uso de transistores FET para registrar potenciais de ação de células de *aplysia Retzius*, de aproximadamente 50 µm de diâmetro (FROMHERZ, 1991). A porta isolada de FET, de 6 por 10 µm, foi completamente coberta pela célula. Uma grande quantidade de sinais foi vista, supostamente resultante de variações no contato entre a célula e a porta. Isso deu início a uma série de pesquisas buscando a interface neurônio-FET.

Em 1995, Welsh et al. (WELSH, 1995) publicou sobre experimentos em MEA desenvolvido no laboratório de Jerome Pine, que demonstrou a possibilidade do seu uso para registrar sinais de redes neuronais por longo período de tempo. Os núcleos supraquiasmáticos em cérebros de mamíferos geram o ritmo circadiano

diurno. Os neurônios supraquiasmáticos foram dissociados, cultivados e suas atividades espontâneas monitoradas por dias com a MEA. Um resultado surpreendente é que a rede cultivada não sincroniza, mas cada neurônio exibiu, em sua atividade, oscilação independente com um período aproximado de 24 horas. Isso significa que cada neurônio pode ter o seu próprio gerador de ritmo circadiano.

Berdondini et al. (BERDONDINI, 2001) apresentou uma nova abordagem para sensoriamento com resolução espacial e temporal em MEA de alta densidade de atividades eletrofisiológicas de redes neurais *in vitro*. Baseado em tecnologia de sensoriamento de pixel ativo (*active pixel sensor technology*, APS), o primeiro projeto de chip consiste em um arranjo de 64x64 (4096) pixels numa área ativa de 2.56x2.56 mm<sup>2</sup>. Cada pixel tem uma dimensão de 40x40 μm<sup>2</sup>, distante um microeletrodo de outro de 20 x 20 μm<sup>2</sup>. Um amplificador diferencial em pixel amplifica localmente o potencial extracelular, minimizando a distância de circuito e o eletrodo. O circuito integrado tem um ganho programável e filtro com o compromisso ruído-velocidade. A atividade neuronal é obtida endereçando os pixels desejados em frequência de amostragem alta e leitura sequencial da saída do chip.

Em 1996, o sistema MEA60 foi originalmente introduzido pela Multi Channel Systems (MCS) e muitos pesquisadores do mundo todo tem usado o sistema com uma variedade de preparações biológicas e diferentes aplicações. Por exemplo, Ganados-Fuentes et al. (GRANADOS-FUENTES, 2004) usou o sistema MEA60 para pesquisar ritmos circadianos. Os autores investigaram se o bulbo olfatório principal é um *pacemaker* circadiano funcional em ratos. Os registros em multieletrodos de longo termo revelaram que os neurônios de bulbo cultivados expressaram oscilações próximas de 24 horas, em taxa de disparo.

Durante os finais dos anos 1990s, grupos no Japão, nos laboratórios Matsushita e NTT (Nippon Telephone and Telegraphic), liderados por Taketani e Kawana fabricaram MEAs de 64 microeletrodos (MAEDA, 1995)(OKA, 1999). Os dispositivos foram desenvolvidos para manter culturas organotípicas de fatias vivas por muitas semanas, tal que o seu desenvolvimento pudesse ser observado por todo o tempo. Para culturas corticais, experimentos provaram plasticidade e conexões como resultado de uma estimulação tetânica (JIMBO, 1999). Um resultado interessante obtido foi que a estimulação de um microeletrodo afetou todos os neurônios, aumentando ou reduzindo a resposta. Mas, para diferentes eletrodos de estimulação, a resposta de neurônios individuais pôde ser aumentado ou reduzido.

---

A detecção de atividades de *spikes* neuronais é um desafio técnico que é um pré-requisito para o estudo de muitos tipos de funções cerebrais. Medir a atividade de neurônios individuais com precisão pode ser difícil devido à grande quantidade de ruídos de fundo e a dificuldade de distinguir os potenciais de ação de um neurônio dos demais numa determinada área. Lewicki (LEWICKI, 1998) trabalhou na revisão dos algoritmos e métodos para a detecção e classificação de potenciais de ação, um problema comumente referido como *spike sorting*, em inglês. Na análise dos sinais registrados, por um considerável número de microeletrodos, o espaço de características precisa ser tratado de forma a desconsiderar informações que não favorecem o processo. São poucos os métodos encontrados na literatura para a classificação de potenciais de ação com redundância de registros.

Um sistema de MEA foi desenvolvido por (LITKE, 2004) para estudar como a retina processa e encodifica as imagens visuais. Esse sistema pode simultaneamente registrar as atividades elétricas extracelulares de centenas de neurônios de saída da retina, quando os sinais de imagem são focalizados nos neurônios de entrada. Os sinais de saída da retina detectados podem ser correlacionados com a entrada visual para estudar o código neural usado pelo olho para enviar informações do mundo visual para o cérebro. O sistema consiste dos seguintes componentes: 1) um arranjo retangular de 32x16 de 512 microeletrodos com uma área sensível de 1.7 mm<sup>2</sup>; espaçamento entre os eletrodos de 60 µm e diâmetro do eletrodo de 5 µm; um sistema de aquisição e um *software* de processamento de dados. Neste sistema, o *software* repete, de forma sequencial, classificações de neurônios já identificados.

Segev (SEGEV, 2004) desenvolveu um estudo sobre a organização funcional de células ganglionares de retinas de salamandra. A abordagem usada para a detecção de *spikes* é baseada no ajuste de *templates*. Este método é formulado para um limitado número de microeletrodos e de *templates*, precisando de conhecimento *a priori* dos neurônios e das formas de onda analisadas.

Einevoll (EINEVOLL, 2012) desenvolveu pesquisas sobre uma nova geração de MEA contendo centenas de microeletrodos com capacidade de registro simultâneo de trens de *spikes* de milhares de neurônios, onde algoritmos de detecção de *spikes* com precisão são desafiadores.

Apesar dos esforços descritos, Brown (BROWN, 2001), já tinha sido revelado o potencial da Análise de Componentes Independentes (ICA, *Independent*

---

*Component Analysis*) para fins de classificação com redundância de registros. Brown descreve que ICA é uma técnica de transformação de dados para encontrar fontes independentes de atividades em registros com misturas de fontes. Pode ser usado para recuperar flutuações de potenciais de membrana de neurônios individuais em registros de múltiplos canais. Existem certos exemplos em que mais de 100 neurônios possam ser separados simultaneamente. ICA separa automaticamente potenciais de ação sobrepostos, recupera potenciais de ação de diferentes tamanhos de um mesmo neurônio, remove artefatos e encontra a posição de cada neurônio no arranjo de microelétrodos. Uma limitação é que o número de fontes – neurônios e artefatos – deve ser igual ou menor que o número de registros simultâneos. ICA pode ser também tem muitas outras aplicações em neurociência incluindo, remoção de artefatos de dados de EEG (*Eletro-Encefalogram*), identificação de regiões de cérebros espacialmente independentes em fMRI (*functional Magnetic Resonance Imaging*) e determinação de codificação de população em registros multi-unitários.

Conceitualmente, ICA é uma técnica de separação cega de fontes de sinais usada para separar um conjunto de fontes de sinais independentes que foram linearmente misturadas através das observações realizadas (HYVARINEN, 1999). No estudo das redes neurais cultivadas em MEA, os neurônios são considerados fontes dos sinais, as quais são linearmente misturadas através dos registros realizados pelos microeletrodos. Embora os neurônios não sejam independentes, visto que podem estar conectados sinapticamente, direta ou indiretamente, os potenciais de ação podem ser considerados estatisticamente independentes, desde que a dependência, neste contexto, seja referida à sobreposição ao invés da dependência pelo tempo de atraso Brown et al. (BROWN, YAMADA e SEJNOWSKI, 2001). Nesse sentido a execução da técnica ICA somente ficará comprometida se na tentativa de separar os sinais de dois neurônios eles disparassem os potenciais de ação sempre no mesmo instante de tempo.

Com o objetivo de conseguir a eficiência computacional no uso da técnica ICA para o caso de um número grande de fontes de sinais, como no registro de sinais eletrofisiológicos em MEA, surgiram várias propostas de algoritmos tentando eliminar as dificuldades no tratamento de grandes conjuntos de microeletrodos. A abordagem mais conhecida é do algoritmo FastICA (HYVARINEN, 1999), em que é usada uma combinação de duas abordagens diferentes para o ICA linear: a abordagem teórica

---

original de Comon (1994), e a abordagem de projeções. Usando as aproximações de máxima entropia de entropia diferencial, é introduzida uma família de novas funções contrastes. Essas funções contrastes habilitam ambas: a estimação da completa decomposição por minimização de informação mútua e a estimação dos componentes independentes individuais como direções de projeções.

Hermle et al. (HERMLE, SCHWARZ e BOGDAN, 2004) descreve um sistema de detecção de spikes empregando ICA e uma rede neural artificial não supervisionada SOM (Self-Organizing Map). Foca-se em como o ICA numa primeira fase da detecção de spikes pode ser usado em registro de sinais de multieletrodos para o sistema nervoso central. Usando dados reais registrados de cérebro de ratos e dados simulados, foi calculado o desempenho de vários algoritmos de ICA para remover a informação cruzada (*cross-talk*) entre os eletrodos usando dados de registros contínuos (ou simulação). Quando usa-se dados do formato padrão de registros de *spikes* extracelulares, novos problemas emergem e algoritmos robustos são necessários. Foi demonstrado que vários algoritmos de ICA mostram um bom desempenho nesses registros de MEA (simulados e reais). Em registros usando tetrodos, o mesmo neurônio é propositalmente registrado por vários eletrodos simultaneamente e foi mostrado como o ICA pode ser usado neste caso para identificar informações redundantes e daí obter informações relevantes, melhorando o agrupamento posterior usando SOM.

No trabalho de Snellings et al. (SNELLINGS, ANDERSON e ALDRIDGE, 2006) observa-se que o ruído pode complicar muito a detecção do potencial de ação de uma célula individual para o propósito de análise eletrofisiológica. Para um experimento envolvendo o registro de sinais de áreas talâmicas e subtalâmicas do cérebro de rato, um método de *hardware/software* híbrido foi utilizado para melhorar a qualidade da razão sinal ruído do sinal registrado, em cada canal. O procedimento usa arranjo de eletrodos pouco espaçadas e ICA para fortificar a energia do sinal de um *spike* único combinando a entrada de vários canais, concorrentemente, para reduzir o ruído de cada canal, isolando os componentes de modo comum, tais como os artefatos, ondas lentas, e ativação de *spikes* distantes correlacionados. Num passo seguinte, uma avaliação da razão sinal ruído, usando *wavelet*, é feita para quantificar a melhoria na qualidade de dados para cada dado registrado. Os dados apresentados aqui demonstraram que esse método, que pode ser aplicado *off-line* como um pré-processamento para quaisquer outros métodos de detecção de *spikes*,

---

como o FastICA, é consistentemente efetivo no melhoramento da qualidade de dados, facilitando a detecção e classificação de neurônios.

Entretanto, para uma eficiente aplicação da técnica ICA, o maior obstáculo é conseguir um número maior ou igual de sinais observados frente ao de número de fontes existentes. Esta dificuldade fica em maior evidência em experimentos *in-vivo* usando eletrodos, onde o número de neurônios apresenta-se em maior quantidade do que os pontos de observação. A detecção automática de atividades multi-neuronais registrados em tetrodos na presença de *spikes* sobrepostos foi estudado por Takahashi et al. (TAKAHASHI, ANZAI e SAKURARI, 2003). O registro multi-neuronal é uma técnica eletrofisiológica poderosa que tem revelado muito sobre as interações neuronais no cérebro. Contudo, é difícil detectar precisamente o momento (*timing*) do *spike*, especialmente quando os disparos são simultaneamente sincronizados, dentre os neurônios próximos, e registrados por um eletrodo comum, pois as formas de ondas dos *spikes* se sobrepõem no eletrodo quando dois ou mais neurônios disparam simultaneamente. Além disso, uma variabilidade não Gaussiana (não-estacionariedade) de forma de onda do *spike*, tipicamente vista na presença dos chamados *spikes* complexos, limita a habilidade de detectar atividades multi-neuronais em componentes de neurônios individuais. Devido a esses problemas, as técnicas ordinárias de detecção de *spikes* apresentam frequentemente resultados imprecisos. Os estudos dos autores mostraram que o ICA pode resolver esses problemas e separar os componentes de neurônios individuais. O ICA, no entanto, tem sérias limitações de que o número de neurônios separados deve ser menor que o número de eletrodos. Nesse sentido, os autores combinaram o ICA e a eficiência da técnica de detecção ordinária de *spikes*, a técnica de *k-means*, para resolver os problemas de sobreposição de *spikes* e não estacionariedade, sem nenhuma limitação no número de neurônios a serem separados. Primeiro, as atividades multi-neuronais são detectadas em um número grande de agrupamentos, por *k-means*. Segundo, os grupos obtidos são decompostos por ICA. Terceiro, os grupos decompostos são progressivamente agregados num conjunto minimal de supostos neurônios individuais baseados em similaridades de vetores de base estimados por ICA. O procedimento foi aplicado para formas de ondas multi-neuronais registrados com tetrodos compostos por quatro micro fios, no córtex pré-frontal de macacos acordados. Os resultados demonstraram que existem conexões funcionais entre os neurônios piramidais vizinhos, alguns disparando de uma maneira precisamente

---

simultânea. A detecção de tais fenômenos sugere que o procedimento apresentado pode detectar atividades multi-neuronais, que inclui *spikes* sobrepostos e a variabilidade não Gaussiana de formas de onda de *spikes*, em componentes de neurônios individuais.

Uma segunda abordagem de Takahashi et al. incluiu o aumento do número de locais de observação, para 12 eletrodos, aumentando assim o número de registros (TAKAHASHI e SAKURAI, 2005). A maioria dos estudos eletrofisiológicos in vivo somente focam em atividades de neurônios individuais ou população grande de neurônios, sem considerar o papel potencial de interações na taxa de sub-milissegundos entre neurônios. Isso devido à limitação dos registros multi-neuronais in vivo e técnicas de detecção de *spikes*. Embora o ICA seja uma abordagem poderosa para vencer certas limitações, tem um problema sério em que o número de eletrodos individuais deve ser maior que o número de neurônios individuais a serem registrados. O método desenvolvido anteriormente resolveu esse problema de ICA, porém a carga computacional é pesada, e o método pode ser usado somente em off-line. Nesta segunda abordagem, foi introduzido um sistema novo automático e de tempo real de detecção de *spikes* com ICA, em combinação com um sistema de dodecaeletrodo. O sistema tem o potencial de responder questões importantes de neurobiologia que não tem sido exploradas em experimentos eletrofisiológicos in vivo: como as interações de sub-milissegundos entre neurônios individuais próximos agem em animais livres.

Um trabalho de David Jäckel (JACKEL, 2012) descreve a aplicabilidade da ICA em registros de MEAs de alta densidade. As fontes separadas constituem estimativas de sinais de neurônios individuais, e a detecção de limiares nesses sinais permite obter os momentos dos *spikes* detectados. A análise de sinais neuronais extracelulares, registrados numa resolução espaço-temporal alta, revelaram que os dados registrados não podem ser modelados como uma mistura linear pura. Como uma consequência, ICA falha na separação completa dos sinais neuronais e não pode ser usada como um método único para a detecção de *spikes* em MEAs de alta densidade. Foi medido o desempenho da separação variando a densidade de neurônios e amplitude dos *spikes*. Os autores mostram como as técnicas de pós-processamento podem ser usadas para resolver os problemas de limitação da ICA, e que com essas técnicas, a ICA representa um método viável para facilitar a detecção rápida de *spikes*, nos registros de alta densidade.

---

Felix Franke (FRANKE, 2012) relata um trabalho sobre registro em MEA de alta densidade, para o registro e controle de atividades neuronais pré-sinápticos e pós-sinápticos, para entender a plasticidade de redes neuronais, incluindo registro intracelular e estimulação de vários neurônios simultaneamente. Segundo os autores, o registro intracelular é uma técnica que tem limitações para um pequeno número de neurônios a serem estimuladas e registradas ao mesmo tempo. As técnicas extracelulares permitem uma possibilidade de registrar simultaneamente um grande número de neurônios com relativa facilidade, com o ônus de um esforço maior para a detecção de atividades de neurônios individuais, para os dados registrados com uma mistura de sinais. No artigo são descritas desenvolvimentos tecnológicos em duas frentes, a saber, construção do arranjo de microeletrodos usando CMOS, que também permite estimulação extracelular de neurônios, e detecção de *spikes* em tempo real. Os autores afirmam que essas técnicas, quando combinadas fornecem uma poderosa ferramenta para o estudo da plasticidade em redes neuronais consistindo de vários milhares de neurônios *in vitro*.

Um trabalho de Bakkum (BAKKUM, 2013) relata um estudo do traçado da propagação do potencial de ação num arranjo de microeletrodos de alta densidade. Apesar de tradicionalmente os axônios serem considerados elementos de transmissão estáveis, evidências da regulação de propagação de potenciais de ação demonstraram que axônios podem ter papéis mais importantes. Contudo, os seus pequenos diâmetros fazem com que os registros intracelulares sejam desafiadores, e os sinais extracelulares de baixa magnitude são difíceis de serem detectados. Neste trabalho, é reportado métodos de visualizar eletricamente a propagação dos potenciais de ação e a topologia da rede em neurônios corticais cultivados em arranjos contendo 11.011 microeletrodos e fabricados usando a tecnologia semicondutora metal-óxido complementar (*complementary metal oxide*). Quaisquer neurônios sobre o arranjo podem ser registrados numa resolução espaço-temporal alta, e estimulado simultaneamente com poucos artefatos. Foram encontradas diferenças de velocidades substanciais ocorrendo localmente dentro de axônios individuais, sugerindo que o controle temporal da saída dos neurônios pode contribuir para o processamento da informação neuronal.

Na visualização de cultura em MEA de cardio-miócitos, Cogollo (COGOLLO, 2011), descreveu um sistema experimental que combina a capacidade de caracterização de superfície usando microscopia de força atômica com escala sub-

---

micrométrica com medida eletrofisiológica não invasiva obtida usando MEA. Para mostrar o potencial das medidas combinadas, foram estudadas as mudanças na topografia das células e propriedades elásticas das células de cardio-miócitos durante os ciclos de relaxação e contração. O início de cada ciclo de batimento foi precisamente identificado em sinais de potencial extracelular, permitindo combinar as medidas manométricas de contrações de múltiplos cardiomiócitos para analisar a variação da morfologia e elasticidade das células. Além disso, estimando a profundidade das diferentes indentações em módulos elásticos numa localização singular da membrana celular, foi observado um comportamento mecânico dinâmico que poderia ser relacionado com a estrutura dinâmica microfibrilar.

Um estudo sobre a funcionalidade de culturas in vitro em MEA foi relatado por Downes (DOWNES, 2012), onde foram identificadas propriedades de redes complexas similares às encontradas in vivo. Iniciando de uma distribuição aleatória, as culturas realizam uma reorganização significativa durante o período inicial in vitro. Neste trabalho, a evolução de conectividade funcional foi estimada de correlações de atividades espontâneas. As propriedades de rede foram quantificadas usando medidas complexas de teoria dos grafos e usados para comparar culturas em diferentes estágios de desenvolvimento durante as primeiras 5 semanas in vitro. As redes obtidas de culturas jovens (14 dias in vitro) exibiram uma topologia aleatória, que evoluíram para uma topologia de pequeno mundo durante a maturação. A mudança de topologia foi acompanhada por uma presença aumentada de áreas altamente conectadas (hubs) e a eficiência da rede foi melhorada com a idade. A topologia de pequeno mundo equilibra a integração de áreas de rede com segregação de unidades de processamento especializadas. A emergência de tal estrutura de rede em neurônios cultivados, apesar da falta de entrada externa, aponta para os mecanismos biológicos intrínsecos complexos. Além disso, a rede funcional de culturas em idade madura é eficiente e altamente adequada para tarefas de processamento complexo.

Quanto a tecnologia de microeletrodos, Bareket-Keren (BAREKET-KEREN, 2013) descreve o uso de nanotubos de carbono (Carbon Nano Tube, CNT). A camada de nanotubos de carbono tem sido demonstrados nos últimos anos como sendo um material promissor para aplicações em interfaces neuronais. Em particular, em implantes neuronais, CNT tem uma grande vantagem devido as suas

---

propriedades elétricas e mecânicas. As investigações usando CNTs em aplicações de interfaces neuronais como na adesão celular em MEAs são descritas.

Um trabalho de Desai (DESAI, 2014) relata uma comparação do uso de macroeletrodos para estimulação profunda *in vivo* e múltiplos microeletrodos em hipocampo de ratos. Uma estimulação de 1V A 25 Hz, com microeletrodos de 33  $\mu\text{m}$  de diâmetro, foi verificado um raio de ativação de 100  $\mu\text{m}$ , que é 50% do que foi identificado com estimulação de macroeletrodo de 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Macroeletrodos ativaram aproximadamente 5.8 vezes mais neurônios que microeletrodos individuais, mas deslocaram 20 vezes mais tecidos neurais. A esfera de influência de microeletrodos de estimulação pode ser significativamente melhorada reduzindo a impedância. Usando a técnica ultrasônica de acoplamento (*sonicoplatin*) os microeletrodos de platina aumentaram a área e reduziram a impedância por uma ordem de magnitude, os raios de ativação aumentaram 50  $\mu\text{m}$  e mais que duplicaram o número de neurônios ativados.

Recentemente, um trabalho de Jimbo (JIMBO, 2015) estudou a separação cega de fontes em neurônios corticais cultivados de acordo com o princípio de energia livre (*Free-Energy Principle*) (FRISTON, 2010). Apesar dos estudos anteriores de técnicas de separação cega de fontes terem revelado que o cérebro pode usar esse procedimento como uma estratégia para o processamento de sinais em percepção sensorial, e numerosos modelos matemáticos terem sido propostos, permanece a questão de como as redes neurais extraem fontes particulares de uma mistura complexa de entradas. Os autores sugerem que os neurônios em culturas de células corticais dissociadas podem aprender a representar fontes particulares enquanto filtram outros sinais. Especificamente, as classes distintas de neurônios na cultura aprenderam a responder a fontes distintas após repetir estimulações de treinamento. Além disso, as estruturas de redes neurais mudaram para reduzir a energia livre, como preditos pelo princípio de energia livre, um candidato para a teoria unificada de aprendizado e memória, e pelo princípio de Jaynes de máxima entropia (JAYNES, 1957). Esse aprendizado implícito pode somente ser explicado por alguma forma de plasticidade Hebbiana. Esses resultados são as primeiras demonstrações *in vitro* de redes neurais desempenhando separação cega de fontes, e a primeira demonstração formal de auto-organização neural sob o princípio de energia livre.

---

Um trabalho sobre a análise quantitativa de neurônios ganglionares de raiz dorsal (Dorsal Root Ganglion, DRG) cultivados em MEA baseado em processamento de imagens de microscopia de fluorescência foi desenvolvido por Mari (MARI, 2015). Relata-se um sistema para análise quantitativa e morfológica de cultura de neurônios em MEAs, processando imagens adquiridas por microscopia de fluorescência. Os neurônios são segmentados de imagens de canais de fluorescência usando uma combinação de segmentação por limiares, transformada *watershed* e classificação de objetos. O posicionamento de microeletrodos é obtido de imagens de canais de transmissão de luz usando transformada de Hough circular. O método proposto foi aplicado a imagens de culturas dissociadas de células DRG de ratos Wistar. A análise quantitativa, morfológica e topológica produziu informações sobre o estado da cultura, tais como, contagem da população de neurônios, distâncias neurônios-a-neurônios e neurônios-a-microeletrodos, morfologias dos núcleos celulares, tamanho dos neurônios, e distribuição espacial dos neurônios e microeletrodos. O sistema proposto propõe padronizar o processamento de imagens e a computação de medidas quantitativas úteis para o estudo integrado de imagens da cultura e de sinais eletrofisiológicos. Embora os experimentos tenham sido realizados com células DRG, células corticais ou hipocâmpais poderiam ser processadas com pequenos ajustes nos parâmetros usados para o processamento de imagens.

## 2.2 Síntese e Discussões

Sintetizando a pesquisa bibliográfica, sobre os primeiros 30 anos, houve uma consolidação sobre as pesquisas com o uso de matrizes de microeletrodos para cultura in vitro de neurônios em fatias de tecidos cerebrais e neurônios dissociados. No final desses 30 anos, surgiram as MEAs comerciais para essas pesquisas. As pesquisas foram feitas para a leitura de sinais eletrofisiológicos de células ganglionares, células corticais, hipocâmpais, e células da retina, além de trabalhos em células supraquiasmáticas. Diversas tecnologias de fabricação foram pesquisadas, incluindo a FET. A Tabela 2.1 faz uma síntese das principais pesquisas realizadas nesse período.

Tabela 2.1 – Pesquisas sobre a MEA durante os 30 primeiros anos

Autores	Ano	Tema	Tecnologia	Tipo de células
Thomas et al.	1972	Desenvolvimento do primeiro arranjo	Duas linhas de 15 microeletrodos	Ganglionares
Gross et al.	1977	Segundo arranjo	36 microeletrodos de ouro	Ganglionares
Jerome Pine	1980	Registro em células dissociadas	Duas linhas de 16 microeletrodos	Ganglionares
Gross et al.	1982	Registro de células dissociadas	36 microeletrodos de ouro	Medula espinhal
Jobling et al.	1981	Desenvolvimento de arranjo com FET	FET	Hipocampo
Wheeler et al.	1986	MEA exclusiva para hipocampo	MEA de 32 microeletrodos	Hipocampo
Meister et al.	1989	Retina de salamandra	MEA do Laboratório de Pine	Retina
Fromherz et al.	1991	MEA de FET	FET	Aplysia Retzius
Welsh et al.	1995	Registro de ritmo circadiano	MEA do Laboratório de Pine	Supraquiasma
Taketani e Kawana	1990s	Desenvolvimento de MEA no Japão	MEA de 64 microeletrodos	Corticais
Jimbo et al.	1999	Estimulação tetânica	MEA de 64 microeletrodos	Corticais
Granados-Fuentes et al.	2004	Ciclos circadianos	MEA60	Supraquiasma
Maeda et al.	1995	Neurônios corticais	MEA de 64 microeletrodos	Corticais
Berdondini et al.	2001	Construção de MEA	MEA alta densidade	

Já nos últimos 15 anos, as pesquisas sobre MEAs foram diversificadas, sendo que uma das tendências foi a de pesquisas em detecção de *spikes* (*spike sorting*). Várias técnicas foram pesquisadas sobre a detecção de *spikes*, incluindo ICA (*Independent Component Analysis*). Pesquisas foram desenvolvidas sobre as redes formadas pelos neurônios nas MEAs, como as redes complexas desenvolvidas; além da utilização de nanotubos de carbono para a fabricação de MEAs; e da análise quantitativa de culturas. A Tabela 2.2 mostra uma síntese dos principais trabalhos realizados nesses últimos anos.

Tabela 2.2 – Pesquisas durante os 15 anos mais recentes.

Autores	Ano	Tema	Tecnologia	Tipo de células
Lewicki et al.	1998	Detecção de spikes	Múltiplos eletrodos	
Litke et al.	2004	Processamento da retina	512 microeletrodos	
Segev et al.	2004	Células ganglionares de retina	Número limitado de microeletrodos	
Einevoll et al.	2012	Nova geração de MEA	Centenas de microeletrodos	
Brown et al.	2001	Aplicação de ICA	MEAs, EEG, fMRI	

Hyvarinen	1999	FastICA	Diversas	
Hermle et al.	2004	Detecção de spikes e ICA e SOM	Tetrodo	
Snellings et al.	2006	Melhoria dos dados para FastICA	Diversas	
Takahashi et al.	2003	k-means e ICA	Tetrodo	
Takahashi et al.	2005	Sistema automático	Dodecaeletrodo	
Bakkum et al.	2013	Propagação do potencial de ação	11.011 microeletrodos	
Cogollo et al.	2011	Microscopia de força atômica	MEA	Cardio miócitos
Downes et al.	2012	Funcional – redes complexas	MEA	
Jäckel et al.	2012	Aplicabilidade da ICA	MEA de alta densidade	
Franke et al.	2012	Registro e detecção em tempo real	MEA de alta densidade	
Bareket-Keren et al.	2013	Nanotubos de carbono	Diversas	
Desai et al.	2014	Comparação de eletrodos	Macroeletrodos e microeletrodos	
Jimbo et al.	2015	Princípio de energia livre	Separação cega em neurônios	Corticais
Mari et al.	2015	Análise de culturas	MEA	DRG

## 2.3 Considerações Finais

Neste capítulo foi apresentada a revisão bibliográfica sobre os principais trabalhos já realizados sobre a matriz de microeletrodos. A seguir descreve-se a metodologia para o desenvolvimento da tese.

# Capítulo 3

## MATERIAL E MÉTODOS

---

*Neste capítulo é apresentada a metodologia do trabalho desenvolvido. O capítulo está dividido da seguinte forma: Na Seção 3.1, é descrita uma síntese da metodologia de trabalho; na Seção 3.2, apresenta-se a metodologia adotada para a obtenção do mapa de atividades neuronais em função do processamento dos sinais eletrofisiológicos registrados usando MEA. Na Seção 3.3 é descrita a metodologia utilizada para a obtenção do mapa de contagem dos neurônios a partir de imagens fotográficas da cultura de neurônios em MEA. Na Seção 3.4 apresenta-se a abordagem de calibração, do número de neurônios virtuais, em função do mapa de atividades e do mapa de contagem de neurônios. Na Seção 3.5 é apresentada uma descrição sobre a técnica de Análise de Componentes Independentes (ICA); e na Seção 3.6 são resumidos alguns tópicos sobre processamento de imagens, aplicados no desenvolvimento da tese. A Seção 3.7 refere-se à descrição do Experimento 371, realizado na Universidade de Gênova, Itália, para a coleta de dados usados nesta tese, e os processamentos de imagem realizados. E por fim, na Seção 3.8, são apresentadas as considerações finais sobre o capítulo.*

### 3.1 Considerações Iniciais

Conforme descrito no Capítulo 1, o objetivo principal desta tese é a obtenção do mapa de atividades dos neurônios, obtidas por registros de sinais em MEA, que se supõe ser proporcional ao número de neurônios adjacentes. A partir da imagem fotográfica de cultura de neurônios dissociados *in-vitro* em MEA, e da contagem de neurônios dessa imagem, é possível obter uma regra de proporção do número de neurônios em função do mapa de atividades dos sinais eletrofisiológicos registrados, num dia próximo à obtenção da imagem.

Os sinais eletrofisiológicos a serem usados para atingir os objetivos foram registrados ao longo dos DIVs 25, 29, 33, 39, 43 e 46, para neurônios hipocâmpais dissociados de embrião de rato Wistar, na Universidade de Gênova, Itália. A imagem fotográfica da cultura, foi obtida no DIV 38.

A metodologia é proposta em três partes: a) análise dos sinais eletrofisiológicos da cultura e a obtenção do mapa de atividades neuronais, em função da contagem de *spikes* e de *bursts*; b) análise da imagem fotográfica da cultura e a obtenção da contagem dos neurônios por microeletrodos; c) considerar a proporcionalidade entre a contagem de neurônios, obtida em (b), e as atividades dos neurônios, obtida em (a), para calibragem do sistema e obtenção do número virtual de neurônios a partir do mapa de atividades.

A finalidade da obtenção do mapa de atividades é a obtenção da distribuição virtual de neurônios, sobre a área de sensibilidade dos microeletrodos da MEA, a partir do estudo dos sinais eletrofisiológicos registrados. Isso é possível, caso exista pelo menos uma imagem fotográfica da cultura, que permite associar o mapa de atividades neuronais ao número de neurônios por microeletrodo, obtido na imagem fotográfica. De posse de ambos os resultados, é possível comparar os dois mapeamentos, virtual e real e validar o trabalho desenvolvido.

### **3.2 Metodologia para a Obtenção do Mapa de Atividades dos Neurônios**

A metodologia proposta para a primeira parte, de análise das atividades fisiológicas com o objetivo de obtenção do mapa de atividades dos neurônios, é resumida no fluxograma da Figura 3.1, que contém as seguintes etapas: (a) obtenção do registro das atividades eletrofisiológicas da cultura; (b) processamento das atividades eletrofisiológicas usando a abordagem de Análise de Componentes Independentes, ICA; e (c) detecção e quantificação das atividades neuronais, resultando em dois tipos de mapas para atividades dos neurônios: contagem de *spikes*, e contagem de *bursts*.. A seguir as etapas relacionadas são descritas.

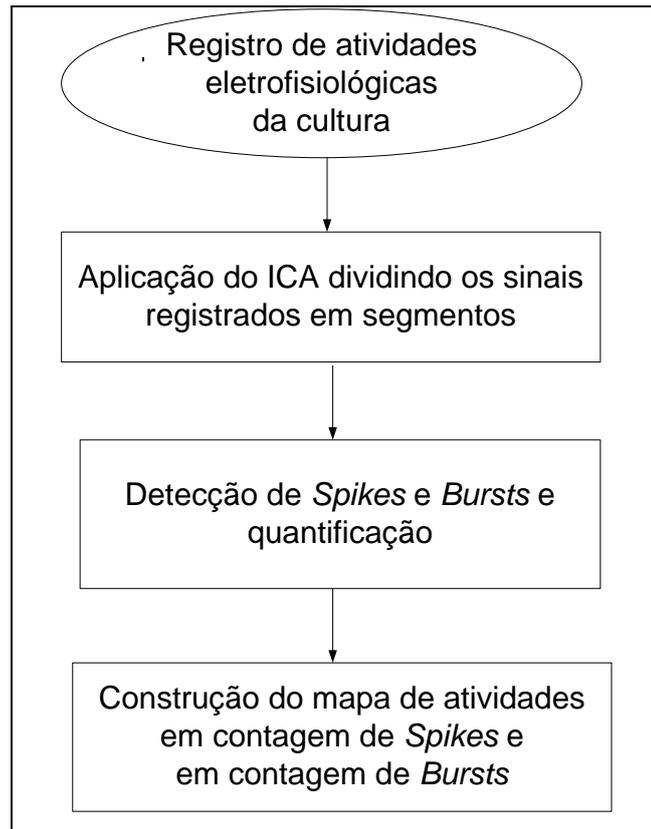
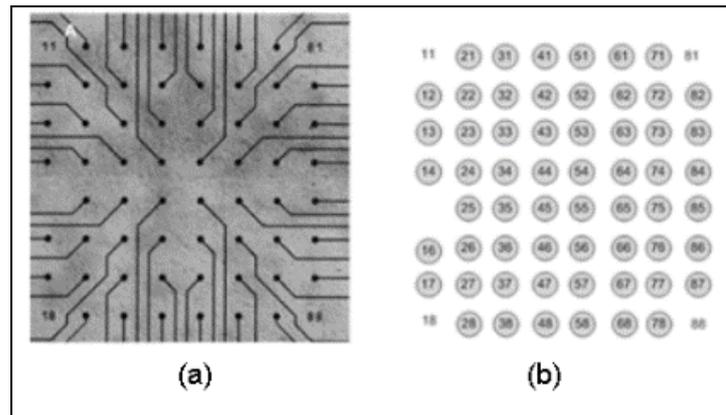


Figura 3.1 – Diagrama da metodologia proposta caracterizando a análise e o processamento da atividade eletrofisiológica em uma cultura *in-vitro*.

### 3.2.1 Obtenção da atividade eletrofisiológica da cultura

O arranjo de 59 microeletrodos, que fica na região central da MEA, é mostrado na Figura 3.2(a), consistindo de um *layout* (8 x 8), de microeletrodos, sendo que as posições dos 4 cantos não são disponíveis para registro de sinais, nem a de coluna 1 e linha 5, que é utilizada para controle, como pode-se observar na Figura 3.2(b). O espaçamento entre os microeletrodos é de 200  $\mu\text{m}$ , e a área referente aos 59 microeletrodos, é de 1.4  $\text{mm}^2$ . Cada microeletrodo apresenta um diâmetro de 30  $\mu\text{m}$ , sendo caracterizado pela baixa impedância para a captação de sinais.



**Figura 3.2 – Ilustração da configuração dos microeletrodos da MEA padrão de 59 microeletrodos: (a) imagem fotográfica da região central da MEA; (b) identificação dos microeletrodos.**

### 3.2.2 Processamento dos segmentos usando ICA

Nesta etapa, é usada a Análise de Componentes Independentes (ICA) sobre os segmentos dos registros eletrofisiológicos da cultura. Um segmento é uma porção de um sinal eletrofisiológico, correspondente a um período de tempo, adotada para efeitos de processamento simultâneo do ICA para todos os 59 microeletrodos.

O objetivo deste processamento é a separação dos sinais elétricos provenientes de neurônios distantes da cultura, que afetam os sinais registrados em vários microeletrodos, fazendo com que um neurônio afete apenas um microeletrodo, o microeletrodo adjacente, ou mais próximo.

Considerando-se que o sinal da atividade neuronal se propaga em todas as direções, o registro, por parte dos microeletrodos, acaba sendo redundante. Imaginando-se a associação de cada neurônio a um microeletrodo mais próximo, ao aplicar o ICA, obtêm-se para um microeletrodo, sinal composto apenas pelos potenciais de ação dos neurônios adjacentes.

### 3.2.3 Detecção e quantificação da atividade extracelular

Após a aplicação da técnica de ICA, é realizada a análise quantitativa dos sinais resultantes de cada microeletrodo da MEA.

Teoricamente, os sinais eletrofisiológicos podem ser analisados quanto a qualquer tipo de elemento do sinal registrado, como os *spikes*, *bursts*, ou mesmo os

ruídos. Para o presente trabalho, foram implementadas as técnicas de detecção de *spikes*, além da detecção de *bursts*.

### 3.2.4 Mapa de atividades dos neurônios

O mapa de atividades dos neurônios, é uma representação visual de círculos concêntricos aos microeletrodos, sendo as dimensões proporcionais aos valores correspondentes às atividades medidas nos microeletrodos associados, após a aplicação de ICA, conforme ilustração na Figura 3.3.

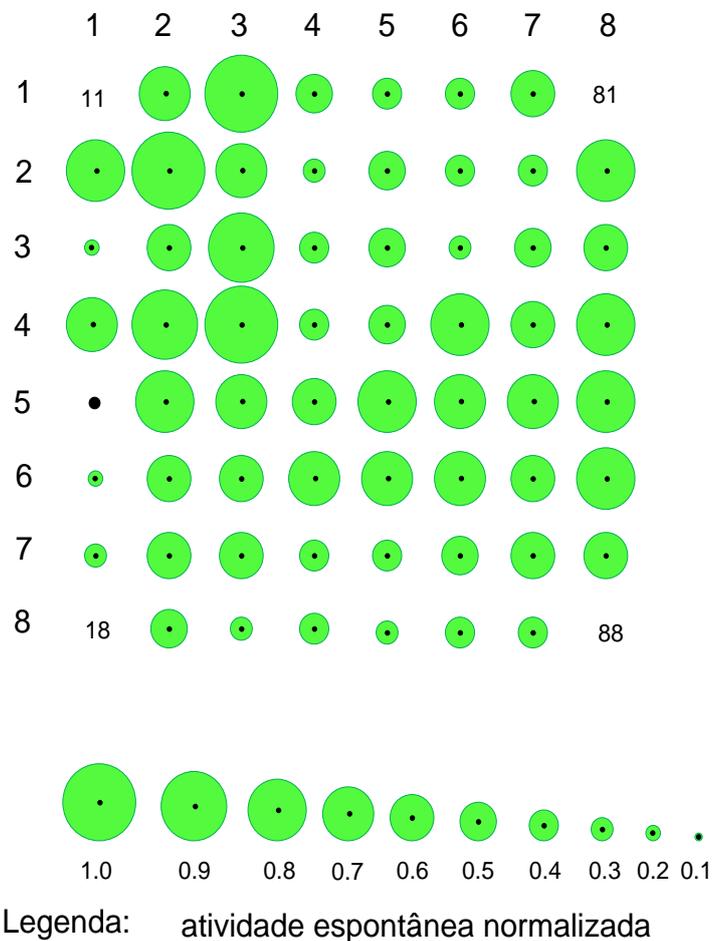


Figura 3.3 – Exemplo de um mapa de atividades dos neurônios.

A dimensão desses círculos é obtida em função do número máximo e mínimo de *spikes* ou *bursts*, normalizado. Posteriormente, essa dimensão normalizada é usada para a obtenção do mapa virtual de distribuição de neurônios, calibrada com o mapa de contagem de neurônios a partir da imagem fotográfica do DIV 38. Entende-se por calibração, o fato de estabelecer um número adequado de neurônios

proporcional às atividades obtidas em função do número de *spikes* ou *bursts*, para o mapa virtual. É possível estabelecer esse número considerando-se que as contagens máxima e mínima de neurônios obtidas nos microeletrodos a partir da imagem fotográfica do DIV 38 seja proporcional às atividades máxima e mínima nos microeletrodos obtidas para o mapa virtual, em função do número de *spikes* ou *bursts*.

O número normalizado de *spikes* é obtido levando-se em consideração a contagem máxima de *spikes*,  $S_{max}$ , e a contagem mínima,  $S_{min}$ . O número de *spikes* normalizados,  $CS$ , é tal que se a contagem é igual a  $S_{max}$ ,  $CS = 1$ , e se a contagem é igual a  $S_{min}$ ,  $CS = 0$ .

O número normalizado de *bursts*,  $CB$ , é obtido de maneira análoga, sendo que se a contagem é igual ao máximo,  $CB = 1$ , e se a contagem é igual ao mínimo,  $CB = 0$ .

Para a construção do mapa de atividades de neurônios, é adotado um procedimento, com os passos seguintes (Algoritmo 3.1):

Algoritmo 3.1. Construção do mapa de atividades de neurônios.

- 1) Determinar as posições dos 59 microeletrodos de sinais e do microeletrodo de referência;
- 2) Enumeração das linhas e colunas da matriz;
- 3) Enumeração das posições dos cantos com as respectivas posições (11, 81, 18, 88);
- 4) Para cada microeletrodo  
    {obter o número normalizado de *spikes* ou *bursts*;  
    desenhar o círculo na respectiva posição com o diâmetro igual ao número normalizado}
- 5) Fim.

### 3.3 Metodologia para a Obtenção do Mapa de Contagem de Neurônios

Nesta parte utiliza-se de técnicas de processamento de imagens da imagem fotográfica para identificar a distribuição real de neurônios, e a construção do mapa de contagem de neurônios.

As etapas envolvendo a metodologia de análise da imagem fotográfica e obtenção do mapa de contagem de neurônios são mostradas na Figura 3.4, que se inicia com o registro fotográfico da cultura; seguido do pré-processamento; da identificação dos neurônios e microeletrodos; e da construção do mapa de contagem de neurônios. Essas etapas são descritas a seguir:

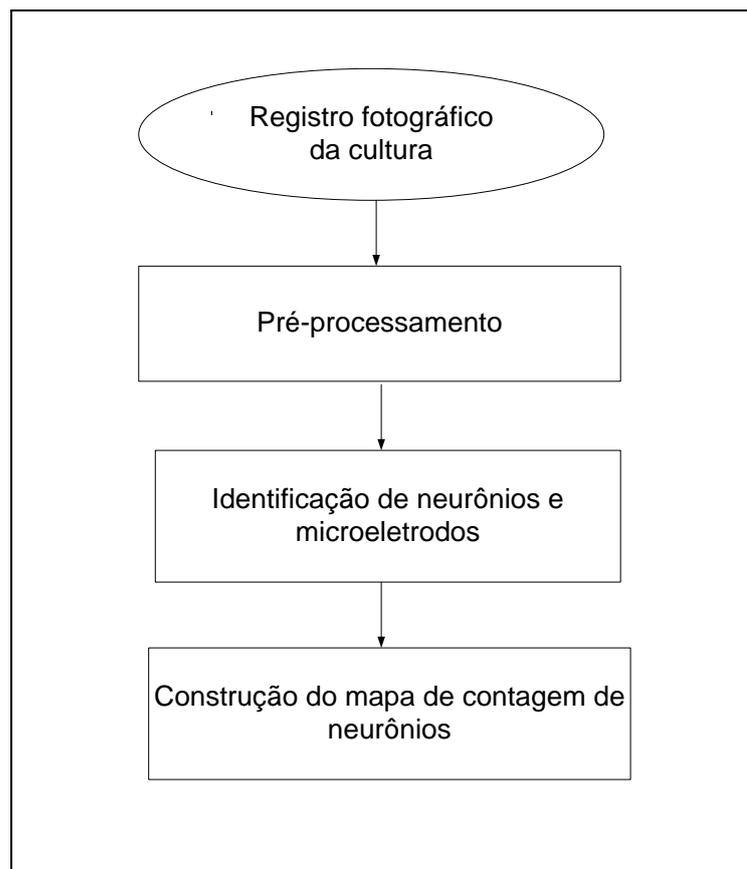


Figura 3.4 – Diagrama da metodologia de processamento de imagens no registro fotográfico da cultura *in-vitro* para a obtenção do mapa de contagem dos neurônios.

### 3.3.1 O Pré-processamento

Nesta etapa de pré-processamento, os registros fotográficos da cultura passam por uma correção de iluminação não homogênea, a qual é produzida durante o registro por quadrantes em alta resolução, da imagem da cultura em MEA, conforme detalhes na Seção 2.5. Nesse sentido, utiliza-se a Transformada *Bottom-Hat* (LOTUFO e AUDIGIER, 2008) e, a seguir, é aplicada a filtragem de mediana para a redução do ruído aleatório (GONZALEZ e WOODS, 2007).

Para o processo de junção dos quadrantes da imagem de cultura em MEA, utiliza-se o posicionamento equidistante dos microeletrodos como pontos de controle e a construção de uma grade de apoio ao processo.

### 3.3.2 Identificação de neurônios e microeletrodos

Considerando-se que este processo é desenvolvido para um experimento numa matriz de microeletrodos de 59 microeletrodos, o mapeamento das posições dos microeletrodos é realizado manualmente. Não obstante, para um maior número de experimentos, é possível automatizar este processo, a partir da aplicação da Transformada de Hough Circular (PENG e BALIJEPALLI, 2007).

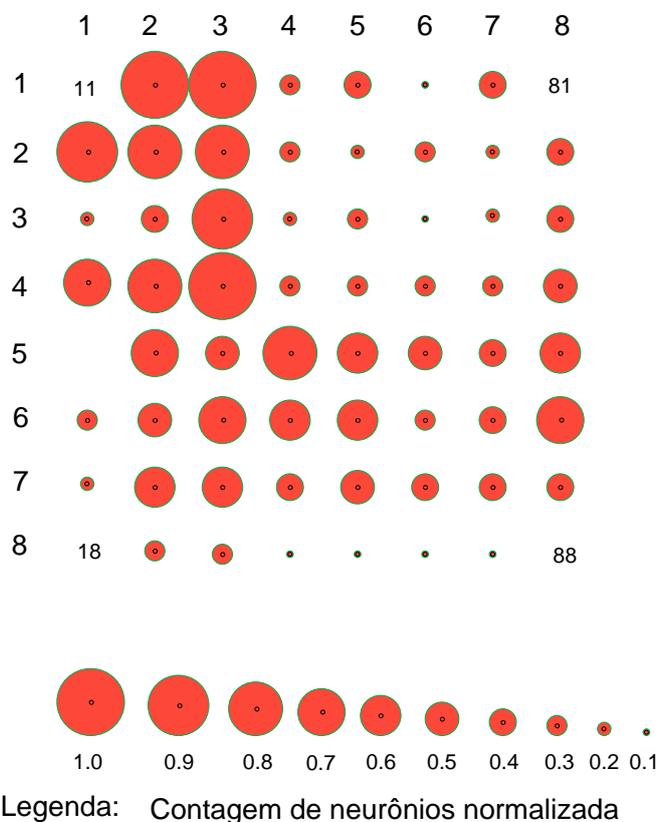
Para a identificação de neurônios utiliza-se a metodologia proposta em (MARI, 2015), resumido no seguinte. O fundo da imagem é separada dos objetos que formam a parte da cultura. Os componentes com áreas superiores ao limiar especificado são extraídos, e os demais removidos. Componentes conectados que representam agrupamentos de células sobrepostas ou muito próximas são separadas utilizando a transformada *watershed*. Finalmente, um método de classificação, baseado na morfologia dos objetos, é aplicado para separar os objetos segmentados em neurônios e artefatos, e em seguida elimina-se os artefatos. Normalmente os objetos arredondados são considerados neurônios.

### 3.3.3 Construção do Mapa de Contagem de Neurônios

Nesta etapa são demarcadas as sub-regiões adjacentes a cada microeletrodo e calculada a quantidade de neurônios para cada sub-região. A demarcação das sub-regiões é em forma de quadrados envolvendo os microeletrodos, sendo as

arestas dos quadrados equidistantes em relação a dois microeletrodos. Os vértices dos quadrados se posicionam equidistante a quatro microeletrodos. Os neurônios internos aos quadrados são associados aos respectivos microeletrodos.

O mapa de contagem de neurônios é construído, normalizando o resultado da contagem, e construindo círculos concêntricos aos microeletrodos, com o diâmetro proporcional à contagem, de forma similar ao mapa de atividades neuronais, descrito na Seção 3.2, e exemplificado na Figura 3.5. A contagem normalizada, CN, é tal que, se o número máximo de contagem entre todos os microeletrodos é  $C_{max}$ ,  $CN = 1$  para  $C_{max}$ . Quando o número de contagem é 0,  $CN = 0$ .



**Figura 3.5 – Exemplo de um mapa de contagem de neurônios.**

Para a construção do mapa de contagem de neurônios, é adotado um procedimento, com os passos seguintes (Algoritmo 3.2):

Algoritmo 3.2. Construção do mapa de contagem de neurônios.

- 1) Determinar as posições dos 59 microeletrodos de sinais e do microeletrodo de referência;
- 2) Enumeração das linhas e colunas da matriz;

- 3) Enumeração das posições dos cantos com as respectivas posições (11, 81, 18, 88);
- 4) Para cada microeletrodo  
{obter o número de contagem normalizado de neurônios;  
desenhar o círculo na respectiva posição com o diâmetro igual ao número normalizado}
- 5) Fim.

### 3.4 Metodologia para a Construção do Mapa de Distribuição Virtual de Neurônios

Nesta etapa é possível obter o mapa de distribuição virtual de neurônios, em função dos dois mapas obtidos pelas metodologias anteriores: mapa de atividades dos neurônios, a partir dos registros eletrofisiológicos; e mapa de contagem de neurônios, a partir da imagem fotográfica, conforme o diagrama da Figura 3.6.

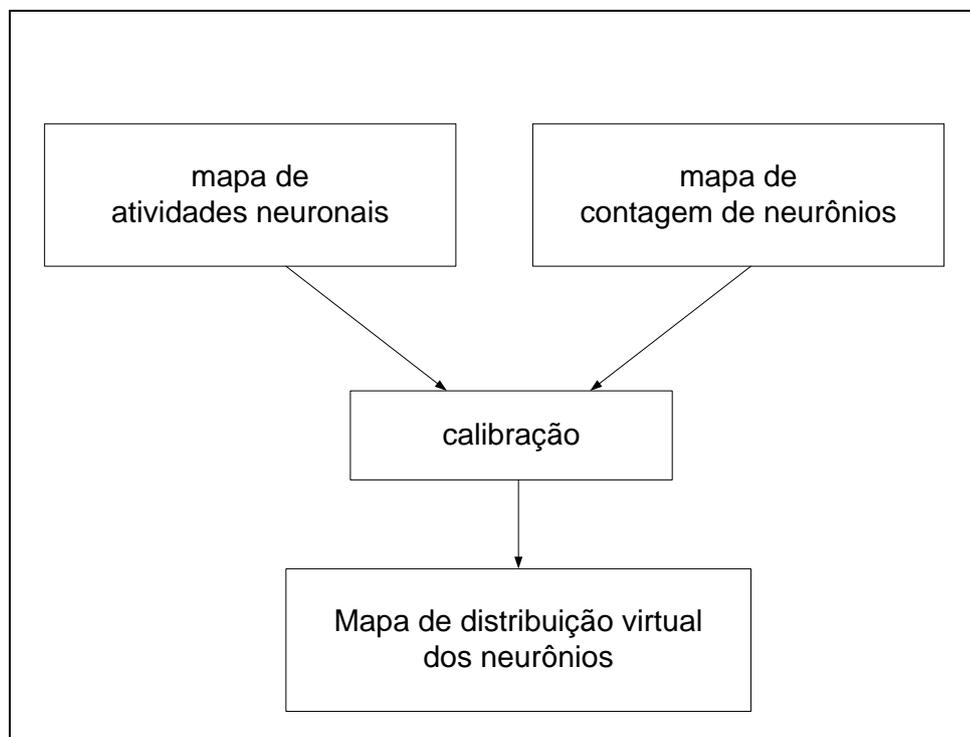


Figura 3.6 – Diagrama da metodologia de calibração para a obtenção do mapa de distribuição virtual dos neurônios.

Para a calibragem do sistema de construção do mapa de distribuição virtual de neurônios, conforme definida na Seção 3.2.4, é usada a contagem de neurônios normalizada obtido na Seção 3.3. Por exemplo, se a contagem máxima de neurônios,  $C_{max} = 40$ , a contagem normalizada,  $CN$ , é tal que,  $CN = 1$  para 40 neurônios e  $CN = 0$  para 0 neurônios. Por outro lado, tem-se a contagem normalizada de atividades em *spikes*,  $CS$ , e *bursts*,  $CB$ . Para o cálculo do número virtual de neurônios,  $VN$ , a partir do mapa de atividades neuronais em *spikes*, basta aplicar a equação  $VN = CS * 40$ ; e a partir do mapa de atividades neuronais em *bursts*,  $VN = CB * 40$ .

Uma vez obtido o número virtual de neurônios  $VN$ , para cada microeletrodo, é possível construir o mapa de distribuição virtual de neurônios, fazendo com que para cada sub-região, da MEA, correspondente a um microeletrodo específico, seja inserido aleatoriamente  $VN$  neurônios. A Figura 3.7 mostra um exemplo de mapa de distribuição virtual de neurônios.

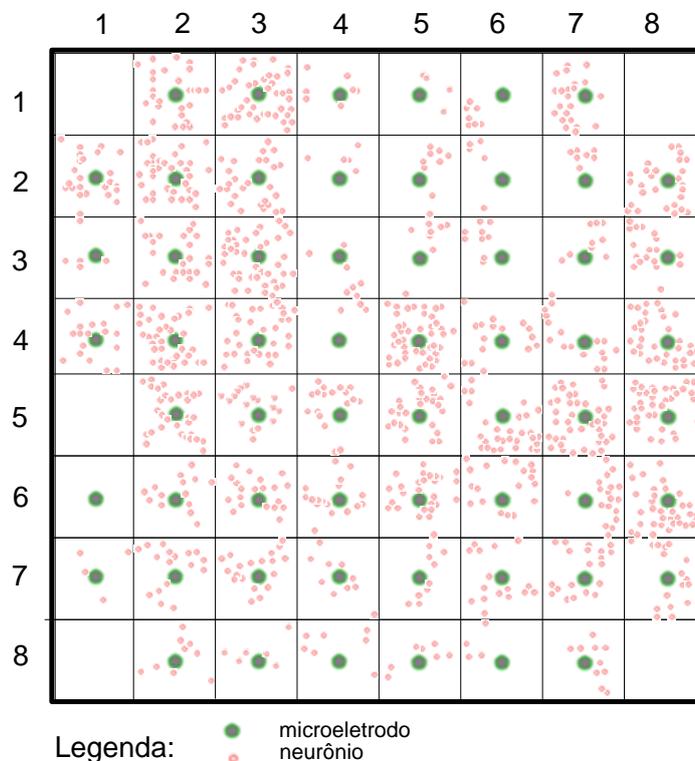


Figura 3.7 – Exemplo de um mapa de distribuição virtual de neurônios.

Para a construção do mapa de distribuição virtual de neurônios, é adotado um procedimento, com os passos seguintes (Algoritmo 3.3):

Algoritmo 3.3. Construção do mapa de atividades de neurônios.

- 1) Desenhar um quadriculado com 8 linhas e 8 colunas;
- 2) Determinar as posições dos 59 microeletrodos de sinais de desenhar os microeletrodos;
- 3) Enumeração das linhas e colunas da matriz;
- 4) Para cada microeletrodo  
{obter a estimativa do número virtual de neurônios;  
internamente ao quadrado respectivo, distribuir aleatoriamente os neurônios}
- 5) Fim.

### 3.5 A Análise de Componentes Independentes

Nesta seção é introduzido o conceito de Análise de Componentes Independentes (ICA, *Independent Component Analysis*), apresentando o modelo estatístico, sobre o qual o ICA é baseado, a sua definição, ambiguidades e consequências. Finalmente, mostra-se um exemplo de aplicação do ICA em sinais unidimensionais, para a resolução de problemas na separação cega de fontes (SCF).

#### 3.5.1 Modelo estatístico e definição

Considerando que  $\mathbf{S} = [S_1, S_2, \dots, S_M]^T$  é um vetor aleatório com  $M$  componentes/fontes estatisticamente independentes entre si, as fontes  $S_i$  serão chamadas de componentes independentes (FERREIRA, 2002). Assim, a função densidade de probabilidade (*fdp*) multivariada do vetor  $\mathbf{S}$  é dada pelo produto das  $M$  *fdps* marginais  $p(S_i)$  de todas as componentes independentes:

$$p(\mathbf{S}) = \prod_{i=1}^M p(S_i) = p(S_1)p(S_2) \dots p(S_M).$$

(1)

Supondo que sobre o vetor  $S$  seja aplicada uma transformação linear  $\mathbf{A}$ , sendo  $\mathbf{A}$  uma matriz de dimensão  $N \times M$ , obtém-se o vetor aleatório  $X = [X_1, X_2, \dots, X_N]^T$  com  $N$  componentes  $X_i$ , designadas aqui de observações:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\mathbf{S}.$$

(2)

Considerando-se o tipo de mistura linear definida como na Equação (2) e para efeitos de simplificação,  $N=M$ , ou seja, com o número de observações igual ao número de fontes, onde a matriz  $\mathbf{A}$  é quadrada. Assim, a Equação (3) será representada através de (JAMES e HESSE, 2005):

$$X = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \vdots \\ X_M \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11}S_1 + a_{12}S_2 + \dots + a_{1M}S_M \\ a_{21}S_1 + a_{22}S_2 + \dots + a_{2M}S_M \\ \vdots \\ a_{M1}S_1 + a_{M2}S_2 + \dots + a_{MM}S_M \end{bmatrix}.$$

(3)

Verifica-se que cada observação  $X_i$  é uma combinação linear de  $M$  componentes independentes  $S_j$ . Analisando-se as combinações lineares que formam as observações  $X_i$ , observa-se que estas não são estatisticamente independentes entre si. Da mesma forma, as componentes independentes  $S_j$  não são diretamente observáveis. De fato, tanto a matriz de mistura  $\mathbf{A}$  como as componentes independentes  $S_j$  são desconhecidas, sendo as observações  $X_i$  as únicas conhecidas.

Os coeficientes da combinação linear que geram  $X_i$ , constituem a linha  $i$  da matriz  $\mathbf{A}$ :

$$X_i = a_{i1}S_1 + a_{i2}S_2 + \dots + a_{iM}S_M = \sum_{j=1}^M a_{ij}S_j, \forall i \in \{1, \dots, M\}.$$

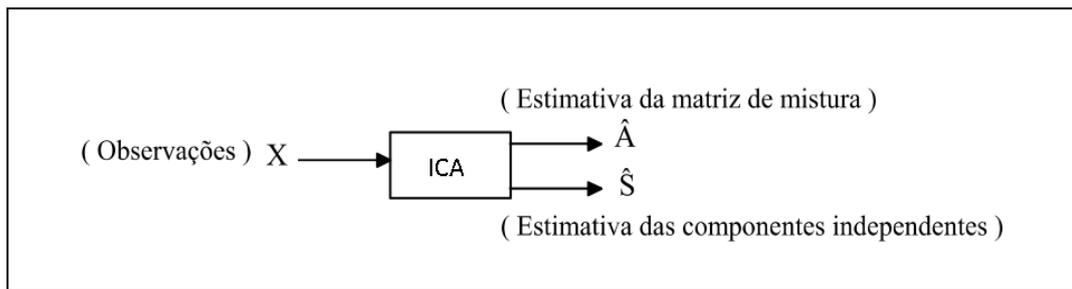
(4)

onde  $a_i = [a_{i1}, \dots, a_{iM}]^T$  é o vetor constituído pela linha  $i$  da matriz  $\mathbf{A}$ . Assim, a observação  $X_i$  resulta do produto interno de  $a_i$  por  $\mathbf{S}$ ,

$$X_i = a_i^T \mathbf{S}. \quad (5)$$

A técnica de estimação das componentes independentes  $\mathbf{S}$  e/ou da matriz de mistura  $\mathbf{A}$ , a partir do vetor de observações  $\mathbf{X}$ , considerando-se o modelo da Equação (2) supracitada, é denominada de Análise de Componentes Independentes (ICA).

A técnica ICA tem por finalidade realizar a estimação das fontes, pressupondo a sua independência estatística. A Figura 3.8 esquematiza o processo da estimação das componentes independentes usando ICA (FERREIRA, 2002).



**Figura 3.8 – Diagrama de blocos de estimação dos componentes independentes usando ICA.**

Analiticamente, a técnica ICA permite estimar a transformação linear  $\mathbf{W}$ , a qual, quando aplicada às observações  $\mathbf{X}$ , gera a estimativa de componentes estatisticamente independentes,  $\hat{\mathbf{S}}$ , conforme Equação (6):

$$\hat{\mathbf{S}} = \mathbf{W}\mathbf{X} = \mathbf{W}\mathbf{A}\mathbf{S}. \quad (6)$$

ou Equação (7):

$$\begin{bmatrix} \hat{S}_1 \\ \hat{S}_2 \\ \vdots \\ \hat{S}_M \end{bmatrix} = \mathbf{W} \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \vdots \\ X_M \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} W_{11}X_1 + W_{12}X_2 + \dots + W_{1M}X_M \\ W_{21}X_1 + W_{22}X_2 + \dots + W_{2M}X_M \\ \vdots \\ W_{M1}X_1 + W_{M2}X_2 + \dots + W_{MM}X_M \end{bmatrix} \quad (7)$$

Após a estimação de  $\mathbf{W}$ , pode-se obter a estimativa da matriz de mistura  $\mathbf{A} = \mathbf{W}^{-1}$ .

Dado que apenas se conhecem as observações  $\mathbf{X}$  e se pretende estimar a matriz de mistura  $\mathbf{A}$  e as componentes independentes,  $\hat{S}_i$ , não é possível uma solução analítica fechada para o ICA. A estimação da transformação linear  $\mathbf{W}$  é realizada através de algoritmos iterativos de otimização, os quais minimizam ou maximizam uma função de custo.

Na Figura 3.9 é ilustrada a transformação direta usando a matriz  $\mathbf{A}$  e a transformação inversa usando a matriz  $\mathbf{W}$ , ou seja, a aplicação do sistema de mistura e do sistema de separação. As componentes independentes ou fontes são combinadas linearmente, produzindo as observações  $\mathbf{X} = [X_1, \dots, X_M]^T$ , e essas observações são aplicadas à transformação linear  $\mathbf{W}$ , sendo obtidas as componentes independentes estimadas, designadas por  $\hat{\mathbf{S}} = [\hat{S}_1, \dots, \hat{S}_M]^T$ .

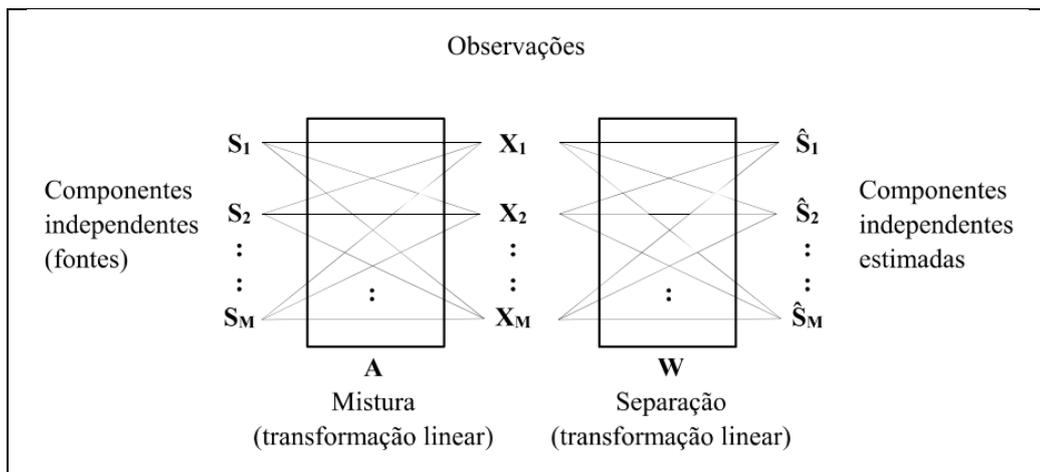


Figura 3.9 – Aplicação do sistema de mistura usando a matriz  $\mathbf{A}$  e do sistema de separação, usando a matriz  $\mathbf{W}$ . Adaptado de (FERREIRA, 2002).

### 3.5.2 Ambiguidades do modelo

Analisando-se a Equação (3), evidencia-se que cada observação é uma combinação linear das componentes independentes, conforme Equação (8):

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \vdots \\ X_M \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} \\ a_{21} \\ \vdots \\ a_{M1} \end{bmatrix} S_1 + \begin{bmatrix} a_{12} \\ a_{22} \\ \vdots \\ a_{M2} \end{bmatrix} S_2 + \cdots + \begin{bmatrix} a_{1M} \\ a_{2M} \\ \vdots \\ a_{MM} \end{bmatrix} S_M$$

(8)

No caso da Equação (8) é possível a constatação de duas ambiguidades no modelo do ICA (COMON, 1994):

- Escalonamento: as variâncias das componentes independentes não podem ser estimadas; de fato, efetuar a multiplicação das componentes independentes  $S_j$  por uma constante  $k$  e, simultaneamente efetuar a divisão da respectiva coluna da matriz  $A$ , pela mesma constante, não altera nenhuma observação  $X_i$ ;
- Permutação: a ordem das componentes independentes não pode ser estimada, dado que a troca da ordem dos termos da Equação (8) não altera nenhuma observação  $X_i$ .

Conseqüentemente, quando combinadas essas duas ambiguidades, é possível afirmar que as componentes independentes são estimadas a menos de um escalamento  $T$  e de uma permutação  $R$ .

$$\mathbf{S} = \mathbf{TRWX}.$$

(9)

Na Equação (9),  $\mathbf{R}$  é uma matriz de permutação, ou seja, para cada linha/coluna, existe apenas um elemento de valor 1, não existindo duas linhas/colunas iguais; onde,  $\mathbf{T}$  é uma matriz de escalonamento, com elementos diferentes de zero, ao longo da diagonal principal.

A chamada matriz de desempenho  $\mathbf{P} = \mathbf{TR}$  traduz a qualidade de separação das componentes independentes, refletindo as ambiguidades de estimação por ICA. Após uma reordenação e normalização, quanto mais próxima  $\mathbf{P}$  encontra-se da matriz identidade,  $\mathbf{I}_M$ , maior será a qualidade de separação. Quando  $\mathbf{P} = \mathbf{I}_M$ , sem reordenação nem normalização, gera-se uma separação ideal, sem ambiguidades das componentes  $\mathbf{S}$ , ou seja, mantendo-se a ordem pela qual foram combinadas e onde não foram utilizados fatores de escala.

Substituindo  $\mathbf{TR}$  por  $\mathbf{P}$ , na equação 9, obtém-se:

$$\mathbf{S} = \mathbf{TRWAS} = \mathbf{PWAS}.$$

(10)

Na separação, onde  $\mathbf{P} = \mathbf{I}_M$ , a matriz estimada  $\mathbf{W}$  é exatamente a inversa de  $\mathbf{A}$ . Em geral, essas duas ambiguidades da ICA não tem grande impacto nos resultados. Por outro lado, no escalonamento, através da multiplicação pela constante, preserva o formato dos sinais, não sendo de importância a ordem com que as componentes independentes ou fontes são estimadas, considerando-se que a finalidade é recuperar as fontes.

Na aplicação de ICA para a estimativa de componentes independentes em registro de microeletrodos da MEA, assume-se que os mesmos sejam uma mistura linear de sinais dos neurônios distribuídos ao longo da matriz. Isso seria uma aproximação, uma vez que o processo físico de transmissão de sinais no meio da cultura, é resultante de uma transmissão de corrente em forma de bipolos elétricos.

### 3.5.3 Separação cega de fontes

As Equações (6) e (7) estabelecem a ligação entre a técnica ICA e o problema de separação cega de fontes (SCF) (FERREIRA, 2002). Entende-se por separação cega de fontes ao processo através do qual é possível obter fontes originais  $\mathbf{S}$ , a partir de um conjunto de observações  $\mathbf{X}$ . Este processo é considerado como separação cega devido a não possuir conhecimento prévio sobre as distribuições de probabilidade das fontes  $\mathbf{S}$  e, por ser a matriz  $\mathbf{A}$  desconhecida.

O desenvolvimento da técnica ICA teve como objetivo inicial resolver o problema da SCF, e atualmente é o método mais utilizado para essa finalidade, sendo os termos ICA e SCF, considerados sinônimos na literatura. Um exemplo muito conhecido de SCF é o denominado *cocktail-party*, no qual em um salão encontram-se pessoas conversando simultaneamente e com música de fundo. O som da sala é capturada por dois microfones instalados em locais diferentes. O objetivo do uso da técnica ICA neste caso é a separação dos sinais da fala e da música registrados através dos microfones (COMON, 1994).

Considerando-se o modelo ICA, o problema é representado conforme Equação (11), considerando-se  $\mathbf{X}$  o vetor representando as amostras de sons registrados nos dois microfones:

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11}S_1 + a_{12}S_2 \\ a_{21}S_1 + a_{22}S_2 \end{bmatrix}. \quad (11)$$

As constantes  $a_{ij}$  representam a atenuação/amplificação aplicada sobre as fontes  $S_1$  e  $S_2$ . A Figura 3.10, ilustra com sinais artificiais, a aplicação da técnica ICA na resolução do problema SCF, exemplificando as duas ambiguidades do ICA. Os sinais são mostrados no domínio do tempo com as concretizações conjuntas. Utilizou-se para tal finalidade a matriz de mistura original, Equação (12):

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} -1 & 0.5 \\ 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (12)$$

Na Figura 3.10 constata-se que  $S_1$  e  $S_2$  são independentes e,  $X_1$  e  $X_2$  dependentes. As componentes são estimadas a menos de um fator de escala, consequência das ambiguidades discutidas anteriormente. Assim, a matriz de mistura estimada é:

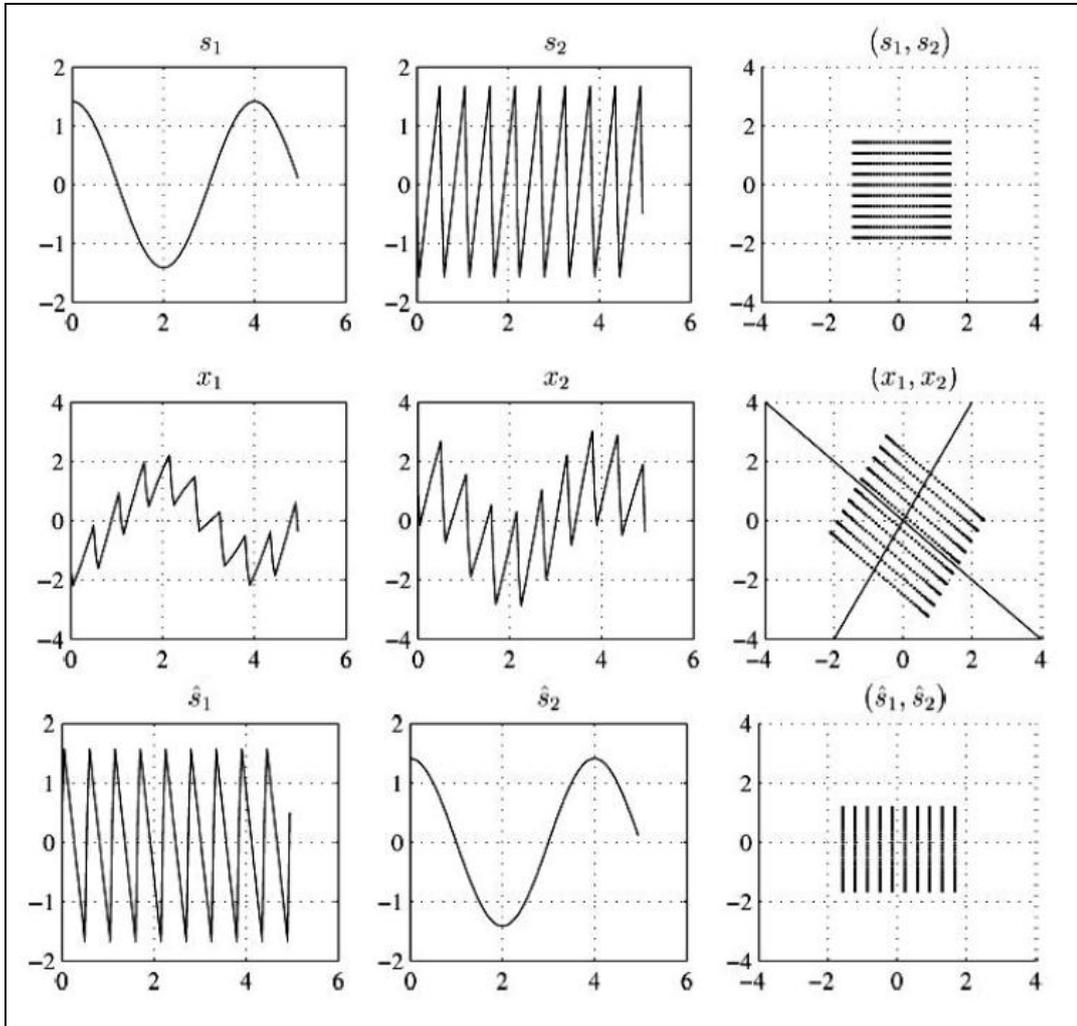
$$\hat{\mathbf{A}} = \begin{bmatrix} -0.5003 & -0.9999 \\ -0.9996 & 1.0001 \end{bmatrix} \quad (13)$$

Comparando-se com a matriz de mistura na Equação (13), nota-se que as colunas foram modificadas, sendo a primeira coluna da matriz  $\hat{\mathbf{A}}$  multiplicada por  $-1$ , ou seja, a primeira componente estimada  $\hat{S}_1$  sofreu inversão de fase, como observados nos sinais estimados da Figura 3.10.

Quanto a separação de sinais de áudio, estas ambiguidades não constituem problemas. Foi observada uma perda na informação da amplitude original, porém os sinais foram reconhecidos. Por outro lado, a inversão de fase não foi ouvida pelos indivíduos. Portanto, a ordem de estimação não influenciou na obtenção de sinais separados. Assim, a matriz de desempenho  $\mathbf{P}$  estimada é dada pela Equação (14):

$$\mathbf{P} = \begin{bmatrix} 0.0003 & 0.9999 \\ -0.9999 & 0.0002 \end{bmatrix} \approx \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ -1 & 0 \end{bmatrix}. \quad (14)$$

onde os valores dos elementos de  $\mathbf{P}$  são próximos de 0 na diagonal principal e próximos de 1 e -1 na diagonal secundária, mostrando que o desempenho foi satisfatório.



**Figura 3.10 – Aplicação da técnica ICA ao problema SCF, onde os diagramas das 2 colunas primeiras mostram os sinais no domínio do tempo e da terceira coluna as concretizações conjuntas. Nos diagramas da linha superior observam-se duas componentes independentes  $s_1$  e  $s_2$ ; da linha intermediária, as duas observações  $x_1$  e  $x_2$ , onde as concretizações formam um paralelograma de arestas, paralelas às retas definidas pelas colunas da matriz  $\mathbf{A}$ ; e na linha inferior, as componentes estimadas  $\hat{s}_1$  e  $\hat{s}_2$ . Adaptado de Ferreira (Ferreira, 2002).**

### 3.5.4 Técnicas de obtenção de ICA

O que a técnica de ICA busca é a não Gaussianidade. Essa informação de estatística de alta ordem (i.e., informação não contida na média e na matriz de covariância) pode ser usada, e portanto, as componentes independentes podem ser

realmente separadas, o que não é possível, em técnicas como a PCA (*Principal Component Analysis*). A descrição apresentada a seguir é baseada no texto de Hyvärinen et al. (HYVÄRINEN, 2001), onde são encontradas todas as definições dos termos usados nesta seção.

Frequentemente, os dados são processados por um processo chamado de branqueamento (*whitening*), que elimina a informação de segunda ordem, que é contida na matriz de covariância, e facilita a obtenção da informação de alta ordem:

$$\mathbf{Z} = \mathbf{V}\mathbf{X} = (\mathbf{V}\mathbf{A})\mathbf{S}. \quad (15)$$

A transformação linear  $\mathbf{V}\mathbf{A}$  no modelo é então reduzida a uma transformação ortogonal, uma rotação. Assim, busca-se por uma matriz ortogonal  $\mathbf{W}$  tal que  $\hat{Y} = \mathbf{S} = \mathbf{W}\mathbf{Z}$  seja uma boa estimativa das componentes independentes.

Várias abordagens podem ser adotadas para a informação de alta ordem. Uma abordagem intuitiva é encontrar combinações lineares de máxima não-Gaussianidade, como motivado pelo teorema do limite central. Somas de variáveis aleatórias não-Gaussianas tendem a ser mais próximas às Gaussianas do que as originais. Portanto, se tomarmos uma combinação

$$Y = \sum_i w_i z_i \quad (16)$$

de variáveis observadas branqueadas, essa combinação será maximalmente não-Gaussiana, se ela é igual a uma das componentes independentes. A não-Gaussianidade pode ser medida por *kurtosis* ou por aproximações de *negentropia* (FERREIRA, 2002). Esse princípio mostra uma aproximação entre ICA e pesquisa de projeções, em que as projeções mais não-Gaussianas são consideradas como as mais interessantes. A teoria de estimação clássica fornece um outro método de estimação de ICA: estimação de máxima verossimilhança. Uma alternativa da teoria da informação é minimizar a informação mútua das componentes. Todos esses princípios são essencialmente equivalentes ou pelo menos proximamente relacionados. O princípio da máxima não-Gaussianidade tem a vantagem adicional de mostrar como estimar as componentes independentes uma a uma. Isso é possível por uma ortogonalização das estimações das componentes independentes

individuais. Com todos os métodos de estimação, otimiza-se as funções de expectância das funções não-quadráticas, para obter acesso a informação de alta ordem. Funções não-quadráticas normalmente não podem ser maximizadas simplesmente resolvendo as equações: algoritmos numéricos sofisticados são necessários. A escolha do algoritmo de ICA é basicamente uma escolha entre algoritmos em *on-line* ou *batch*. No caso *on-line*, os algoritmos são obtidos por métodos de gradiente estocástico. Se todas as componentes independentes são estimadas em paralelo, o algoritmo mais popular nessa categoria é a probabilidade ascendente de gradiente natural (*natural gradient ascent of likelihood*). A equação fundamental neste método é:

$$W \leftarrow W + \mu [I + g(y)y^T]W \quad (17)$$

onde a função não-linear  $g$  é determinada da densidade logarítmica (*log-densities*) das componentes independentes, conforme Algoritmo 3.4.

#### Algoritmo 3.4

1. Centrar os dados fazendo a sua média igual a zero
2. Escolher uma matriz  $B$  de separação inicial (por exemplo, aleatória). Escolher os valores iniciais de  $\gamma_i$ ,  $i = 1, \dots, n$ , ou aleatoriamente ou usando informação prévia. Escolher a taxa de aprendizado  $\mu$  e  $\mu_\gamma$ .
3. Computar  $y = Bx$ .
4. Se as não linearidades não são fixas a priori:
  - (a) Atualizar  $\gamma_i = (1 - \mu_\gamma) \gamma_i + \mu_\gamma E\{-\tanh(y_i)y_i + (1 - \tanh(y_i)^2)\}$ .
  - (b) Se  $\gamma_i > 0$ , definir  $g_i$  como  $g^+(y) = -2\tanh(y)$ , caso contrario definir como  $g^-(y) = \tanh(y) = y$ .
5. Atualizar a matriz de separação por
 
$$B \leftarrow B + \mu [I + g(y)y^T]B$$
 onde  $g(y) = (g_1(y_1), \dots, g_n(y_n))^T$ .
6. Se não convergir ir para o passo 3.

No caso mais usual, onde as computações são feitas no modo *batch*, são disponíveis algoritmos mais eficientes. O FastICA é um algoritmo *batch* muito

eficiente que pode derivar da iteração em ponto fixo ou como uma aproximação do método de Newton. A iteração fundamental do FastICA é, para uma linha  $w$  de  $\mathbf{W}$ :

$$w \leftarrow E \{ z g (w^T z) \} - E \{ g' (w^T z) \} w \quad (18)$$

onde a não linearidade  $g$  pode ser quase uma função suave, e  $w$  pode ser normalizada para a norma unitária a cada iteração. FastICA pode ser usada para estimar as componentes ou uma por uma, encontrando direções não gaussianas maximais (Algoritmo 3.5) ou em paralelo, por maximização da não-Gaussianidade da probabilidade (Algoritmo 3.6).

#### Algoritmo 3.5

1. Centrar os dados fazendo a sua média igual a zero
2. Branquear os dados para obter um  $z$ .
3. Escolher  $m$ , o número de componentes independentes (CI) para estimar. Iniciar o contar para  $p \leftarrow 1$ .
4. Escolher um valor inicial de norma unitária para  $w_p$ , por ex., aleatoriamente.
5. Fazer  $w_p \leftarrow E \{ z g (w_p^T z) \} - E \{ g' (w_p^T z) \} w_p$ , onde  $g$  é definida, por ex., como  $g_1(y) = \tanh(a_1 y)$ ,  $g_2(y) = y \exp(-y^2/2)$  ou  $g_3(y) = y^3$ .
6. Fazer a seguinte ortogonalização:

$$w_p \leftarrow w_p - \sum_{j=1}^{p-1} (w_p^T w_j) w_j$$

7. Fazer

$$w_p \leftarrow w_p / \|w_p\|$$

8. Se  $w_p$  não convergiu vai para o passo 5.
9. Fazer  $p \leftarrow p + 1$ . Se  $p \leq m$  vai para o passo 4.

### Algoritmo 3.6

1. Centrar os dados fazendo a sua média igual a zero. Computar a matriz de correlação  $C = E\{xx^T\}$ .
2. Escolher uma matriz de separação inicial (por ex. aleatoriamente).
3. Computar

$$y = Bx$$

$$\beta_i = -E\{y_i g(y_i)\}, \text{ para } i = 1, \dots, n$$

$$\alpha_i = -1/(\beta_i + E\{g'(y_i)\}), \text{ para } i = 1, \dots, n$$

4. Atualizar a matriz de separação usando

$$B \leftarrow B + \text{diag}(\alpha_i)[\text{diag}(\beta_i) + E\{g(y)y^T\}]B$$

5. Decorrelacionar e normalizar usando

$$B \leftarrow (BCB^T)^{-1/2}B$$

6. Se não convergir, ir para o passo 3.

Na prática, antes da aplicação desses algoritmos, pré-processamentos adequados são necessários. Além disso, para a centralização e enbranquecimento, é frequentemente sugerido o uso do PCA para reduzir a dimensão de dados, ou as vezes, filtragem, tomando a média em movimento (*moving average*).

Na presente tese de doutorado, foi usado o algoritmo de FastICA no modo *batch*, Algoritmo 3.6.

## 3.6 Processamento de Imagens

Nesta seção são descritas as técnicas de processamento de imagens utilizadas durante as diferentes etapas do presente trabalho de tese. O processamento de imagens é utilizado para o melhoramento e análise de imagens

fotográficas de microscopia da cultura de neurônios em MEA, com a finalidade de reduzir ruídos e corrigir as imperfeições.

### 3.6.1 Filtragem pela mediana

A característica desta filtragem é conseguir reduzir o ruído e ao mesmo tempo preservar a forma original dos objetos (GONZALEZ; WOODS, 2007). Para o cálculo da mediana, uma máscara é aplicada com o centro no *pixel* de aplicação. A seguir, verifica-se qual o valor correspondente à mediana entre todos os pixels envolvidos pela máscara, e esse valor é atribuído ao *pixel*. Essa verificação consiste na construção de uma lista ordenada dos *pixels* envolvidos pela máscara e na identificação do elemento central.

### 3.6.2 Filtragem por suavização Gaussiana

A filtragem por suavização Gaussiana permite a remoção do ruído de altas frequências mediante a convolução da imagem original com a função Gaussiana,  $G(i,j)$ , definida pela Equação 19 (DA FONTOURA e CESAR JR , 2010),

$$G(i,j) = \exp\left(-\frac{i^2+j^2}{2a^2}\right), \quad (19)$$

sendo que  $a$  é o parâmetro de espalhamento da Gaussiana. Conforme  $a$  aumenta, a Gaussiana se torna maior no espaço, aumentando assim o efeito de borramento e suavização na imagem.

### 3.6.3 Normalização de histograma

O histograma de uma imagem em níveis de cinza pode ser computado como uma função  $p(r_k)$ , definida pela Equação 20,

$$p(r_k) = \frac{n_k}{n} \quad (20)$$

onde  $n_k$  é o número de ocorrências do pixel com o nível de cinza  $r_k$  e  $n$  é o número total de pixels na imagem. O histograma de uma imagem reflete a probabilidade da ocorrência de um determinado nível de cinza nos pixels de uma imagem e fornece informações sobre o contraste da imagem (GONZALEZ; WOODS, 2007).

A forma mais simples de melhorar o contraste em uma imagem é por meio da normalização do seu histograma, que faz com que a informação de intensidade dos pixels seja distribuída ao longo de todo o intervalo de valores válido para aquela imagem, por exemplo, [0, 255] em imagens de 8 bits (TELEA, 2014). Isso é realizado por meio da Equação 21,

$$I'(x) = \frac{x - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \times 255 \quad (21)$$

onde  $I_{min}$  é a menor intensidade da imagem original e  $I_{max}$ , a maior.

### 3.6.4 Separação da imagem de fundo

O Processo de segmentação de imagens consiste em dividir os *pixels* de uma imagem em *pixels* de objetos (*foreground*) e *pixels* de fundo (*background*). Grupos conectados de *pixels* pertencentes a um mesmo objeto são denominados componentes conectados (GONZALEZ e WOODS, 2008), (TELEA, 2014).

A segmentação por limiarização separa os *pixels* de objeto dos *pixels* de fundo, em uma imagem de intensidades,  $I$ , por meio da definição de um limiar  $T$ , de forma que os *pixels* com intensidade menor ou igual a  $T$  sejam rotulados com 0 e os maiores rotulados com 1, como mostra a Equação 22,

$$B(x, y) = 1, \text{ se } I(x, y) > T \wedge 0, \text{ se } I(x, y) \leq T \quad (22)$$

onde  $B$  é a imagem binária resultante. No caso do valor de  $T$  ser o mesmo para todos os *pixels* da imagem, a abordagem é denominada limiar global. Já, quando  $T$  varia de acordo com alguma propriedade do *pixel*  $p$  que está sendo processado, tem-se o limiar dinâmico (GONZALEZ e WOODS, 2008), (GONZALEZ, WOODS e EDDINS, 2010).

Métodos baseados em agrupamento (*clustering*) são utilizados para segmentação de imagens por meio da classificação não supervisionada dos vetores de características que representam cada um dos *pixels* da imagem (JAIN., 1999). Os algoritmos *k-means* (DUDA, HART e STORK, 2006) e *fuzzy C-means* (BEZDEK, 1981) são dois algoritmos de agrupamento muito utilizados para essa tarefa.

### 3.6.5 O método de Otsu para separação da imagem de fundo

O método de Otsu (OTSU, 1975) baseia-se no histograma da imagem para definir um limiar  $k$  que maximiza a variância entre as classes de *pixels*. Primeiro, o método calcula o histograma normalizado da imagem. Seja  $L$  o número total de valores que os *pixels* podem assumir, o método de Otsu define um limiar  $k$  que define duas classes, sendo  $C_0$  o conjunto de *pixels* que possuem níveis de cinza  $[0, 1, \dots, k-1]$ , e  $C_1$  é o conjunto de *pixels* com níveis de cinza  $[k, k+1, \dots, L-1]$ . A escolha de  $k$  é realizada de forma a maximizar a variância entre as classes,  $\sigma_B^2$ , por meio da Equação 23,

$$\sigma_B^2 = \omega_0(\mu_0 - \mu_T)^2 + \omega_1(\mu_1 - \mu_T)^2 \quad (23)$$

em que:

$$\begin{aligned} \omega_0 &= \sum_{q=0}^{k-1} p_q(r_q) \\ \omega_1 &= \sum_{q=k}^{L-1} p_q(r_q) \\ \mu_0 &= \sum_{q=0}^{k-1} qp_q(r_q) / \omega_0 \\ \mu_1 &= \sum_{q=k}^{L-1} qp_q(r_q) / \omega_1 \\ \mu_T &= \sum_{q=0}^{L-1} qp_q(r_q) \end{aligned}$$

onde  $p_q(r_q)$  é o histograma normalizado da imagem considerando os *pixels* com intensidade  $r_q$ ;  $\omega_0$  é a probabilidade de um pixel ser atribuído à classe  $C_0$  e  $\omega_1$  é a

probabilidade de um pixel pertencer à classe  $C_1$ ;  $\mu_0$  é o valor médio da intensidade dos pixels atribuídos à classe  $C_0$  e similarmente,  $\mu_1$  é o valor médio dos *pixels* da classe  $C_1$ ; e  $\mu_T$  é o valor médio global dos *pixels* de toda a imagem.

### 3.6.6 Filtragem morfológica

A morfologia matemática fornece um conjunto de operações úteis em muitas aplicações de processamento de imagens como filtragem, segmentação e extração de características. De maneira geral, as operações da morfologia matemática processam os objetos contidos em uma imagem de acordo com alguma comparação entre estes e um elemento estruturante (LOTUFO, 2008). As transformadas *Top-Hat*, *Bottom-Hat* e *watershed* pertencem ao campo da morfologia matemática (SERRA, 1984).

### 3.6.7 As transformadas *Top-Hat* e *Bottom-Hat*

Combinando a subtração de imagens com aberturas e fechamentos são produzidas as transformadas conhecidas como *Top-Hat* e *Bottom-Hat*.

A transformada *Top-Hat* de uma imagem binária  $A$  por um elemento estruturante  $B$  consiste em subtrair a abertura morfológica da imagem  $A$  da própria imagem (Equação 24).

$$A \triangleright B = A - (A \circ B) \quad (24)$$

A transformada *Top-Hat* pode ser utilizada para corrigir a iluminação não uniforme realçando os objetos que casam com o elemento estruturante  $B$ , ao mesmo tempo, suprimindo objetos que não casam  $B$  (LOTUFO, 2008).

Analogamente, define-se a transformada *Bottom-Hat* de uma imagem binária  $A$  por um elemento estruturante  $B$ , pelo fechamento morfológico da imagem  $A$  com a subtração da própria imagem  $A$  (Equação 25).

$$A \triangleleft B = (A * B) - A \quad (25)$$

### 3.6.8 A transformada *watershed*

A transformada *watershed* (VINCENT e SOILLE, 1991), (BEUCHER e MEYER, 1992), (BELAID e MOUROU, 2011) considera a imagem de entrada como uma superfície topográfica e simula a inundação dessa superfície a partir de cada um dos seus mínimos regionais. As barragens (*watershed lines*), são construídas para impedir que as águas provenientes de mínimos regionais distintos se encontrem. As superfícies dos lagos formadas pelas *watershed lines* recebem o nome de *catchment basins* e representam as regiões segmentadas na imagem. O processo de inundação termina quando toda a superfície topográfica estiver submersa e apenas as *catchment basins* e as *watershed lines* estiverem visíveis (ADIGA e CHAUDHURI, 2001), (LOTUFO, 2008).

## 3.7 Cultura de neurônios 371

Nesta seção é descrito um experimento sobre coleta de dados eletrofisiológicos realizados na Universidade de Gênova, e sobre o processamento de imagens fotográficas da respectiva cultura de neurônios. O processamento das imagens fotográficas para a segmentação e registro dos neurônios e microeletrodos, foi realizado por João Fernando Mari, conforme descrito por Saito (SAITO e MARI, 2013).

A cultura de neurônios *in-vitro* identificado pelo número 371, foi realizada com o objetivo de registrar atividades eletrofisiológicas em MEA, por Danilo Roman Campos, graduando em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia, durante os dias 29/12/2006 a 19/01/2007, em treinamento científico, no Grupo de Bionanotecnologia e Neuroengenharia (*Neuroengineering and Bionanotechnology group*) na Universidade de Gênova, Itália, orientado por João Batista Destro Filho, professor da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia.

Neurônios de embriões de rato Wistar de 18 dias, foram extraídos, após anestesia, de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo Comitê de Ética da

Universidade de Genova. Detalhes de preparo da cultura podem ser encontrados no artigo de Novellino (NOVELLINO e CHIAPPALONE, 2003).

Para o registro de sinais eletrofisiológicos usando o sistema MEA60, o experimento foi conduzido como segue: os neurônios cultivados *in-vitro* em MEA foram conectados a um banco de 59 amplificadores (cada um associado a um microeletrodo), montado em estágios de pré-amplificação e amplificação, com um total de ganho de 1200 vezes. Um regulador de temperatura, um computador pessoal com uma placa PCI para aquisição de dados com monitoração em tempo real, um microscópio invertido, uma mesa anti-vibratória e uma gaiola de Faraday foram usados. Os dados foram monitorados e registrados usando um *software* comercialmente disponível MC Rack do sistema MEA60 (MULTICHANNEL SYSTEM, 2015). Cada vez que os sinais foram registrados, a MEA com a cultura de neurônios *in-vitro* foi removido de uma incubadora com CO<sub>2</sub> e colocado no aparato de aquisição de sinais. Após 20 minutos de posicionamento da cultura no aparato, tempo suficiente para a adaptação das células ao novo ambiente, as medidas foram iniciadas. Quatro registros consecutivos de atividades espontâneas de neurônios, cada um de 5 minutos, foram obtidos, totalizando 20 minutos de registro. As medidas foram feitas nos DIVs 25, 29, 32, 36, 39, 42, 46.

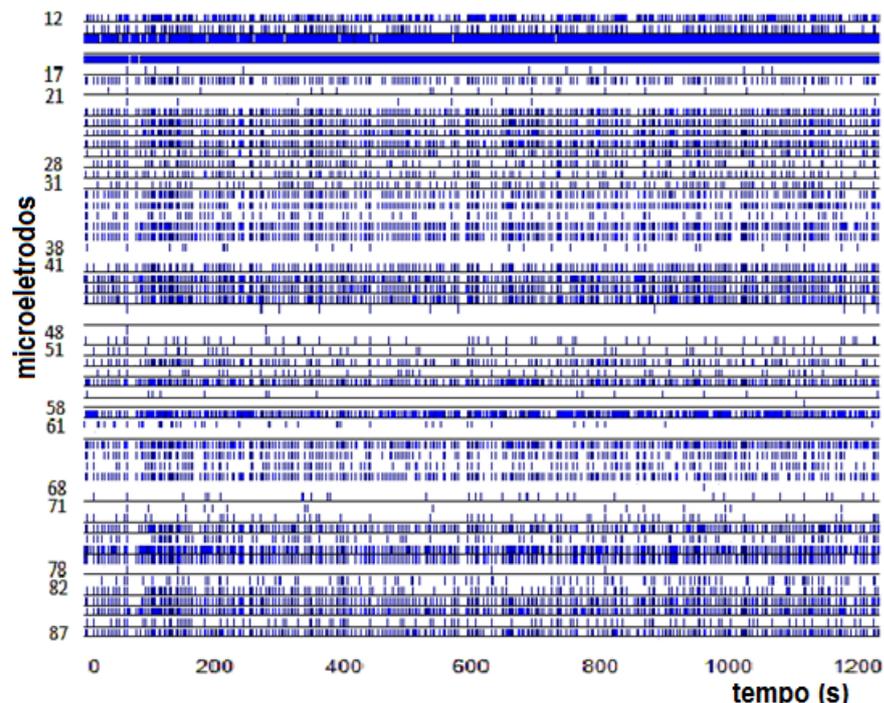


Figura 3.11 – Detecção de spikes no experimento 371, DIV 39, num registro de 20 minutos.

A Figura 3.11 mostra o resultado de processamento dos sinais dos microeletrodos medidos no DIV 39, após a detecção de spikes. O eixo horizontal corresponde ao tempo em segundos, e o eixo vertical, aos *spikes* obtidos. São mostradas 59 linhas, sendo a primeira denotada por 12 e a última, 87. O dígito da esquerda dessa denotação corresponde à coluna e o dígito da direita corresponde à linha, da MEA. Por motivos de espaçamento, apenas os microeletrodos do início e do fim de uma coluna foram explicitados na Figura 3.11. Em cada linha, é possível ver pequenos traços verticais, que correspondem à ocorrência de *spikes*.

### **3.7.1 Identificação da distribuição dos neurônios no arranjo de microeletrodos.**

As imagens fotográficas da cultura foram tomadas no DIV 38, usando um microscópio convencional Olympus BV51M, com câmera Camedia C-7070, com resolução de 3.1 *megapixels*. Seis imagens foram tomadas de diferentes regiões de grupos de microeletrodos, usando lentes objetivas com *zoom* de 10 vezes. Para o processamento de imagens, a imagem foi numerada do topo para a base, e da esquerda para a direita, como é mostrado na Figura 3.12.

### **3.7.2 Segmentação de neurônios**

O seguinte procedimento foi aplicado para cada uma das 6 imagens da Figura 3.12 para segmentar as células neuronais, usando um procedimento similar ao descrito por Mari et al. (MARI, 2009). Para reduzir o ruído, foi aplicado o filtro de borrimento Gaussiano, seguido de normalização de histograma, para melhorar o contraste. Os neurônios foram separados da imagem de fundo com a aplicação de uma operação de limiar. Assim, os *pixels* com intensidade maior que o limiar foram consideradas neurônios. As operações foram realizadas usando *software* ImageJ (LAMBERT , MARIAM e SUSAN , 2010).

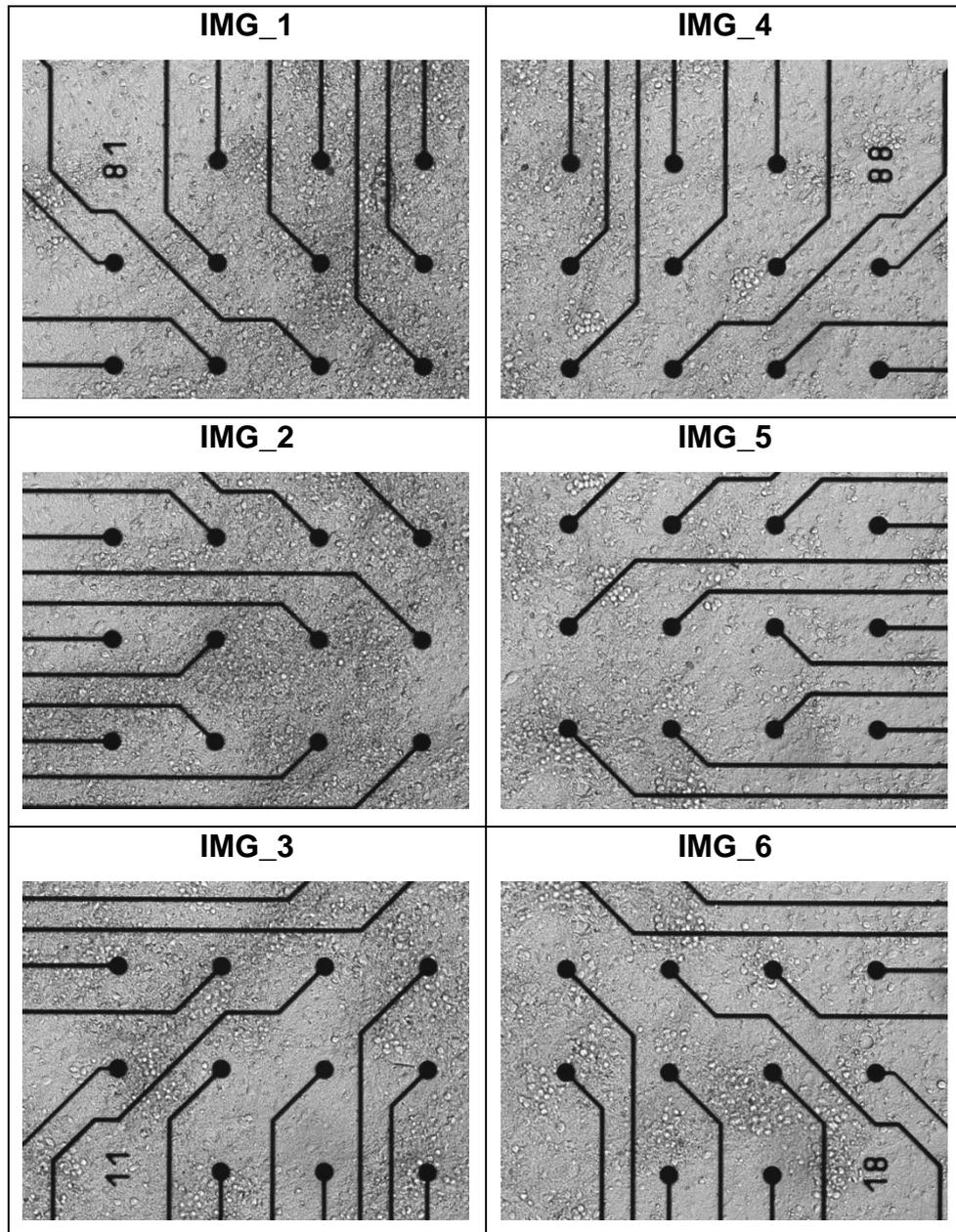


Figura 3.12 – Seis imagens que compõem uma imagem completa da cultura 371.

### 3.7.3 Registro de imagens

As seis imagens de culturas *in-vitro* de MEA (Figura 3.12) e os resultados do processo de segmentação foram usados no processo de registro de imagens, para compor uma imagem original completa da cultura, e uma imagem completa dos neurônios. O registro de imagens é um processo de sobreposição de mesmas cenas de imagens, onde os pontos em comum são chamados de pontos de controle, para compor uma imagem maior (ZITOVA e FLUSSER, 2003). No nosso caso, a técnica de registro de imagens é usada na intersecção de regiões de duas imagens, onde

---

alguns microeletrodos são vistos em comum, para a junção de duas imagens numa única imagem. O comando *cpselect* do MATLAB (*Control Point Selection Tool*) habilita a interface gráfica a selecionar interativamente, os pontos de controle entre as duas imagens.

Neste trabalho, os pontos de controle foram obtidos das imagens originais e os mesmos pontos foram também usados para as imagens segmentadas de neurônios. Como todas as imagens foram obtidas com o mesmo *zoom* de 10 vezes e posição de câmera sem rotação, somente a operação de translação (GONZALEZ, WOODS e EDDINS, 2010) foi necessária para o registro. O deslocamento (x,y) necessário para a operação de translação foi calculado como a média aritmética dos pontos de controle obtidos usando o comando *cpselect*, para reduzir o erro de registro.

As seis imagens foram registradas em pares, primeiro IMG\_1 e IMG\_2 foram processados produzindo IMG\_12; em seguida IMG\_12 e IMG\_3, produziram IMG\_123, que corresponde ao lado esquerdo da imagem completa. Para a obtenção do lado direito da imagem, IMG\_4 e IMG\_5 foram processadas, produzindo IMG\_45, que foi posteriormente processada com IMG\_6 produzindo a imagem IMG\_456, que corresponde ao lado direito da imagem completa. Finalmente, IMG\_123 e IMG\_456 foram processadas resultando na imagem completa identificada como IMG\_REG.

O procedimento de processamento e registro de imagens descrito foi aplicado para os dois conjuntos de imagens: as imagens originais, e as imagens de neurônios segmentados, gerando, duas imagens completas: a imagem original composta e a de neurônios segmentados. Usando a operação morfológica de abertura (GONZALEZ E WOODS, 2008) foi então aplicada na imagem de neurônios segmentados, para remover objetos com tamanho menor que o valor limiar, definido pelo usuário. Neste experimento, objetos com área menor que 7 *pixels* foram considerados falso positivos e, portanto, removidos da imagem registrada.

A imagem gerada do registro de imagens originais (Figura 2.8a) foi usada para obter as posições dos microeletrodos. Os 59 microeletrodos (o microeletrodo 15 não é visível) foram segmentados manualmente usando o *software* GIMP, e como resultado, uma imagem binária contendo os microeletrodos e a imagem de fundo foi gerada. Após o registro, todas as imagens resultantes foram rotacionadas 90<sup>o</sup> em direção horária, para permitir com que a MEA fosse visualizada com o eletrodo de controle posicionado no lado esquerdo, de acordo com a numeração padrão. As

imagens finais são mostradas na Figura 3.13: a) imagem original completa; b) imagem completa dos microeletrodos; c) imagem completa dos neurônios; e d) imagem completa dos eletrodos e dos neurônios.

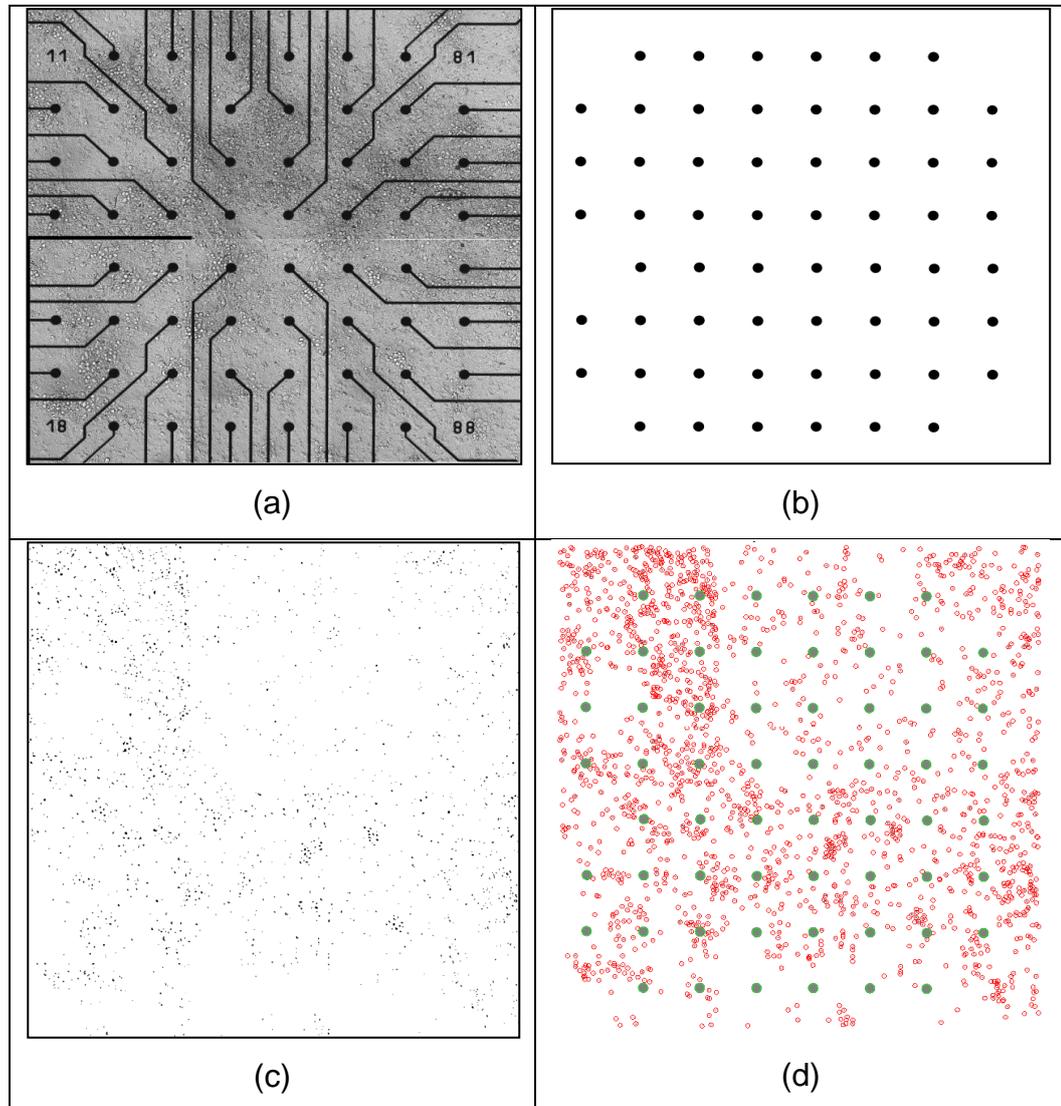


Figura 3.13 – (a) imagem completa da cultura, (b) imagem dos microeletrodos, (c) imagem completa dos neurônios e (d) imagem completa dos microeletrodos e os neurônios.

#### 3.7.4 Determinação dos neurônios e posições dos microeletrodos

As posições  $(x,y)$  dos neurônios e dos microeletrodos foram obtidas calculando o centroide dos componentes conectados (grupos de *pixels* conectados com valores diferentes de *pixels* de fundo) em imagens de neurônios segmentados e

---

microeletrodos segmentados, respectivamente. Os comandos MATLAB *bwconncomp* e *regionprops* foram usados para obter, a lista de componentes conectados e para determinar o centroide dos neurônios e dos microeletrodos, respectivamente. Os valores obtidos foram representados em escala de *pixel* e não em micrômetros. Conhecendo a distância real em micrômetros e a distância (em *pixels*) entre os microeletrodos adjacentes, foi possível determinar as dimensões reais de cada *pixel*. A MEA usada no experimento 371 tinha microeletrodos com diâmetro de 30  $\mu\text{m}$  e microeletrodos adjacentes com distâncias de 200  $\mu\text{m}$ . As distâncias (em *pixels*) entre todos os pares de microeletrodos adjacentes foram calculadas em MATLAB, e a média aritmética de todos os valores foi usada para a redução de erro. Assim, conhecendo a distância real entre microeletrodos adjacentes de 200  $\mu\text{m}$ , e a distância na imagem de 310.26 pixels, foi possível estabelecer a medida de 0.6446  $\mu\text{m}$ , para cada *pixel*.

### 3.8 Considerações Finais

Neste capítulo foi descrita a metodologia para a obtenção do mapa de distribuição virtual de neurônios, em função do mapa de atividades fisiológicas. Para calibrar o sistema, é necessário no entanto, pelo menos uma imagem fotográfica, em que seja possível obter o número de neurônios por microeletrodo. Uma vez calibrado o sistema, outros mapas de distribuição virtual de neurônios poderão ser construídos, para um mesmo tipo de neurônios. A metodologia de cálculo do ICA e de processamento de imagens também foi descrita, seguida da descrição sobre a obtenção dos dados usados nesta tese.

No capítulo seguinte serão descritos os experimentos realizados e os resultados obtidos.

# Capítulo 4

## RESULTADOS E VALIDAÇÃO

---

*Neste capítulo é descrito o trabalho realizado. Após a contextualização dos experimentos (Seção 4.1 e 4.2), é descrita a obtenção do mapa de atividades neuronais para o DIV 39 (Seção 4.3), do mapa da contagem de neurônios da imagem fotográfica do DIV 38 (Seção 4.4) e comparação com o mapa de atividades do DIV 39 (Seção 4.5). Em posse desses dois mapas é realizada a calibração do sistema de mapeamento virtual dos neurônios, para o caso do DIV 39, e realizado o mapeamento virtual para atividades relativas a spikes e bursts (Seção 4.6). Após esses experimentos, são descritos outros experimentos de análise da cultura ao longo dos 46 DIVs, como a classificação em alta concentração, média concentração e baixa concentração de atividades neuronais, usando K-means.*

### 4.1 Considerações Iniciais

Os procedimentos descritos no Capítulo 3 foram aplicados nos dados obtidos no Experimento 371, descrito na Seção 3.7, resumido a seguir.

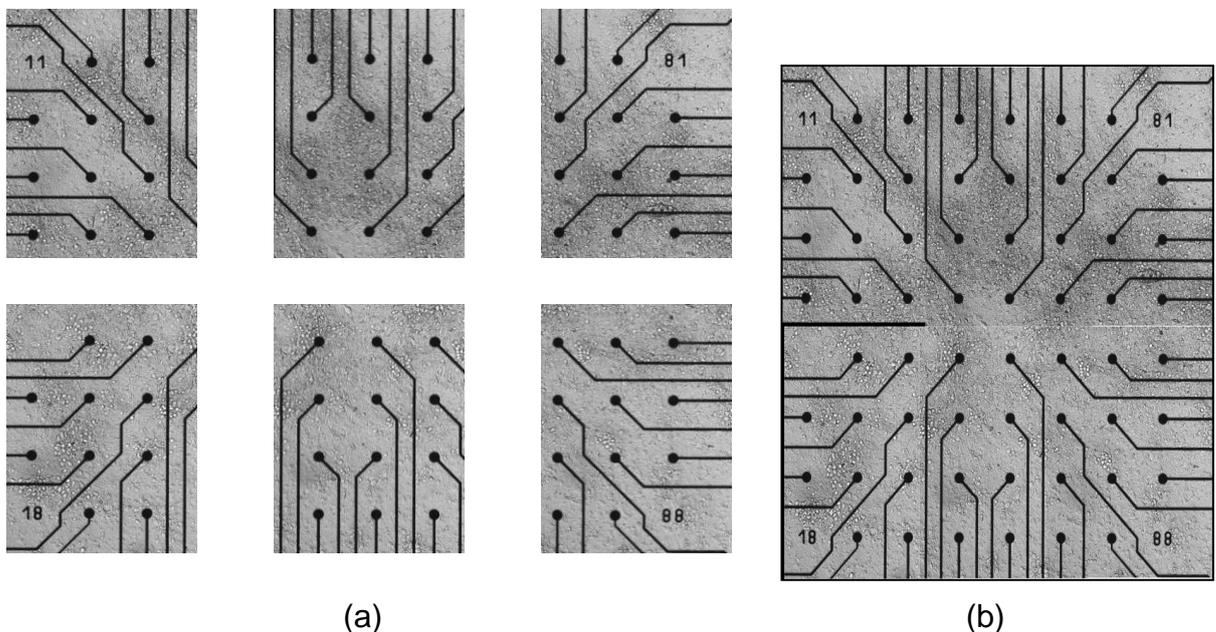
#### 4.1.1 Registros eletrofisiológicos

Conforme descrito na Seção 3.7, a cultura de neurônios *in-vitro* identificada como Experimento 371, foi realizada na Universidade de Gênova, Itália, usando neurônios de embriões de rato Wistar de 18 dias. Após 20 minutos de posicionamento da cultura no aparato, tempo suficiente para a adaptação das células ao novo ambiente, as medidas se iniciaram. Quatro registros consecutivos de atividades espontâneas de neurônios, cada um de 5 minutos, foram obtidos,

totalizando 20 minutos de registro. Os dados eletrofisiológicos obtidos foram rotulados respectivamente 371\_DIV25\_29\_12\_2006, 371\_DIV29\_02\_01\_2007, 371\_DIV32\_05\_01\_2007, 371\_DIV36, 09\_01\_2007, 371\_DIV39\_12\_01\_2007, 371\_DIV43\_16\_01\_2007 e 371\_DIV46\_19\_01\_2007.

#### 4.1.2 Registros fotográficos

Foram obtidas imagens fotográficas da cultura no DIV 38, usando um microscópio convencional Olympus BV51M, com câmera Camedia C-7070, com resolução de 3.1 megapixels. Seis imagens foram tomadas de diferentes regiões de grupos de microeletrodos, usando lentes objetivas com zoom de 10 vezes, Figura 4.1(a). Essas seis imagens foram compostas numa única imagem completa da cultura, Figura 4.1(b), usando um procedimento de segmentação e registro de imagens conforme descrito na Seção 3.7.



**Figura 4.1 – (a) seis imagens de diferentes regiões de grupos de microeletrodos; (b) imagem da cultura 371, resultante do processo de registro das seis imagens.**

---

Seguindo a metodologia proposta no Capítulo 3, foram realizadas as etapas para o mapeamento da contagem de neurônios.

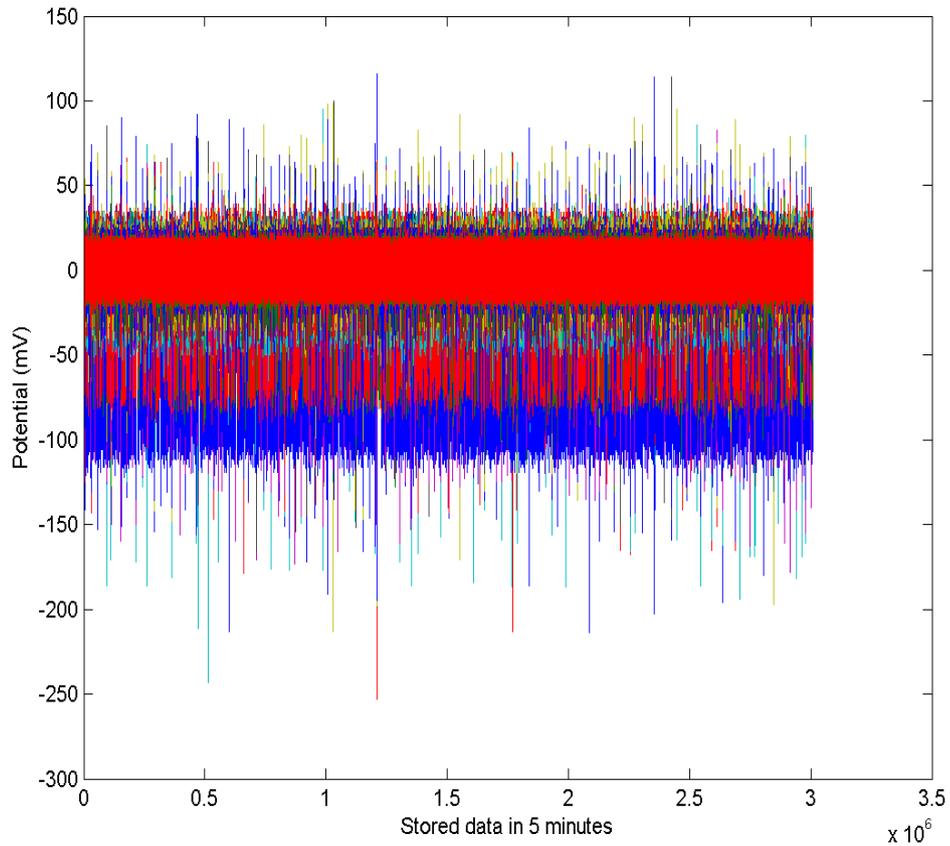
## 4.2 Registros eletrofisiológicos

As gravações dos sinais mencionadas na Seção 4.1 foram obtidas utilizando matrizes de microeletrodos (MEAs) planares, contendo 59 microeletrodos. Cada microeletrodo tem 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 200  $\mu\text{m}$  de espaçamento entre eles. Esses microeletrodos são distribuídos em uma matriz 8x8, com a exclusão dos cantos e do microeletrodo de referência, na coluna 1 e linha 5 (posição 15).

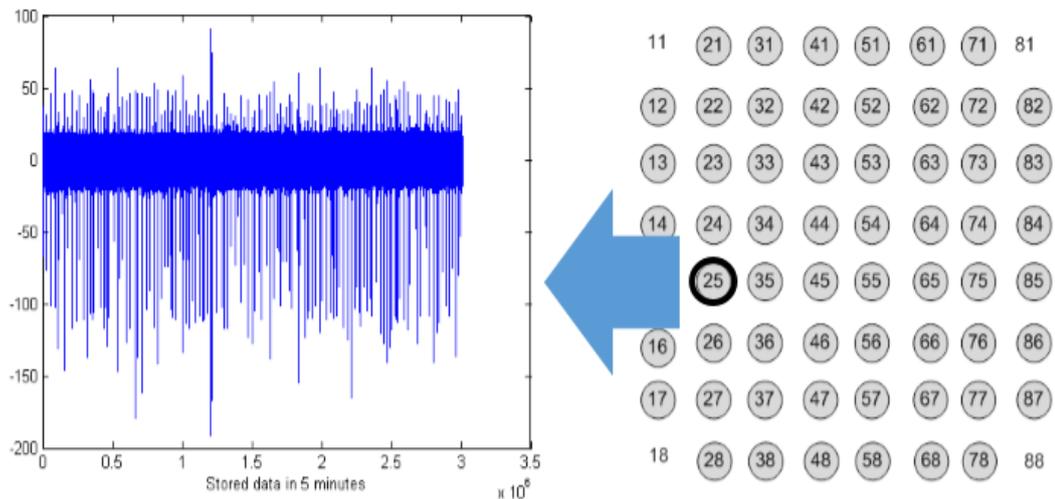
O procedimento para o registro dos sinais seguiu o seguinte procedimento: as MEAs contendo as culturas de neurônios eram retiradas da estufa de  $\text{CO}_2$ , na qual eram mantidas, e colocadas sobre um amplificador, com temperatura controlada entre 37,1 a 37,4  $^{\circ}\text{C}$ . As medidas eram iniciadas após 20 minutos, com o objetivo de permitir com que as células se adaptassem ao novo ambiente. Em cada experimento foram coletadas 20 minutos de amostra do sinal da MEA, divididos em quatro fases de 5 minutos cada. Esses registros em períodos de 5 minutos é devido ao protocolo adotado para o registro, evitando um período contínuo de registro. Durante o intervalo entre as fases de 5 minutos, pode-se realizar a troca do meio da cultura, o que pode melhorar o seu funcionamento.

Salienta-se que a MEA usada possui referência interna, na posição do eletrodo 15, coluna 1, linha 5; portanto, não existe registro de atividade neural, nessa posição. A frequência de aquisição de sinais foi de 10 kHz.

Foram realizados 4 registros de gravação durante um período de 5 minutos cada, nos DIVs (*Day In-Vitro*) 25, 29, 32, 36, 39, 43 e 46 da cultura. Um exemplo de visualização simultânea dos registros eletrofisiológicos de 59 microeletrodos utilizados nos experimentos é mostrado na Figura 4.2, que corresponde a uma amostra de 5 minutos, no DIV25. Na Figura 4.3, mostra-se, no lado esquerdo, o registro do microeletrodo 25, na mesma amostra de 5 minutos do DIV25; e no lado direito é feita uma ilustração da posição 25.



**Figura 4.2 – Visualização simultânea de registros eletrofisiológicos de 59 microeletrodos ativos, correspondentes a 5 minutos, obtido no experimento do DIV 25.**



**Figura 4.3 – Registro realizado pelo microeletrodo 25 para o experimento DIV 25, nos mesmos 5 minutos, correspondentes à Figura 4.2.**

#### 4.2.1 Processamento dos segmentos usando ICA.

Para a aplicação da metodologia proposta, o algoritmo de ICA (descrito na Seção 3.5) foi aplicado, nos 20 minutos de registro, em 4 conjuntos de registros de 5 minutos e cada conjunto dividido em 5 grupos de 1 minuto. Cada aplicação do algoritmo de ICA, simultânea aos 59 microeletrodos, deu-se em conjuntos de 600,000 amostras, correspondentes a um minuto de observação, por microeletrodo, considerando-se a frequência de amostragem de 10 kHz, ou 10,000 amostras por segundo. O algoritmo de ICA usado foi o FastICA em modo *batch*, (Algoritmo 3.6), conforme descrito na Seção 3.5.

Na Figura 4.4 ilustra-se a obtenção dos resultados na aplicação do ICA. Na parte superior é mostrado o conjunto de dados correspondente ao intervalo de 5 minutos. Na parte inferior, o resultado da aplicação do ICA é mostrado para cada segmento de 1 minuto.

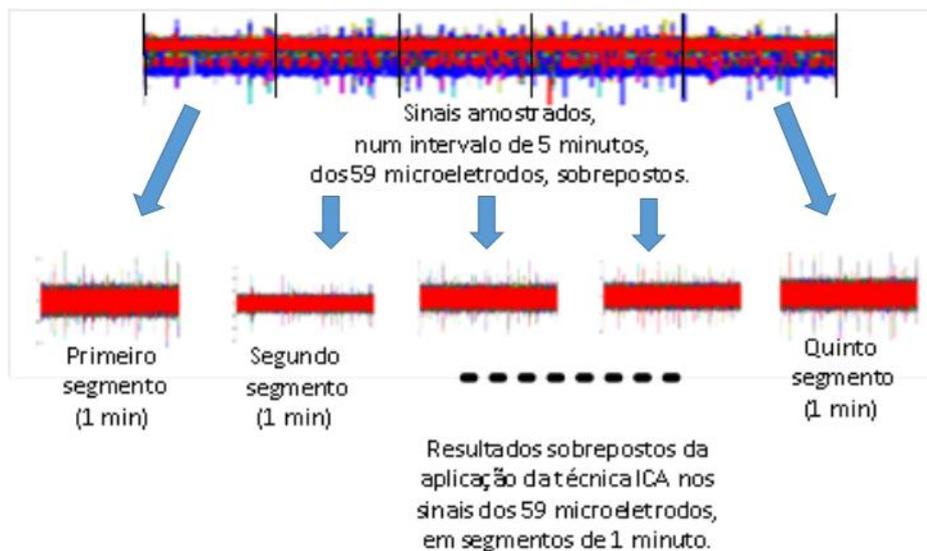


Figura 4.4 – Ilustração da aplicação do ICA – (Superior) sinais num intervalo de 5 min.; (inferior) resultados de ICA em segmentos de 1 min.

### 4.3 Obtenção do mapa de atividades neuronais do 39 DIV

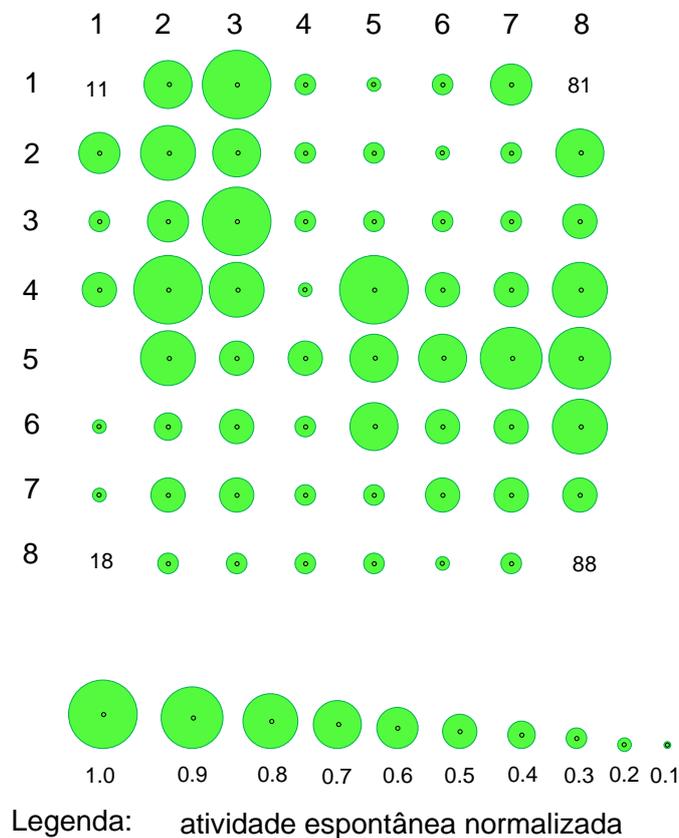
Para a obtenção do mapa de atividades neuronais do 39 DIV, após a aplicação do algoritmo de ICA em quatro registros de 5 minutos (denotados de I a IV), foi desenvolvido o processo de contagem de *spikes* por registro e calculada a média, conforme é mostrada na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Contagem de *spikes* por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 39 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâmetro
12	620	623	650	635	632,00	0,57
13	550	610	512	625	574,25	0,15
14	634	610	610	605	614,75	0,45
16	540	580	560	541	555,25	0,01
17	562	566	585	558	567,75	0,10
21	641	635	642	641	639,75	0,63
22	660	672	660	670	665,50	0,82
23	690	610	612	613	631,25	0,57
24	681	682	690	684	684,25	0,96
25	662	652	654	650	654,50	0,74
26	610	601	610	580	600,25	0,34
27	605	611	615	610	610,25	0,41
28	584	578	583	591	584,00	0,22
31	694	678	675	691	684,50	0,96
32	641	638	639	646	641,00	0,64
33	684	684	685	686	684,75	0,96
34	654	652	687	632	656,25	0,75
35	611	601	623	610	611,25	0,42
36	621	625	614	615	618,75	0,48
37	642	610	590	614	614,00	0,44
38	580	581	545	594	575,00	0,15
41	583	564	584	582	578,25	0,18
42	550	571	582	583	571,50	0,13
43	575	561	583	582	575,25	0,16
44	581	575	569	535	565,00	0,08
45	616	618	610	605	612,25	0,43
46	610	598	612	615	608,75	0,40
47	585	586	575	594	585,00	0,23
48	585	591	570	555	575,25	0,16
51	561	548	578	585	568,00	0,10
52	575	586	584	586	582,75	0,21
53	577	585	569	587	579,50	0,19
54	596	597	985	584	690,50	1,00
55	641	651	630	655	644,25	0,66
56	635	642	641	650	642,00	0,65
57	561	610	575	581	581,75	0,20
58	562	588	591	566	576,75	0,17
61	551	564	585	604	576,00	0,16
62	584	565	585	541	568,75	0,11
63	587	584	578	584	583,25	0,22
64	611	600	607	610	607,00	0,39
65	650	652	622	662	646,50	0,68
66	601	642	610	611	616,00	0,46
67	602	628	595	601	606,50	0,39
68	578	584	545	555	565,50	0,08
71	645	640	610	610	626,25	0,53
72	581	574	566	580	575,25	0,16
73	575	585	599	581	585,00	0,23
74	604	585	615	614	604,50	0,37
75	684	685	661	692	680,50	0,93
76	599	611	612	621	610,75	0,42
77	618	615	621	616	617,50	0,47
78	588	596	587	574	586,25	0,24
82	614	648	654	652	642,00	0,65
83	618	621	615	594	612,00	0,43
84	656	676	645	672	662,25	0,80
85	645	664	684	678	667,75	0,84
86	678	684	644	635	660,25	0,78
87	612	610	610	601	608,25	0,40

Na Tabela 4.1, são mostrados para cada microeletrodo (denotado Micro) o número de *spikes* obtidos por contagem para cada conjunto de registro de 5 minutos (denotados de I a IV), seguido da média aritmética dessas quatro contagens, e do valor do diâmetro do círculo calculado para o mapa de atividades. Esse diâmetro é igual à normalização da contagem de *spikes*.

Conforme descrito no Capítulo 3, o número normalizado de *spikes* foi obtido, levando em consideração a contagem máxima de *spikes*,  $S_{max} = 690$ , e a contagem mínima,  $S_{min} = 555$ . O número de *spikes* normalizado, CS, é tal que se a contagem é igual a  $S_{max}$ ,  $CS = 1$ , e se a contagem é igual a  $S_{min}$ ,  $CS = 0$ . Esse número normalizado é o valor usado para a construção do mapa de atividades, conforme Figura 4.5.



**Figura 4.5 – Mapa de atividades neuronais em função da contagem média de *spikes* para DIV 39.**

O limiar usado para a detecção de *spikes* foi de 8 vezes o desvio padrão no segmento de 1 minuto considerado. Esse número é o comumente adotado em detecção de *spikes* (CHIAPPALONE, 2003). A detecção de *spikes* é baseada numa janela de 2 milisegundos que desloca ao longo do sinal após a aplicação do ICA, o valor de limiar de artefato de 800 mV, e uma distância mínima de artefato de 0,5

segundos. Para *bursts* foi considerado o mínimo de 5 *spikes* num período de 100 ms (CHIAPPALONE, 2003). Os detalhes foram descritos na Seção 1.2.1.

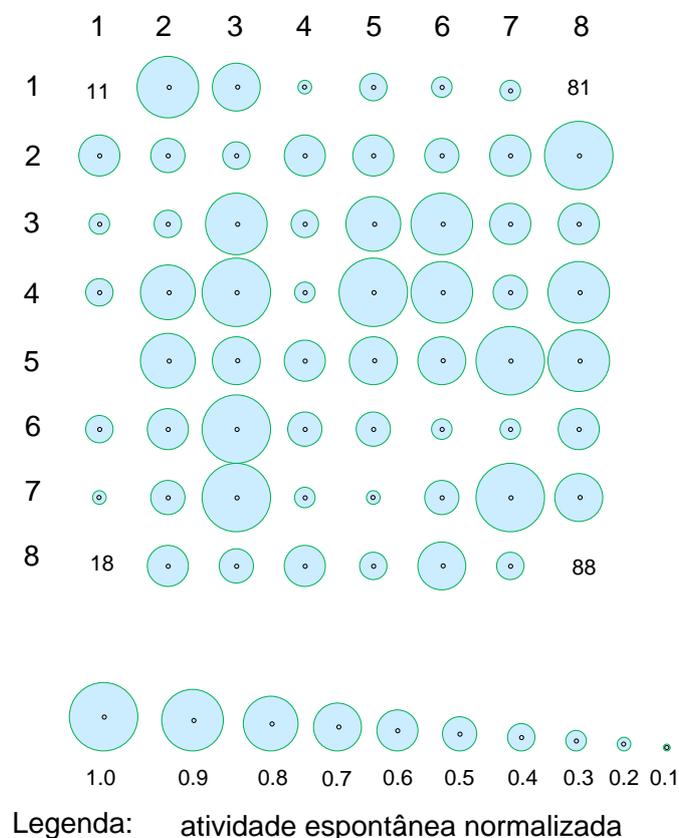
Um procedimento análogo foi aplicado para a contagem de *bursts* e construção do respectivo mapa de atividades neuronais.

**Tabela 4.2 – Contagem de *bursts* por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 39 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâmetro
12	42	46	45	51	46,00	0,50
13	32	34	40	45	37,75	0,13
14	38	40	42	44	41,00	0,27
16	38	38	45	43	41,00	0,27
17	35	34	39	36	36,00	0,05
21	56	55	49	58	54,50	0,89
22	37	48	50	44	44,75	0,44
23	46	40	45	38	42,25	0,33
24	54	48	50	60	53,00	0,82
25	60	45	44	56	51,25	0,74
26	45	44	55	48	48,00	0,59
27	40	38	44	50	43,00	0,36
28	49	44	50	47	47,50	0,57
31	58	44	49	46	49,25	0,65
32	40	45	35	45	41,25	0,28
33	49	56	58	60	55,75	0,94
34	60	54	55	60	57,25	1,01
35	50	48	46	55	49,75	0,67
36	44	61	56	65	56,50	0,98
37	45	62	55	64	56,50	0,98
38	40	50	45	45	45,00	0,45
41	32	35	40	38	36,25	0,06
42	44	46	45	48	45,75	0,49
43	40	35	40	47	40,50	0,25
44	35	44	35	41	38,75	0,17
45	42	45	50	46	45,75	0,49
46	35	50	50	45	45,00	0,45
47	39	40	36	42	39,25	0,19
48	50	46	45	46	46,75	0,53
51	38	44	46	38	41,50	0,30
52	48	45	50	46	47,25	0,56
53	50	56	58	44	52,00	0,77
54	44	56	65	60	56,25	0,97
55	54	55	45	44	49,50	0,66
56	37	44	50	43	43,50	0,39
57	40	34	36	35	36,25	0,06
58	38	45	36	48	41,75	0,31
61	36	45	34	40	38,75	0,17
62	34	46	44	52	44,00	0,41
63	45	56	62	55	54,50	0,89
64	60	48	50	62	55,00	0,91
65	44	45	64	48	50,25	0,69
66	35	40	40	40	38,75	0,17
67	38	46	48	45	44,25	0,42
68	49	55	44	50	49,50	0,66
71	44	37	37	35	38,25	0,15
72	48	42	50	43	45,75	0,49
73	50	49	44	45	47,00	0,55
74	39	45	54	40	44,50	0,43
75	55	60	55	54	56,00	0,95
76	38	45	36	39	39,50	0,20
77	62	54	56	55	56,75	0,99
78	37	48	34	45	41,00	0,27
82	58	45	60	65	57,00	1,00
83	48	50	45	49	48,00	0,59
84	49	58	54	58	54,75	0,90
85	40	56	59	58	53,25	0,83
86	47	52	47	45	47,75	0,58
87	51	57	48	44	50,00	0,68

A Tabela 4.2 resume a contagem dos *bursts* por registro de 5 minutos, o cálculo da média, e o cálculo do diâmetro dos círculos concêntricos aos microeletrodos, normalizando o valor médio da contagem dos *bursts*. A tabela mostra para cada microeletrodo (denotado Micro), as contagens de *bursts* nos 4 conjuntos de registros de 5 minutos, seguidas do valor da média aritmética (denotado Média) dessas contagens, e do diâmetro do círculo para o mapa de atividades, que corresponde ao número normalizado de *bursts*. O número normalizado de *bursts* foi obtido, levando-se em consideração a contagem máxima de *bursts*,  $B_{max} = 57$ , e a contagem mínima,  $B_{min} = 36$ . O número de *bursts* normalizado, CB, é tal que se a contagem é igual a  $B_{max}$ ,  $CB = 1$ , e se a contagem é igual a  $B_{min}$ ,  $CB = 0$ .

A Figura 4.6 mostra o mapa de atividades neuronais em função da contagem de *bursts* para do DIV 39.



**Figura 4.6 – Mapa de atividades neuronais em função da contagem média de *bursts* para DIV 39.**

---

## 4.4 Construção do Mapa de Contagem de Neurônios na Imagem Fotográfica do DIV 38

Para a construção do mapa de distribuição virtual de neurônios, é necessário fazer a calibração com o mapa de contagem de neurônios, a partir de uma imagem fotográfica, da mesma cultura em que a distribuição virtual deve ser feita, para a obtenção do número de neurônios proporcional à atividade eletrofisiológica.

Para validação do procedimento foram usados dois tipos de dados: (1) imagem fotográfica da cultura realizado no 38 DIV, onde se tem a distribuição topológica real dos neurônios; e (2) registros dos sinais correspondentes ao 39 DIV, escolhidos por serem registros muito próximos, à imagem fotográfica, com apenas 1 DIV de diferença.

Comparando-se o mapa de atividade neuronal em função de *spikes* e *bursts* dos dados eletrofisiológicos do 39 DIV, e o mapa da contagem de neurônios da imagem fotográfica do DIV 38, ambos normalizados, é possível fazer a validação do procedimento adotado, caso os resultados de comparação apontem para uma proximidade em termos de alguma medida de distância.

### 4.4.1 Definição de regiões por adjacência de microeletrodos na imagem fotográfica

O processamento do registro fotográfico é realizado com o objetivo de identificar os neurônios da cultura, além da localização dos microeletrodos, como é mostrado na Figura 4.7(a). A seguir a imagem da cultura é dividida em quadrados para delimitar a área de ação de cada microeletrodo (Figura 4.7(b)).

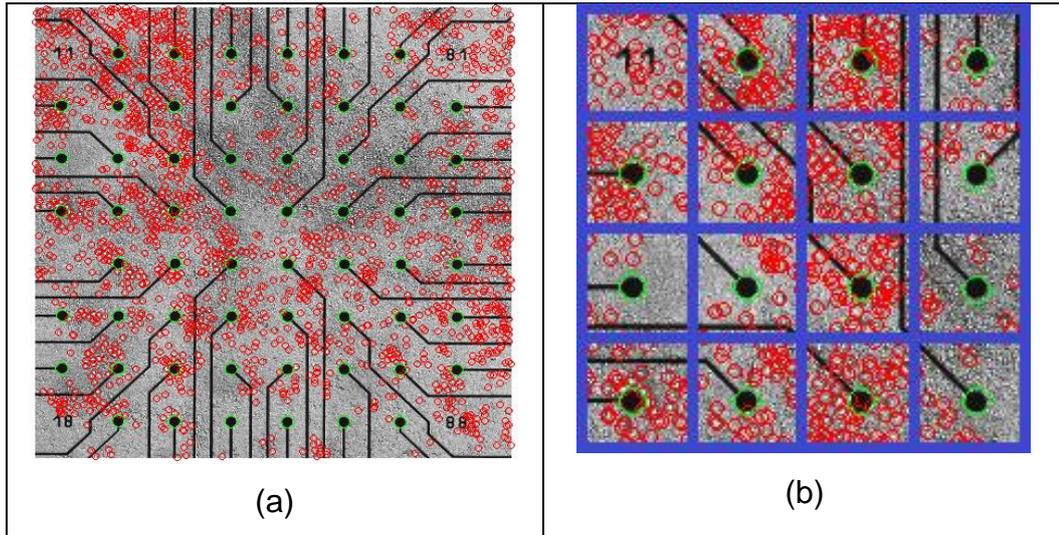


Figura 4.7 – Processamento do registro fotográfico. (a) identificação dos neurônios, (b) delineamento da região de atuação de cada microeletrodo.

#### 4.4.2 Número de neurônios por microeletrodo na imagem fotográfica

Realizada a segmentação dos neurônios, foi possível delinear a área de cada eletrodo quadriculando a área da matriz e obter a contagem dos neurônios por eletrodo. O número de neurônios por área de cada microeletrodo é mostrado na Tabela 4.3, onde para cada coluna da MEA, os microeletrodos correspondentes são representados à esquerda e o número de neurônios, à direita.

Tabela 4.3 – Contagem de neurônios por microeletrodo na imagem da cultura no DIV 38.

<i>eletrodos núm. neurônios</i>															
	21	43	31	43	41	13	51	15	61	5	71	15			
12	38	22	34	32	32	42	14	52	10	62	13	72	9	82	15
13	9	23	15	33	39	43	10	53	11	63	6	73	7	83	15
14	30	24	32	34	41	44	11	54	13	64	12	74	11	84	20
		25	28	35	22	45	33	55	24	65	23	75	19	85	23
16	11	26	20	36	28	46	27	56	24	66	12	76	17	86	31
17	8	27	24	37	27	47	18	57	22	67	15	77	15	87	19
		28	12	38	11	48	1	58	5	68	3	78	6		

Na Tabela 4.3, o primeiro dígito da numeração dos microeletrodos corresponde à coluna e o segundo dígito, à linha; assim, o microeletrodo 12 corresponde à coluna 1 e linha 2. As posições 11, 15, 18, 81 e 88 não são usadas para medições, portanto não aparecem na tabela.

Seguida da contagem do número de neurônios, esse número foi normalizado, conforme descrito na Seção 3.3, para a obtenção do mapa de contagem de neurônios, mostrado na Figura 4.8.

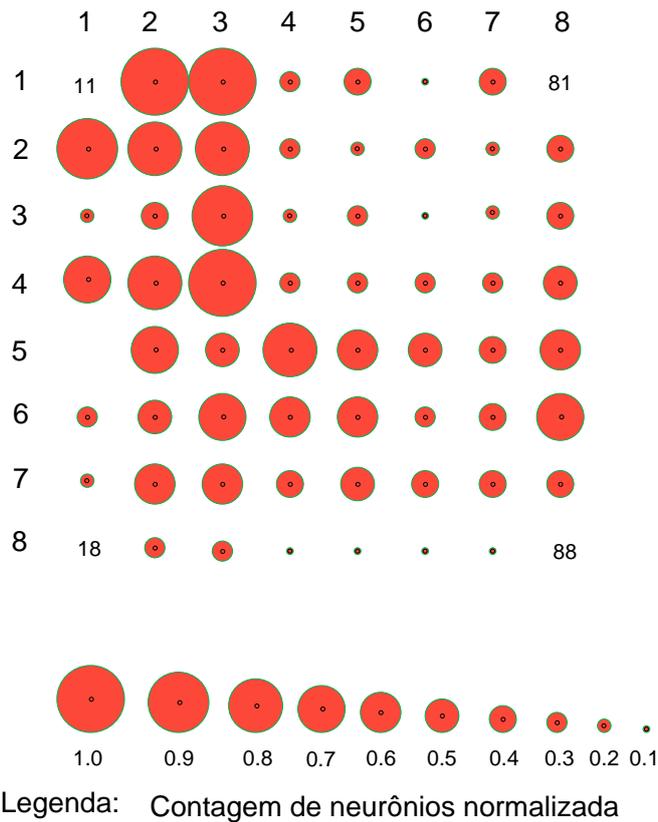


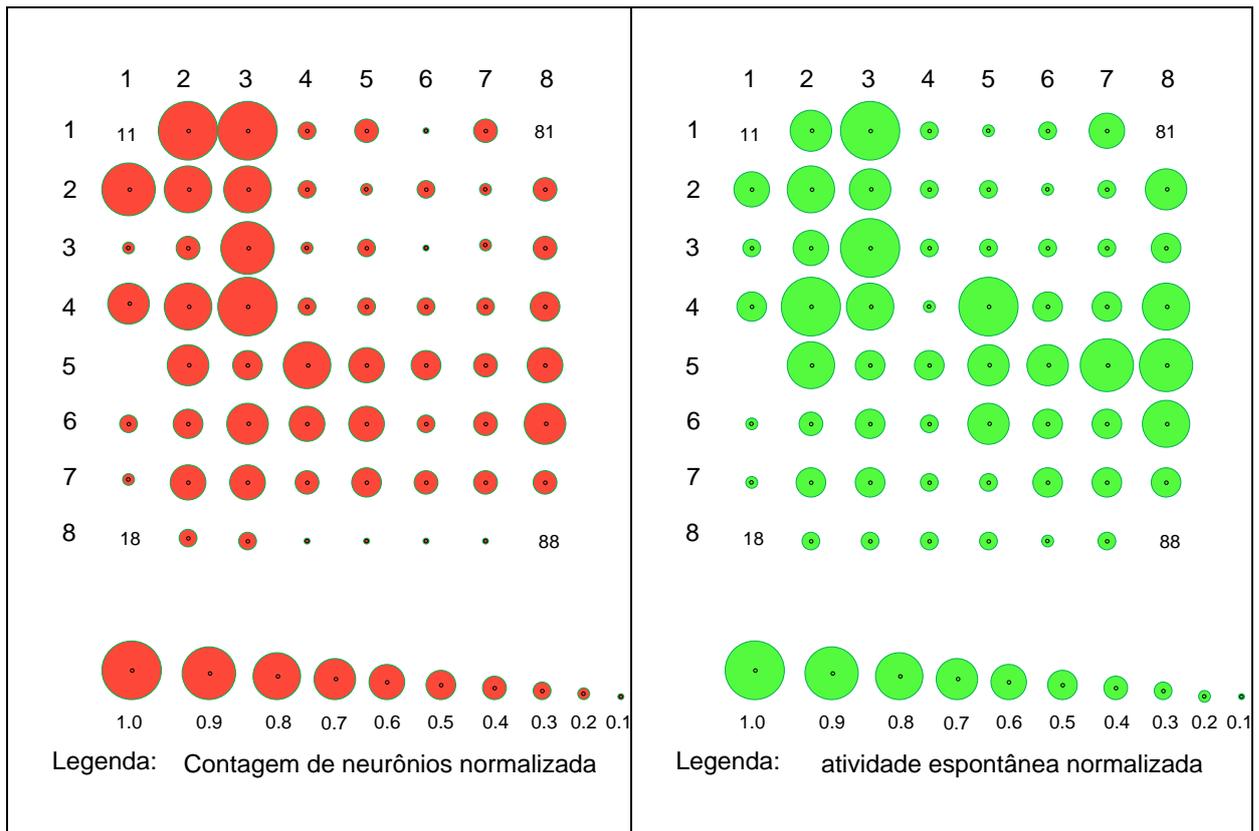
Figura 4.8 – Mapa de contagem de neurônios, para a imagem fotográfica 38 DIV.

#### 4.5 Comparação do mapa de contagem dos neurônios do DIV38 com o mapa de atividades do DIV 39

O mapa de contagem de neurônio do DIV38 pode ser comparada com o mapa de atividades do DIV39, obtidas em função da contagem de *spikes* ou em função da contagem de *bursts*.

#### 4.5.1 Comparação em função da contagem de *spikes*

Na Figura 4.9 é feita a justaposição do mapa de contagem de neurônios e o mapa de atividades em contagem de *spikes*, para propósito de comparação visual. Na parte superior é visto o mapa de contagem de neurônios e na parte inferior o mapa de atividades.

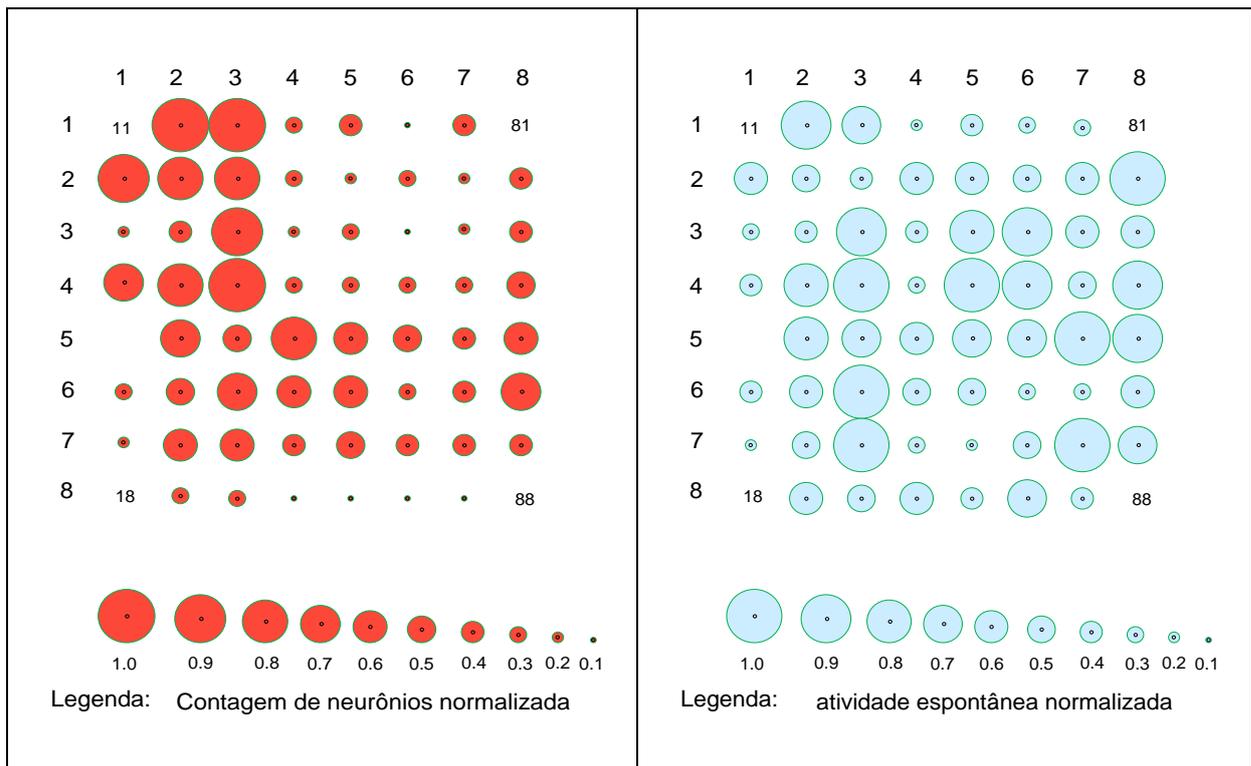


**Figura 4.9 – Comparação do mapa de contagem de neurônios do DIV 38 com o mapa de atividades em *spikes* do DIV 39.**

Foi calculada a distância Euclidiana entre as contagens normalizadas, levando-se em conta o vetor de contagem de neurônios do DIV 38 e o vetor da contagem de *spikes* do DIV 39, resultando no valor 1,52. Esse valor representa uma medida de proximidade da distribuição topológica real de neurônios obtida pela imagem fotográfica em relação à distribuição topológica virtual de neurônios obtida pela contagem de *spikes*, no DIV 39. Quanto menor for essa distância Euclidiana, mais próxima da distribuição real obtida pela imagem fotográfica seria a distribuição virtual de neurônios obtida.

#### 4.5.2 Comparação em função da contagem de *bursts*

Na Figura 4.10 é feita a justaposição do mapa da contagem de neurônios do DIV 38 e do mapa de atividades em função do número de *bursts*, sendo visto na parte superior o mapa da contagem de neurônios e na parte inferior o mapa de atividades.



**Figura 4.10 – Comparação do mapa de contagem de neurônios do DIV 38 e do mapa de atividades, obtidos proporcionalmente aos *bursts* registrados.**

Foi calculada a distância Euclidiana entre as contagens normalizadas, levando-se em conta o vetor de contagem de neurônios do DIV 38 e o vetor da contagem de *bursts* do DIV 39, resultando no valor 2,47. Esse valor representa uma medida de quão próximo da distribuição topológica real de neurônios obtida pela contagem de neurônios, resulta a distribuição topológica virtual de neurônios, construída usando a contagem de *bursts*.

Com esse valor de distância Euclidiana é possível comparar qual das abordagens de construção de distribuição virtual de neurônios é melhor, dentre as abordagens de contagem de *spikes* e *bursts*. No caso, comparando as duas

---

distâncias 1,52 obtida para *spikes* (Seção 4.5.1) e 2,47 obtida para *bursts*, conclui-se que a abordagem de contagem de *spikes* é melhor.

## 4.6 Obtenção do mapa de distribuição virtual dos neurônios do 39 DIV

O principal objetivo da contagem de neurônios em imagem fotográfica é possibilitar a calibração do procedimento do mapa de distribuição virtual de neurônios, proposto neste trabalho.

Uma vez obtido o mapa de atividades neuronais normalizado, é possível comparar as atividades entre os microeletrodos da MEA, porém, não é possível calcular o número de neurônios adjacentes a cada microeletrodo. Isso seria possível se existisse uma referência do número de neurônios para a cultura que esteja sendo analisada. Assim, no caso da cultura 371, tendo a contagem de neurônios no DIV38, é possível assumir a proporcionalidade da atividade neuronal ao longo do experimento, em relação a essa contagem. Levando isso em consideração, foi feita a calibração do número virtual de neurônios estimado para o DIV 39, em função da contagem normalizada no DIV38. Assim, conforme descrito na Seção 3.4, para a obtenção do número virtual de neurônios VN para um determinado microeletrodo no DIV 39, multiplicamos o valor do mapa de atividade normalizada do DIV 39, pela contagem máxima,  $C_{max}$ , de neurônios no DIV38, que corresponde ao valor normalizado igual a 1.

Uma vez obtido o número virtual de neurônios por microeletrodo, é possível construir o mapa de distribuição virtual dos neurônios. A Figura 4.11 ilustra o mapa para a distribuição virtual em função da contagem de *spikes* e a Figura 4.12, em função da contagem de *bursts*.

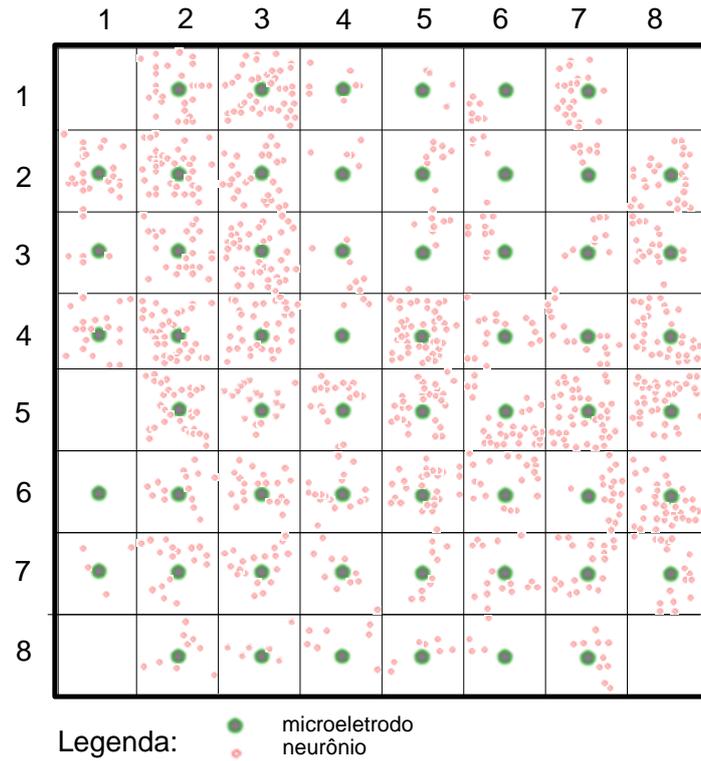


Figura 4.11 – Mapa da distribuição virtual dos neurônios em função da contagem de *spikes*.

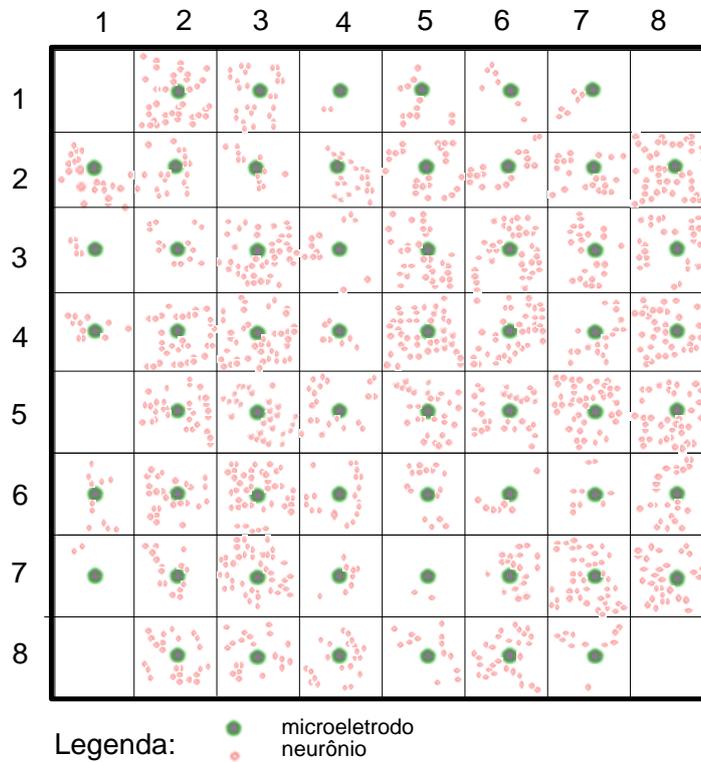
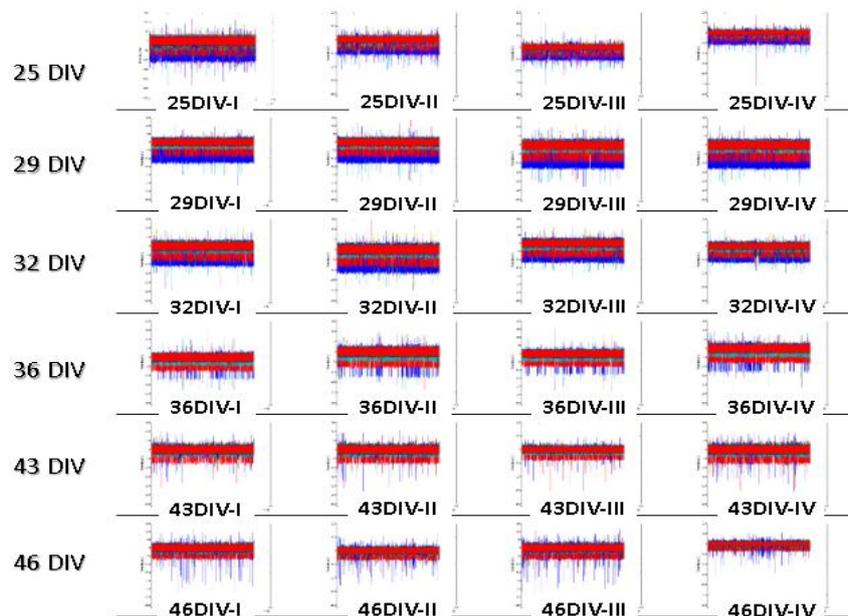


Figura 4.12 – Mapa da distribuição virtual dos neurônios em função da contagem de *bursts*.

## 4.7 Construção do mapa de atividades dos neurônios para os 25, 29, 32, 36, 43 e 46 DIVs

Para a construção do mapa de atividades dos neurônios para os DIVs 25, 29, 32, 36, 43 e 46, o ICA foi também calculado, nos 20 minutos de registro, divididos em 4 conjuntos de registros de 5 minutos. No total, foram realizados 24 experimentos (4 para cada DIV), sendo que cada conjunto de registro foi denotado mediante o uso de números romanos (I a IV) acrescentados ao DIV utilizado. Na Figura 4.13 são ilustrados, compactadamente no tempo, todos os registros vinculados aos experimentos realizados diante da metodologia proposta. Na linha horizontal são vistos 4 conjuntos de 5 minutos de duração, e a linha vertical, corresponde aos 6 dias em que os registros foram realizados.

A aplicação do ICA foi feita dividindo os dados de cada conjunto de 5 minutos em grupos de amostras de 1 minuto de duração, como descrito na Seção 4.2.



**Figura 4.13 – Ilustração dos registros eletrofisiológicos vinculados aos experimentos, organizados por DIVs, sendo que cada DIV contém 4 registros de 5 minutos. Cada um desses 4 registros está sendo identificado por algarismos romanos de I a IV.**

#### 4.7.1 Detecção e quantificação da atividade dos neurônios

A identificação das ocorrências de *spikes* e de *bursts* foi feita para cada conjunto de amostras e armazenadas por microeletrodo.

Foram feitos os processamentos para todos os DIVs em questão, e obtidos os mapas de atividades neuronais em função da contagem de *spikes* e da contagem de *bursts*. As contagens realizadas para *spikes* estão em tabelas do Apêndice A, e as contagens para *bursts* estão em tabelas do Apêndice B. Os diâmetros dos círculos concêntricos ao microeletrodos, bem como o número de neurônios constam nessas tabelas.

As figuras relativas a esses mapas estão no Apêndice C, Figura C1, em função dos *spikes*, e Figura C2, em função dos *bursts*.

Uma vez que o número virtual de neurônios nos diversos DIVs foram obtidos e listados nas Tabelas A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7, para *spikes* e Tabelas B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7, para *bursts*, foi possível calcular a distância Euclidiana do vetor do número virtual de neurônios, com o vetor do número de neurônios do DIV 38, obtido por contagem de neurônios. O resultado desse cálculo é mostrado no gráfico da Fig. 4.14.

Nota-se que as distâncias oscilam ao longo dos experimentos do DIV 25 ao DIV46, não ficando evidenciada nenhuma tendência ao longo dos vários dias de experimentos, nem para a contagem de *spikes*, nem para *bursts*. Nota-se no entanto, que as distâncias calculadas em função das atividades em *spikes* são menores em relação às distâncias calculadas em função da contagem dos *bursts*. Isso significa que o cálculo das atividades baseado em contagem de *spikes*, e portanto, a distribuição topológica virtual de neurônios obtida usando esse cálculo, resulta numa distribuição topológica mais próxima da distribuição real, obtida pela imagem fotográfica, do que o cálculo das atividades baseado em contagem de *bursts*.

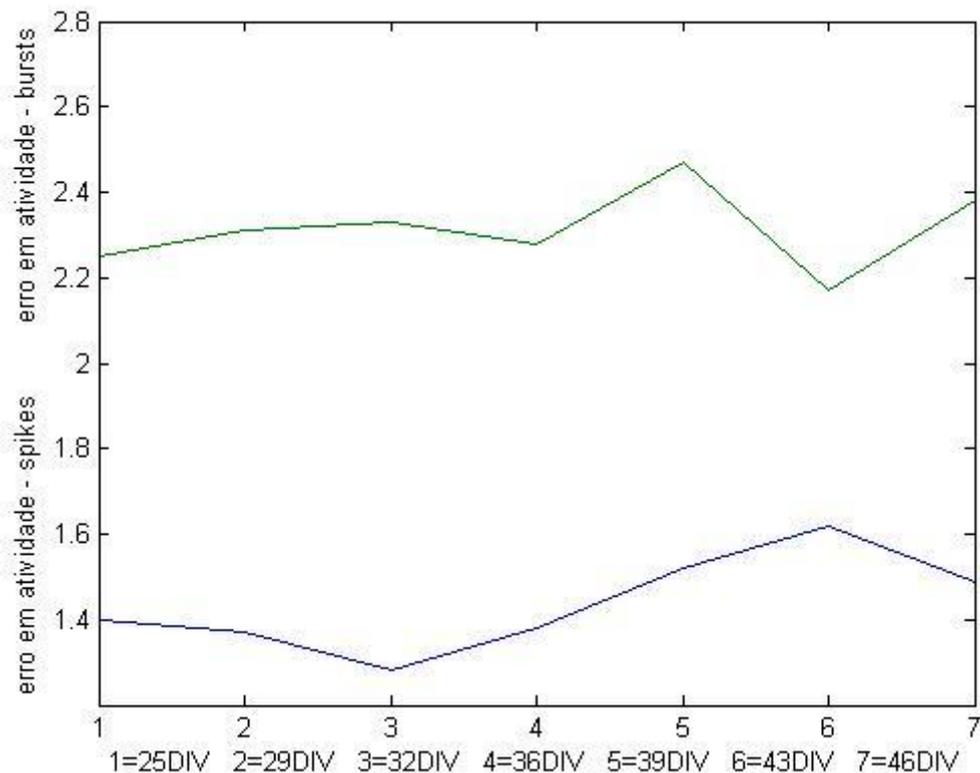


Figura 4.14 – Gráfico da distância Euclidiana do vetor de contagem de neurônios real (DIV 38) e virtual, DIVs 25 a 46, para spikes e bursts.

## 4.8 Agrupamento por *K-means* e análise dos segmentos de sinais eletrofisiológicos

Para simplificar a análise da distribuição dos neurônios em função das atividades eletrofisiológicas, foi aplicado o algoritmo de agrupamento por *K-means* usando a contagem de *spikes* e de *bursts*. O número de classes usado foi de  $k = 3$ . Esse valor foi adotado para a obtenção de classes de alta, média e baixa densidade de *spikes* ou *bursts*. O algoritmo foi aplicado para cada um dos segmentos de 1 minuto envolvidos no experimento, sendo posteriormente acumulado.

No diagrama da Figura 4.15 são mostrados os resultados da contagem de *spikes* do primeiro segmento do 25DIV-I e a classificação. Cada célula do diagrama corresponde a uma posição no arranjo de microeletrodos da MEA. As células em branco indicam a inexistência de microeletrodos naquelas posições (11, 15, 18, 81 e

88). Os números internos às células indicam a contagem de *spikes* e as cores indicam a classificação do microeletrodo em função dessa contagem. A cor verde, classe A, indica maior ocorrência de *spikes*; amarela, classe B, uma ocorrência média; e azul, classe C, menor ocorrência.

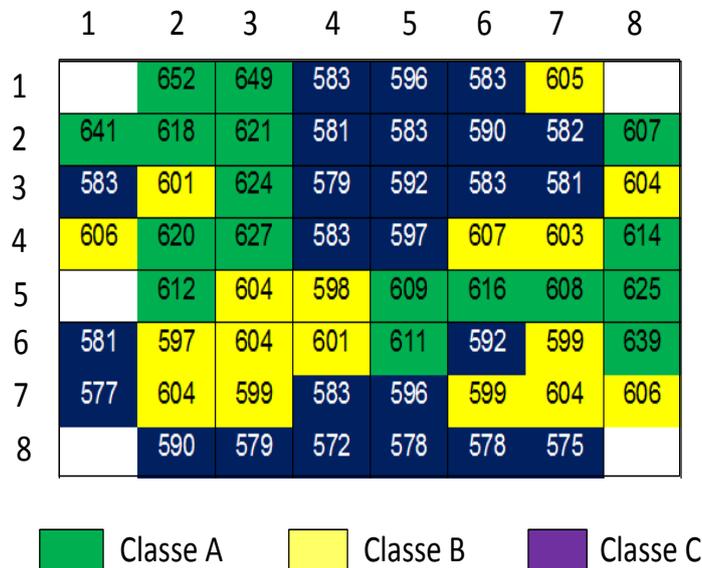


Figura 4.15 – Diagrama da contagem de *spikes* no primeiro segmento do 25DIV-I.

No diagrama da Figura 4.16 são mostrados a contagem de *bursts* e a respectiva classificação.

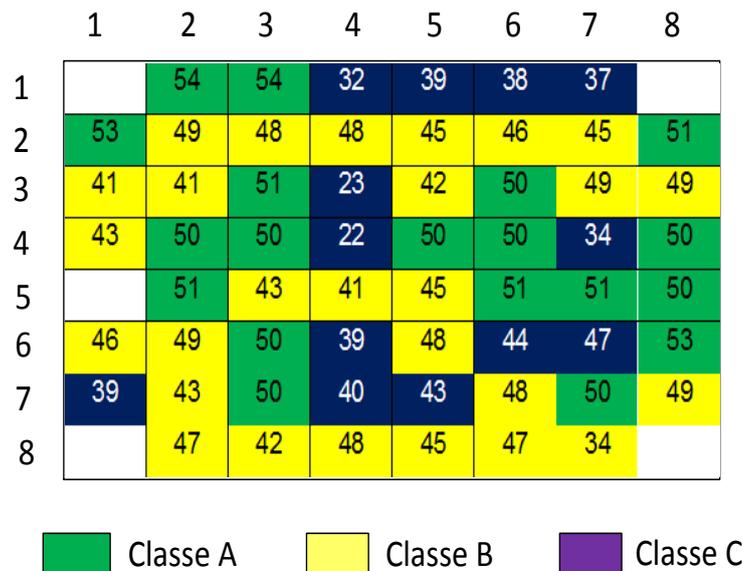
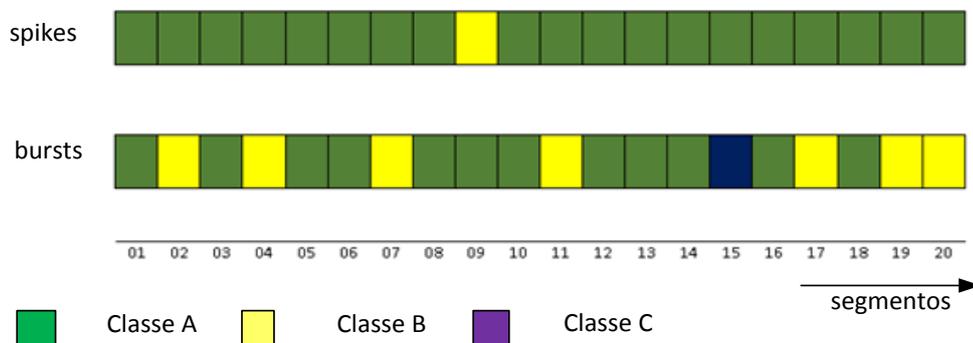


Figura 4.16 – Diagrama da contagem de *bursts* no primeiro segmento do 25DIV-I.

Nos dados de registros correspondentes aos **25DIV-II**, **25DIV-III** e **25DIV-IV** foram também executados os mesmos passos realizados no experimento **25DIV-I**, permitindo, em conjunto, realizar um acompanhamento por grupos da instabilidade das classes através do tempo em cada microeletrodo, e ao mesmo tempo, analisar, através de histogramas, o comportamento por microeletrodo aplicando medidas de dispersão.

Com isto, estabeleceram-se as bases para determinar o conjunto de quantificação que melhor caracterize a cultura de neurônios e origine o mapeamento virtual dos neurônios.

Na Figura 4.17 ilustra-se a instabilidade de classes, ao longo dos 20 minutos de dados registrados pelo microeletrodo 21, durante o 25 DIV. Nota-se no diagrama da parte superior que a classificação em função dos *spikes* variou entre as classes A e B; enquanto que, na parte inferior é vista a variação da classificação em função dos *bursts* entre as classes A, B e C. Em ambos os diagramas, no entanto, não existe uma variação brusca entre duas classes mais distantes, quais sejam, classes A e C.



**Figura 4.17 – Instabilidade das classes, ao longo do período de 20 minutos, no microeletrodo 21, considerando o número de *spikes* e de *bursts* no DIV 25.**

Conclui-se que a contagem de *spikes* ficou mais estável, em relação à contagem de *bursts*, no microeletrodo 21, ao longo dos 20 minutos de registro, no DIV 25.

A Tabela 4.4 mostra os valores médios obtidos da contagem de *spikes* nos dados registrados no 25DIV por microeletrodos, separados em grupos de registros (experimentos) de 5 minutos (I, II, III, IV), e as respectivas classificações em A, B e C, correspondentes às maiores, médias e menores ocorrências, respectivamente.

Para cada grupo de registro, foi calculada a média aritmética das contagens de *spikes* em segmentos de 1 minuto.

**Tabela 4.4 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 25 DIV.**

Microeletrodos MEA	25DIV-I		25DIV-II		25DIV-III		25DIV-IV		Microeletrodos MEA	25DIV-I		25DIV-II		25DIV-III		25DIV-IV	
	S P I K E S	C L A S S E	S P I K E S	C L A S S E	S P I K E S	C L A S S E	S P I K E S	C L A S S E		S P I K E S	C L A S S E	S P I K E S	C L A S S E	S P I K E S	C L A S S E	S P I K E S	C L A S S E
12	630	A	615	A	642	A	611	A	51	560	C	584	C	551	C	599	C
13	550	C	595	B	520	C	532	C	52	591	C	583	C	577	C	581	C
14	612	B	606	B	621	B	604	B	53	584	C	597	C	572	C	590	C
16	536	C	578	C	581	C	535	C	54	600	C	582	C	577	C	591	B
17	558	C	590	B	577	C	524	C	55	624	A	618	A	608	A	639	A
21	622	A	587	A	630	A	612	A	56	618	A	611	A	625	A	609	A
22	648	A	661	A	629	A	643	A	57	570	C	549	C	592	C	598	C
23	610	B	590	C	605	B	614	B	58	587	C	574	C	571	C	540	C
24	645	A	620	A	654	A	642	A	61	561	C	580	C	563	C	591	C
25	620	A	637	A	601	A	650	A	62	577	C	564	C	575	C	555	C
26	590	B	605	B	611	B	595	B	63	581	C	576	C	591	C	539	C
27	610	B	595	B	622	B	590	B	64	621	B	607	B	631	B	618	B
28	580	C	575	C	600	C	589	C	65	617	A	601	A	625	A	611	B
31	656	A	604	A	662	A	643	A	66	604	B	597	B	611	B	617	B
32	604	A	618	A	625	A	616	A	67	601	B	589	B	594	B	588	B
33	662	A	645	A	620	A	627	A	68	570	C	583	C	564	C	579	C
34	643	A	615	A	686	A	623	A	71	612	B	591	B	606	B	588	B
35	612	B	597	B	622	A	608	B	72	575	C	581	C	573	C	585	C
36	619	B	608	B	596	B	601	B	73	579	C	584	C	597	C	583	C
37	595	B	604	B	590	B	610	B	74	594	B	608	B	589	B	601	B
38	560	C	582	C	543	C	587	C	75	618	A	621	A	613	A	622	A
41	592	C	585	C	576	C	583	C	76	587	B	594	B	601	B	598	B
42	571	C	569	C	591	C	557	C	77	612	B	603	B	596	B	593	B
43	583	C	575	C	590	C	571	C	78	562	C	574	C	590	C	569	C
44	577	C	569	C	581	C	596	C	82	621	A	635	A	607	A	641	A
45	604	B	612	B	589	B	609	B	83	597	B	606	B	588	B	609	B
46	615	B	594	B	622	B	611	B	84	639	A	625	A	630	A	621	A
47	576	C	587	C	574	C	584	C	85	623	A	619	A	625	A	614	B
48	579	C	568	C	586	C	583	C	86	634	A	625	A	618	A	631	A
									87	591	C	603	B	611	B	597	B

A Tabela 4.5 mostra os valores médios obtidos da contagem de *bursts* nos dados registrados no 25DIV por eletrodos, separados em grupos de registros (experimentos) de 5 minutos (I, II, III, IV), e as respectivas classificações em A, B e C, correspondentes às maiores, médias e menores ocorrências, respectivamente.

Para cada grupo de registro, foi calculada a média aritmética das contagens de *bursts* em segmentos de 1 minuto.

**Tabela 4.5 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em experimentos de 5 minutos para o 25 DIV.**

Microeletrodos MEA	25DIV-I		25DIV-II		25DIV-III		25DIV-IV		Microeletrodos MEA	25DIV-I		25DIV-II		25DIV-III		25DIV-IV	
	BURSTS	CLASSE	BURSTS	CLASSE	BURSTS	CLASSE	BURSTS	CLASSE		BURSTS	CLASSE	BURSTS	CLASSE	BURSTS	CLASSE	BURSTS	CLASSE
12	54	A	52	A	53	A	52	A	51	39	C	35	C	36	C	41	C
13	43	B	41	B	45	B	41	B	52	51	B	49	B	46	B	47	B
14	47	B	46	B	49	B	46	B	53	46	B	48	B	45	B	42	B
16	44	B	45	B	41	B	45	B	54	56	A	59	A	55	A	52	A
17	38	C	33	C	37	C	33	C	55	51	B	54	B	47	B	49	B
21	57	A	60	A	56	A	60	A	56	49	B	50	B	48	B	55	B
22	48	B	46	B	56	A	46	B	57	41	C	46	C	45	C	44	C
23	43	B	47	B	50	B	47	B	58	46	B	48	B	42	B	43	B
24	52	A	55	A	60	A	55	A	61	38	C	34	C	36	C	33	C
25	49	A	47	A	41	A	47	A	62	43	B	48	B	41	B	46	B
26	51	B	53	B	54	B	53	B	63	53	A	58	A	56	A	62	A
27	46	B	49	B	51	B	49	B	64	57	A	51	A	54	A	50	A
28	49	B	52	B	55	B	52	B	65	58	A	58	A	54	A	56	A
31	56	A	58	A	61	A	58	A	66	38	C	46	C	51	B	42	C
32	47	B	45	B	48	B	45	B	67	45	B	46	B	49	B	35	B
33	52	A	55	A	56	A	55	A	68	48	B	46	B	41	B	49	B
34	52	A	54	A	51	A	54	A	71	35	C	39	C	38	C	35	C
35	44	B	49	B	46	B	49	B	72	50	B	48	B	47	B	51	B
36	52	A	58	A	60	A	61	A	73	52	B	57	B	59	B	54	B
37	51	B	57	B	61	A	60	A	74	37	B	39	B	32	B	38	B
38	44	B	48	B	43	B	45	B	75	61	A	59	A	62	A	60	A
41	34	C	36	C	35	C	31	C	76	48	C	36	C	31	C	42	C
42	50	B	51	B	49	B	50	B	77	57	A	56	A	58	A	50	A
43	26	C	33	C	37	C	39	C	78	41	B	44	B	43	B	42	B
44	26	C	34	C	39	C	30	C	82	56	A	59	A	61	A	60	A
45	44	B	49	B	47	B	45	B	83	50	B	41	B	45	B	49	B
46	41	C	44	C	41	C	42	C	84	54	A	55	A	51	A	59	A
47	42	C	43	C	44	C	45	C	85	57	A	62	A	61	A	66	A
48	48	B	52	B	50	B	51	B	86	53	B	54	B	49	B	54	B
									87	51	B	53	B	56	B	52	B

Na Figura 4.18, são apresentados os histogramas correspondentes ao microeletrodo 21 durante os 20 minutos de observação do 25 DIV, da ocorrência de *spikes* (Figura 4.18(a)) e *bursts* (Fig.4.18(b)).

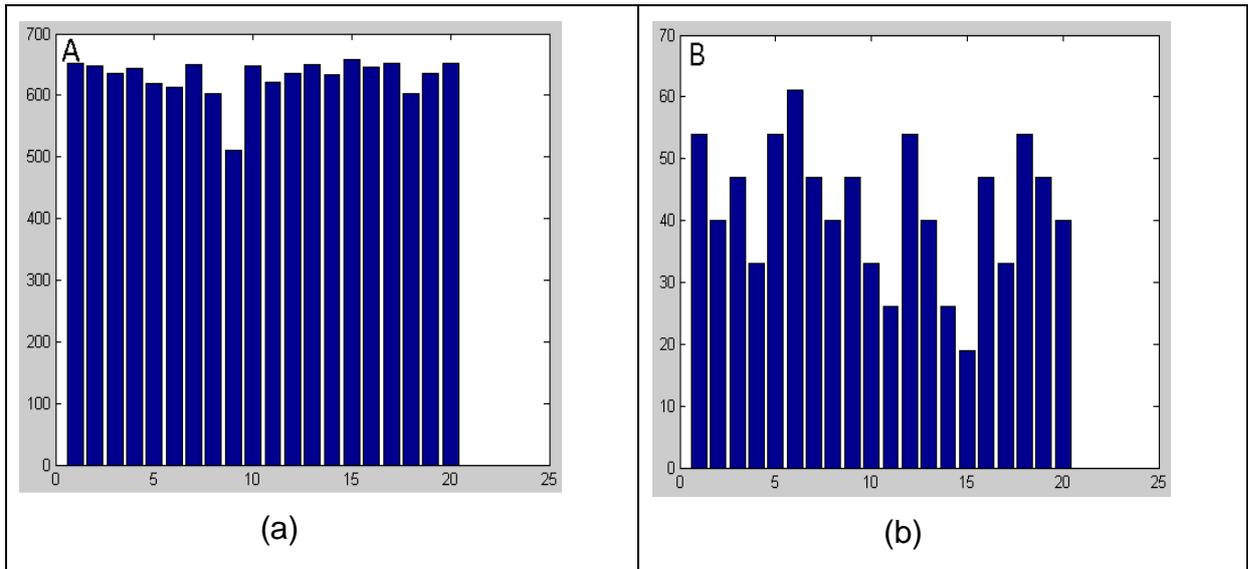


Figura 4.18 – Comportamento do microeletrodo 21, em função do número de *spikes* e de *bursts* nos 20 minutos do 25 DIV. (a) número de *spikes*; e (b) número de *bursts*.

Na Figura 4.19(a), são resumidos em histograma os números de *spikes*, e na Figura 4.19(b), o número de *bursts*, ao longo dos 20 minutos de registro, do 29 DIV, em segmentos de 1 minuto, para o microeletrodo 21.

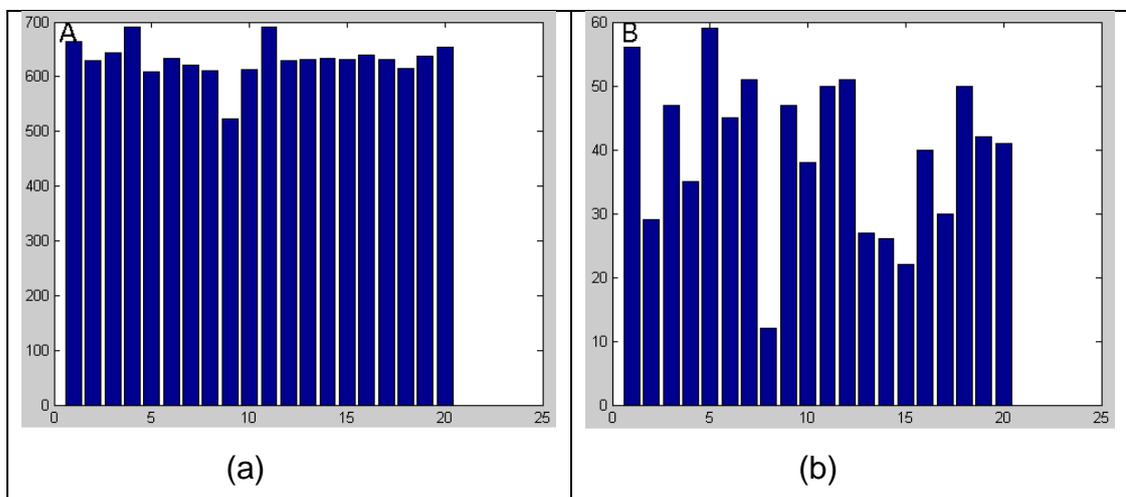


Figura 4.19 – Contagem de *spikes* e *bursts* para o microeletrodo 21, nos experimentos do 29 DIV: (a) número de *spikes*; (b) número de *bursts*.

Nas Figuras 4.20, 4.21, 4.22 e 4.23, são ilustrados, da mesma forma que o anterior, os histogramas para o 32 DIV, 36 DIV, 43 DIV e 46 DIV, respectivamente, do mesmo microeletrodo 21.

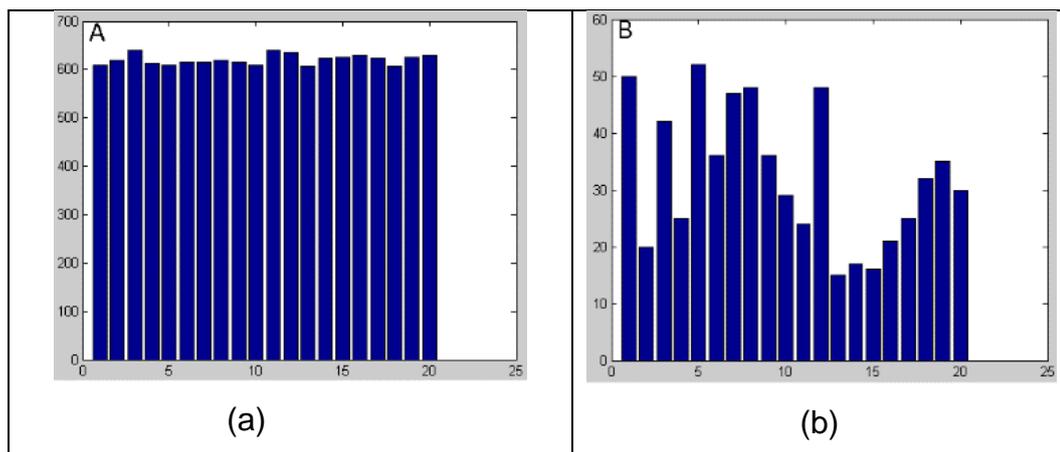


Figura 4.20 – Contagem de *spikes* e *bursts* para o microeletrodo 21, nos experimentos do 32 DIV: (a) número de *spikes*; (b) número de *bursts*.

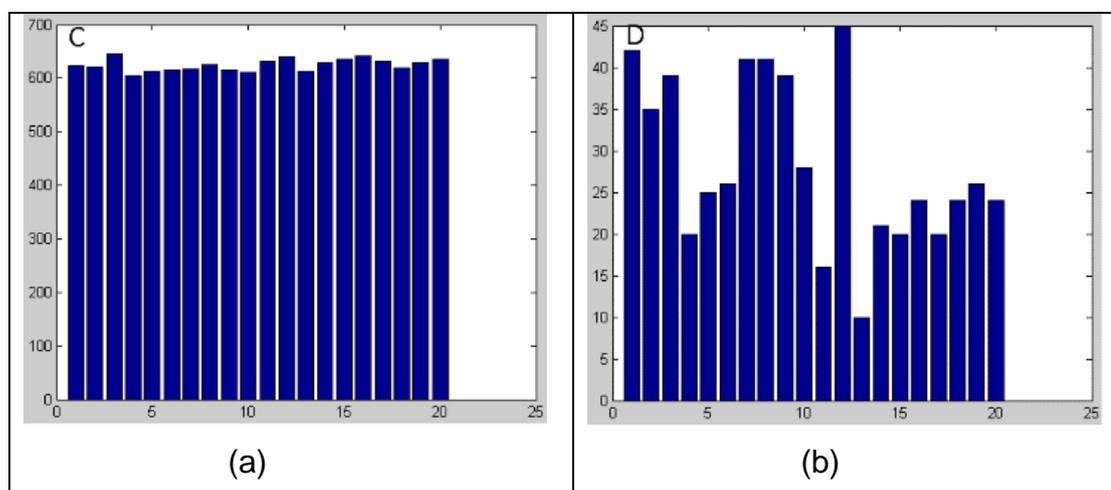


Figura 4.21 – Contagem de *spikes* e *bursts* para o microeletrodo 21, nos experimentos do 36 DIV: (a) número de *spikes*; (b) número de *bursts*.

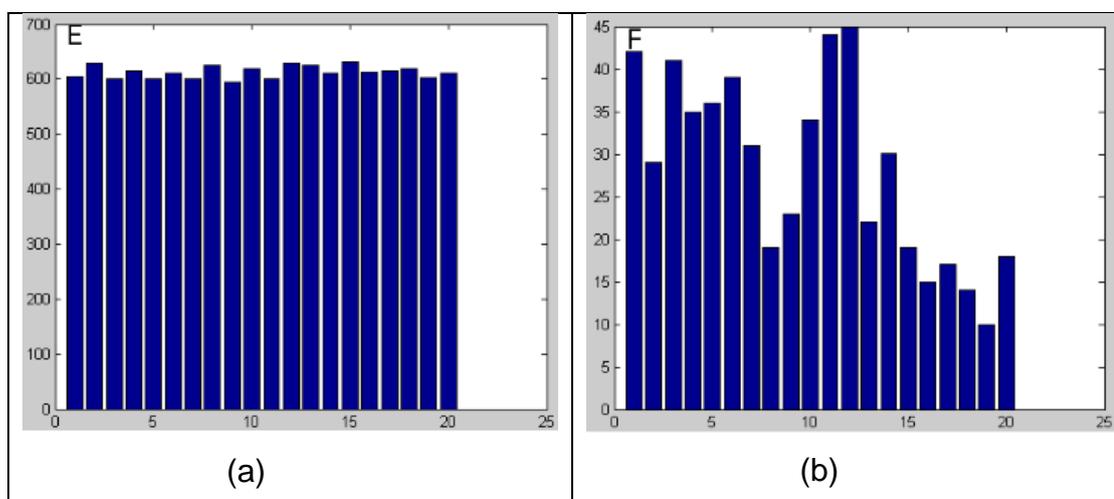


Figura 4.22 – Contagem de *spikes* e *bursts* para o microeletrodo 21, nos experimentos do 43 DIV: (a) número de *spikes*; (b) número de *bursts*.

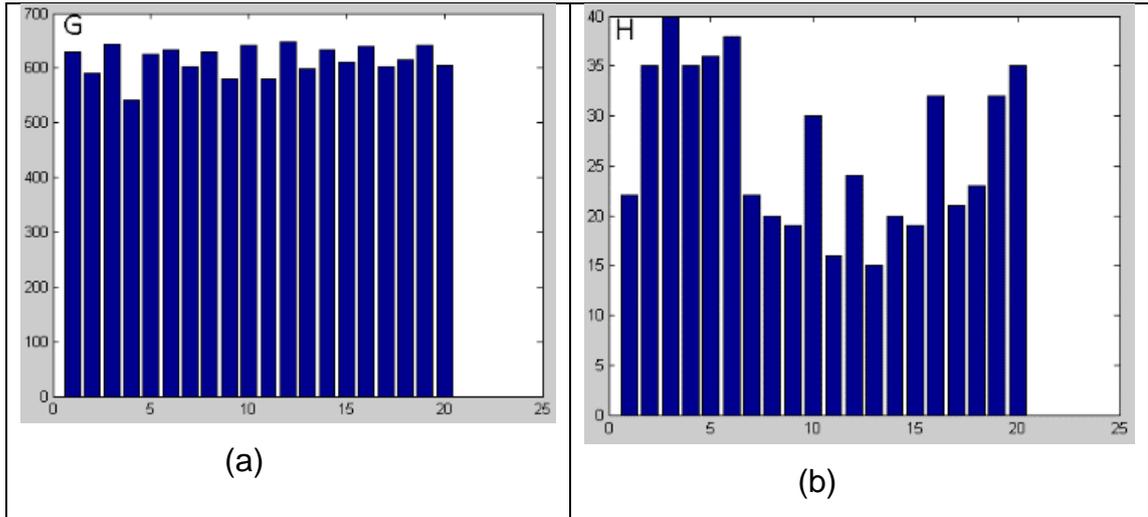


Figura 4.23 – Contagem de *spikes* e *bursts* para o microeletrodo 21, nos experimentos do 46 DIV: (a) número de *spikes*; (b) número de *bursts*.

Também, foi realizado um cálculo de medida de dispersão, mediante o cômputo da variância nos dados normalizados, por microeletrodo durante um DIV, considerando-se os dados individuais dos 20 segmentos de 1 minuto. Os cálculos das medidas de variância são mostrados por posições de microeletrodos na Figura 4.24 para *spikes* e na Figura 4.25 para *bursts*, respectivamente.

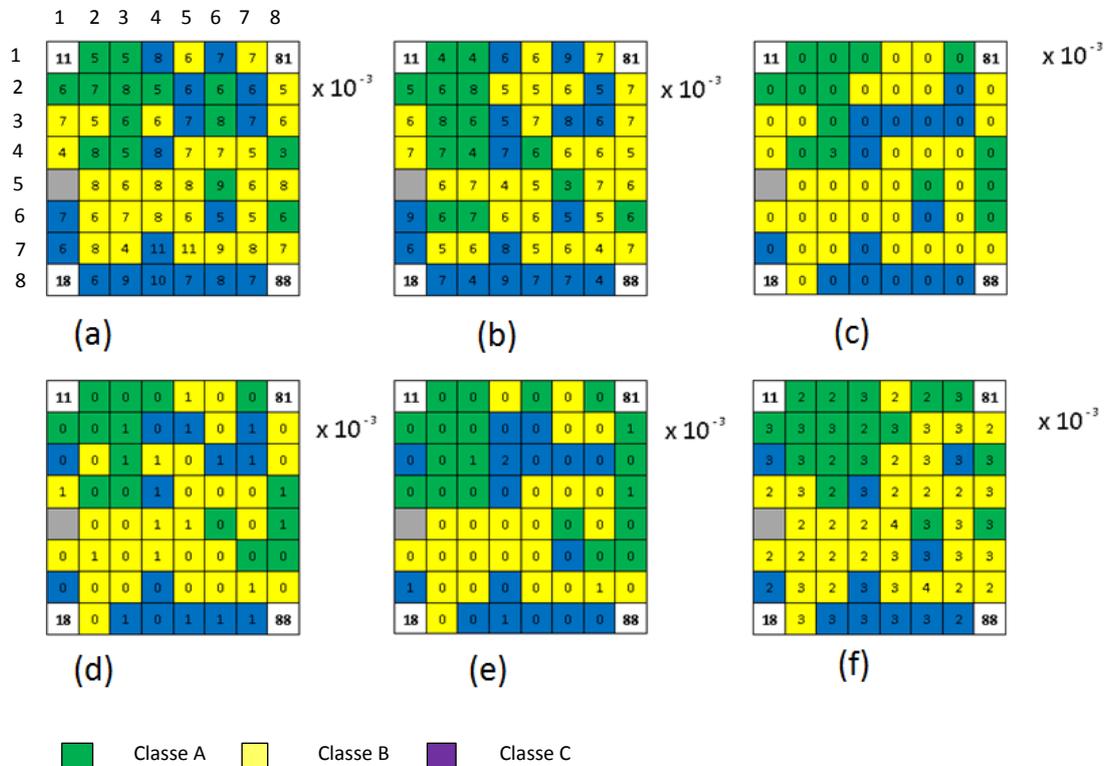


Figura 4.24 – Ilustração da classe dominante por DIVs, em cores, sendo cor verde (classe A), cor amarela (classe B) e cor azul (classe C); e o cálculo da variância para cada microeletrodo,

mostrado internamente às células, considerando-se a contagem de *spikes*, para: (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV.

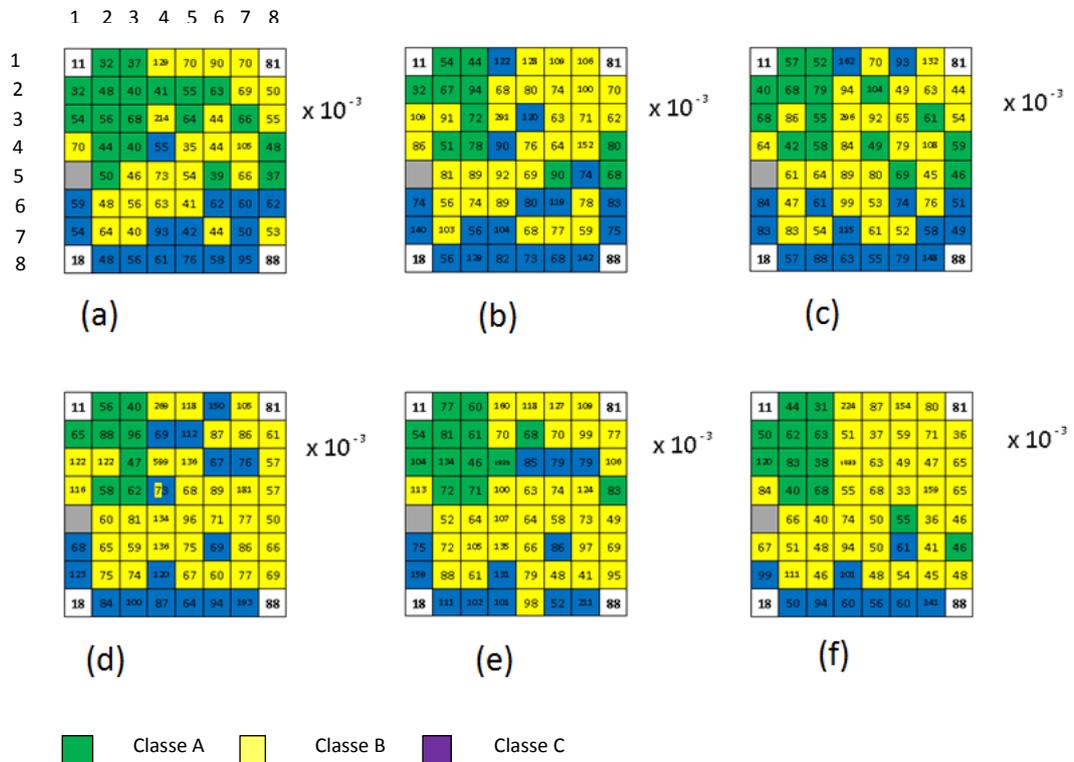


Figura 4.25 – Ilustração da classe dominante por DIVs, em cores, sendo cor verde (classe A), cor amarela (classe B) e cor azul (classe C); e o cálculo da variância para cada microeletrodo, mostrado internamente às células, considerando-se a contagem de *bursts*, para: (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV.

Considerando-se os dados quantificados por ambos os tipos de informações (*spikes* e *bursts*), observa-se que as variâncias pelo cálculo de *spikes* é menor com respeito aos cálculos encontrados usando *bursts*. Isso implica que é a classificação em função do número de *spikes* é mais estável em relação à classificação em função do número de *bursts*.

Na Figura 4.26, mostra-se o comportamento do microeletrodo 21 nos diferentes DIVs, quanto os valores de variância mostrados anteriormente (Figuras 4.24 e 4.25).

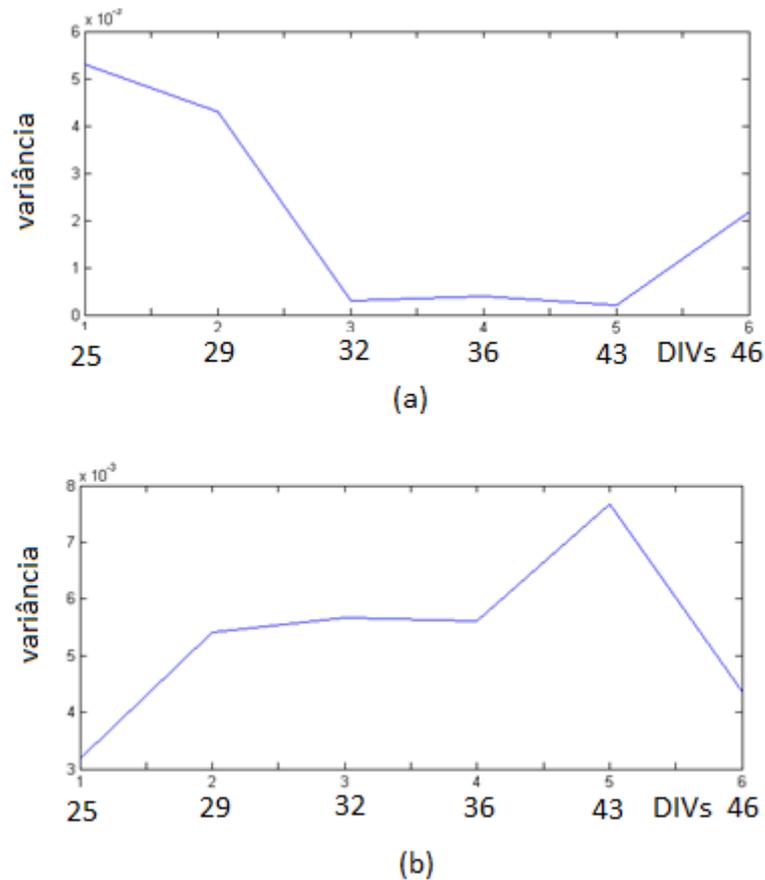


Figura 4.26 – Microeletrodo 21, quanto a variância nos diferentes DIVs ( 25DIV, 29DIV, 32DIV, 36DIV, 43DIV e 46DIV): (a) para *spikes* e (b) para *bursts*.

Segundo a Figura 4.26, pode se ratificar que a menor variância é a encontrada nos dados quantificados por *spikes*. Também, pode se observar que na Figura 4.26(a) existe uma região muito estável de comportamento dos neurônios no intervalo entre o 32DIV e 43DIV, que poderia ser considerado um período de maturidade da cultura. Por outro lado, observa-se na Figura 4.26(b), relativa à variância sobre a quantificação de *bursts*, observa-se uma região de estabilidade na região entre o 29 DIV e 36 DIV, indicando uma possível identificação de maturidade da cultura. Considerando-se as observações anteriores, nota-se que os intervalos de maturidade da cultura seriam diferentes, em função das duas quantificações *spikes* e *bursts*, de um ponto de vista. Porém, uma outra possibilidade seria considerar a ocorrência de menor variância para uma das quantificações, dentre *spikes* e *bursts*, como indicação de maturidade da cultura, caso em que todo o período entre 29 DIV a 43 DIV possa ser considerado.

## 4.9 Considerações Finais

Neste capítulo foram descritos os resultados obtidos dos procedimentos usados de obtenção da distribuição topológica virtual de neurônios em função dos registros de sinais eletrofisiológicos em matriz de microeletrodos, MEA. O método foi validado a partir de uma comparação com uma distribuição topológica real de neurônios obtida por processamento de imagem numa imagem fotográfica da cultura. Também, foram realizadas análises de instabilidade de atividades espontâneas, em função da contagem de *spikes* e *bursts*, ao longo dos 20 minutos de registro para o microeletrodo 21; e a análise de variância das atividades em função dessas contagens durante os 20 minutos de registro, para todos os microeletrodos. O próximo capítulo apresenta as conclusões e proposições para trabalhos futuros.

# Capítulo 5

## CONCLUSÕES

---

Uma característica importante deste trabalho de doutorado, é o desenvolvimento de uma metodologia que mistura dos processamentos de: imagens (PI) e sinais (PS), para a estimação da distribuição topológica virtual de neurônios numa cultura em matriz de microeletrodos planar, MEA, em função do mapeamento das atividades de registros de sinais eletrofisiológicos.

Para a validação da metodologia, foi usado um conjunto de dados anteriormente obtidos na Universidade de Gênova, sobre registro de sinais eletrofisiológicos de neurônios hipocâmpais em embriões de ratos Wistar, correspondentes a 46 dias de cultivo de neurônios, além de um conjunto de imagens fotográficas da cultura de neurônios.

Em função da mistura de sinais de diversos neurônios da cultura, quando são registrados os sinais pelos microeletrodos da MEA, foi aplicado o método de separação cega de fontes, com o uso do ICA (*Independent Component Analysis*), assegurando-se que cada microeletrodo receba sinais apenas dos neurônios adjacentes, permitindo estimar o número de neurônios adjacentes aos microeletrodos.

Neste trabalho foram realizados vários experimentos utilizando dados de uma cultura real. Os processamentos foram feitos para a obtenção do mapa de distribuição topográfica virtual dos neurônios ao longo dos experimentos.

Foram obtidos mapas de distribuição topológica virtual baseados em contagem de *spikes* e contagem de *bursts*, e feitas as comparações, concluindo-se que a contagem de *spikes* representa melhor a atividade dos neurônios do que a contagem de *bursts*.

As estimações do número de neurônios do mapa de distribuição virtual só poderiam ser obtidas e validadas comparando o mapa de contagem real de

---

neurônios na imagem fotográfica da cultura e o mapa de atividades neuronais, em função de dados fisiológicos registrados.

## 5.1 Contribuições e Limitações

A principal contribuição desta tese é a metodologia de mapeamento topológico virtual de cultura de neurônios a partir de registros de sinais eletrofisiológicos. Essa estimativa, no entanto, só pode ser feita com a existência de pelo menos uma imagem fotográfica em algum dia da cultura em maturidade, ou alguma informação que permita inferir sobre o número real de neurônios, em função da atividade neuronal em termos de contagem de *spikes* ou *bursts*.

Durante o processamento dos dados fisiológicos, identificou-se uma característica de valores que permitiu localizar intervalos nos dados quantificados, que deviam ser considerados para o mapeamento representativo da cultura.

Com a metodologia, ganhou-se uma ferramenta de análise da instabilidade de classes, com a qual podem ser identificados períodos estáveis de cultura, o que pode originar novas pesquisas, não sendo de fácil identificação se não fosse realizado o mapeamento topológico da cultura.

Observa-se que a metodologia pode ser aplicada a quaisquer tipos de dados quantificáveis a partir dos sinais eletrofisiológicos, garantido uma representação topológica não convencional, além dos *spikes* e *bursts*.

Em termos computacionais, um conjunto de ferramentas que combinam técnicas de processamento de imagens e de sinais foram desenvolvidas.

## 5.2 Trabalhos Futuros

Propõe-se utilizar a metodologia com simuladores e observar, mediante outros algoritmos o desenvolvimento e geração dos sinais por mais tempo.

Um outro trabalho futuro é a construção de um sistema gráfico que permita construir o mapa de distribuição virtual de neurônios, automaticamente.

---

# BIBLIOGRAFIA

---

- ADIGA**, U.; **CHAUDHURI**, B. B.(2001). An efficient method based on watershed and rule-based merging for segmentation of 3-D histo-pathological images, *Pattern Recognition*, v. 34, n. 7, p. 1449-1458.
- BAKKUM**, J.; **GAMBLIN**, P.M.; **BEN-ARY**, G.; **CHAO**, Z.C.; **POTTER**, S.M. (2007). MEART: the semi-living artist. *Frontiers in neurorobotics*, v. 1.
- BAKKUM**, J.D.; **FREY**, U.; **RADIVOJEVIC**, M.; **RUSSELL**, T.L.; **MULLER**, J.; **FISCELLA**, M.; **TAKAHASHI**, H.; **HIELERMANN**, A. (2013). Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites, *Nature Communications*, v.4, n.2181, p.1-12.
- BAREKET-KEREN**, L.; **HANEIN**, Y. (2014). Carbon nanotube-based multi electrode arrays for neuronal interfacing: progress and prospects, *Frontiers Research Topics - Closing the Loop Around Neural Systems*, Potter, S.M.; Hady, A.E.; Fetz, E.E. eds., p. 10-25.
- BELAID**, J.; **MOUROU**, W. (2011). Image segmentation: a watershed transformation algorithm. *Image Analysis & Stereology*, v. 28, n. 2, p. 93-102.
- BERDONDINI**, L.; **OVERSTOLZ**, T.; **ROOIJ**, N.F.; **KOUDELKA-HEP**, M.; **WANY**, M.; **SEITZ**, P. (2001). High-Density microelectrode arrays for electrophysiological activity imaging of neuronal networks, *ICECS 2001, 8th IEEE International Conference on Electronics, Circuits and Systems*, 2-5 set, p. 1239-1242.
- BERGER**, T.W.; **HAMPSON**, R.E.; **SONG**, D.; **GOONAWARDENA**, A.; **MARMARELIS**, V.Z.; **DEADWYLER**, S.A. (2011). A cortical neural prosthesis for restoring and enhancing memory. *Journal of Neural Engineering*, v. 8, n. 4, p. 046017.
- BEUCHER**, S.; **MEYER**, F. (1992). The morphological approach to segmentation: the watershed transformation. *OPTICAL ENGINEERING-NEW YORK-MARCEL DEKKER INCORPORATED*, v. 34, p. 433-433.
- BEZDEK**, J.C. (1981). *Pattern recognition with fuzzy objective function algorithms*. Norwell, MA, USA, Kluwer Academic Pub.
- BLUM**, R. A. (2007). *An Electronic System for extracellular neural stimulation and recording*, tese de doutorado. Georgia Institute of Technology.

- BOIDO**, D.; FARISELLO, P.; CESCA, F.; FERREA, E.; VALTORTA, F.; BENFENATI, F.; BALDELLI, P. (2010). Cortico-hippocampal hyperexcitability in synapsin I/II/III knockout mice: age-dependency and response to the antiepileptic drug levetiracetam. *Neuroscience*, v. 171, n. 1, p. 268-283.
- BREIT**, S.; SCHULZ, B.; BENABID, A.-L. (2004). Deep brain stimulation. *Cell and tissue research*, v. 318, n. 1, p. 275-288.
- BROWN**, D.; YAMADA, S.; SEJNOWSKI, J. (2001). Independent component analysis at the neural cocktail party. *Trends in neurosciences*, v. 24, n. 1, p. 54-63.
- CHIAPPALONE**, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARCOLI, M.; DAVIDE, F.; MARTINOIA, S. (2003). Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, n. 5, p. 627-634.
- CHIAPPALONE**, M.; BOVE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S. (2006). Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain research*, v. 1093, n. 1, p. 41-53.
- COGOLLO**, J.F.S.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S.; RAITERI, R. (2011). A new integrated system combining atomic force microscopy and micro-electrode array for measuring the mechanical properties of living cardiac myocytes. *Biomedical Microdevices*, 13, pp. 613-621.
- COMON, P.(1994). Independent component analysis, a new concept? *Signal processing*, v. 36, n. 3, p. 287-314.
- DA FONTOURA** , L. C.; CESAR JR , M. (2010). *Shape analysis and classification: theory and practice*. Boca Raton, FL, USA, CRC press.
- DESAI**, S.A.; GUTEKUNST,C.A.; POTTER, S.M.; GROSS, R.E. (2014). Deep brain stimulation macroelectrodes compared to multiple microelectrodes in rat hippocampus, *Frontiers in Neuroengineering*, v.7, p.1-8.
- DOWNES**, J.H.; HAMMOND, M.W.; XYDAS, D.; SPENCER, M.C.; BECERRA, V.M.; WARWICK, K.; WHALLEY, B.J.; NASUTO, S.J. ( 2012). Emergence of a small-world functional network in cultured neurons, *PLOS Computational Biology*, Vol.8, n. 5, p. 1-16.
- DROGE**, M.H.; GROSS, G.H.; HIGHTOWER, M.H.; CZISNY, L.E. (1986). Multielectrode analysis of coordinated, multisite, rhythmic bursting in cultured CNS monolayer networks, *J. Neurosciences*, 6: 1583-1592.
- DUDA**, R. O.; HART, P. E.; STORK, D.G.(2006). *Pattern Classification*. New York, NY, USA, John Wiley & Sons.

- EGERT, U.; HÄMMERLE, H.** (2002). Application of the microelectrode-array (MEA) technology in pharmaceutical drug research, *Sensoren im Fokus neuer Anwendungen*, Baselt JP, Gerlach G (eds.), p. 51–54.
- EINEVOLL, G. T.; FRANKE, F.; HAGEN, E.; POUZAT, C.; HARRIS, K.D.** (2012). Towards reliable spike-train recordings from thousands of neurons with multielectrodes. *Current opinion in neurobiology*, v. 22, n. 1, p. 11-17.
- FEJTL, M.; STETT, A.; NISCH, W.; BOVEN, K. H.; MOLLER, A.** (2006). On micro-electrode array revival: its development, sophistication of recording, and stimulation. *Advances in Network Electrophysiology*. [S.l.]: Springer. 2006. p. 24-37.
- FERREIRA, A. J.** Aplicação da análise em componentes independentes na compressão de imagem. Lisboa: Engenharia Electrotécnica e de Computadores, Univ. Técnica de Lisboa, Dissertação de Mestrado, 2002.
- FRANKE, F.; JACKEL, D.; DRAGAS, J.; MUILER, J.; RADIVOJEVIC, M.; BAKKUM, D.; HIERLEMANN, A.** (2012). High-density microelectrode array recordings and real-time spike sorting for closed-loop experiments: an emerging technology to study neural plasticity, *Frontier in Neural Circuits*, v.6, n. 105, p.1-7.
- FRISTON, K.J.** (2010). The free-energy principle: a unified brain theory? *Nat Rev. Neuroscience* 11(2), p.127-138.
- FROMHERZ, P.; OFFENHAUSSER, A.; VETTER, T.; WEIS, J.** (1991). A neuron-silicon junction: A Retzius cell of the leech on an insulated-gate field effect transistor, *Science*, 252, p.1290-1293.
- GONZALEZ, R.C. ; WOODS, R.E. ; EDDINS,S.V.** (2010). *Digital Image Processing Using MATLAB*. New Jersey, Pearson Education.
- GONZALEZ, R.C.; WOODS, R.E.** (2008) *Digital Image Processing*, 3rd ed.. New Jersey, Pearson Education.
- GRANADOS-FUENTES, D.; SAXENA, M.T.; PROLO, L.M.; ATON,S.J.; HERZOG, E.D.** (2004). Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms, *European Journal of Neuroscience*, Vol. 19, p. 898-906.
- GROSS, G.W.**(1979). Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multi-microelectrode surface, *IEEE Trans. Biomed. Engineering*, v.26, p. 273-279.

- GROSS**, G.W.; **KOWALSKI**, J.M. (1991). Experimental and theoretical analyses of random network dynamics. In: Antognetti, P., Milutinovic, V. (eds.), *Neural Networks, Concepts, Application and Implementation*, vol.4. New Jersey, Prentice-Hall, p. 47-110.
- GROSS**, G. W.; **AZZAZU**, H.M.E.; **WU**, M.C. (1995). The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 10, n. 6, p. 553-567.
- HALES**, C. M.; **ROLSTON**, D.; **POTTER**, M. (2010). How to culture, record and stimulate neuronal networks on micro-electrode arrays (MEAs). *Journal of Visualized Experiments*, n. 39.
- HERMLE**, T.; **SCHWARZ**, C.; **BOGDAN**, M. (2004). Employing ICA and SOM for spike sorting of multielectrode recordings from CNS. *Journal of Physiology-Paris*, v. 98, n. 4, p. 349-356.
- HYVARINEN**, A. (1999). Fast and robust fixed-point algorithms for independent component analysis, *IEEE Transactions on Neural Networks*, v. 10, n. 3, p. 626-634.
- HYVARINE**, A.; **KARHUNEN**, J.; **OJA**, E. (2001). *Independent Component Analysis*. New York, John Wiley & Sons.
- ISOMURA**, T., **KOTANI**, K., **JIMBO**, Y.(2015). Cultured Cortical Neurons Can Perform Blind Source Separation According to the Free-Energy Principle. *PLOS-Computational Biology*, p.1-29.
- JACKEL**, D.; **FREY**, U.; **FISCELA**, M.; **FRANKE**, F.; **HIELEMANN**, A. (2012). Applicability of independent component analysis on high-density microelectrode array recordings, *J. Neurophysiology*, v.108, p. 334-348.
- JAMES**, J.; **HESSE**, W. (2005). Independent component analysis for biomedical signals. *Physiological measurement*, v. 26, n. 1, p. R15.
- JAYNES**, E.T. (1957). Information theory and statistical mechanics, *Physical Review*, 106(4); 620-630.
- JIMBO**, Y.; **TATENO**, T.; **ROBINSON**, H.P.C. (1999). Simultaneous induction of pathway specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys. J.*, 76: 670-678.
- JIMBO**, Y., **ROBINSON**, H.P. (2000). Propagation of spontaneous synchronized activity in cortical slice cultures recorded by planar electrode arrays. *Bioelectrochemistry*, v.51, n.2, p.107-115.
- JOBLING**, D.T.; **SMITH**, J.G.; **WHEAL**, H.V. (1981). Active microelectrode array to record from the mammalian central nervous system in vivo, *Med. Biol. Comp.* v.19, p.553-560.
- LAMBERT** , S.; **MARIAM** , T.; **SUSAN** , H. (2010). *ImageJ*. VDM Publishing.

- LEBEDEV, A.; NICOLELIS, A. (2006).** Brain-machine interfaces: past, present and future. *TRENDS in Neurosciences*, v. 29, n. 9, p. 536-546.
- LENT, R. (2001).** Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência. São Paulo, Ed. Atheneu.
- LEWICKI, S. (1998).** A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network: Computation in Neural Systems*, v. 9, n. 4, p. 53-78.
- LITKE, A. M.; BEZAYIFF, N.; CHICHILNISKY, E.J.; CUNNINGHAM, W.; DABROWSKI, W.; GRILLO, A.A.; GRIVICH, M.; GRIBOS, P.; HOTOWY, P.; KACHIGUINE, S.; KALMAR, R.S.; MATHIESON, K.; PETRUSCA, D.; RAHMAN, M.; SHER, A. (2004).** What does the eye tell the brain?: Development of a system for the large-scale recording of retinal output activity. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, v. 51, n. 4, p. 1434-1440.
- LITT, B.; D'ALESSANDRO, A.; ESTELLER, R.; ECHAUZ, J.; VACHTSEVANOS, G. (2003).** Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy. *First International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 2003. Conference Proceedings. IEEE*, p. 485-488.
- LOTUFO, R. A.; AUDIGIER, R.; SAÚDE, A. V.; MACHADO, R. C. (2008).** Morphological Image Processing. Q. Wu; F. A. Merchant; K. R. Castleman (Eds.); *Microscope Image Processing*. Burlington, Academic Press, p.113–157.
- MAEDA, E.; ROBINSON, H.P.C.; KAWANA, A. (1995).** The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons, *J. Neuroscience*, v.15, p.6834-6845.
- MAHER, M. P.; PINE, J.; WRIGHT, J.; TAI, Y.C. (1999).** The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *Journal of neuroscience methods*, v. 87, n. 1, p. 45-56.
- MARI, F.; SAITO, J.H.; DESTRO-FILHO, J.B.; MARTINOIA, S. (2009).** Three-dimensional visualization of rat hippocampal cultured neurons based on images of multielectrode arrays (MEA). *Sixth International Workshop on Computational Systems Biology, WCSB 2009. Aarhus, Denmark: Proceedings of the Sixth International Workshop on Computational Systems Biology, WCSB 2009. 2009. p. 115-118.*

- MARI, J. F.** (2015). Análise quantitativa de culturas de neurônios em matrizes de microeletrodos por meio do processamento de imagens de microscopia confocal de fluorescência. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos.
- MARI, J.F.; SAITO, J.H.; NEVES, A.F.; LOTUFO, C.M.C.; DESTRO-FILHO, J.B.; NICOLETTI, M.C.** (2015). Quantitative analysis of rat dorsal root ganglion neurons cultured on microelectrode arrays based on fluorescence microscopy image processing, *International Journal of Neural Systems*, v.25, p.1-22.
- MAROM, S.; SHAHAF, G.** (2002). Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Quarterly reviews of biophysics*, v. 35, n. 1, p. 63-87.
- MARTINOIA, S.; MASSOBRIO, P.; BOVE, M.; MASSOBRIO, G.** (2004). Cultured neurons coupled to microelectrode arrays: circuit models, simulations and experimental data , *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51, p. 859– 864.
- MEISTER, M.; PINE, J.; BAYLOR, D.A.** (1994). Multi-neuronal signals from the retina - acquisition and analysis, *Neuroscience Methods*, v.51, p. 95-106.
- MORIN, O.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E.** (2005). Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 100, n. 2, p. 131-143.
- MULTICHANNEL SYSTEM** (2015). Multichannel Systems Innovations in Electrophysiology. Disponível em: <<http://www.multichannelsystems.com/products/usb-mea-systems>>. Acesso em: 20 setembro 2015.
- NOVELLINO, A.; CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; BOVE, M.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S.** (2003). Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays. *Neurocomputing*, v. 52, p. 661-669.
- NOVELLINO, A.; D'ANGELO, P.; COZZI, L.; CHIAPPALONE, M.; SANGUINETI, V.; MARTINOIA, S.** (2007). Connecting neurons to a mobile robot: an in vitro bidirectional neural interface. *Computational Intelligence and Neuroscience*, v. 2007, 13 páginas.
- OKA, H.; SHIMONO, K.; OGAWA, R.; SUGIHARA, H.; TAKETANI, M.** (1999). A new planar multielectrode array for extracellular recording: Application to hippocampal acute slice, *J. Neuroscience Methods*, v.93, p.61-67.
- OTSU, N.** (1975). A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica* , v. 11, p. 23-27.

- PENG**, T.; **BALIJEPELLI**, A.; **GUPTA**, S.K.; **LEBRUN**, T. (2007). Algorithms for On-Line Monitoring of Micro Spheres in an Optical Tweezers-Based Assembly Cell. *Journal of Computing and Information Science in Engineering*, v. 7, n. 4, p. 330–338.
- PINE**, J. (1980). Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes, *J. Neuroscience Methods*, v.2, p.19-31.
- PINE**, J. (2006). A History of MEA development. In: Baudry M., Taketani, M., eds. *Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays*. New York: Springer Press, p.3:23.
- POTTER**, M.; **WAGENAAR**, A.; **DEMARSE**, B. (2006). Closing the loop: stimulation feedback systems for embodied MEA cultures. *Advances in Network Electrophysiology*, M.Taketani & M.Baudry (eds.), New York, NY, Springer, p. 215-242.
- POTTER**, S. M. (2001). Distributed processing in cultured neuronal networks. *Progress in brain research*, v. 130, p. 49-62.
- POTTER**, S. M.; **DEMARSE**, T. B. (2001). A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of neuroscience methods*, v. 110, n. 1, p. 17-24.
- RODRIGUEZ**, M. Z. (2012). Análise evolutivo e modelado da dinâmica de interação de cultura de neurônios de tecido cortical in vitro numa matriz de microeletrodos. Dissertação de Mestrado, UFSCar.
- RUTTEN**, W.; **MOUVEROUX**, J.M.; **BUITENWEG**, J.; **HEIDA**, C.; **RUARDIJ**, T.; **MARANI**, E.; **LAKKE**, E. (2001). Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a cultured probe. *Proceedings of the IEEE*, vol. 89, n.7, p. 1013-1029.
- SAITO**, J. H.; **MARI**, J.F.; **PEDRINO**, E.; **DESTRO-FILHO**, J.B.; **NICOLETTI**, M.C. (2013). Simulated Activation Patterns of Biological Neurons Cultured onto a Multi-Electrode Array Based on a Modified Izhikevich's Model. *Fundamental Informaticae*, v. 124, p. 111-132.
- SCHNITZER**, M.J.; **MEISTER**, M. (2003). "Multineural firing patterns in the signal from eye to brain", *Neuron*, vol. 37, p. 499-511.
- SCHWARTZ**, B. (2004). Cortical neural prosthetics. *Annual review of neuroscience*, v. 27, p. 487-507.
- SEGEV**, R.; **GOODHOUSE**, J.; **PUCHALLA**, J.; **BERRY**, M.J. (2004). Recording spikes from a large fraction of the ganglion cells in a retinal patch. *Nature neuroscience*, v. 7, n. 10, p. 1155-1162.
- SERRA**, J. (1984). *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Londres, Academic Press.

- SNELLINGS**, A.; **ANDERSON**, D. J.; **ALDRIDGE**, J. W. (2006). Improved signal and reduced noise in neural recordings from close-spaced electrode arrays using independent component analysis as a preprocessor. *Journal of neuroscience methods*, v. 150, n. 2, p. 254-264.
- STEGENGA**, J.; **LE FEBER**, J.; **MARANI**, E.; **RUTTEN**, W.L. (2008). Analysis of cultured neuronal networks using intraburst firing characteristics. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 55, n. 4, p. 1382-1390.
- STETT**, A.; **EGERT**, U.; **GUENTER**, E.; **HOFMANN**, F.; **MEYER**, T.; **NISCHI**, W.; **MAEMMERLE**, H. (2003). Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.377, p. 486-495.
- TAKAHASHI**, S.; **ANZAI**, Y.; **SAKURAI**, Y. (2003). Automatic sorting for multi-neuronal activity recorded with tetrodes in the presence of overlapping spikes. *Journal of neurophysiology*, v. 89, n. 4, p. 2245-2258.
- TAKAHASHI**, S.; **SAKURAI**, Y. (2005). Real-time and automatic sorting of multi-neuronal activity for sub-millisecond interactions in vivo. *Neuroscience*, v. 134, n. 1, p. 301-315.
- TELEA**, C. (2014). *Data visualization: principles and practice*, second edition. Wellesley, MA, A.K.Peters.
- THOMAS**, C.A.; **SPRINGER**, P.A.; **LOEB**, G.E.; **BERWALD-NETTER**, Y.; **OKUN**, L.M. (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Research*, v.74, p. 61-66.
- VINCENT**, L.; **SOILLE**, P. (1991). Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis & Machine Intelligence*, n. 6, p. 583-598.
- WAGENAAR**, D.A.; **POTTER**, S.M. (2005). A versatile all-channel stimulator for electrode arrays, with real-time control, *J. Neural Engineering*, v.1, p. 39-44.
- WARWICK**, K.; **GASSON**, M.; **HULT**, B.; **GOODHEW**, I.; **KYBERD**, P.; **ANDREWS**, B.; **TEDDY**, P.; **SHAD**, A. (2003). The application of implant technology for cybernetic systems. *Archives of neurology*, v. 60, n. 10, p. 1369-1373.
- WELSH**, D.K.; **LOGOTHETIS**, D.E.; **MEISTER**, M.; **REPERT**, S.M. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms, *Neuron*, v.14, p.697-706.

**WHEELER**, B.C.; **NOVAK**, J.L. (1986). Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation, *IEEE Trans. Biomedical Engineering*, v.33, p.1204-1212.

**ZIEGLER**, C. (2000). Cell-based biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 366, p. 552-559.

**ZITOVA**, B.; **FLUSSER**, J. (2003). Image registration methods: a survey, *Image and vision computing*, v. 21, n. 11, p. 977-1000.

## Apêndice A – Tabelas de contagem de spikes

**Tabela A.1 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 25 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neur
12	630	615	642	611	624,50	0,80	33
13	550	595	520	532	549,25	0,04	2
14	612	606	621	604	610,75	0,66	28
16	536	578	581	535	557,50	0,13	5
17	558	590	577	524	562,25	0,17	7
21	622	587	630	612	612,75	0,68	28
22	648	661	629	643	645,25	1,00	42
23	610	590	605	614	604,75	0,60	25
24	645	620	654	642	640,25	0,95	40
25	620	637	601	650	627,00	0,82	34
26	590	605	611	595	600,25	0,55	23
27	610	595	622	590	604,25	0,59	25
28	580	575	600	589	586,00	0,41	17
31	656	604	662	643	641,25	0,96	40
32	604	618	625	616	615,75	0,71	30
33	662	645	620	627	638,50	0,94	39
34	643	615	686	623	641,75	0,97	41
35	612	597	622	608	609,75	0,65	27
36	619	608	596	601	606,00	0,61	26
37	595	604	590	610	599,75	0,55	23
38	560	582	543	587	568,00	0,23	10
41	592	585	576	583	584,00	0,39	16
42	571	569	591	557	572,00	0,27	11
43	583	575	590	571	579,75	0,35	15
44	577	569	581	596	580,75	0,36	15
45	604	612	589	609	603,50	0,59	25
46	615	594	622	611	610,50	0,66	28
47	576	587	574	584	580,25	0,35	15
48	579	568	586	583	579,00	0,34	14
51	560	584	551	599	573,50	0,29	12
52	591	583	577	581	583,00	0,38	16
53	584	597	572	590	585,75	0,41	17
54	600	582	577	591	587,50	0,43	18
55	624	618	608	639	622,25	0,77	32
56	618	611	625	609	615,75	0,71	30
57	570	549	592	598	577,25	0,32	14
58	587	574	571	540	568,00	0,23	10
61	561	580	563	591	573,75	0,29	12
62	577	594	575	555	575,25	0,30	13
63	581	576	591	539	571,75	0,27	11
64	621	607	631	618	619,25	0,74	31
65	617	601	625	611	613,50	0,69	29
66	604	597	611	617	607,25	0,62	26
67	601	589	594	588	593,00	0,48	20
68	570	583	564	579	574,00	0,29	12
71	612	591	606	588	599,25	0,54	23
72	575	581	573	585	578,50	0,34	14
73	579	584	597	583	585,75	0,41	17
74	594	608	589	601	598,00	0,53	22
75	618	621	613	622	618,50	0,74	31
76	587	594	601	598	595,00	0,50	21
77	612	603	596	593	601,00	0,56	24
78	562	574	590	569	573,75	0,29	12
82	621	635	607	641	626,00	0,81	34
83	597	606	588	609	600,00	0,55	23
84	639	625	630	621	628,75	0,84	35
85	623	619	625	614	620,25	0,75	32
86	634	625	618	631	627,00	0,82	34
87	591	603	611	597	600,50	0,56	23

**Tabela A.2 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 29 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	632	611	645	615	625,75	0,79	33
13	552	600	524	536	553,00	0,03	1
14	618	605	630	611	616,00	0,69	29
16	533	581	590	529	558,25	0,09	4
17	560	584	581	530	563,75	0,14	6
21	635	589	642	625	622,75	0,76	32
22	656	654	632	644	646,50	1,01	42
23	610	585	601	613	602,25	0,54	23
24	644	614	671	652	645,25	0,99	42
25	630	621	620	632	625,75	0,79	33
26	601	604	611	589	601,25	0,53	22
27	614	605	622	584	606,25	0,59	25
28	595	574	603	598	592,50	0,44	19
31	660	615	656	652	645,75	1,00	42
32	611	629	632	614	621,50	0,74	31
33	674	652	632	611	642,25	0,96	40
34	623	614	690	635	640,50	0,94	40
35	632	602	595	601	607,50	0,60	25
36	611	612	602	614	609,75	0,62	26
37	595	603	595	611	601,00	0,53	22
38	665	589	565	584	600,75	0,53	22
41	602	562	586	590	585,00	0,36	15
42	571	568	584	560	570,75	0,22	9
43	590	575	574	574	578,25	0,29	12
44	578	580	576	605	584,75	0,36	15
45	611	624	601	613	612,25	0,65	27
46	612	602	620	613	611,75	0,64	27
47	580	587	575	584	581,50	0,33	14
48	591	568	580	592	582,75	0,34	14
51	559	587	541	601	572,00	0,23	10
52	587	590	574	581	583,00	0,34	14
53	588	580	573	597	584,50	0,36	15
54	595	584	565	589	583,25	0,35	15
55	632	625	618	629	626,00	0,79	33
56	631	623	620	611	621,25	0,74	31
57	578	560	589	585	578,00	0,29	12
58	586	580	565	536	566,75	0,17	7
61	560	574	562	692	597,00	0,49	21
62	580	562	571	566	569,75	0,21	9
63	586	568	589	542	571,25	0,22	9
64	632	314	642	623	552,75	0,03	1
65	614	612	630	614	617,50	0,70	30
66	605	602	621	614	610,50	0,63	26
67	613	590	602	595	600,00	0,52	22
68	581	592	574	595	585,50	0,37	16
71	614	622	606	590	608,00	0,60	25
72	580	594	566	587	581,75	0,33	14
73	584	589	599	586	589,50	0,41	17
74	602	609	584	613	602,00	0,54	23
75	613	612	603	632	615,00	0,68	28
76	578	602	600	604	596,00	0,48	20
77	615	608	605	601	607,25	0,60	25
78	584	581	602	570	584,25	0,36	15
82	602	622	603	635	615,50	0,68	29
83	602	611	600	614	606,75	0,59	25
84	635	620	632	614	625,25	0,78	33
85	623	620	623	613	619,75	0,73	31
86	632	625	615	631	625,75	0,79	33
87	602	605	595	603	601,25	0,53	22

**Tabela A.3 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 32 DIV**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	622	613	652	620	626,75	0,69	29
13	560	603	532	526	555,25	0,01	0
14	615	603	622	604	611,00	0,54	23
16	526	584	586	532	557,00	0,03	1
17	558	595	584	524	565,25	0,11	4
21	622	584	632	612	612,50	0,55	23
22	648	663	632	645	647,00	0,88	37
23	603	594	603	614	603,50	0,47	20
24	642	623	655	652	643,00	0,84	35
25	623	637	605	642	626,75	0,69	29
26	584	603	614	603	601,00	0,44	19
27	614	605	632	598	612,25	0,55	23
28	574	575	605	574	582,00	0,26	11
31	660	609	674	654	649,25	0,90	38
32	609	624	632	611	619,00	0,61	26
33	672	652	630	628	645,50	0,86	36
34	650	675	692	623	660,00	1,00	42
35	623	589	625	608	611,25	0,54	23
36	618	608	603	598	606,75	0,50	21
37	609	608	601	602	605,00	0,48	20
38	574	595	562	587	579,50	0,24	10
41	602	585	574	585	586,50	0,31	13
42	580	582	596	557	578,75	0,23	10
43	595	574	566	575	577,50	0,22	9
44	578	569	581	596	581,00	0,25	11
45	611	612	589	611	605,75	0,49	21
46	615	600	611	603	607,25	0,50	21
47	564	587	571	562	571,00	0,16	7
48	574	580	590	581	581,25	0,26	11
51	566	587	560	602	578,75	0,23	10
52	605	594	589	586	593,50	0,37	16
53	582	602	570	604	589,50	0,33	14
54	602	582	584	602	592,50	0,36	15
55	632	615	608	645	625,00	0,67	28
56	614	609	632	600	613,75	0,56	24
57	560	542	600	584	571,50	0,17	7
58	591	574	574	540	569,75	0,15	6
61	564	600	555	591	577,50	0,22	9
62	577	566	580	550	568,25	0,13	6
63	594	580	603	539	579,00	0,24	10
64	606	612	603	622	610,75	0,54	22
65	618	614	612	624	617,00	0,59	25
66	612	613	600	617	610,50	0,53	22
67	603	600	584	588	593,75	0,38	16
68	580	592	574	583	582,25	0,27	11
71	609	600	598	590	599,25	0,43	18
72	575	594	566	587	580,50	0,25	11
73	570	584	605	585	586,00	0,30	13
74	600	608	570	608	596,50	0,40	17
75	623	619	613	624	619,75	0,62	26
76	591	584	598	604	594,25	0,38	16
77	618	600	609	600	606,75	0,50	21
78	581	570	574	560	571,25	0,16	7
82	535	641	600	678	613,50	0,56	24
83	586	600	584	609	594,75	0,38	16
84	645	632	641	652	642,50	0,83	35
85	671	654	635	666	656,50	0,97	41
86	645	656	618	655	643,50	0,84	35
87	562	584	590	597	583,25	0,28	12

**Tabela A.4 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 36 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm.	Neuro
12	625	622	658	635	635,00	0,64	27
13	549	602	512	532	548,75	0,01	1
14	635	600	603	604	610,50	0,46	19
16	536	582	574	536	557,00	0,07	3
17	560	564	580	562	566,50	0,14	6
21	639	632	645	639	638,75	0,67	28
22	658	671	659	684	668,00	0,88	37
23	692	590	611	614	626,75	0,58	24
24	678	681	690	685	683,50	1,00	42
25	652	653	621	666	648,00	0,74	31
26	590	598	611	598	599,25	0,38	16
27	603	611	613	600	606,75	0,44	18
28	576	575	584	589	581,00	0,25	10
31	684	689	674	689	684,00	1,00	42
32	635	639	641	645	640,00	0,68	29
33	678	689	687	685	684,75	1,01	42
34	649	652	686	622	652,25	0,77	32
35	608	597	625	611	610,25	0,46	19
36	619	622	613	614	617,00	0,51	21
37	615	614	600	613	610,50	0,46	19
38	574	584	543	582	570,75	0,17	7
41	582	560	580	583	576,25	0,21	9
42	546	572	584	582	571,00	0,18	7
43	574	579	584	582	579,75	0,24	10
44	580	569	575	531	563,75	0,12	5
45	615	617	590	609	607,75	0,44	19
46	609	594	613	610	606,50	0,43	18
47	584	585	569	585	580,75	0,25	10
48	584	586	574	556	575,00	0,20	9
51	552	574	550	584	565,00	0,13	6
52	574	582	577	584	579,25	0,24	10
53	570	584	569	584	576,75	0,22	9
54	595	594	584	584	589,25	0,31	13
55	639	648	635	654	644,00	0,71	30
56	635	639	641	651	641,50	0,69	29
57	560	600	574	581	578,75	0,23	10
58	574	574	589	561	574,50	0,20	8
61	546	562	580	602	572,50	0,19	8
62	580	564	578	542	566,00	0,14	6
63	578	580	586	578	580,50	0,24	10
64	600	607	605	611	605,75	0,43	18
65	647	651	625	656	644,75	0,71	30
66	602	639	612	617	617,50	0,51	22
67	611	619	594	599	605,75	0,43	18
68	574	583	541	546	561,00	0,10	4
71	614	611	606	599	607,50	0,44	19
72	580	576	565	578	574,75	0,20	9
73	574	584	597	580	583,75	0,27	11
74	602	596	611	613	605,50	0,43	18
75	680	685	659	692	679,00	0,96	40
76	594	611	612	619	609,00	0,45	19
77	612	615	619	616	615,50	0,50	21
78	584	596	581	574	583,75	0,27	11
82	614	648	654	652	642,00	0,69	29
83	613	619	616	594	610,50	0,46	19
84	656	676	645	672	662,25	0,84	35
85	648	659	681	674	665,50	0,86	36
86	674	682	645	631	658,00	0,81	34
87	611	606	615	599	607,75	0,44	19

**Tabela A.5 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 39 DIV**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	620	623	650	635	632,00	0,57	24
13	550	610	512	625	574,25	0,15	6
14	634	610	610	605	614,75	0,45	19
16	540	580	560	541	555,25	0,01	0
17	562	566	585	558	567,75	0,10	4
21	641	635	642	641	639,75	0,63	26
22	660	672	660	670	665,50	0,82	34
23	690	610	612	613	631,25	0,57	24
24	681	682	690	684	684,25	0,96	40
25	662	652	654	650	654,50	0,74	31
26	610	601	610	580	600,25	0,34	14
27	605	611	615	610	610,25	0,41	17
28	584	578	583	591	584,00	0,22	9
31	694	678	675	691	684,50	0,96	40
32	641	638	639	646	641,00	0,64	27
33	684	684	685	686	684,75	0,96	40
34	654	652	687	632	656,25	0,75	32
35	611	601	623	610	611,25	0,42	18
36	621	625	614	615	618,75	0,48	20
37	642	610	590	614	614,00	0,44	19
38	580	581	545	594	575,00	0,15	6
41	583	564	584	582	578,25	0,18	7
42	550	571	582	583	571,50	0,13	5
43	575	561	583	582	575,25	0,16	7
44	581	575	569	535	565,00	0,08	3
45	616	618	610	605	612,25	0,43	18
46	610	598	612	615	608,75	0,40	17
47	585	586	575	594	585,00	0,23	10
48	585	591	570	555	575,25	0,16	7
51	561	548	578	585	568,00	0,10	4
52	575	586	584	586	582,75	0,21	9
53	577	585	569	587	579,50	0,19	8
54	596	597	985	584	690,50	1,00	42
55	641	651	630	655	644,25	0,66	28
56	635	642	641	650	642,00	0,65	27
57	561	610	575	581	581,75	0,20	9
58	562	588	591	566	576,75	0,17	7
61	551	564	585	604	576,00	0,16	7
62	584	565	585	541	568,75	0,11	5
63	587	584	578	584	583,25	0,22	9
64	611	600	607	610	607,00	0,39	16
65	650	652	622	662	646,50	0,68	29
66	601	642	610	611	616,00	0,46	19
67	602	628	595	601	606,50	0,39	16
68	578	584	545	555	565,50	0,08	4
71	645	640	610	610	626,25	0,53	22
72	581	574	566	580	575,25	0,16	7
73	575	585	599	581	585,00	0,23	10
74	604	585	615	614	604,50	0,37	16
75	684	685	661	692	680,50	0,93	39
76	599	611	612	621	610,75	0,42	18
77	618	615	621	616	617,50	0,47	20
78	588	596	587	574	586,25	0,24	10
82	614	648	654	652	642,00	0,65	27
83	618	621	615	594	612,00	0,43	18
84	656	676	645	672	662,25	0,80	33
85	645	664	684	678	667,75	0,84	35
86	678	684	644	635	660,25	0,78	33
87	612	610	610	601	608,25	0,40	17

**Tabela A.6 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 43 DIV**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	630	652	648	651	645,25	0,67	28
13	582	610	578	569	584,75	0,14	6
14	612	616	615	616	614,75	0,40	17
16	576	578	581	584	579,75	0,10	4
17	569	572	578	569	572,00	0,03	1
21	682	587	684	682	658,75	0,79	33
22	652	661	645	656	653,50	0,75	31
23	611	600	610	614	608,75	0,35	15
24	665	659	665	642	657,75	0,79	33
25	675	673	662	656	666,50	0,86	36
26	600	611	615	618	611,00	0,37	16
27	621	616	611	605	613,25	0,39	16
28	580	585	581	574	580,00	0,10	4
31	666	636	656	668	656,50	0,77	33
32	635	641	648	652	644,00	0,66	28
33	674	681	672	680	676,75	0,95	40
34	666	671	686	684	676,75	0,95	40
35	619	618	620	618	618,75	0,44	18
36	621	619	600	605	611,25	0,37	16
37	610	614	619	610	613,25	0,39	16
38	570	580	575	587	578,00	0,08	3
41	580	584	576	575	578,75	0,09	4
42	575	576	585	557	573,25	0,04	2
43	585	580	571	576	578,00	0,08	3
44	578	576	581	590	581,25	0,11	5
45	614	616	615	610	613,75	0,40	17
46	616	618	620	618	618,00	0,43	18
47	579	584	586	586	583,75	0,13	5
48	578	580	586	586	582,50	0,12	5
51	574	575	576	584	577,25	0,07	3
52	584	583	587	586	585,00	0,14	6
53	574	578	574	579	576,25	0,06	3
54	596	584	584	581	586,25	0,15	6
55	684	682	679	685	682,50	1,00	42
56	620	635	642	645	635,50	0,59	25
57	572	570	569	574	571,25	0,02	1
58	578	580	582	574	578,50	0,08	4
61	665	666	665	591	646,75	0,69	29
62	581	564	574	570	572,25	0,03	1
63	581	584	586	584	583,75	0,13	5
64	615	616	616	618	616,25	0,42	18
65	644	615	639	654	638,00	0,61	26
66	614	611	613	614	613,00	0,39	16
67	616	617	619	617	617,25	0,43	18
68	562	575	564	579	570,00	0,01	0
71	616	615	609	609	612,25	0,38	16
72	578	574	584	585	580,25	0,10	4
73	582	581	586	589	584,50	0,14	6
74	613	619	612	619	615,75	0,41	17
75	621	635	642	640	634,50	0,58	24
76	618	617	619	620	618,50	0,44	18
77	605	611	615	619	612,50	0,38	16
78	584	584	590	569	581,75	0,11	5
82	645	610	654	658	641,75	0,64	27
83	613	616	617	609	613,75	0,40	17
84	665	659	674	678	669,00	0,88	37
85	674	675	682	667	674,50	0,93	39
86	665	658	663	659	661,25	0,82	34
87	614	616	619	616	616,25	0,42	18

**Tabela A.7 – Contagem de spikes por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 46 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	645	625	665	660	648,75	0,74	31
13	610	585	586	574	588,75	0,18	8
14	612	611	616	613	613,00	0,41	17
16	581	579	584	580	581,00	0,11	5
17	576	584	572	570	575,50	0,06	3
21	668	666	658	675	666,75	0,91	38
22	656	660	672	678	666,50	0,90	38
23	615	612	614	636	619,25	0,47	20
24	658	659	660	665	660,50	0,85	36
25	636	635	640	648	639,75	0,66	28
26	615	611	613	614	613,25	0,41	17
27	618	602	612	614	611,50	0,39	17
28	582	579	580	584	581,25	0,11	5
31	665	658	659	643	656,25	0,81	34
32	624	638	650	647	639,75	0,66	28
33	676	678	668	665	671,75	0,95	40
34	665	674	682	689	677,50	1,00	42
35	612	605	620	619	614,00	0,42	18
36	620	612	611	615	614,50	0,42	18
37	610	615	614	619	614,50	0,42	18
38	570	582	679	685	629,00	0,56	23
41	581	586	579	584	582,50	0,13	5
42	571	586	590	584	582,75	0,13	5
43	586	589	584	578	584,25	0,14	6
44	574	581	585	579	579,75	0,10	4
45	619	619	611	610	614,75	0,42	18
46	610	612	614	615	612,75	0,41	17
47	580	574	586	578	579,50	0,10	4
48	580	579	586	588	583,25	0,13	6
51	580	575	576	584	578,75	0,09	4
52	582	586	583	572	580,75	0,11	5
53	586	595	582	580	585,75	0,16	7
54	600	574	581	583	584,50	0,14	6
55	675	670	682	671	674,50	0,98	41
56	666	654	653	649	655,50	0,80	34
57	580	615	584	586	591,25	0,21	9
58	588	574	581	576	579,75	0,10	4
61	578	583	581	582	581,00	0,11	5
62	579	571	576	580	576,50	0,07	3
63	590	584	591	582	586,75	0,16	7
64	619	616	605	617	614,25	0,42	18
65	647	641	651	658	649,25	0,74	31
66	614	615	603	609	610,25	0,38	16
67	611	603	618	619	612,75	0,41	17
68	570	575	572	566	570,75	0,02	1
71	616	600	610	615	610,25	0,38	16
72	576	578	583	585	580,50	0,11	4
73	580	581	579	576	579,00	0,09	4
74	605	608	614	610	609,25	0,37	16
75	654	659	662	660	658,75	0,83	35
76	616	617	601	611	611,25	0,39	16
77	616	619	618	620	618,25	0,46	19
78	562	578	573	569	570,50	0,01	1
82	645	657	652	650	651,00	0,76	32
83	570	586	588	587	582,75	0,13	5
84	656	678	679	666	669,75	0,93	39
85	648	658	659	665	657,50	0,82	34
86	636	646	639	644	641,25	0,67	28
87	615	613	614	616	614,50	0,42	18

## Apêndice B – Tabelas de contagem de bursts

**Tabela B.1 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 25 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	54	52	53	52	52,75	0,73	30
13	43	41	45	41	42,50	0,38	16
14	47	46	49	46	47,00	0,53	22
16	44	45	41	45	43,75	0,43	18
17	38	33	37	33	35,25	0,14	6
21	57	60	56	60	58,25	0,91	38
22	48	46	56	46	49,00	0,60	25
23	43	47	50	47	46,75	0,53	22
24	52	55	60	55	55,50	0,82	34
25	49	47	41	47	46,00	0,50	21
26	51	53	54	53	52,75	0,73	30
27	46	49	51	49	48,75	0,59	25
28	49	52	55	52	52,00	0,70	29
31	56	58	61	58	58,25	0,91	38
32	47	45	48	45	46,25	0,51	21
33	52	55	56	55	54,50	0,78	33
34	52	54	51	54	52,75	0,73	30
35	44	49	46	49	47,00	0,53	22
36	52	58	60	61	57,75	0,89	37
37	51	57	61	60	57,25	0,88	37
38	44	48	43	45	45,00	0,47	20
41	34	36	35	31	34,00	0,10	4
42	50	51	49	50	50,00	0,63	27
43	26	33	37	39	33,75	0,09	4
44	26	34	39	30	32,25	0,04	2
45	44	49	47	45	46,25	0,51	21
46	41	44	41	42	42,00	0,37	15
47	42	43	44	45	43,50	0,42	18
48	48	52	50	51	50,25	0,64	27
51	39	35	36	41	37,75	0,23	9
52	51	49	46	47	48,25	0,58	24
53	46	48	45	42	45,25	0,48	20
54	56	59	55	52	55,50	0,82	34
55	51	54	47	49	50,25	0,64	27
56	49	50	48	55	50,50	0,65	27
57	41	46	45	44	44,00	0,43	18
58	46	48	42	43	44,75	0,46	19
61	38	34	36	33	35,25	0,14	6
62	43	48	41	46	44,50	0,45	19
63	53	58	56	62	57,25	0,88	37
64	57	51	54	50	53,00	0,73	31
65	58	58	54	56	56,50	0,85	36
66	38	46	51	42	44,25	0,44	19
67	45	46	49	35	43,75	0,43	18
68	48	46	41	49	46,00	0,50	21
71	35	39	38	35	36,75	0,19	8
72	50	48	47	51	49,00	0,60	25
73	52	57	59	54	55,50	0,82	34
74	37	39	32	38	36,50	0,18	8
75	61	59	62	60	60,50	0,98	41
76	48	36	31	42	39,25	0,28	12
77	57	56	58	50	55,25	0,81	34
78	41	44	43	42	42,50	0,38	16
82	56	59	61	60	59,00	0,93	39
83	50	41	45	49	46,25	0,51	21
84	54	55	51	59	54,75	0,79	33
85	57	62	61	66	61,50	1,02	43
86	53	54	49	54	52,50	0,72	30
87	51	53	56	52	53,00	0,73	31

**Tabela B.2 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 29 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	53	55	56	51	53,75	0,66	28
13	45	43	45	43	44,00	0,36	15
14	47	47	50	46	47,50	0,47	20
16	45	45	45	47	45,50	0,41	17
17	34	37	40	42	38,25	0,19	8
21	60	65	65	63	63,25	0,95	40
22	50	48	44	48	47,50	0,47	20
23	50	47	52	48	49,25	0,52	22
24	60	62	64	62	62,00	0,91	38
25	67	65	59	55	61,50	0,89	38
26	52	56	54	58	55,00	0,70	29
27	49	46	50	48	48,25	0,49	21
28	48	47	52	57	51,00	0,58	24
31	58	55	61	55	57,25	0,77	32
32	48	46	42	48	46,00	0,42	18
33	55	60	65	62	60,50	0,86	36
34	63	68	64	65	65,00	1,00	42
35	52	52	49	53	51,50	0,59	25
36	62	61	60	58	60,25	0,86	36
37	64	62	63	62	62,75	0,93	39
38	48	49	43	46	46,50	0,44	18
41	34	35	37	32	34,50	0,08	3
42	52	49	51	53	51,25	0,58	25
43	30	34	37	34	33,75	0,05	2
44	30	32	34	36	33,00	0,03	1
45	47	49	47	49	48,00	0,48	20
46	45	44	42	46	44,25	0,37	16
47	35	38	39	40	38,00	0,18	8
48	49	52	50	54	51,25	0,58	25
51	39	33	36	44	38,00	0,18	8
52	55	51	49	47	50,50	0,56	24
53	49	47	46	50	48,00	0,48	20
54	61	62	55	57	58,75	0,81	34
55	56	54	52	51	53,25	0,64	27
56	48	49	46	50	48,25	0,49	21
57	39	36	37	38	37,50	0,17	7
58	47	49	47	45	47,00	0,45	19
61	32	38	40	45	38,75	0,20	9
62	48	46	43	46	45,75	0,42	18
63	64	58	56	68	61,50	0,89	38
64	60	65	64	55	61,00	0,88	37
65	65	58	55	56	58,50	0,80	34
66	40	46	44	45	43,75	0,36	15
67	48	45	50	43	46,50	0,44	18
68	50	56	52	49	51,75	0,60	25
71	39	37	38	36	37,50	0,17	7
72	53	49	47	44	48,25	0,49	21
73	52	49	54	52	51,75	0,60	25
74	49	47	42	43	45,25	0,40	17
75	65	62	63	61	62,75	0,93	39
76	37	39	35	40	37,75	0,17	7
77	62	65	64	50	60,25	0,86	36
78	49	44	48	47	47,00	0,45	19
82	60	65	67	62	63,50	0,95	40
83	52	48	43	47	47,50	0,47	20
84	62	67	65	63	64,25	0,98	41
85	62	62	60	67	62,75	0,93	39
86	54	52	53	50	52,25	0,61	26
87	52	53	57	49	52,75	0,63	26

**Tabela B.3 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 32 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	56	55	53	45	52,25	0,61	26
13	45	43	40	43	42,75	0,33	14
14	50	47	47	46	47,50	0,47	20
16	45	45	45	50	46,25	0,43	18
17	40	37	33	42	38,00	0,18	8
21	65	65	60	63	63,25	0,95	40
22	44	48	50	48	47,50	0,47	20
23	52	47	50	55	51,00	0,58	24
24	64	62	60	61	61,75	0,90	38
25	59	65	67	56	61,75	0,90	38
26	54	56	52	55	54,25	0,67	28
27	50	46	49	54	49,75	0,54	23
28	52	47	48	50	49,25	0,52	22
31	61	55	58	52	56,50	0,74	31
32	42	46	48	48	46,00	0,42	18
33	65	60	55	62	60,50	0,86	36
34	64	68	63	65	65,00	1,00	42
35	49	52	52	53	51,50	0,59	25
36	60	61	62	58	60,25	0,86	36
37	63	62	64	62	62,75	0,93	39
38	43	49	48	46	46,50	0,44	18
41	37	40	34	32	35,75	0,11	5
42	51	49	55	53	52,00	0,61	25
43	37	34	30	34	33,75	0,05	2
44	34	32	35	36	34,25	0,07	3
45	47	49	47	49	48,00	0,48	20
46	42	44	45	46	44,25	0,37	16
47	39	38	40	40	39,25	0,22	9
48	50	52	49	54	51,25	0,58	25
51	36	33	44	44	39,25	0,22	9
52	49	51	55	47	50,50	0,56	24
53	46	47	55	50	49,50	0,53	22
54	55	62	61	57	58,75	0,81	34
55	52	54	56	51	53,25	0,64	27
56	46	49	48	50	48,25	0,49	21
57	37	36	39	38	37,50	0,17	7
58	47	49	47	45	47,00	0,45	19
61	40	38	32	45	38,75	0,20	9
62	43	46	48	46	45,75	0,42	18
63	56	58	66	68	62,00	0,91	38
64	64	65	60	55	61,00	0,88	37
65	55	58	65	56	58,50	0,80	34
66	44	46	40	45	43,75	0,36	15
67	50	45	48	43	46,50	0,44	18
68	52	56	55	49	53,00	0,64	27
71	38	37	39	36	37,50	0,17	7
72	47	49	53	44	48,25	0,49	21
73	54	49	52	52	51,75	0,60	25
74	42	47	49	43	45,25	0,40	17
75	63	62	65	61	62,75	0,93	39
76	35	39	37	40	37,75	0,17	7
77	64	65	62	50	60,25	0,86	36
78	48	44	49	50	47,75	0,48	20
82	67	65	59	62	63,25	0,95	40
83	43	48	55	47	48,25	0,49	21
84	65	67	62	65	64,75	0,99	42
85	60	62	62	67	62,75	0,93	39
86	53	52	55	50	52,50	0,62	26
87	57	53	52	49	52,75	0,63	26

**Tabela B.4 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 36 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	50	50	52	54	51,50	0,56	24
13	40	43	40	42	41,25	0,23	10
14	48	46	47	47	47,00	0,42	18
16	45	50	45	44	46,00	0,39	16
17	40	42	33	37	38,00	0,13	5
21	65	63	60	65	63,25	0,94	40
22	44	48	50	50	48,00	0,45	19
23	52	55	50	47	51,00	0,55	23
24	64	61	60	62	61,75	0,90	38
25	59	56	67	65	61,75	0,90	38
26	54	55	52	56	54,25	0,65	27
27	50	54	49	46	49,75	0,51	21
28	52	50	48	47	49,25	0,49	21
31	61	52	58	55	56,50	0,73	30
32	42	48	48	46	46,00	0,39	16
33	65	62	55	60	60,50	0,85	36
34	64	65	63	68	65,00	1,00	42
35	49	53	52	52	51,50	0,56	24
36	60	58	62	61	60,25	0,85	36
37	63	62	64	62	62,75	0,93	39
38	43	46	48	49	46,50	0,40	17
41	40	32	40	45	39,25	0,17	7
42	51	53	55	49	52,00	0,58	24
43	37	34	40	44	38,75	0,15	6
44	34	36	35	35	35,00	0,03	1
45	47	49	47	49	48,00	0,45	19
46	42	46	45	54	46,75	0,41	17
47	39	40	40	38	39,25	0,17	7
48	50	54	49	52	51,25	0,56	23
51	36	44	44	33	39,25	0,17	7
52	49	47	55	51	50,50	0,53	22
53	46	50	55	47	49,50	0,50	21
54	55	57	61	62	58,75	0,80	34
55	52	51	56	54	53,25	0,62	26
56	46	50	48	49	48,25	0,46	19
57	40	38	39	36	38,25	0,14	6
58	47	45	47	49	47,00	0,42	18
61	40	45	32	38	38,75	0,15	6
62	43	46	48	46	45,75	0,38	16
63	56	68	66	58	62,00	0,90	38
64	64	55	60	65	61,00	0,87	37
65	55	56	65	58	58,50	0,79	33
66	44	45	40	46	43,75	0,31	13
67	50	43	48	45	46,50	0,40	17
68	52	49	55	56	53,00	0,61	26
71	44	36	39	37	39,00	0,16	7
72	47	44	53	49	48,25	0,46	19
73	54	52	52	49	51,75	0,57	24
74	42	43	49	47	45,25	0,36	15
75	63	61	65	62	62,75	0,93	39
76	43	40	37	39	39,75	0,19	8
77	64	50	62	65	60,25	0,85	36
78	48	50	49	44	47,75	0,44	19
82	67	62	59	65	63,25	0,94	40
83	43	47	55	48	48,25	0,46	19
84	65	65	62	67	64,75	0,99	42
85	60	67	62	62	62,75	0,93	39
86	53	50	55	52	52,50	0,60	25
87	57	49	52	53	52,75	0,60	25

**Tabela B.5 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 39 DIV.**

Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	42	46	45	51	46,00	0,50	21
13	32	34	40	45	37,75	0,13	5
14	38	40	42	44	41,00	0,27	11
16	38	38	45	43	41,00	0,27	11
17	35	34	39	36	36,00	0,05	2
21	56	55	49	58	54,50	0,89	37
22	37	48	50	44	44,75	0,44	19
23	46	40	45	38	42,25	0,33	14
24	54	48	50	60	53,00	0,82	34
25	60	45	44	56	51,25	0,74	31
26	45	44	55	48	48,00	0,59	25
27	40	38	44	50	43,00	0,36	15
28	49	44	50	47	47,50	0,57	24
31	58	44	49	46	49,25	0,65	27
32	40	45	35	45	41,25	0,28	12
33	49	56	58	60	55,75	0,94	40
34	60	54	55	60	57,25	1,01	42
35	50	48	46	55	49,75	0,67	28
36	44	61	56	65	56,50	0,98	41
37	45	62	55	64	56,50	0,98	41
38	40	50	45	45	45,00	0,45	19
41	32	35	40	38	36,25	0,06	2
42	44	46	45	48	45,75	0,49	21
43	40	35	40	47	40,50	0,25	11
44	35	44	35	41	38,75	0,17	7
45	42	45	50	46	45,75	0,49	21
46	35	50	50	45	45,00	0,45	19
47	39	40	36	42	39,25	0,19	8
48	50	46	45	46	46,75	0,53	22
51	38	44	46	38	41,50	0,30	12
52	48	45	50	46	47,25	0,56	23
53	50	56	58	44	52,00	0,77	32
54	44	56	65	60	56,25	0,97	41
55	54	55	45	44	49,50	0,66	28
56	37	44	50	43	43,50	0,39	16
57	40	34	36	35	36,25	0,06	2
58	38	45	36	48	41,75	0,31	13
61	36	45	34	40	38,75	0,17	7
62	34	46	44	52	44,00	0,41	17
63	45	56	62	55	54,50	0,89	37
64	60	48	50	62	55,00	0,91	38
65	44	45	64	48	50,25	0,69	29
66	35	40	40	40	38,75	0,17	7
67	38	46	48	45	44,25	0,42	18
68	49	55	44	50	49,50	0,66	28
71	44	37	37	35	38,25	0,15	6
72	48	42	50	43	45,75	0,49	21
73	50	49	44	45	47,00	0,55	23
74	39	45	54	40	44,50	0,43	18
75	55	60	55	54	56,00	0,95	40
76	38	45	36	39	39,50	0,20	9
77	62	54	56	55	56,75	0,99	42
78	37	48	34	45	41,00	0,27	11
82	58	45	60	65	57,00	1,00	42
83	48	50	45	49	48,00	0,59	25
84	49	58	54	58	54,75	0,90	38
85	40	56	59	58	53,25	0,83	35
86	47	52	47	45	47,75	0,58	24
87	51	57	48	44	50,00	0,68	29

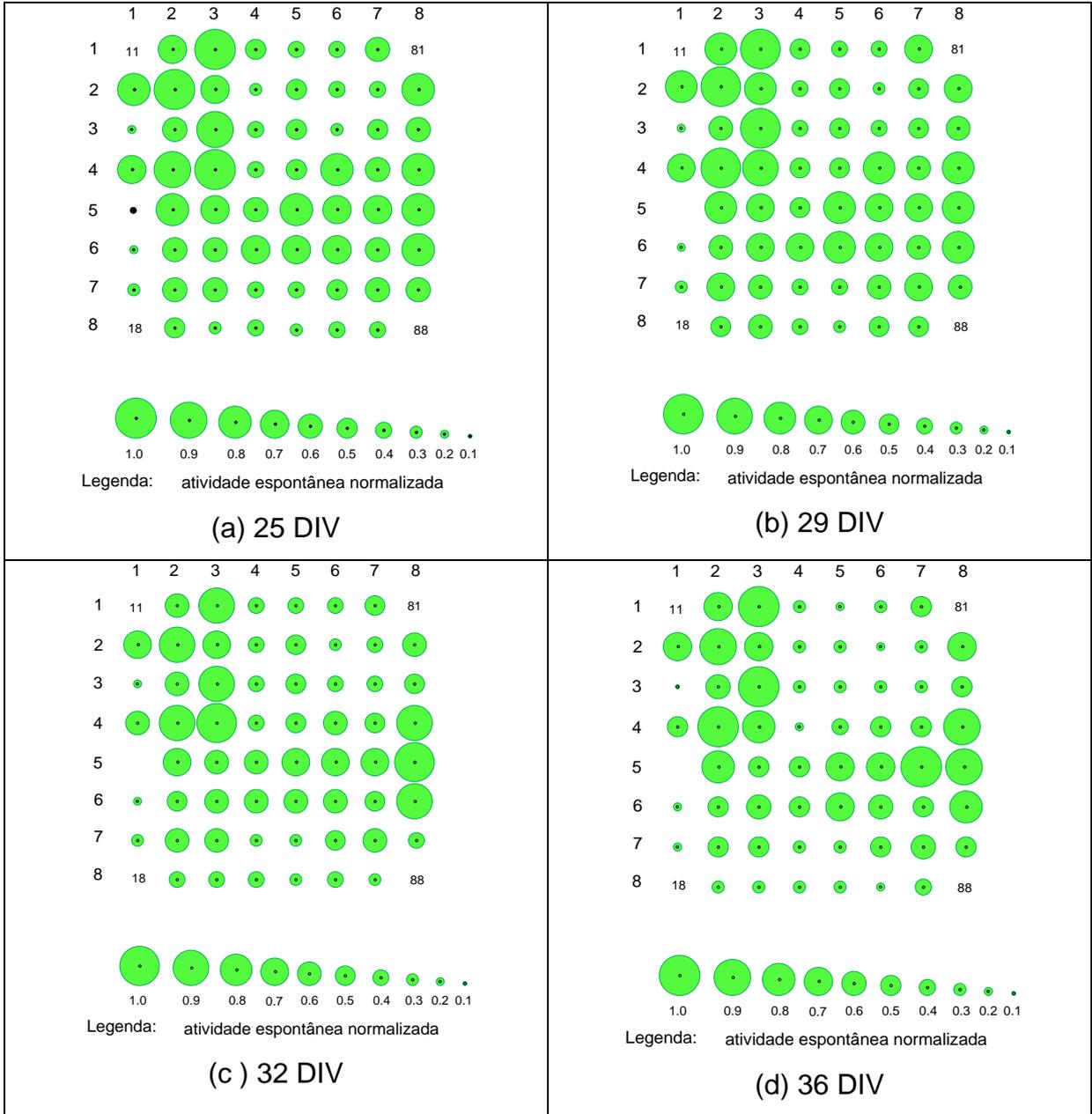
**Tabela B.6 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 43 DIV.**

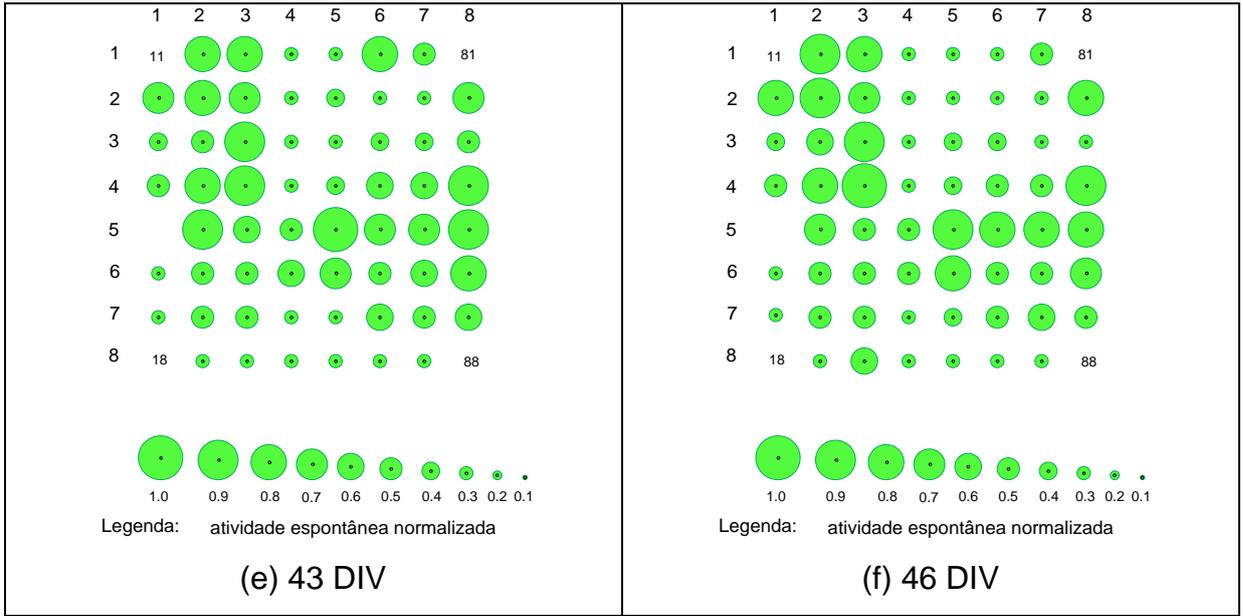
Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	45	46	52	55	49,50	0,57	24
13	38	42	41	45	41,50	0,28	12
14	47	45	44	50	46,50	0,46	19
16	44	56	41	43	46,00	0,44	19
17	35	42	33	37	36,75	0,10	4
21	65	55	60	65	61,25	1,01	42
22	45	48	50	50	48,25	0,53	22
23	52	54	50	45	50,25	0,60	25
24	64	61	60	62	61,75	1,03	43
25	59	56	55	65	58,75	0,92	39
26	54	55	52	56	54,25	0,75	32
27	50	45	49	46	47,50	0,50	21
28	52	50	48	47	49,25	0,56	24
31	61	52	58	55	56,50	0,83	35
32	42	48	48	46	46,00	0,44	19
33	65	62	55	60	60,50	0,98	41
34	61	64	54	61	60,00	0,96	40
35	50	45	56	52	50,75	0,62	26
36	55	60	59	56	57,50	0,87	37
37	59	58	54	66	59,25	0,94	39
38	38	44	45	50	44,25	0,38	16
41	38	32	38	44	38,00	0,15	6
42	48	45	55	47	48,75	0,55	23
43	38	35	39	40	38,00	0,15	6
44	33	40	37	40	37,50	0,13	5
45	44	48	45	50	46,75	0,47	20
46	39	44	44	50	44,25	0,38	16
47	40	39	38	40	39,25	0,19	8
48	48	50	45	45	47,00	0,48	20
51	35	40	45	34	38,50	0,17	7
52	50	45	50	50	48,75	0,55	23
53	46	50	55	47	49,50	0,57	24
54	45	55	62	61	55,75	0,81	34
55	50	49	45	45	47,25	0,49	21
56	40	45	45	46	44,00	0,37	16
57	38	36	34	35	35,75	0,06	3
58	45	44	40	45	43,50	0,35	15
61	38	44	33	34	37,25	0,12	5
62	40	45	45	50	45,00	0,41	17
63	55	55	60	54	56,00	0,81	34
64	56	50	48	64	54,50	0,76	32
65	50	45	60	50	51,25	0,64	27
66	34	40	38	40	38,00	0,15	6
67	40	44	45	44	43,25	0,34	14
68	54	50	45	50	49,75	0,58	25
71	45	33	35	35	37,00	0,11	5
72	44	40	50	44	44,50	0,39	16
73	48	50	45	44	46,75	0,47	20
74	40	42	50	45	44,25	0,38	16
75	60	59	60	61	60,00	0,96	40
76	45	40	33	39	39,25	0,19	8
77	64	54	55	55	57,00	0,85	36
78	44	45	40	44	43,25	0,34	14
82	62	50	55	61	57,00	0,85	36
83	44	47	45	48	46,00	0,44	19
84	45	65	64	66	60,00	0,96	40
85	50	66	59	60	58,75	0,92	39
86	50	49	44	50	48,25	0,53	22
87	54	56	49	45	51,00	0,63	26

**Tabela B.7 – Contagem de bursts por microeletrodo, divididos em conjuntos de dados de 5 minutos para o 46 DIV.**

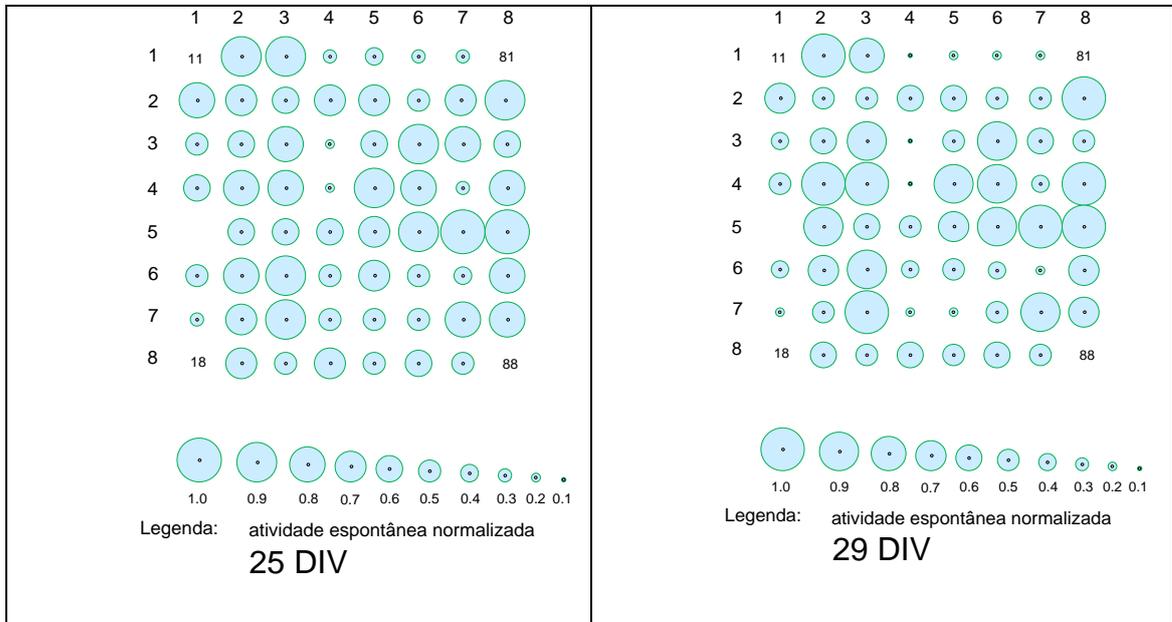
Micro	I	II	III	IV	Média	Diâm	Neuro
12	40	45	45	50	45,00	0,50	21
13	33	38	38	44	38,25	0,22	9
14	40	40	41	45	41,50	0,35	15
16	40	48	35	44	41,75	0,36	15
17	34	34	40	35	35,75	0,11	5
21	55	54	50	56	53,75	0,86	36
22	40	45	48	44	44,25	0,47	20
23	45	44	45	40	43,50	0,44	18
24	55	55	50	56	54,00	0,88	37
25	55	46	44	55	50,00	0,71	30
26	44	45	50	50	47,25	0,59	25
27	45	40	45	44	43,50	0,44	18
28	48	45	42	45	45,00	0,50	21
31	56	45	50	45	49,00	0,67	28
32	38	44	38	45	41,25	0,34	14
33	55	56	56	58	56,25	0,97	41
34	58	54	54	60	56,50	0,98	41
35	48	48	48	55	49,75	0,70	29
36	45	60	56	55	54,00	0,88	37
37	48	60	54	60	55,50	0,94	39
38	38	45	45	44	43,00	0,42	18
41	30	32	34	40	34,00	0,04	2
42	43	45	45	47	45,00	0,50	21
43	38	33	39	41	37,75	0,20	8
44	33	40	37	40	37,50	0,19	8
45	45	48	45	50	47,00	0,58	25
46	39	45	44	50	44,50	0,48	20
47	40	39	38	40	39,25	0,26	11
48	48	45	45	45	45,75	0,53	22
51	35	40	45	34	38,50	0,23	10
52	45	45	45	50	46,25	0,55	23
53	45	50	55	47	49,25	0,68	28
54	45	55	62	61	55,75	0,95	40
55	50	50	45	45	47,50	0,60	25
56	38	45	45	46	43,50	0,44	18
57	38	36	34	35	35,75	0,11	5
58	40	44	38	45	41,75	0,36	15
61	38	44	33	34	37,25	0,18	7
62	34	45	45	50	43,50	0,44	18
63	45	55	60	54	53,50	0,85	36
64	56	50	48	64	54,50	0,90	38
65	45	45	65	48	50,75	0,74	31
66	34	40	38	40	38,00	0,21	9
67	38	44	45	45	43,00	0,42	18
68	54	50	45	50	49,75	0,70	29
71	45	34	35	35	37,25	0,18	7
72	45	40	50	44	44,75	0,49	21
73	48	50	45	44	46,75	0,57	24
74	40	42	50	45	44,25	0,47	20
75	54	59	56	58	56,75	0,99	42
76	45	40	33	39	39,25	0,26	11
77	60	54	55	55	56,00	0,96	40
78	40	45	34	44	40,75	0,32	14
82	62	50	55	61	57,00	1,00	42
83	44	47	45	48	46,00	0,54	23
84	50	55	54	60	54,75	0,91	38
85	40	56	59	58	53,25	0,84	35
86	45	49	44	46	46,00	0,54	23
87	52	56	50	45	50,75	0,74	31

**Apêndice C – Figura do mapeamento das atividades em função da contagem de spikes e bursts para os 25, 29, 32, 36, 43 e 46 DIVs.**





**Figura C.1 – Mapeamento de atividade neural, com círculos concêntricos aos microeletrodos, e raios proporcionais à quantificação de spikes: (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV.**





**Figura C.2 – Mapeamento de atividade neural, com círculos concêntricos aos microeletrodos, e raios proporcionais à quantificação de bursts: (a) 25 DIV, (b) 29 DIV, (c) 32 DIV, (d) 36 DIV, (e) 43 DIV e (f) 46 DIV.**