

ANÁLISE DE SINAL MEA BASEADA EM TESTES ESTOCÁSTICOS DESCREVENDO A ESTRUTURA DE DENSIDADE DE PROBABILIDADE

V. N. R. FARIA¹ e J. B. DESTRO-FILHO¹

¹Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

e-mail: naves.vinicius@gmail.com

Resumo: A matriz multieletrodo (MEA) é considerada como uma tecnologia potencialmente útil para estudos de processamento de informações em redes do sistema nervoso. Por outro lado, a apoptose (morte celular fisiológica) é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas. O objetivo deste artigo é apresentar uma plataforma baseada em técnicas não lineares, a fim de caracterizar sinais de MEA. Tanto os primeiros quanto os últimos DIV apresentam características muito semelhantes com atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária. Ao longo da vida da cultura, as características de estacionariedade e gaussianidade mudam, sendo possível estabelecer um paralelo com o ciclo de vida clássico. Por fim, cabe ressaltar que tais modificações ocorrem de maneira diferente nas regiões geométricas do MEA.

Palavras-chave: MEA, Estacionariedade, Gaussianidade

Abstract: Multi-electrode array (MEA) is considered as a potentially useful technology for information processing studies in neural networks. On the other hand, apoptosis (physiological cell death) is characterized by morphological and biochemical changes. This paper presents a platform based on nonlinear techniques, with purpose of characterizing MEA signals. Both the first and last DIVs present very similar characteristics, namely, highly gaussian and stationary electrical activity. Throughout life of the crop, characteristics of stationarity and gaussianity change, being possible to establish a parallel with classic life cycle. Finally, it is noteworthy such modifications occur differently in geometric regions of MEA.

Keywords: MEA, Stationarity, Gaussianity.

Introdução

A matriz de multieletrodo (MEA) é considerada como uma tecnologia potencialmente útil para estudos de processamento de informações em redes do sistema nervoso [1,2]. Em contraste aos métodos invasivos, o uso de MEAs *in vitro* extracelulares afetam apenas temporariamente os sinais elétricos além de permitir o registro e estimulação simultâneos de grandes populações de células excitáveis durante dias sem causar danos à membrana plasmática do neurônio [3,4].

As interfaces neuronal-eletrônica baseadas em MEA, proporcionam o estudo da rede neuronal. Isto inclui a dinâmica da rede, a plasticidade neuronal a curto prazo e a longo prazo, a excito toxicidade, efeitos de tratamentos

farmacológicos, mecanismos subjacentes às condições patológicas e o crescimento da cultura de células neurais [3].

O papel da atividade neuronal espontânea no processo de crescimento celular está relacionado às características de estabilidade e plasticidade dos padrões de atividade. Por outro lado, a apoptose (morte celular fisiológica) é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas, em que, estas últimas, são observadas em condições de estresse. Já o processo de morte celular por necrose é induzido por uma abrupta perturbação ambiental das condições fisiológicas [5]. A partir destes efeitos de estresse oxidativo na morte celular, deve-se indagar se as alterações na permeabilidade ao íon Ca^{2+} e suas concentrações aumentariam a atividade elétrica.

Através de experimentos desenvolvidos neste trabalho, as etapas de evolução celular serão apresentadas, discutidas e caracterizadas quantitativamente, levando-se em conta a evolução temporal da atividade elétrica ao longo das regiões geométricas da MEA, principalmente nas etapas finais de morte celular. Para tanto, este artigo apresenta uma plataforma dotada de diversos quantificadores, pautados em técnicas não lineares, com o objetivo de caracterizar os sinais MEA no que diz respeito ao sistema fisiológico da mesma na condição normal de atividade elétrica espontânea.

Materiais e métodos

Preparação da cultura de células neurais - Neste trabalho foram utilizados neurônios do córtex e do hipocampo cerebral, obtidos de seis a oito embriões de ratos Wistar em seu 18º dia de desenvolvimento. Na etapa de dissecação, o córtex e o hipocampo de cada cérebro passaram por diversos momentos de digestão enzimática e subsequente maceração, em que a concentração de células resultou em 8×10^5 neurônios/mL. A cultura foi mantida em uma estufa umedecida a 37 °C, com atmosfera de 5% CO_2 .

Aquisição dos sinais MEA - Para a aquisição dos sinais MEA foi utilizado a MEA60 (Multi Channel Systems, 2005) que contém 60 microeletrodos. Esses eletrodos são distribuídos em uma matriz 8x8, com os cantos excluídos. Em cada experimento coletaram-se 20 minutos de amostra do sinal da MEA com frequência de aquisição de 10 kHz. Completam o aparato experimental um microscópio invertido, uma mesa antivibratória, um controlador de temperatura, uma gaiola de Faraday e um computador equipado com placa PCI de aquisição de

dados com no máximo 128 canais de registro e 12 bits de resolução. Os dados foram monitorados e gravados usando o software comercial *MCRack*.

Análise Clássica - A partir do software *SpikeManager* os sinais brutos adquiridos foram processados e vários quantificadores foram obtidos. Destacam-se neste trabalho: intervalos entre *bursts* (IBI – *Inter Burst Interval*) e o número total de *spikes* para cada DIV (dia *in vitro*).

Técnica de DFA - A técnica de DFA (Análise de Flutuações Destendenciadas) [6], realiza a remoção da tendência local da série de dados, analisando o comportamento das flutuações resultantes em função da escala empregada no processo de destendenciamento [6,7]. Dessa maneira podem se distinguir diferentes zonas de estacionariedade: para $\alpha < 0,5$ o sinal é altamente estacionário e para $\alpha > 1,5$ é altamente não-estacionário, com uma zona de transição entre $0,5 \leq \alpha \leq 1,5$. Dada a correspondência observa-se que $\alpha = 0$ para o ruído branco e para o ruído Browniano.

Expoente Hurst - A auto similaridade pode ser entendida como a semelhança entre as componentes da escala aparente de um objeto e suas subcomponentes, observadas em menores escalas. No contexto de processos estocásticos a auto similaridade é definida em termos da distribuição estatística do processo. Neste trabalho o expoente de Hurst foi estimado através do método do Periodograma.

Mean Ratio Test (MRT) - O *Mean Ratio Test* (Teste Razão Média) pode ser empregado para comparar as funções de distribuição espectral dos subconjuntos de amostras [8] a fim de observar se a função é ou não estacionária. Caso haja uma diferença significativa entre os espectros dos subconjuntos amostrais o processo é dito como não estacionário. O resultado deste processamento é o quantificador PSNE, porcentagem de segmentos não estacionários.

Jarque-Bera (JB) - A verificação da gaussianidade ou normalidade de um conjunto de amostras da MEA se dá pelo teste não paramétrico denominado Jarque-Bera (JB) que possui ótimas propriedades assintóticas de poder e bom desempenho para amostras finitas. Devido a sua simplicidade, este teste é uma ferramenta útil em análises estatísticas [9]. O procedimento para a construção do teste de gaussianidade usa o princípio do método multiplicador de Lagrange, que já foi bastante aplicado em muitos problemas econômicos; por exemplo, [10]. O resultado desta técnica é o PSNG, porcentagem de segmentos não gaussianos.

Resultados

Alguns resultados da análise clássica são dispostos na Figura 1. Pode-se observar que para as DIV iniciais, durante o processo de formação da rede neural, os totais de *spikes* são os mais baixos, como os entre as DIV's 08 e 18. Isto evidencia a baixa atividade da rede, reforçado pelos altos intervalos entre *bursts* (IBI). No período de maturidade (DIV 22 até DIV 60) da cultura, observa-se os maiores índices de *spikes*, assim como, os menores

intervalos IBI, caracterizando uma cultura ativa, com atividade neurológica organizada. Por fim, após o período de maturidade, a cultura de células começa a esboçar menor atividade elétrica, com a queda do total de *spikes* e aumento dos intervalos IBI, excetuando-se nas DIV's que antecedem a morte celular (DIV 81 – DIV 88) em que ocorrem um aumento significativo de *spikes* e uma diminuição dos intervalos IBI.

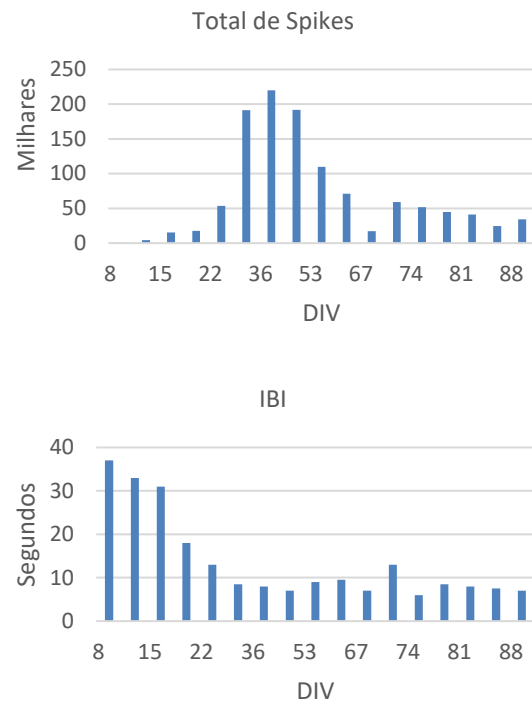


Figura 1 – Gráficos de análise clássica do sinal MEA. O gráfico “Total de Sspikes” representa o número total de spikes em cada DIV. No gráfico “IBI” são apresentados o intervalo médio entre Bursts por DIV.

A Figura 2 mostra os valores do Expoente Alfa (A) para cada DIV. As barras de erro da figura são referentes ao desvio padrão e a curva azul ao expoente alfa. Observa-se que no DIV 08 o menor valor do Expoente Alfa (-1,20) com elevado desvio padrão. Do DIV 18 até o DIV 29 o valor de alfa aumentou cruzando a linha do 0. De forma sintética, a partir do DIV 29, até o 53-71 DIV's observa-se estabilidade de alfa em torno de zero, o que é característico de ruído branco. Abaixo de zero indica um sinal altamente estacionário com um possível controle momentâneo do crescimento da cultura, com uma atividade semelhante em todos os canais da matriz de eletrodos. Entre os DIV's 74 e 88 há uma variação dos Expoentes Alfa e dos respectivos desvios padrão. Estes últimos DIV's retomam o comportamento dos primeiros DIV's que pode ser tratado como um desacoplamento funcional da atividade elétrica dos neurônios em que a rede perde sua capacidade de auto-organização culminando na morte celular após este período.

A Figura 3 representa o valor médio do Expoente Hurst para cada DIV com o respectivo desvio padrão. Entre os DIV's 08 e 18 o valor do Expoente Hurst varia em torno de 0,5. O pico observado na DIV 18 pode ser

relacionado ao processo de *pruning*. Entre 36 e 71, há certa estabilidade dos valores de H em torno de 0,45 o que é característico de ruído branco. Além disso, a dispersão dos valores diminui revelando comportamento semelhante nos diferentes sítios da rede. Do DIV 71 ao 88 o H varia entre 0,40 e 0,50 o que indica perda das propriedades fractais, devido a um excesso de ordem ou randomicidade descorrelacionada da série de dados.

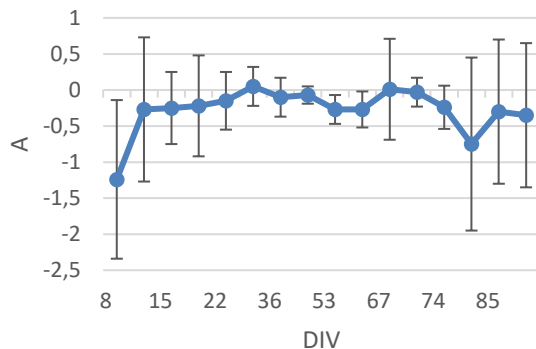


Figura 2 – Resultados do expoente alfa médio (A) para as DIV consideradas

A Figura 4 representa a mediana da porcentagem de segmentos não gaussianos (PSNG) dos 60 canais das DIV's consideradas neste trabalho. Os resultados são referentes à média dos processamentos executados para janelamento de 40, 60, 80, 100 e 150 ms. Observa-se que as DIV's 08 a 18 e 74 a 88 correspondem a valores próximos evidenciando o comportamento semelhante nos estágios iniciais de crescimento da cultura e nos estágios finais antecedentes à morte celular. O PSNG dos DIV's 22 a 67 são os maiores apresentados na Figura 4. Neste período a cultura atinge a maturidade de acordo com os estudos da literatura.

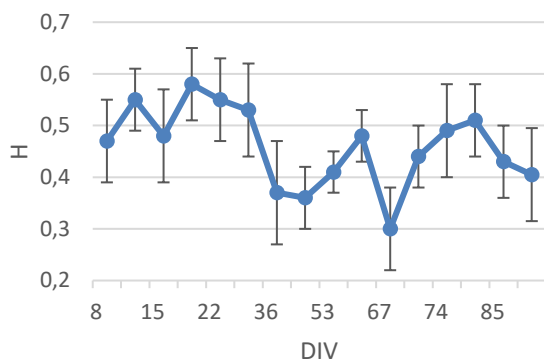


Figura 3 – Resultados do expoente de Hurts (H) para as DIV consideradas

Analogamente à Figura 4, a Figura 5 apresenta as porcentagens de segmentos não estacionários (PSNE). O comportamento deste parâmetro é similar ao PSNG. OS DIV's 22 à 60 possuem o maior valor de PSNE e os DIV's 60 à 74 possuem os valores intermediários. Observa-se que no DIV 88 há um aumento do PSNE que revela uma grande diversidade de comportamentos estacionários do conjunto de sinais.

A Figura 6 apresenta uma visão geométrica do indicador PSNE para a média das janelas de processamento em cada canal do experimento. De uma maneira geral, constata-se que há um aumento gradativo da quantidade de canais com comportamento não estacionário, o que se inverte a partir da DIV 71, em que menos canais apresentam comportamento não estacionário. Desta forma o padrão de gaussianidade dos sinais MEA se modifica do ponto de vista geométrico, até atingir homogeneidade a partir da DIV 81, o que pode ser interpretado como um sinalizador biológico da morte celular.

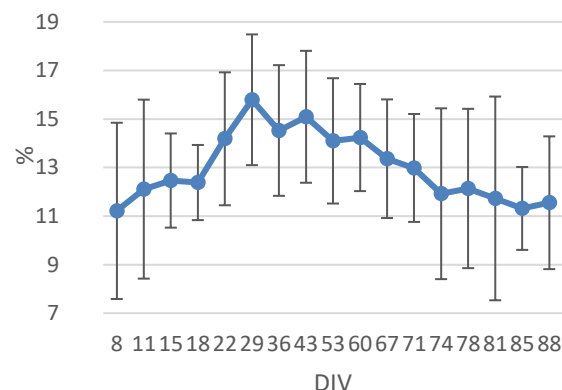


Figura 4 – Resultado do cálculo da mediana dos PSNG de cada canal das DIV consideradas.

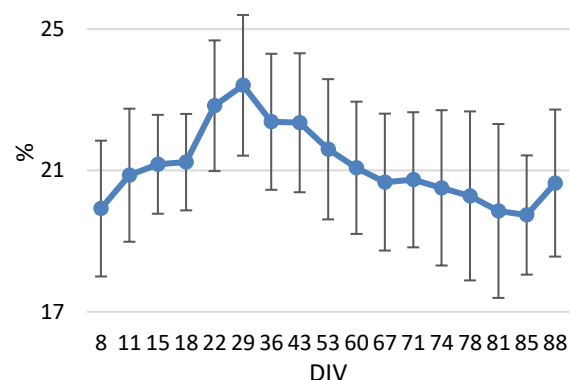


Figura 5 – Resultado do cálculo da mediana dos PSNE de cada canal das DIV consideradas.

Discussão

Utilizando-se de testes estatísticos precisos e bem estabelecidos pode-se concluir os seguintes pontos relativamente ao estudo de caso realizado juntamente com o experimento:

a) Tanto os primeiros DIVs quanto os últimos apresentam características muito semelhantes, atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária. Particularmente, durante o período de maturidade (DIV 29 à DIV 67), os sinais são não-gaussianos e não-estacionários.

b) As conclusões do item (a) acima aplicam-se praticamente a todos os canais da MEA de tal forma que

as variâncias tanto em termos de caráter gaussiano quanto do estacionário dos sinais medidos são baixíssimas. Todavia, a partir de DIV 81, estas duas variâncias são claramente muito diferentes de todas as demais, revelando que a partir deste DIV o comportamento da atividade elétrica é extremamente desorganizado, variando muito de canal para canal. De fato, levando-se em conta os resultados quantitativos apresentados, a variância de PSNG (Figura 4) e de PSNE (Figura 5) poderiam ser usados como biomarcadores do início da morte celular.

c) Ao longo do tempo de vida da cultura, as características de estacionariedade e gaussianidade se modificam, sendo possível estabelecer um paralelo com o ciclo de vida clássico. De acordo com a Figura 6, é interessante observar que tais modificações ocorrem de maneira diferente nas regiões geométricas da MEA, em que, mesmo próximo à morte celular, ainda assim, alguns grupos de neurônios apresentam comportamento típico da maturidade.

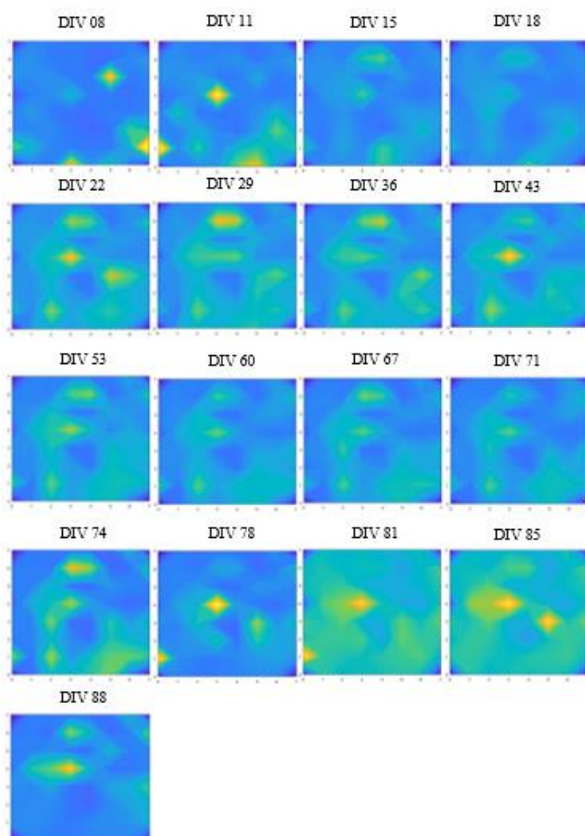


Figura 6 – Distribuição geométrica da mediana do parâmetro PSNE. A cor amarela representa a área da MEA com extremo não estacionário e a cor azul escuro o extremo estacionário.

Conclusão

A análise clássica de sinais MEA e estatísticas básicas são utilizadas para quantificar o padrão da atividade elétrica. Todavia, a fim de caracterizar o sinal MEA, principalmente, o momento de morte celular, foram desenvolvidos quantificadores não lineares que

consideraram a evolução temporal da atividade elétrica ao longo das regiões geométricas da MEA. Foi possível concluir que tanto os primeiros quanto os últimos DIV apresentam características muito semelhantes, atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária; ao longo do tempo, as características de estacionariedade e gaussianidade mudam, sendo possível estabelecer um paralelo com o ciclo de vida clássico; tais modificações ocorrem de maneira diferente nas regiões geométricas do MEA; e PSNE e PSNG podem ser estudados como possíveis biomarcadores de morte celular.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEG e FAPEMIG.

Referências

- [1] Mercer HD, White RL. Photolithographic fabrication and physiological performance of microelectrode arrays for neural stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 1978; 25(6):494-500.
- [2] Colombi F, Tinarelli V, Pasquale V, Tucci, Chiappalone M. A Simplified In vitro Experimental Model Encompasses the Essential Features of Sleep. *Frontiers in Neuroscience*. 2016.
- [3] Obien ME, Deligkarisk BT, Bakkum DJ, Frey U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in Neuroscience*. 2014; 8:423.
- [4] Vassallo A, Chiappalone M, De Camargos R, Scelfo B, Novellino A, Defranchi E, Palosaari T, Weisschu T, Ramirez T, Martinoia S, Johnstone AFM, Mack CM, Landsiedel R, Whelan M, Bal-Price A, Shafer TJ. A multi-laboratory evaluation of microelectrode array-based measurements of neural network activity for acute neurotoxicity testing. *Neurotoxicology*. 2017; 60:280-292.
- [5] Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases *Annual Reviews*. 1996; 36:83-106.
- [6] Peng CK, Havlin S, Stanley EH, Goldberger AL. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos*. 1995; 5:82-87.
- [7] Esposti F, Ferrario M, Signorini G. A blind method for the estimation of the Hurst exponent in time series: Theory and application. *Chaos*. 2008; 18.
- [8] Assis AR. Análise da estacionariedade e gaussianidade da atividade elétrica neural do ruído biológico de instrumentação. [dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2011.
- [9] Jarque CM, Bera AK. A test for Normality of Observations and Regression Residuals. *International Statistical Review*. 1987; 55(2):163-172.
- [10] Breusch TS, Pagan AR. The lagrange multiplier test and its applications to model specification in econometrics. *Rev. Econ. Studies*. 1980; 97:239-253.