



UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA INFORMÁTICA

Proyecto de Fin de Master en
I.A. AVANZADA: FUNDAMENTOS, MÉTODOS Y APLICACIONES

**ANÁLISIS DE VARIACIÓN DE FRECUENCIA EN
CULTIVOS NEURONALES
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL
ESTÍMULO**

Mikel Val Calvo

Dirigido por: Jose Ramón Álvarez Sánchez

Codirigido por: Jose Manuel Ferrández y Félix de la Paz López

Curso: 2016-2017: 2ª Convocatoria



ANÁLISIS DE VARIACIÓN DE FRECUENCIA EN CULTIVOS NEURONALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTÍMULO

Proyecto de Fin de Master

I.A. AVANZADA: FUNDAMENTOS, MÉTODOS Y APLICACIONES

Realizado por: Mikel Val Calvo

Dirigido por: Jose Ramón Álvarez Sánchez

Codirigido por: Jose Manuel Ferrández y Félix de la Paz López

Tribunal calificador

Presidente: D/D^a.

Secretario: D/D^a.

Vocal: D/D^a.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido resultado del trabajo y esfuerzo realizado por un amplio colectivo de personas y entidades que han hecho posible que el mismo llegara a un buen término. Es por ello que se hace necesario realizar una valoración justa del esfuerzo aportado por cada uno.

Quiero agradecer al Dr. Félix de la Paz, profesor del departamento de inteligencia artificial de la UNED, al Dr. José Manuel Ferrández Vicente, Vicerrector de Relaciones Internacionales de la UPCT, Dr. José Ramón Álvarez Sánchez, director del departamento de inteligencia artificial y al Dr. Eduardo Fernández Jóver, director de la Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, por aceptarme para realizar este proyecto de fin de master bajo su dirección, por su calidez y apoyo, y por poner todo lo que estaba a su alcance para el buen desarrollo de este proyecto.

De forma especial quiero mostrar mi agradecimiento al Dr. José Ramón Álvarez Sánchez, a Javier Alegre Cortés, a mi hermano Inhar Val Calvo y Cristina Soto Sánchez por su disponibilidad y su apoyo y sobre todo por sus aportaciones en los aspectos teóricos sobre inteligencia artificial, neurociencia, matemáticas y electrofisiología respectivamente.

Agradezco a Desi, técnica de laboratorio, su dedicación al trabajo realizado con los cultivos neuronales.

Quiero reconocer al Programa de Ayudas a la Excelencia de la Región de Murcia, de la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia.

Este trabajo está dedicado a mis padres Eloy y Luisa y a mi hermano Inhar.

Abstract

In vitro neuronal cultures embodied in a closed-loop control system have been used recently to study neuronal dynamics. This allows the development of neurons in a controlled environment with the purpose of exploring the computational capabilities of such biological neural networks. Due to the intrinsic properties of in vitro neuronal cultures and how the neuronal tissue grows in them, the ways in which signals are transmitted and generated within and throughout the culture can be difficult to characterize. The neural code is formed by patterns of spikes whose properties are in essence non linear and non stationary. The usual approach for this characterization has been the use the post-stimulus time histogram (PSTH). The PSTH is calculated by counting the spikes detected in each neuronal culture electrode during some time windows after a stimulus in one of the electrodes. The objective is to find pairs of electrodes where stimulation in one of the pair produces a response in the other but not in the rest of electrodes in other pairs.

The aim of this work is to explore possible ways of extracting relevant information from the global response to culture stimulus by studying the patterns of variation over time for the firing rate, estimated from inverse interspike intervals, in each electrode. Machine-learning methods can then be applied to distinguish the stimulated electrode from the whole culture response, in order to obtain a better characterization of the culture and its computational capabilities so it can be useful for robotic applications.

Resumen

Los cultivos neuronales in vitro embebidos en un sistema de control de lazo cerrado se han utilizado recientemente para estudiar las dinámicas neuronales. Este proceso permite el desarrollo de neuronas en un ambiente controlado con el propósito de explorar las capacidades computacionales de redes neuronales biológicas. Debido a las propiedades intrínsecas de los cultivos neuronales in vitro y la forma en que el tejido neuronal crece en ellos, las formas en que las señales se transmiten y generan dentro y a lo largo del cultivo son difíciles de caracterizar. El código neural está formado por patrones de spikes cuyas propiedades son en esencia no lineales y no estacionarias. El enfoque habitual para esta caracterización ha sido el uso del histograma de tiempo post-estímulo (PSTH). El PSTH se calcula contando los spikes detectados en cada electrodo del cultivo neuronal durante la ventana de tiempo tras un estímulo en uno de los electrodos. La principal estrategia empleada hasta la actualidad consiste en encontrar pares de electrodos $C_n = E_{est}, E_{resp}$ disjuntos de forma que $C_1 \neq C_2$.

El objetivo de este trabajo es explorar otras formas posibles de extraer información relevante de la respuesta global al estímulo en el cultivo mediante el estudio de las variaciones en los patrones a lo largo del tiempo para la tasa de disparo (firing rate-FR), estimada a partir de intervalos inter-spike en cada electrodo. A continuación se pueden aplicar métodos de aprendizaje automático para distinguir el electrodo estimulado a raíz de la respuesta global del cultivo, con el fin de obtener una mejor caracterización del cultivo y sus capacidades computacionales, de modo que pueda ser útil para aplicaciones robóticas.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción general y objetivos | 1 |
| 1.1. Proyecto previo | 1 |
| 1.2. Objetivos de este TFM | 4 |
| 1.3. Estado del arte | 4 |
| 1.4. Neurociencia | 6 |
| 1.4.1. Neuronas | 7 |
| 1.4.2. Células neurogliales | 10 |
| 1.4.3. Circuitos neurales | 10 |
| 1.5. Motivación | 10 |
| 1.5.1. Características del código neural | 13 |
| 1.5.2. Computación natural y computación digital | 14 |
| 1.5.3. Aspectos neurofisiológicos del aprendizaje | 15 |
| 1.5.4. Computación natural en IA | 15 |
| 2. Análisis de frecuencias inter-spike inversas IISI | 17 |
| 2.1. Diseño del experimento | 17 |
| 2.1.1. Material necesario | 18 |
| 2.1.2. Setup experimental | 23 |
| 2.2. Herramienta para la limpieza y clasificación de potenciales de acción | 24 |
| 2.2.1. Cleaner_App | 25 |
| 2.2.2. Descripción general de la aplicación | 26 |
| 2.3. Registro | 30 |
| 2.3.1. Selección de entradas salidas | 30 |
| 2.3.2. Registro de estimulación | 31 |
| 2.4. Preprocesado de los datos | 32 |
| 2.5. Estudio de tipos de análisis aplicables | 37 |
| 2.5.1. Cables neuronales | 38 |
| 2.5.2. Análisis centro de masas | 41 |
| 2.5.3. Análisis tiempo-frecuencia NA-MEMD | 44 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.5.4. | Análisis de frecuencias inter-spike inversas IISI | 47 |
| 2.5.4.1. | Machine-learning | 48 |
| 2.5.4.2. | Evolución temporal de la caracterización del cultivo | 49 |
| 2.6. | Resumen de los resultados de investigación | 51 |
| 2.7. | Comparativa de las estrategias | 53 |
| 2.7.1. | Controlling a mobile robot with a biological brain | 53 |
| 2.7.2. | The Neurally controlled Animat: Biological Brains Acting with Simulated Bodies | 53 |
| 2.7.3. | Towards an embodied in vitro electrophysiology: The NeuroBit project . . . | 54 |
| 2.7.4. | Modular Neuronal Assemblies Embodied in a Close-Loop Environment: To- ward Future Integration of Brain and Machines | 54 |
| 2.7.5. | Análisis de variación de frecuencia en cultivos neuronales para la caracteriza- ción de la respuesta al estímulo | 55 |
| 2.7.6. | Cuadro de resumen comparativo | 56 |
| 3. | Conclusiones y trabajos futuros | 57 |
| 3.1. | Conclusiones | 57 |
| 3.2. | Objetivos alcanzados | 58 |
| 3.3. | Dificultades encontradas | 59 |
| 3.4. | Trabajos futuros | 60 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| 1.1. Close-loop para el control del cultivo. | 2 |
| 1.2. Turtlebot Create de la empresa iRobot. | 2 |
| 1.3. Sensor Kinect. | 3 |
| 1.4. Morfología de la neurona. | 7 |
| 1.5. Potencial de acción en el interior de la membrana celular. | 9 |
| 1.6. Potencial de acción en el exterior de la membrana celular. | 9 |
| 2.1. Close-loop para el control del cultivo. | 18 |
| 2.2. Tarjeta de adquisición de datos MC_CARD. | 18 |
| 2.3. Estimulador STG-1002. | 19 |
| 2.4. Amplificador MEA 1060BC. | 19 |
| 2.5. Controlador TC01 de MCS. | 19 |
| 2.6. Micro-electrode Array. | 20 |
| 2.7. Vista superior del Micro-electrode Array junto a vista en detalle de la disposición de los electrodos en sustrato. | 20 |
| 2.8. Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 1 de cultivo. | 20 |
| 2.9. Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 1 de cultivo. | 21 |
| 2.10. Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 12 de cultivo. | 21 |
| 2.11. Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 12 de cultivo. | 22 |
| 2.12. Software de adquisición de datos MC_RACK. | 22 |
| 2.13. MC_Stimulus. | 23 |
| 2.14. MEA_Select. | 23 |
| 2.15. Pantalla principal de la interfaz. | 28 |
| 2.16. Carga de archivos en formato '.mcd'. | 29 |
| 2.17. Visualización de potenciales de acción asociados al electrodo 1 para los intervalos tras los 200 estímulos. | 29 |
| 2.18. Visualización de potenciales de acción asociados al canal 1 para el intervalo tras el estímulo 1. | 30 |
| 2.19. Comparativa de la actividad del cultivo del número de potenciales de acción por intervalo de la actividad basal frente a la actividad tras el estímulo. | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.20. Forma de onda de un Spike registrada mediante el software MC_RACk. | 32 |
| 2.21. Se presenta la relación de forma y amplitudes entre un artefacto(rojo) y los potenciales de acción(verde) registrados para el 21 tras 150ms de la estimulación. | 33 |
| 2.22. Histograma de los valores RMS obtenidos para un registro de lectura. | 35 |
| 2.23. Histograma de los valores RMS obtenidos para el mismo registro de estimulación. . . | 35 |
| 2.24. Histograma de los valores RMS resultantes del proceso de filtrado. | 36 |
| 2.25. Histograma de los valores RMS obtenidos para un registro de lectura. | 36 |
| 2.26. Histograma de los valores RMS obtenidos para el mismo registro de estimulación. . . | 37 |
| 2.27. Histograma de los valores RMS resultantes del proceso de filtrado. | 37 |
| 2.28. PSTH de la activadas promedio en el electrodo 25 tras las estimulaciones en el electrodo 10. | 39 |
| 2.29. PSTH de la activadas promedio en el electrodo 10 tras las estimulaciones en el electrodo 25. | 40 |
| 2.30. PSTH de la activadas promedio en el electrodo 39 tras las estimulaciones en el electrodo 36. | 40 |
| 2.31. PSTH de la activadas promedio en el electrodo 36 tras las estimulaciones en el electrodo 39. | 40 |
| 2.32. Comparativa del promedio de actividad antes y después de las estimulaciones. | 41 |
| 2.33. Distribución de centros de masas sobre la rejilla del MEA. El eje X representa la columna y el eje Y la fila, del MEA. | 42 |
| 2.34. Matriz de confusión para la clasificación de los CM. | 43 |
| 2.35. Visualización del PSTH de la actividad global tras el estímulo 1 en los electrodos 20 y 42, así como la visualización de la descomposición en modos IMFs mediante la transformada de Hilbert para obtener las diferencias de amplitud. | 45 |
| 2.36. Resultado de la clasificación mediante una red neuronal artificial con 10 neuronas en la capa oculta y función de aprendizaje Levenberg-Marquardt backpropagation. | 46 |
| 2.37. Muestras de evolución de secuencias de intervalos inter-spike inversos a partir de los electrodos 43 y 48 tras las estimulaciones en los electrodos 20 y 42. | 47 |
| 2.38. Un ejemplo de la huella digital generada por la actividad global después de un estímulo representado mediante las variaciones de ángulos IISI para todos los electrodos se muestra en la parte superior de la figura. Las dos distribuciones estadísticas de las respuestas descritas como ángulos de IISI para todos los electrodos, después de las estimulaciones en los electrodos 20 y 42, se muestran en los dos gráficos inferiores. El número de identificación del electrodo es el orden de cada electrodo según ha sido leído por el software, no la etiqueta (posición de fila de columnas) en el MEA. | 48 |

| | |
|---|----|
| 2.39. Evolución de la caracterización del cultivo a lo largo de 9 días. Se muestra en azul el resultado de la clasificación teniendo en cuenta todos los electrodos con actividad significativa, a excepción de los electrodos estimulados. En rojo se muestra la el resultado de la clasificación sin tener en cuenta los electrodos distintivos para cada registro. | 50 |
|---|----|

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| 2.1. Estructura de datos para almacenar la información de las señales registradas. | 26 |
| 2.2. Cuadro comparativo de métodos de análisis de la actividad del cultivo y resultados. . | 52 |
| 2.3. Cuadro comparativo de métodos de análisis de la actividad del cultivo y resultados. . | 56 |

Capítulo 1

Introducción general y objetivos

Este proyecto se encuentra enlazado con mi anterior proyecto de fin de grado, por tanto en las dos primeras secciones se va a explicar el trabajo realizado de forma general en dicho proyecto así como los objetivos del proyecto actual de fin de master.

1.1. Proyecto previo

Este proyecto es la continuación del proyecto de fin de grado: **TURTLEBOT: PROPUESTA DE CONTROL REACTIVO MEDIANTE NEUROPROCESADORES BIOLÓGICOS**, realizado por Mikel Val Calvo durante el curso 2014-2015 bajo la dirección de Félix de la Paz López y Jose Manuel Ferrández. El objetivo global de aquel proyecto fue el montaje y la puesta en funcionamiento del robot Turtlebot y su interconexión con un sistema de estimulación y lectura de cultivos biológicos sobre arrays de electrodos (MEA). El sistema completo permitió la realización de experimentos simples de control de robots mediante procesadores biológicos. Este objetivo global resultó en una serie de sub-objetivos:

1. Montaje y puesta en funcionamiento del robot turtlebot. Implementación del algoritmo del centro de área con feedback visual.
2. Desarrollo de los programas software de interfaz con el sistema MEA.
3. Experimentos con el robot usando el neuroprocesador para verificar que el sistema de conexión cumple con las restricciones en tiempo real.

La figura 1.1 es una muestra representativa del diseño experimental que se propuso para la realización de los experimentos. De forma general se pretendió que un robot que se movía a través de un espacio con obstáculos, detectara el centroide del hueco, por medio del cálculo del centro de masas de la imagen. En paralelo el robot detectaba un objeto de color y trataba de alcanzarlo. En este caso si el robot detectaba que el objeto rojo se encontraba situado en un lado de la imagen(derecha

o izquierda), se enviaba dicha información a través de comunicación TCP/IP al ordenador que interactuaba con el cultivo, dicha información era empleada para estimular el cultivo mediante los electrodos.

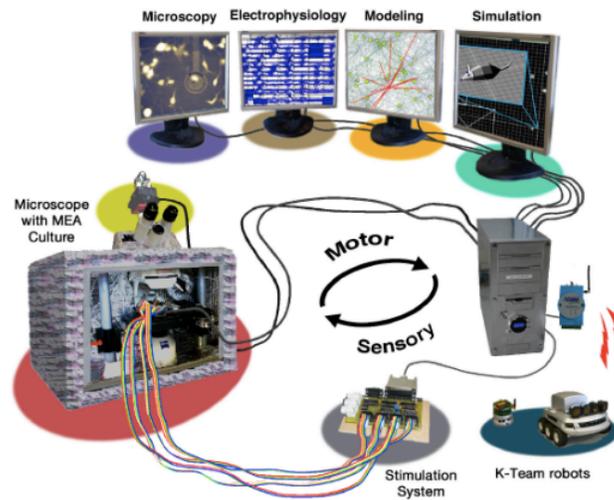


Figura 1.1: Close-loop para el control del cultivo.

Previamente se había realizado un análisis de selección de entradas del cultivo y se determinaron dos de entre todos los electrodos, siendo uno asociado a la detección del objeto en el lado derecho y el otro asociado a la detección del objeto en el lado izquierdo. A continuación se emitía un estímulo sobre un electrodo, la información global obtenida tras un intervalo de $150ms$ tras el estímulo era recogida y filtrada. La salida del cultivo se enviaba al robot que al recibir dicha información ejecutaba un movimiento a un lado o al otro en función de la respuesta obtenida.

A rasgos generales se muestran los recursos que se emplearon para este proyecto:

1. Hardware del robot:

- Robot Turtlebot Create, de la empresa iROBOT.



Figura 1.2: Turtlebot Create de la empresa iRobot.

- Sensor Kinect para la consola XBOX 360, se empleará para la detección de objetos y obstáculos.



Figura 1.3: Sensor Kinect.

2. Software del robot:

- Pseudo-sistema operativo ROS (Robot operative system), versión Indigo.

3. Hardware del cultivo:

- Generador de estímulos STG-1002 de Multichannel System, nos permitirá estimular el cultivo neuronal por medio de señales eléctricas.
- Amplificador MEA1060BC de Multichannel System, nos permitirá tanto registrar información del cultivo neuronal como estimular el cultivo mediante las señales generadas por el estimulador STG-1002.
- Tarjeta de adquisición de datos MC_CARD de Multichannel System. Nos permitirá establecer una comunicación serial con el PC del cultivo.

4. Por último fue necesario disponer de material especial para uso biológico.

- MEA, Microelectrode Arrays. Se trata de unas placas en las que se puede mantener un cultivo vivo in vitro, que nos permite tanto estimular cómo registrar señales eléctricas en la red neuronal.
- Red Neuronal obtenida a partir del hipocampo de un embrión de ratón.

5. Software del cultivo

- MEABENCH 1.2.0, creado por Daniel Wagenaar de la universidad Georgia Institute of Technology. Se trata de un conjunto de programas capaces de interactuar en un entorno Linux para registrar información de los MEA y procesar la información en tiempo real.
- Mea_select, para la configuración del amplificador MEA1060BC a través de comunicación serial.
- Stg_control, para la configuración y control de comandos del estimulador STG-1002 a través de comunicación serial.

- Spikecounter, para la interacción con el conjunto de programas MEABENCH. Este programa nos permite obtener y manipular información procedente del cultivo como, el número de los potenciales de acción detectados y la numeración del electrodo en el que se ha producido la lectura de un potencial de acción.

A partir de este software y bajo los requisitos del sistema close-loop se generó un software que por medio de control de hilos gestiona el orden y las operaciones del conjunto de programas que intervienen en la parte del control del close-loop sobre el cultivo.

1.2. Objetivos de este TFM

El desarrollo del proyecto “Turtlebot: propuesta de control reactivo mediante neuroprocesadores biológicos” se llevó a cabo de forma satisfactoria en la medida en que cubría los pasos previos a un proceso de investigación, es decir, generar un setup de experimentación completo que cubriese todos los aspectos necesarios para el proceso de experimentación sobre cultivos biológicos.

Posteriormente se ha procedido a realizar un estudio sistemático de las aproximaciones realizadas por otros grupos investigadores para estudiar la forma de decodificar la actividad de los cultivos en términos de señales eléctricas, esto es, potenciales de acción. Este proceso de estudio nos llevó a la conclusión de que los métodos actuales no son lo suficientemente robustos para caracterizar la respuesta de los cultivos ante la estimulación tetánica.

Es precisamente en este aspecto en el que este estudio de investigación se centra y sobre el que trata de aportar una aproximación que mejore la caracterización de la actividad global de los cultivos frente a los estímulos.

La hipótesis principal es que el cultivo neuronal tiene una topología de activación global con una respuesta distintiva dependiendo de la localización del estímulo que puede ser utilizada para obtener probablemente más de dos pares simples de entradas y salidas y así permitir su aplicación a otros vehículos más complejos de tipo Braitenberg Braitenberg [5].

1.3. Estado del arte

Nuestro cerebro procesa continuamente entradas sensoriales para producir respuestas conductuales a ellos. Para hacer frente a estos procesos, los circuitos neurales que deben formar parte de nuestro cerebro deben generar dinámicas multidimensionales que codifiquen información sobre múltiples características internas y externas. Durante las últimas décadas, muchos investigadores han abordado el estudio de estos procesos trabajando con cultivos de neuronas disociados, donde se espera que surjan circuitos espontáneos. La idea principal detrás de ese enfoque es que la combinación de la estimulación eléctrica externa controlada junto al registro de la salida del cultivo nos permitirá entender la dinámica de los circuitos implícitos.

Dado que sabemos que el desarrollo temprano del cerebro se lleva a cabo mediante la interacción con el medio ambiente, cuando las células disociadas se cultivan en aislamiento, sin retroalimentación de entrada/salida, no desarrollarán una arquitectura definida, ni por lo tanto, una funcionalidad específica. De acuerdo con Xydas et al. [27], el uso de entradas sensoriales artificiales y salidas de efectores para superar el problema de la 're-incorporación' parece ser una solución lógica. Esta ha sido una de las principales motivaciones para estudiar los cultivos neuronales desarrollados sobre una matriz de múltiples electrodos cultivada en sustrato (MEA) y fusionada con robots (Hibrots) o animales simulados (Animats).

Se han hecho muchos intentos de combinar la computación biológica con la robótica, donde el objetivo principal es explorar las capacidades computacionales y las capacidades de aprendizaje de tales cultivos neuronales in vitro. Este enfoque podría permitirnos en el futuro entender cómo las redes neuronales manejan la información para crear comportamientos de alto nivel.

- DeMarse et al. [7] desarrolló un animat controlado neuralmente (animal artificial), donde estudiaron "cómo se procesa y codifica la información en las redes neuronales cultivadas vivas conectándolas a un animal generado por ordenador". Su principal objetivo fue estudiar la interacción entre las entradas sensoriales de estos animats a través de su entorno con el cultivo neuronal disociado en un MEA.
- Más tarde, Bakkum et al. [4] se adentró en el estudio con tales animats investigando sobre "cómo se realiza el aprendizaje, la memoria y el procesamiento de la información en tiempo real". Estudiaron un enfoque prometedor mediante la fusión de un cultivo neuronal disociado con un robot real, llamado hibrot (robot híbrido), bajo la hipótesis de que "si una reacción neural dada es repetible con baja varianza, entonces la respuesta se puede utilizar para controlar un robot para manejar una tarea específica ". Aplicando pares de estímulos eléctricos a diferentes electrodos, encontraron una manera de producir respuestas no lineales estables que caracterizaron para controlar el comportamiento del robot.
- Ese mismo año, Martinoia et al. [15] proponen el estudio de la 're-incorporación' de un cultivo junto a un robot para discutir los efectos en términos de la conectividad y la modificación de la actividad global debidos a dicha 're-incorporación'. El término '**re-incorporación**' es debido a que cuando un sistema nervioso se desarrolla en un cuerpo biológico, lo hace en continua interacción con el medio a través de sus sensores y actuadores de forma que se considera que dicha interacción continua es completamente determinante en el desarrollo de las estructuras neuronales y su funcionalidad, esto es, en la adaptación y el aprendizaje. Sin embargo, el proceso de extracción de las neuronas, la disociación y su posterior cultivo in vitro, suponen el aislamiento de dicha red. Es por esto muchos investigadores sugieren que es necesario para entender correctamente el desarrollo y el aprendizaje en estructuras neuronales in vitro, su 're-incorporación' mediante un cuerpo artificial robótico que le provea de la interacción con el mundo real a través de sus sensores y actuadores.

- Además, Warwick et al. [26] propuso un "sistema híbrido que incorpora el control en bucle cerrado (Close-loop) de un robot móvil por un cultivo dissociado de neuronas". Ellos desarrollaron un enfoque metodológico para caracterizar la tasa de disparo instantáneo del cultivo neuronal en varios electrodos con el fin de mapear las entradas y salidas del sistema en general.
- Por último, Tessadori et al. [25] y Tessadori et al. [24] mejoraron los enfoques antes mencionados añadiendo un paso más en el experimento, donde después de cada colisión debido a una mala respuesta del cultivo celular, estimularon el circuito para aumentar la plasticidad sobre el material seleccionando electrodos de entrada-salida.

El principal requisito en cualquier realización de cultivo neuronal es la caracterización de la dinámica neural después de la estimulación para identificar qué canales del MEA pueden usarse como entradas sensoriales (es decir, conectadas a los sensores del robot) y cuáles como salidas del motor (es decir, conectadas a los actuadores del robot). La herramienta matemática habitual utilizada para esta caracterización ha sido el **histograma de tiempo post-estímulo (PSTH)**, Novellino et al. [19], Warwick et al. [26]. El PSTH se calcula contando los potenciales de acción detectados en cada electrodo de cultivo neuronal durante la ventana de tiempo tras un estímulo en uno de los electrodos. El objetivo es encontrar pares de electrodos donde la estimulación en uno de los pares, electrodo entrada, produce una respuesta en el electrodo seleccionado como electrodo de salida, pero no en otros pares de electrodos entrada/salida. Este método de selección de electrodos no puede aplicarse a cultivos neuronales con alta conectividad, porque en ese caso es difícil encontrar pares de electrodos conectados y aislados para un estímulo dado pero no para el resto.

Como una forma de superar las dificultades en el método PSTH, para caracterizar pares de electrodos conectados en un cultivo neuronal, proponemos utilizar los patrones de variación en el tiempo de la tasa de disparo estimada, a partir de intervalos interspike inversos (IISI) en cada electrodo, para distinguir el electrodo estimulado.

1.4. Neurociencia

En el siglo XIX ya se encontraba establecido entre la comunidad científica que la célula era la unidad fundamental de los organismos biológicos, sin embargo, aún no estaba claro como se encontraba fundamentado el tejido nervioso. De hecho no fue hasta bien entrado el siglo XX cuando algunos científicos comienzan a argumentar por medio de observaciones que este también se encuentra formado por células. Los principales teóricos de esta doctrina, llamada doctrina de la neurona, fueron Ramón y Cajal y Charles Sherrington.

Ramón y Cajal argumentó que las neuronas eran entidades individuales separadas que formaban un entrelazado tejido interconectado que permitía la comunicación intercelular por medio de contactos especializados a los que Sherrington llamó sinapsis.

Posteriormente, Cajal y Golgi determinaron que el tejido nervioso se encontraba formado principalmente por dos tipos de células, a saber, las neuronas, cuyo propósito fundamental es la comunicación de información, y la neuroglia, un conjunto de células a las que se suponía que su cometido era soportar la estructura neuronal, de forma que ambos tipos de células forman las unidades fundamentales para generar circuitos neurales específicos como componentes primarios para formar sistemas sensitivos, asociativos y motores, que en conjunto permiten el desarrollo de los sistemas nerviosos en los que emergen las funciones de orden superior, como la percepción, la atención, etc.

Por fin en los años 50, el desarrollo de la tecnología a través de los microscopios electrónicos permitió la observación empírica de dichas conexiones y se demostró que efectivamente las neuronas formaban conexiones sinápticas.

En neurociencia la pregunta fundamental se centra en estudiar como se organizan dichos circuitos neurales específicos a partir de los cuales se generan los sistemas nerviosos de los que emerge la conducta.

En los siguientes apartados explicaremos unas nociones básicas sobre las características de estos dos tipos de células así como de las estructuras que forman para el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso.

1.4.1. Neuronas

La neurona como unidad fundamental de la arquitectura de los sistemas nerviosos se puede describir a grandes rasgos por cuatro factores por su morfología. Se encuentran formadas por:

- El soma, el cuerpo celular, dentro del cual se encuentra el núcleo celular.
- Las dendritas, ramificaciones cuyo principal cometido es captar la información aferente de otras unidades neuronales.
- El axón, cuya funcionalidad consiste en integrar la información proveniente de las ramificaciones dendríticas.
- Las terminaciones sinápticas o pie sináptico, pequeñas ramificaciones que se encuentran en la terminación del axón y que permiten la transmisión sináptica a otras unidades neuronales.

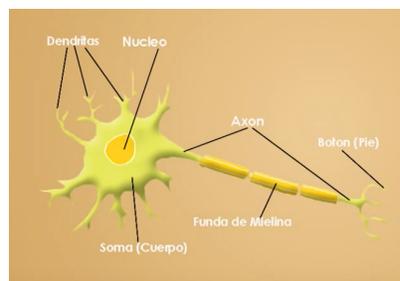


Figura 1.4: Morfología de la neurona.

La distinción fundamental entre las neuronas y otras entidades celulares se encuentra claramente definida por su morfología, esto es, el desarrollo de la morfología de la neurona se encuentra claramente dirigido a realizar la integración y la comunicación de información. Esto se observa por un lado en la complejidad de las arborizaciones dendríticas para recoger información proveniente de otras unidades neuronales, así como la morfología del axón que se encuentra determinada a favorecer la transmisión e integración de la información a otras zonas de los tejidos nerviosos.

Existe un amplio espectro de neuronas, que se diferencian principalmente debido a su estructura funcional. Algunas no tienen arborizaciones dendríticas y otras se asemejan con un árbol maduro en la complejidad de sus ramificaciones. De hecho, la cantidad de aferencias que recibe una neurona es un factor determinante de su función neural. El número de aferencias que puede recibir una neurona varía entre 1 y 100.000 lo que refleja un claro propósito para integrar la información.

El proceso de transmisión de la información se denomina transmisión sináptica y se produce en las terminaciones sinápticas donde la conexión entre neuronas no se realiza por contacto físico sino a través de la hendidura sináptica. La terminación presináptica del axón contiene vesículas sinápticas que segregan moléculas denominadas neurotransmisores, estos son captados por receptores en la especialización postsináptica de otra o la misma unidad neuronal.

El comportamiento de una neurona aislada se encuentra determinada en última instancia por gradientes electro-químicos. Es posible observar el estado dichos gradientes por medio de técnicas electrofisiológicas como el Patch Clamp.

Cuando una neurona se encuentra en reposo, la neurona mantiene un gradiente eléctrico, una diferencia de potencial, constante entre el interior y el exterior de la membrana celular. Este gradiente se caracteriza por ser más negativo en el interior celular. Para poder mantener dicho gradiente, la neurona emplea dos tácticas en colaboración, por un lado, emplea unos canales permeables selectivamente al potasio. Este puede entrar y salir de la célula a través de dicha membrana, pero dado que la concentración de potasio es mayor en el interior que en el exterior, el gradiente químico empuja a equilibrar esta relación expulsando potasio al exterior de la membrana. Por su parte, la bomba de sodio-potasio, realiza un trasvase de sodio al exterior y potasio al interior, en una relación 3 a 2. En conjunto mantienen una diferencia de potencial en torno a los $-90mv$.

Por otra parte, si se produce una transmisión sináptica, el trasvase de neurotransmisores entre una terminación presináptica y una especialización postsináptica puede generar una reacción en cadena en la neurona diana que se denomina potencial de acción. Dicha reacción es controlada mayormente por medio de tres canales, los canales de permeabilidad selectiva al potasio, los canales de sodio y las bombas de sodio-potasio.

Cuando el potencial en el interior de la membrana celular se vuelve más positivo que su estado de reposo, hasta superar cierto umbral, los canales de potasio se cierran y se abren los canales de sodio, debido a la diferencia de potencial entre el exterior y el interior de la membrana, el sodio con su carga positiva intenta equilibrar la diferencia de potencial internándose en la célula para generar un interior más positivo. Esto produce el proceso de despolarización de la neurona, cuya diferencia

de potencial logra alcanzar valores positivos en torno a 35mv . Llegados a este punto, los canales de sodio se cierran y se abren de nuevo los canales de potasio, así como las bombas de sodio-potasio. La acción conjunta de estos canales permite la reinsertión del potasio al interior de la membrana celular para restablecer el desequilibrio del gradiente electro-químico inicial, proceso al que se llama repolarización.

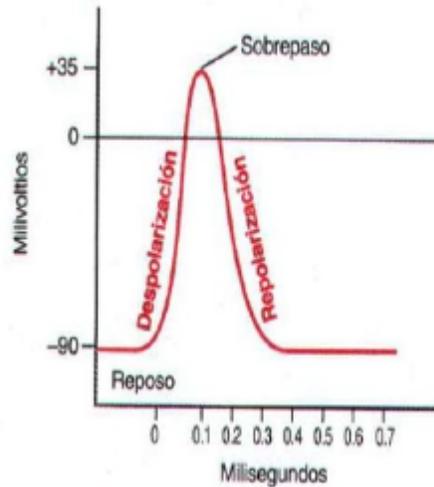


Figura 1.5: Potencial de acción en el interior de la membrana celular.

Dado que nosotros registramos la actividad neural desde el exterior de las membranas celulares, la visión que obtenemos de dichos procesos de despolarización y repolarización se encuentran complementadas.

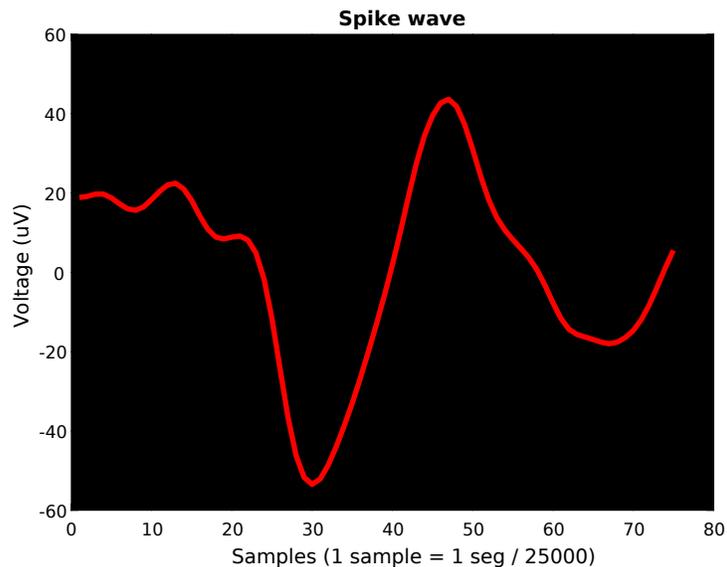


Figura 1.6: Potencial de acción en el exterior de la membrana celular.

1.4.2. Células neurogliales

El término 'glia' proviene del griego y significa 'pegamento', esto es debido a la suposición en el siglo XIX sobre que dichas células mantenían unido el sistema nervioso. La neuroglía se encuentra formada por tres tipos de células distintas, a saber:

- Los astrocitos, de aspecto estrellado, se ocupan de mantener un entorno químico apropiado en el entorno celular de forma que controlan el medio iónico.
- Los oligodendrocitos, son unas células que depositan una envoltura laminada llamada mielina alrededor de los axones, esto permite aumentar la velocidad de transmisión de las neuronas.
- La microglia, formadas por un tipo específico de células similares a los macrófagos que se encargan de limpiar y regenerar el entorno celular y controlar aspectos como la inflamación local.

Una característica de este conjunto de células es que su relación con respecto al número de neuronas en el sistema nervioso es aproximadamente de 3 a 1. En conjunto su función es mantener el medio iónico para modular la transmisión de neurotransmisores en las hendiduras sinápticas, ayudar a la recuperación de lesiones neurales y proporcionar el soporte estructural del desarrollo neural.

1.4.3. Circuitos neurales

Se estima, que en conjunto en los sistemas nerviosos existen alrededor de 100.000 millones de neuronas y que el número de conexiones sinápticas se encuentra entre 100 y 500 trillones. Esto nos muestra la extraordinaria especialización de este órgano para manipular la información.

Otro aspecto relevante es el gran número de tipos de células neuronales distintas, especializadas para integrar dicha información de formas diversas, con el objetivo de permitir redes específicas con distintos tipos de funcionalidad para lograr redes más complejas.

El cerebro parece tener una distribución neural de sus estructuras para acometer distintas funcionalidades, donde una de las principales características, es su gran interconexión, para que las distintas estructuras neurales realicen un trabajo paralelo del procesado de donde emerge un comportamiento dialéctico debido a la competición y colaboración en el procesado de la información.

1.5. Motivación

¿Qué es la inteligencia?, ¿Cuál es el conocimiento necesario para poder generar un sistema inteligente? Del modo en que se afrontan estas dos cuestiones surgen los diferentes paradigmas que tratan de resolver la segunda pregunta a partir de la primera. De hecho, la forma en que cada aproximación trata de resolver el problema genera enfoques totalmente distintos, siendo además

imposible, a priori, saber cuál de ellos podrá llevarnos a la solución, o si de otro modo, cada uno aportará un foco de luz para determinar las diferentes maneras que permiten obtener un sistema inteligente. Estas preguntas, que llevan siendo formuladas desde hace siglos, han obtenido a lo largo de los tiempos un sinnúmero de respuestas y sin embargo, a día de hoy, aún es imposible encontrar una medida exacta o una definición concreta y ampliamente aceptada sobre lo que es la inteligencia.

Sin embargo, los avances teóricos y tecnológicos del siglo pasado, sobre todo a raíz de la segunda guerra mundial, han permitido acercarnos, sino a la respuesta, hacia unas metodologías más propias del ámbito científico que de la especulación. Por un lado, el desarrollo de la teoría de la computación por Alan Turing en 1936 y el desarrollo de la computadora programable digital en la década de los 50, bajo la supervisión del matemático John Von Neumann, forzaron a los científicos a pensar de un modo diferente sobre la mente y la inteligencia. Por otro, gracias al descubrimiento de Santiago Ramón y Cajal en 1888 sobre los mecanismos que gobiernan la morfología y los procesos conectivos de las células nerviosas y al postulado de aprendizaje en 1949 por Donal Hebb, se establecieron las bases para el estudio de las redes neuronales al describir la estructura de las neuronas y su forma de interconexión. Este último, postuló que la información para modificar los parámetros se encuentra implícita en la actividad espacio-temporal de la red y modeló un tipo de aprendizaje por refuerzo, en el que, si una neurona se encontraba lo suficientemente próxima a otra como para excitarla electroquímicamente y además lo hacía de forma repetida, la conexión sináptica entre ambas neuronas se vería reforzada.

De nuevo replanteándonos las preguntas: ¿Que es la inteligencia?, ¿Cuál es el conocimiento necesario para poder generar un sistema inteligente?, uno podría responder que la inteligencia es la capacidad de pensar, entender, razonar, asimilar, elaborar información, etc. Sin embargo, esta respuesta, ¿nos lleva a poder resolver la segunda pregunta? La cuestión es que si queremos entender lo que realmente significa la inteligencia, necesitamos encontrar preguntas más adecuadas que puedan llevarnos a resolver el problema de como se construye la inteligencia, que es lo que en definitiva el ser humano trata de conseguir. Más aún, del planteamiento de estas dos preguntas y del modo de abordarlas, surge la manera en que se realiza la aproximación para resolver dicha cuestión, esto es, si uno piensa en la inteligencia de esta forma abstracta, mediante respuestas tan generales como: entender, razonar, asimilar; uno se encuentra en un espacio de definiciones demasiado ambiguo, que le plantea a su vez plantearse de manera recursiva las siguientes cuestiones: ¿que es el razonamiento?, ¿que significa entender?, ...El problema reside en que una pregunta tan general y pre científica nos lleva a planteamientos confusos donde es fácil perderse en las aportaciones subjetivas propias del dominio del observador externo.

La naturaleza, por medio de la evolución, la genética y la selección natural, ha resuelto este problema de diversas maneras, generando múltiples sistemas inteligentes, cada uno en su ámbito. En mi opinión se debe revisar la cuestión desde una perspectiva puramente pragmática y científica, considerando que la mayoría de sistemas inteligentes en la naturaleza son considerados inteligentes por el observador externo, como valoración personal del éxito que tienen de adaptarse al medio.

Podemos observar que la mayoría de dichos sistemas son de tipo reactivo/situado, e incluso en casos más complejos, se trata de sistemas híbridos en los que se mezclan capacidades adaptativas de tipo reactivo/situado, con otras de tipo simbólico. Parece más razonable por tanto tratar de aproximarse a la cuestión de la inteligencia desde una perspectiva que no incluya valoraciones externas sino que describa los sistemas como lo que son, conjuntos de componentes individuales que formando estructuras complejas logran adquirir una sinergia que dota a dichos sistemas de propiedades distintas que no se encuentran en los elementos individuales por sí solos.

Esta aproximación, denominada conexionista, parece tener un futuro razonable, siempre y cuando se ponga énfasis en el desarrollo de herramientas formales más adecuadas que las actuales para describir tales sistemas dinámicos. De la misma forma que para los ordenadores se han generado un conjunto de herramientas formales, como la teoría de la computación, la teoría de autómatas, etc, que han permitido generar lenguajes de programación, compiladores y sistemas operativos, desde la perspectiva conexionista se hace necesario investigar un método para estudiar las propiedades de sistemas dinámicos complejos, así como de una metodología para crear sistemas basados en computación natural emergente.

Según W.S. McCulloch McCulloch et al. [16], parece razonable seguir el enfoque conexionista para resolver los problemas de la inteligencia y del conocimiento, planteados desde la perspectiva anatómica y fisiológica de las redes neuronales específicas de las que emerge dicha inteligencia. Esta forma de atacar al problema sería como tratar de construir sistemas inteligentes de abajo hacia arriba, para contestar primera a cuestiones tales como: dinamismo, representación, control, adaptación y autonomía, antes de intentar modelar procesos cognitivos complejos, lo que no significa que no se consideren tales procesos cognitivos importantes o metas a alcanzar, sino más bien, que para alcanzar dichos objetivos, antes es necesario comprender otros fenómenos más básicos que seguramente serán el soporte de estos.

Por tanto se trata de estudiar las arquitecturas de las redes neurales biológicas con el fin de imitarlas para conseguir modelos más complejos que los generados mediante redes neuronales artificiales. Estas últimos tienen el inconveniente de ser estáticas en estructura y simples en la capacidad computacional de cada neurona artificial. Se sabe, que las neuronas biológicas acometen procesos computacionales complejos en la realización de funciones de activación, debido a la interacción de elementos tales como el sodio y el potasio en los procesos de permeabilidad selectiva de la membrana celular.

Es por tanto motivo de este trabajo el tratar de comprender desde una perspectiva descriptiva y bajo su propio dominio de estudio, en términos de las propiedades físicas de las señales, las propiedades del código neural que emerge bajo la interacción de una red neuronal biológica en dos dimensiones.

1.5.1. Características del código neural

Cuando analizamos el comportamiento de una neurona aislada, no nos da la impresión de que dicha funcionalidad pueda dar soporte, a simple vista, a sistemas de conocimiento. Las neuronas biológicas presentan un comportamiento aparentemente simple, con potenciales de acción lentos producidos tras la estimulación dendrítica. Sin embargo, los trenes de pulsos parecen transportar significado mediante ciertos rastros analógicos, a saber, la densidad y duración del pulso, de forma que la actividad nerviosa es dual, analógica y digital Neumann [18]. Por tanto se pueden extraer las siguientes características del código neuronal:

- La actividad todo o nada es posible verla reflejada en la existencia o falta de un potencial de acción para una determinada neurona.
- La duración del tren de pulsos de una neurona.
- La frecuencia de disparo de un tren de pulsos.

Por tanto, las neuronas no solo tienen esa capacidad digital todo o nada, también son capaces de representar valores continuos en función de la duración del tren de pulsos y la propia frecuencia de disparo. La información parece estar almacenada en la estructura de las conexiones neuronales, pero lo que da significado a la información no es en sí la estructura que la soporta, sino la interacción de la estructura que soporta una vibración particular, esto es, una oscilación con unas características determinadas en términos de neuronas activadas, trenes de pulsos y frecuencias de disparo, o expresado de otra forma, la partitura melódica de cada estructura neuronal, donde se da soporte a las estructuras espacio-temporales del código neural.

Una vibración particular de una cierta estructura neuronal nos proporcionará una serie de notas dispuestas en pentagramas paralelos con distintas duraciones y tonos, formando conjuntos de acordes. Existen además ciertas propiedades globales que pueden ser asignadas a dichas partituras neurales, como son el tempo o la velocidad. Es sabido que el cerebro dispone de oscilaciones alpha, beta y gamma, en diferentes estados de vigilia. Esto es, el cerebro trabaja con oscilaciones globales que marcan el tempo neural bajo el cual se producen los patrones. Bajo estas suposiciones, se asume que ciertas partituras se encuentran almacenadas en ciertas estructuras neurales y que dan soporte a las partituras neurales cuando son activadas.

Es de hecho en las arquitecturas biológicas formadas por estas neuronas donde comienza a verse el comportamiento emergente de la actividad sincronizada, colaborativa y competitiva, que da lugar a procesos cognitivos superiores como la percepción, la manipulación de símbolos, etc. Esto implica que para entender la transcendencia de la funcionalidad neuronal, es necesario estudiar los comportamientos dinámicos de las redes neuronales interactuando con el medio.

Como última consideración, no existe una clara referencia en biología para pensar que en el sistema nervioso el cálculo se realiza de manera secuencial y estanca. Es cierto que se producen procesos

ascendentes de manipulación y transformación de la información, así como posteriores procesos descendentes en los que existe un orden, pero también es cierto, que dichos procesos son más bien cíclicos en su conjunto y que operan concurrentemente. Entender la forma de representación y manipulación de la información en las redes neuronales nos permitiría en el futuro diseñar paradigmas computacionales aplicables a robótica mucho más flexibles y robustos que los actuales.

Un símil accesible se basa en los elementos computacionales de un ordenador; tales como sumadores, comparadores y la arquitectura que soporta los programas, el lenguaje máquina y los compiladores. De la misma forma, no parece especialmente importante la función de estos elementos fundamentales, sin embargo, trabajando de una forma secuencial concreta dan soporte a los sistemas computacionales.

1.5.2. Computación natural y computación digital

Según se explica en Sanchez. [22], es posible estudiar los sistemas nerviosos biológicos con el fin de entender la forma en que computan la información. Este enfoque aplica conocimientos sobre Neurociencia y computación para tratar de dar una descripción lo más completa de los procesos ocurridos en dichos sistemas. El objetivo de esta aproximación es comprender de una manera más profunda los procesos de percepción que se dan en los sistemas biológicos con el fin de diseñar nuevos dispositivos basados en paradigmas computacionales naturales.

En la actualidad, los paradigmas computacionales clásicos emplean procesadores de silicio serie y supervisados, con relojes de alta frecuencia, con un consumo moderado de energía, y circuitos de estructura fija. Frente a ellos, los sistemas nerviosos biológicos emplean millones de procesadores biológicos, con estructura dinámica, conmutaciones lentas(en comparación con los circuitos de silicio), bajo consumo de energía y sin aprendizaje supervisado. Los sistemas nerviosos biológicos tratan de una forma muy eficiente el problema de la percepción y el reconocimiento, haciendo frente a dificultades tales como la variación natural de los patrones perceptivos y la falta de conocimiento a priori acerca del dominio a percibir. Algunos investigadores han investigado la manera de imitar este tipo de procesamiento. Por un lado tratando de generar nuevos paradigmas algorítmicos Rumelhart et al. [21] y también desde el diseño de circuitos de silicio que implementen las propiedades de los sistemas nerviosos biológicos como en Meier [17].

Dado que la biología ha resuelto, algunos problemas complejos de resolver mediante los paradigmas actuales de computación (que emplean procesadores serie, estáticos, realizados con silicio), se trata de comprender la aproximación biológica, con su gran capacidad de adaptación, para generar nuevos diseños capaces de resolver problemas como el reconocimiento de patrones, la visión artificial o el control adaptativo en robótica.

1.5.3. Aspectos neurofisiológicos del aprendizaje

El proceso de aprendizaje consiste en la creación y modulación de enormes conjuntos de asociaciones entre células neuronales que son generados mediante los procesos de estimulación y respuesta del conjunto del sistema. Por ello es necesario entender dicho proceso, para poder definir los mecanismos neurofisiológicos que los soportan y determinar la relación entre las asociaciones de estímulos y respuestas.

La neurofisiología ha tratado de aportar un foco de luz a la comprensión del funcionamiento de los sistemas nerviosos mediante el estudio del funcionamiento de neuronas aisladas. Esto se ha realizado por medio de técnicas como el 'Patch Clamp', una técnica que permite el estudio de los canales iónicos de las neuronas mediante la cual Alan Hodgkin y Andrew F. Huxley [10] registraron por primera vez las corrientes de un canal iónico para una neurona de un calamar gigante. Los mismos autores descubrieron el efecto de la permeabilidad selectiva en la membrana celular de las neuronas que describe la forma característica de los potenciales de acción Hodgkin and Huxley [9].

Un número considerable de estudios se ha centrado en las respuestas de una única célula Ammermüller and Kolb [2] y Ammermüller et al. [3]. Sin embargo el empleo de la actividad de células individuales no es suficiente para comprender el funcionamiento global de los sistemas. Un paso natural para estudiar sistemas neuronales, limitando la complejidad de los mismos, es abordar el estudio de las características dinámicas emergentes en redes planas, como paso previo al estudio de redes tridimensionales. Esto es posible realizarlo gracias a las nuevas tecnologías como los MEA.

Mediante esta tecnología es posible estudiar los procesos de aprendizaje, fundamentalmente de tipo Hebbiano, que se dan en dichas estructuras planas y modelar el efecto que tiene el aprendizaje sobre la estructura de las conexiones sinápticas y los patrones de actividad generados JIMBO [11].

1.5.4. Computación natural en IA

La IA y la robótica pueden claramente enriquecerse de los modelos aprendidos a partir de la biología y de hecho hasta ahora lo han hecho bastante bien, los modelos de computación reactiva, las redes neuronales artificiales, así como ciertos aspectos de la visión artificial, se han visto claramente influenciados y mejorados gracias a las lecciones tomadas.

Sin embargo, parece que es necesario aún dar un salto cualitativo en lo que respecta al fondo, a la verdadera raíz de la aproximación biológica, esto es, a su código neural y la forma en que la información es representada. Mientras que para los computadores la información es una serie de transistores que almacenan campos eléctricos de una forma estable, que da lugar al desarrollo de lenguajes basados en código binario, esto no representa más que una parte de la potencia computacional de los sistemas biológicos.

Capítulo 2

Análisis de frecuencias inter-spike inversas IISI

En los siguientes apartados vamos a explicar el proceso de investigación seguido partiendo de los requisitos que debe cumplir el diseño del experimento, para realizar una aproximación adecuada al problema de la decodificación de la actividad neural en el cultivo disociado.

Dado que los métodos actuales no son lo suficientemente robustos para caracterizar la respuesta de los cultivos ante la estimulación tetánica, debido a la alta variabilidad de las estructuras neuronales a lo largo de su desarrollo, como a la variabilidad de la respuesta neuronal ante los estímulos, es necesario realizar un proceso de investigación para encontrar una estrategia de caracterización robusta.

Nuestra propuesta final, como resultado de esta investigación, se centra en el análisis de las frecuencias inter-spike inversas IISI, sin embargo, queremos argumentar el proceso de investigación mediante los resultados y la discusión de las distintas alternativas propuestas, para explicar el motivo de nuestra propuesta final, el análisis IISI.

2.1. Diseño del experimento

El objetivo experimental consiste en encontrar una metodología para detectar, mediante el análisis de la actividad global del cultivo, el electrodo estimulado. De esta forma, si somos capaces de caracterizar la respuesta del cultivo al estímulo aplicado en dos electrodos distintos, podremos en un futuro realizar un bucle cerrado entre un robot y el cultivo neuronal con el fin de que el cultivo interactúe con el entorno mediante un vehículo Braitenberg tipo 2-C.

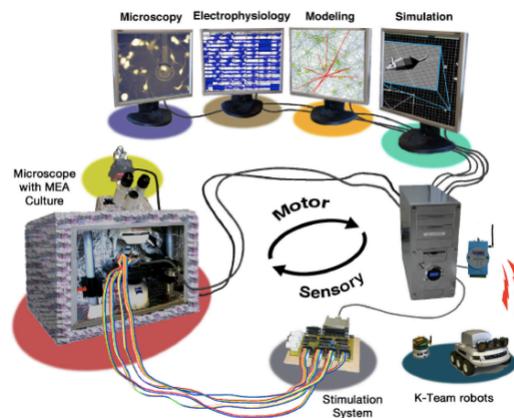


Figura 2.1: Close-loop para el control del cultivo.

De forma general el experimento debe cubrir los siguientes procesos:

1. Estrategia de selección de entradas y salidas en los electrodos del MEA sobre el que se encuentra la red neuronal biológica.
2. Fase de registro de estimulación del circuito neural y limpieza de ruido en tiempo real.
3. Análisis en tiempo real de la actividad global del cultivo.
4. Entrenamiento de un clasificador supervisado mediante redes neuronales artificiales.
5. Análisis del resultado de la clasificación.

2.1.1. Material necesario

Para la realización del experimento vamos a emplear el siguiente hardware:

1. PC de sobremesa junto con la tarjeta de adquisición de datos MC_CARD de Multichannel System. Nos permitirá establecer una comunicación serial con el PC del cultivo.

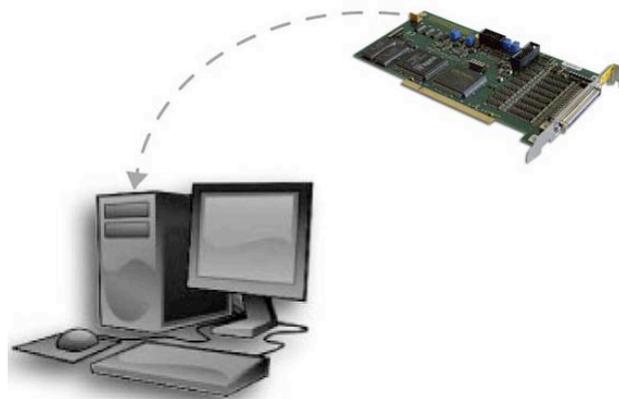


Figura 2.2: Tarjeta de adquisición de datos MC_CARD.

2. Generador de estímulos STG-1002 de Multichannel System, nos permitirá estimular el cultivo neuronal por medio de señales eléctricas.



Figura 2.3: Estimulador STG-1002.

3. Amplificador MEA1060BC de Multichannel System, nos permitirá tanto registrar información del cultivo neuronal como estimular el cultivo mediante las señales generadas por el estimulador STG-1002.

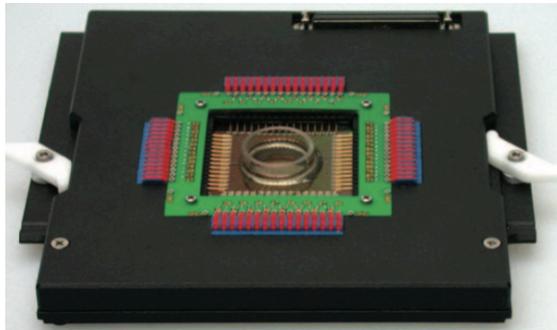


Figura 2.4: Amplificador MEA 1060BC.

4. Controlador de temperatura modelo TC01 de Multichannel Systems. Los amplificadores MEA llevan integrado un sistema de calentamiento para controlar la temperatura del MEA. La temperatura se ajusta mediante la utilización de sensores y componentes térmicos.



Figura 2.5: Controlador TC01 de MCS.

Por último ha sido necesario disponer de material especial para uso biológico:

- MEA, Microelectrode Arrays. Se trata de unas placas en las que se puede mantener un cultivo vivo in vitro, que nos permite tanto estimular cómo registrar señales eléctricas en la red neuronal.

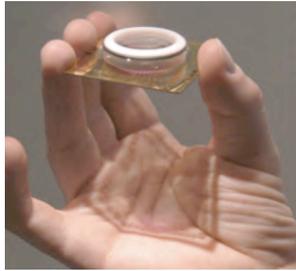


Figura 2.6: Micro-electrode Array.

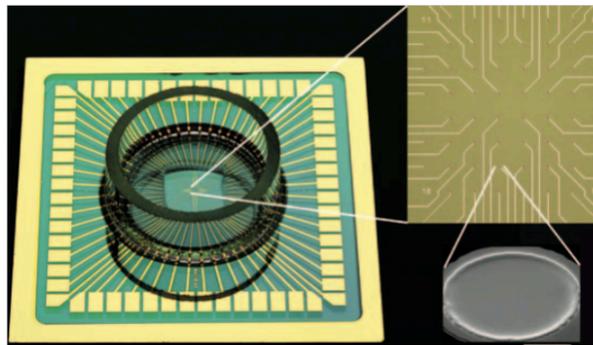


Figura 2.7: Vista superior del Micro-electrode Array junto a vista en detalle de la disposición de los electrodos en sustrato.

- Red Neuronal obtenida a partir del cortex de un embrión de ratón (E16).

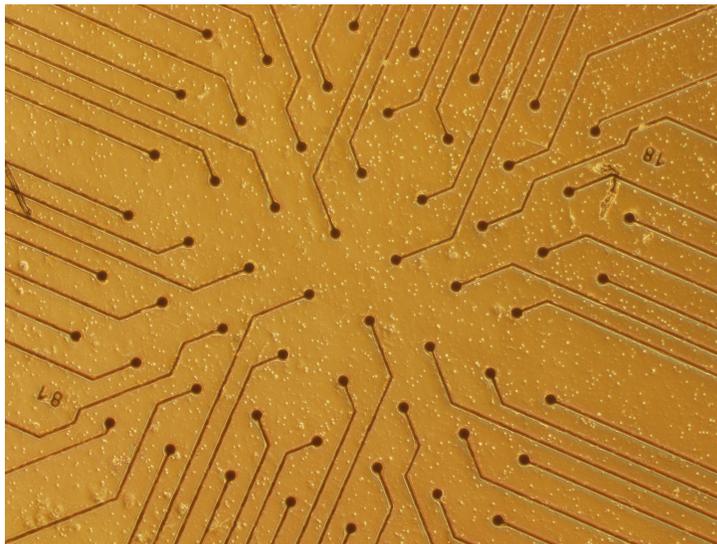


Figura 2.8: Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 1 de cultivo.

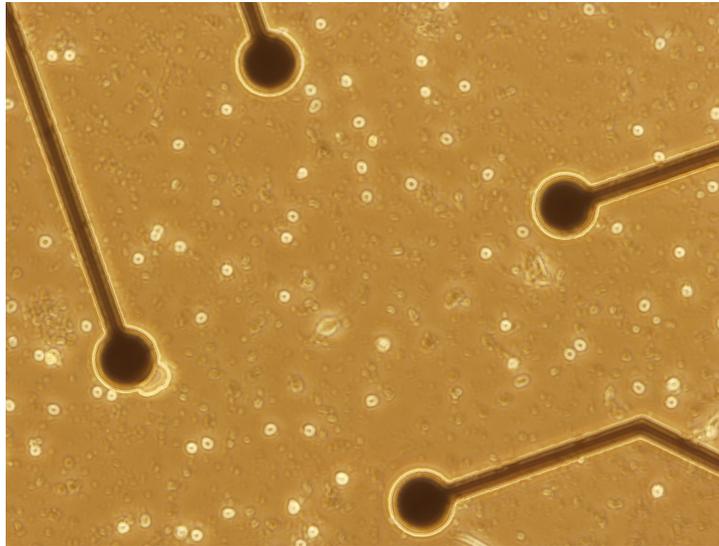


Figura 2.9: Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 1 de cultivo.

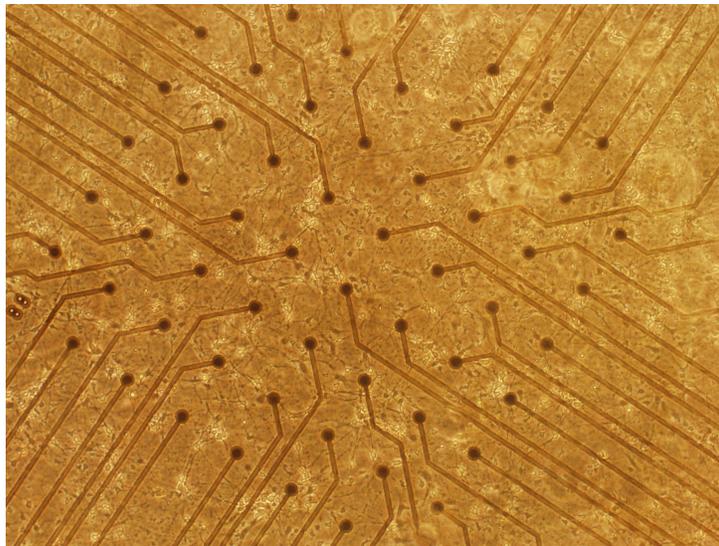


Figura 2.10: Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 12 de cultivo.

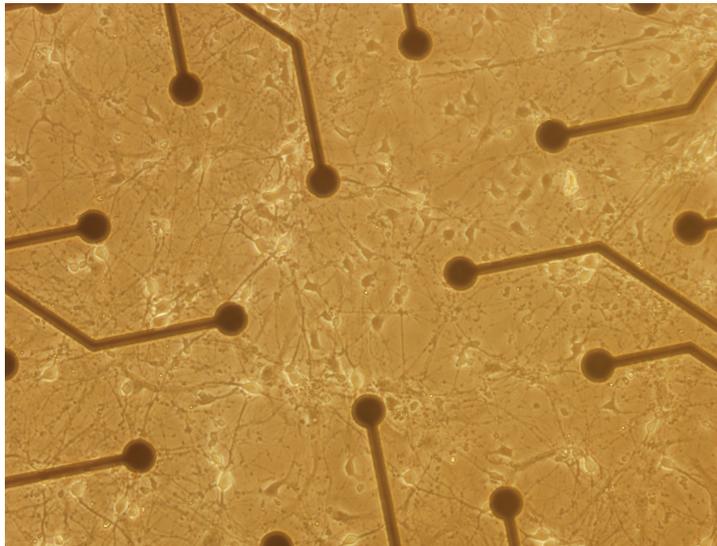


Figura 2.11: Cultivo neuronal in vitro sobre un MEA, fotografía tomada el día 12 de cultivo.

Para el análisis es necesario disponer de software de análisis de datos científico. Se ha empleado el siguiente software:

1. Matlab 2016a para el análisis científico.
2. MC_RACK adquirido de MCS para la adquisición de datos electrofisiológicos. Mediante este software es posible visualizar la actividad en tiempo real, que es mostrada mediante un osciloscopio. Entre otras características, se incluyen un osciloscopio virtual, un filtro y un detector de eventos.

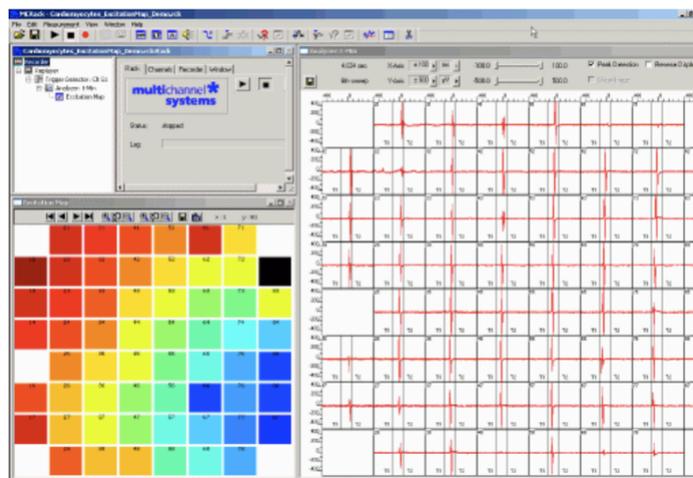


Figura 2.12: Software de adquisición de datos MC_RACK.

3. MC_Stimulus adquirido de MCS para generar el estímulo.

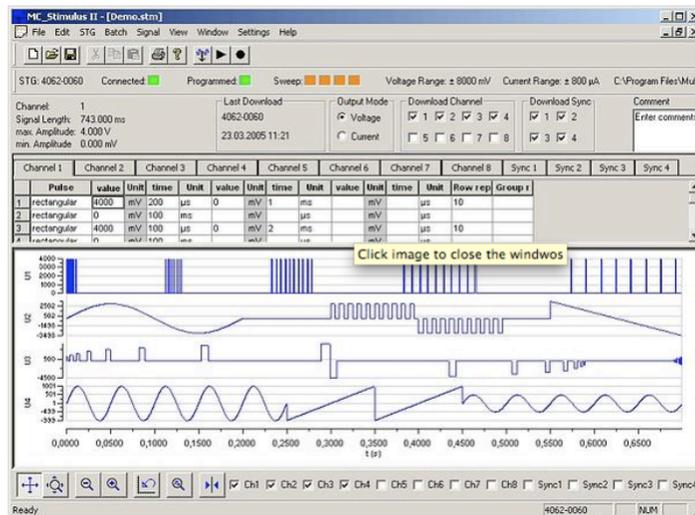


Figura 2.13: MC_Stimulus.

4. MEA_Select adquirido de MCS para la selección de los electrodos a estimular.



Figura 2.14: MEA_Select.

2.1.2. Setup experimental

Para el desarrollo de este experimento hemos empleado células disociadas corticales de cerebros embrionarios de ratas (E16), cultivadas sobre una matriz de múltiples electrodos (MEA) incrustada en sustrato. Las células de cultivo se han mantenido en un medio de cultivo que contiene nutrientes, hormonas de crecimiento y antibióticos y han sido reemplazadas cada tres días, manteniéndose en una incubadora humidificada a $37^{\circ}C$ y $5\%CO_2$. Los experimentos han sido realizados tras 20 días in vitro.

Nuestra configuración consiste en un conjunto de dispositivos de sistemas multicanal (MCS). Un MEA estándar se compone de una matriz de 60 electrodos $Ti/Au/TiN$ de $30\mu m$ de diámetro, dispuestos en una cuadrícula cuadrada $8 * 8$ y espaciados $200\mu m$ entre sí, que permiten el registro y la estimulación simultáneas. Se ha empleado un amplificador comercial de 60 canales (MEA1060-BC) con una frecuencia limitada en el rango de $10Hz - 3000Hz$. La estimulación ha sido realizada utilizando el estimulador (STG1002) capaz de multiplexar las señales para la estimulación de 60

electrodos en un proceso casi paralelo. Los datos se han digitalizado mediante la tarjeta de adquisición de datos MC_CARD con interfaz analógico-digital. Cada canal ha sido muestreado a una frecuencia de $25KHz$, donde la señal es filtrada por un filtro de paso de banda en el rango $300Hz \leq \omega \leq 1300Hz$, adquirido con el software MC_Rack, también proporcionado por MCS. Los datos crudos y los instantes de tiempo han sido extraídos también con el software MC_Rack. El estímulo consiste en tren de 20 pulsos bifásicos de $\pm 2V$ de amplitud y $1ms$ de periodo.

2.2. Herramienta para la limpieza y clasificación de potenciales de acción

Las neuronas se comunican mediante la liberación de gradientes electro-químicos que generan un cambio en el voltaje entre el interior y el exterior de la célula. Cuando se registra dicho cambio, los electrodos en un Array de MultiElectrodos(MEA), transducen el cambio de voltaje de corrientes iónicas en corrientes electrónicas. Al estimular los electrodos, a su vez, transducen corrientes electrónicas en corrientes iónicas a través de los medios. Esto desencadena la apertura ordenada de los canales de iones en las membranas de las células excitables, haciendo que la célula pueda despolarizar y desencadenar un potencial de acción.

El tamaño y la forma de una señal registrada dependen de varios factores: la naturaleza del medio en el que están localizadas la célula o las células (la conductividad eléctrica, la capacitancia y la homogeneidad del medio); La naturaleza del contacto entre las células y el electrodo MEA (área de contacto y estanqueidad), la naturaleza del propio electrodo MEA (su geometría, impedancia y ruido).

Se puede usar un MEA para realizar experimentos electrofisiológicos en cultivos celulares disociados. Las neuronas se conectan en forma de redes. Las dinámicas tanto de la actividad espontánea como de la actividad del cultivo tras una estimulación en uno o varios electrodos puede ser analizada a nivel macroscópico. Sin embargo, para ello es necesario extraer la información relevante de los datos registrados.

El software de adquisición de datos, normalmente emplea técnicas simples de detección de potenciales de acción basadas en umbral, lo que provoca que habitualmente se detecten artefactos eléctricos (ruido) que son considerados por el software de adquisición como potenciales de acción. La labor del investigador, antes de analizar cualquier registro de actividad de un cultivo, consiste en limpiar el registro de todos aquellos artefactos, para poder extraer información relevante sobre las dinámicas de actividad del mismo. Este paso, la mayoría de las veces se vuelve una tarea ardua que normalmente requiere varias horas e incluso días.

Aunque es cierto que existen herramientas software para la realización de esta tarea, la mayoría de ellas poseen ciertas carencias como son:

- Software privado.

- Interfaces gráficas complejas donde la interacción se realiza de forma pesada y lenta.
- No contienen atajos de teclado para agilizar la interacción y el preprocesado de los datos.
- Emplean técnicas de filtrado automática basadas en PCA o Wavelets y los resultados son bastante limitados.
- Son herramientas software de código cerrado, lo que impide su modificación.
- La visualización de los potenciales de acción no es clara y al pasar varias horas se produce vista cansada.

Es por esto, por lo que se ha tratado de generar una herramienta que facilite la labor del investigador para realizar este proceso de manera semiautomática, esto es, se realiza una extracción del ruido de forma automática y después se produce una supervisión manual para el análisis offline. El software empleado para la resolución del problema ha sido:

- Matlab 2016a para la generación de una aplicación que permite acometer el preprocesado de limpieza y sorting de forma semiautomática.

Así mismo, las características principales de este software son las siguientes:

- Carga de archivos en formato '.mcd', extensión propia del software MC_RACK de MCS.
- Interfaz sencilla dirigida a una visualización clara de los potenciales de acción registrados.
- Atajos de teclado para una interacción rápida con el software.
- Análisis semiautomático para eliminar artefactos y outliers.
- Spike-sorting semiautomático mediante técnicas de Machine Learning.
- Interfaz de código abierto.

2.2.1. Cleaner_App

Los datos obtenidos para el problema en cuestión son adquiridos a partir del software MCRack de la empresa Multichannel Systems. Dicho software adquiere cada muestra de señal según los siguientes parámetros:

- Frecuencia de muestreo: 25000 Hz.
- 75 puntos de muestra por señal capturada, lo que implica una ventana temporal de 3ms.

Tras la carga de datos estos son almacenados en MATLAB mediante la siguiente estructura de datos:

- Channel: Indica el número de electrodo en el que se ha detectado el evento.
- Time_stamp: Indica el instante de tiempo en el que se ha detectado el evento.
- Context: Almacena 75 valores muestrales en torno al instante de detección del evento, esta información nos permite representar la forma de onda de la señal registrada.
- Spike_ID: Indica la unidad asignada a dicho evento. Esto permite clasificar mediante un identificador si dicha señal corresponde a ruido o a neuronas distintas según sus propiedades morfológicas, esto es, la forma de onda de la señal.
- Old_spike_ID: Almacena el valor anterior asignado a dicho evento, de esta forma podemos deshacer la última operación.

| Channel | Time_stamp | Context | Spike_ID | Old_spike_ID |
|---------|------------|-------------|----------|--------------|
| 12 | 102,05184 | 75X1 double | 2 | 0 |
| 1 | 102,05244 | 75X1 double | 2 | 0 |
| 29 | 102,05244 | 75X1 double | 3 | 2 |
| 47 | 102,05244 | 75X1 double | 5 | 2 |
| 41 | 102,05244 | 75X1 double | 2 | 0 |
| 35 | 102,05248 | 75X1 double | 0 | 0 |
| 49 | 102,05248 | 75X1 double | 2 | 0 |
| 46 | 102,05248 | 75X1 double | 0 | 0 |
| 43 | 102,05248 | 75X1 double | 2 | 0 |
| 6 | 102,05248 | 75X1 double | 4 | 2 |

Cuadro 2.1: Estructura de datos para almacenar la información de las señales registradas.

Para la resolución del problema se ha optado por realizar un análisis del área contenida en un rango del muestreo en el que los artefactos tienen normalmente una norma mayor que los potenciales de acción. Se emplea esta estrategia basada en la norma debido a que el potencial eléctrico medido en dicho rango para los potenciales de acción varía según las condiciones del electrodo, el medio y el cultivo, lo que dificulta la tarea de establecer un umbral superior basado únicamente en la medida del potencial eléctrico. La explicación detallada de esta estrategia ha sido realizada en el capítulo 2 así que no nos extenderemos más en este apartado. En las siguientes líneas se explicará de forma general el funcionamiento de la interfaz y una aproximación a sus resultados.

2.2.2. Descripción general de la aplicación

En las siguientes figuras se puede observar la interfaz gráfica desarrollada para el análisis offline de las señales registradas mediante el software MC_RACK. De forma general se pueden observar tres áreas importantes en la interfaz situadas en el área izquierda de la misma. La primera está

formada por los botones 'Open file' y 'Save data'. Los archivos son cargados en formato '.mcd' de MCS, sin embargo son almacenados en formato '.mat' de MATLAB. La segunda área se encuentra inmediatamente debajo, en esta área se encuentran los botones 'Box selection', 'Delete', 'Undo' y 'Auto clean'. Por último se observa que se encuentra un editable sobre el que se indica el nombre del parámetro editable como 'ventana', mediante este editable es posible indicarle al algoritmo de limpieza automática la ventana muestral sobre la que se debe realizar el análisis de los valores RMS.

- El botón 'Box selection' nos permite clicar sobre la pantalla negra donde se encontrarán visualizadas las señales y generar una selección de las señales que se encuentren contenidas dentro de la 'box', esto permite seleccionar varias señales de una sola vez. Este botón se encuentra asociado a un atajo de teclado pulsando la tecla 'D'. Además, es posible deshacer una selección múltiple mediante el atajo de teclado 'S'. Por otra parte, clicando sobre una de las señales con el ratón es posible seleccionar y deseleccionar una a una las señales. Las señales seleccionadas cambiarán su color a rojo para una mejor visualización.
- El botón 'Delete' elimina las señales seleccionadas de la visualización. A su vez las señales eliminadas alteran su valor de identificación a 0, esto es, pasan a ser consideradas ruido. A su vez tiene asociado un atajo de teclado pulsando la tecla 'F'.
- El botón 'Undo' permite deshacer la última operación realizada. Pulsando la tecla 'A' se ejecuta dicha acción.
- El botón 'Auto clean' realiza una extracción automática de los artefactos por medio de la estrategia basada en análisis de los valores RMS. La tecla asociada es 'E'.

El último área a describir se encuentra en la zona izquierda inferior y consiste en un 'popup' y un editable cuyo nombre de parámetro indica 'configuración'. El popup muestra el nombre 'LOUVAIN'. Seleccionando en el popup dicha opción se aplica un método de Spike sorting que se explicará más adelante. El parámetro configuración consiste en un editable que permite enviar al algoritmo de clustering parámetros de configuración del mismo. El diseño se encuentra pensado para extender el popup con diferentes técnicas de clusterización.

La pantalla negra central es el área de visualización de señales, se encuentra vinculada a los popups visibles en su parte superior. De izquierda a derecha tenemos los popups 'STG_Time', 'Channel', 'UnitID' y 'ToUnitID'.

- El popup 'STG_Time' indica que se van a visualizar aquellas señales que se encuentren tras el estímulo indicado. Su valor por defecto es 0 e indica que para este caso se visualizan las señales tras los 200 intervalos juntas.
- El popup 'Channel' indica que se van a visualizar las señales correspondientes al electrodo indicado para el intervalo especificado mediante el popup 'STG_Time', estos se encuentran numerados del 1 al 60.

- El popup 'UnitID' indica la unidad que se va a mostrar para el electrodo seleccionado mediante el popup 'Channel' tras el estímulo indicado en el popup 'STG_Time'.
 - El valor 0 indica que se mostrarán aquellas señales consideradas ruido.
 - El valor 1 indica que se mostrarán todas las unidades correspondientes a dicho electrodo e intervalo tras el estímulo.
 - Los valores 2 en adelante solo muestran los potenciales de acción asociados a dicha unidad.
- El popup 'ToUnitID' indica la unidad a la que se van a enviar los potenciales de acción seleccionados.

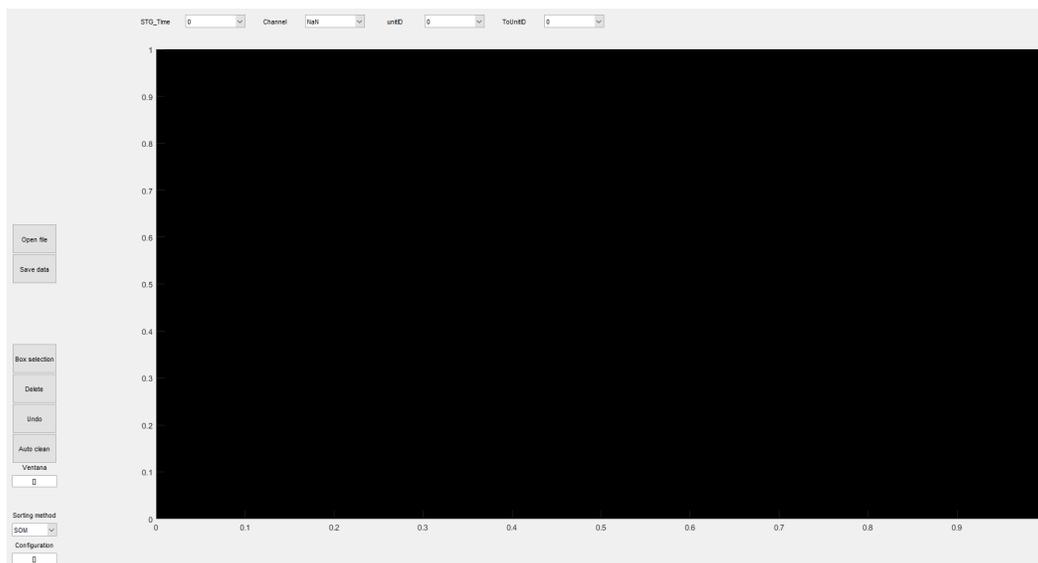


Figura 2.15: Pantalla principal de la interfaz.

Los archivos son importados desde el formato propio '.mcd' de dicho software. La carga se realiza extrayendo las señales de la estructura de datos contenida en el formato por medio de un paquete de funciones proporcionado por el propio fabricante MCS, dicho paquete se encuentra disponible online para descarga en la página del fabricante. Dicho paquete se denomina 'mcintfac' y sus funciones principales son 'datastrm(path)' y 'getfield(file,param)', mediante las cuales se tiene acceso a las estructuras de datos contenidas y a los campos de dicha estructura respectivamente.

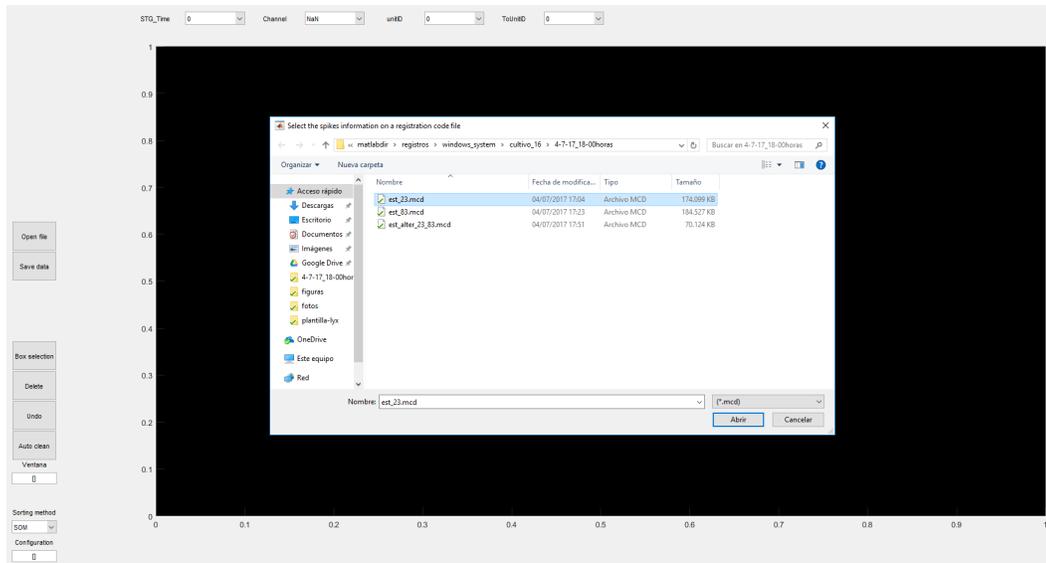


Figura 2.16: Carga de archivos en formato '.mcd'.

Una vez cargados los datos la aplicación muestra directamente las señales registradas. En las siguientes figuras podemos observar primero la visualización de todas las señales registradas para el electrodo 1 tras los 200 intervalos, sin embargo podemos generar una visualización con mucho más detalle dado que podemos seleccionar para visualización sólo aquellas señales detectadas para el electrodo 1 tras el estímulo seleccionado, así como también por unidad neuronal asignada. Esto nos permite tener un control muy fino sobre la actividad detectada para realizar un análisis preciso.

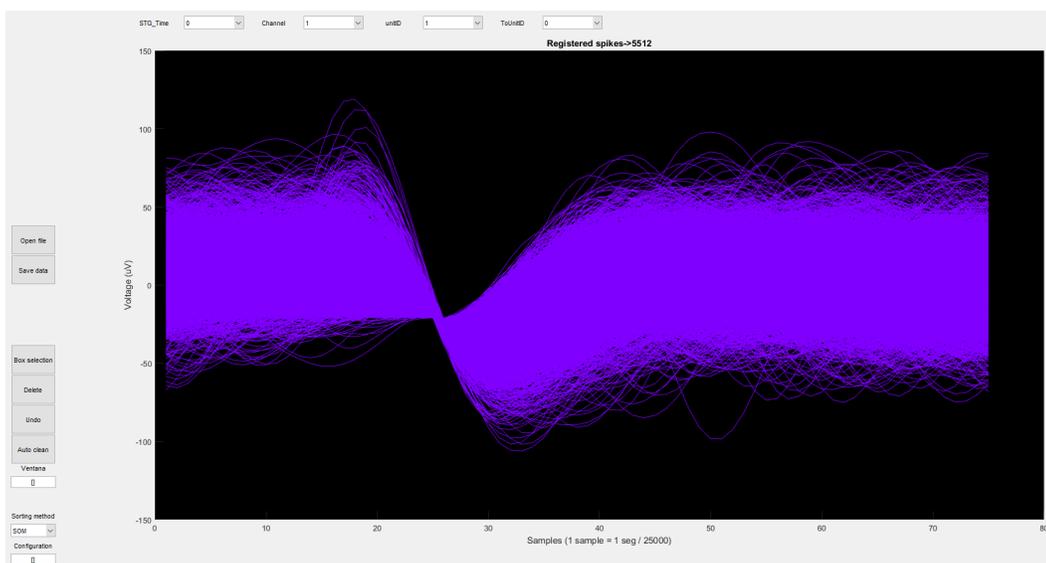


Figura 2.17: Visualización de potenciales de acción asociados al electrodo 1 para los intervalos tras los 200 estímulos.

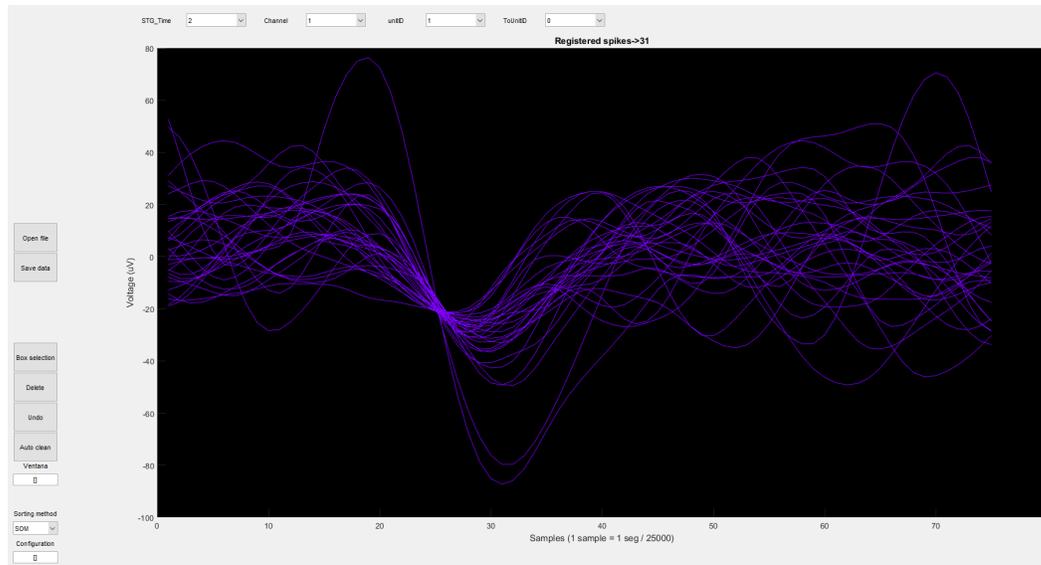


Figura 2.18: Visualización de potenciales de acción asociados al canal 1 para el intervalo tras el estímulo 1.

2.3. Registro

2.3.1. Selección de entradas salidas

Antes de registrar los datos de la respuesta global en los electrodos ante el estímulo, se debe seleccionar un pequeño conjunto de electrodos como *entradas* con el fin de descubrir, sobre cuáles de ellos, el estímulo tiene el efecto buscado, esto es, que cuando se estimula sobre dicho electrodo se produce un incremento en la actividad global del cultivo en términos de aumento de la cantidad y la frecuencia de los potenciales de acción. A continuación, se realiza un conjunto de estimulaciones repetidas en cada uno de los electrodos seleccionados para registrar las respuestas en el resto.

Los electrodos a estimular se seleccionan comparando la actividad global tras el estímulo, en relación con la actividad global sin estímulo. La actividad espontánea de todos los electrodos en el cultivo se mide durante diez intervalos de 1s. Después se aplican 10 estímulos por intervalos de 4 segundos y se mide la actividad global de los potenciales de acción para un segundo tras cada estímulo. La actividad después del estímulo en cada electrodo se compara con la actividad espontánea o basal, a través del test de Wilcoxon, este se realiza en Matlab mediante la función `ranksum()` y equivale al "Mann-Whitney U test". La hipótesis nula es que los datos en el electrodo X (después de la estimulación en el electrodo Y) y en el mismo electrodo X (de la actividad basal), son muestras de distribuciones continuas con medianas iguales. El rechazo de la hipótesis nula significa que la estimulación en el electrodo Y produjo cambios en el comportamiento de las células neuronales cercanas al electrodo X registrado.

Tras estimular aleatoriamente una serie de electrodos se comprobó que para los electrodos 20

y 42 se producía el efecto deseado. Dichos electrodos con mayor influencia en la actividad global fueron seleccionados como *entradas* para ser estimulados en la siguiente fase de caracterización de la actividad del cultivo. En la siguiente figura se muestra a modo de ejemplo la comparativa gráfica de la actividad global medida en número de potenciales de acción por intervalo para el electrodo 4 habiendo estimulado el electrodo 42.

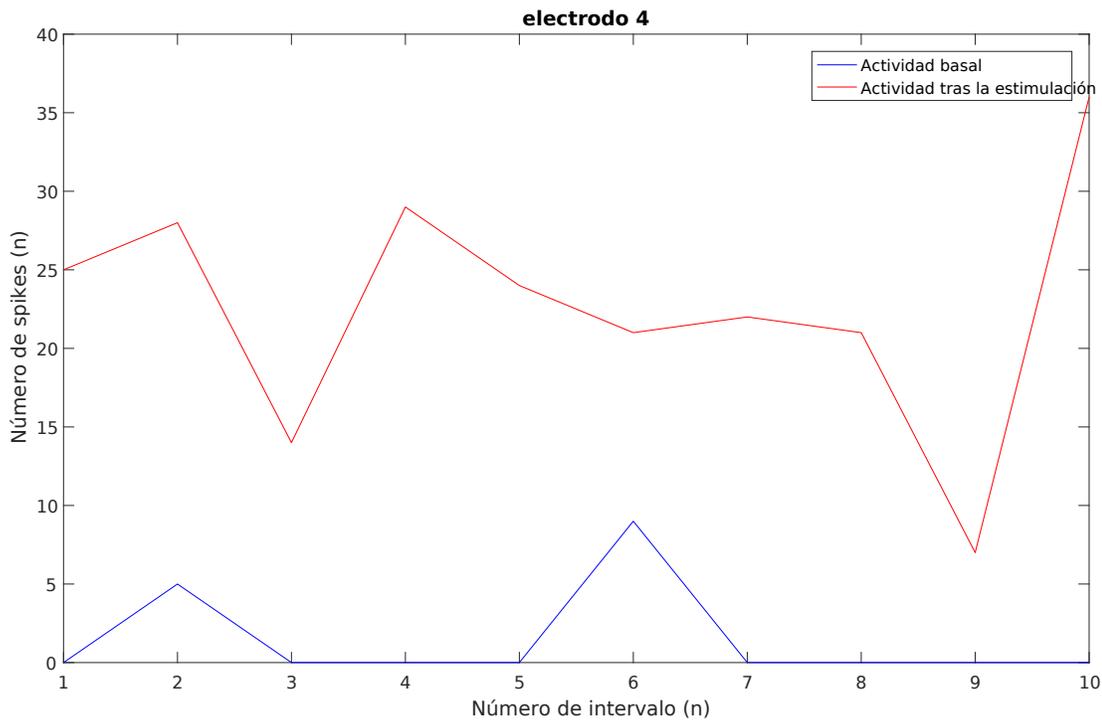


Figura 2.19: Comparativa de la actividad del cultivo del número de potenciales de acción por intervalo de la actividad basal frente a la actividad tras el estímulo.

Para la selección de salidas se ha decidido seleccionar aquellos electrodos que tras el proceso de estimulación en la siguiente fase presentan un incremento de actividad significativo en términos estadísticos, esto es, se aplica de nuevo el test de Wilcoxon.

2.3.2. Registro de estimulación

Para cada uno de los electrodos seleccionados a estimular, el proceso de registro se realiza en la siguiente secuencia:

- Se registra la actividad basal del cultivo durante 200s.
- Se repite 200 veces la estimulación a intervalos de 4s, siendo el estímulo un tren de 20 pulsos bifásicos de 1ms de periodo y $\pm 2V$ de amplitud.
- Finalmente, se continúa el registro de la actividad basal durante otros 200s.

La actividad de los potenciales de acción registrada incluye información sobre el electrodo y el instante de tiempo en que se detectó el potencial de acción, pero también incluye 75 valores de datos brutos, medidos antes y después del instante de detección del potencial de acción, que representan la forma del mismo.

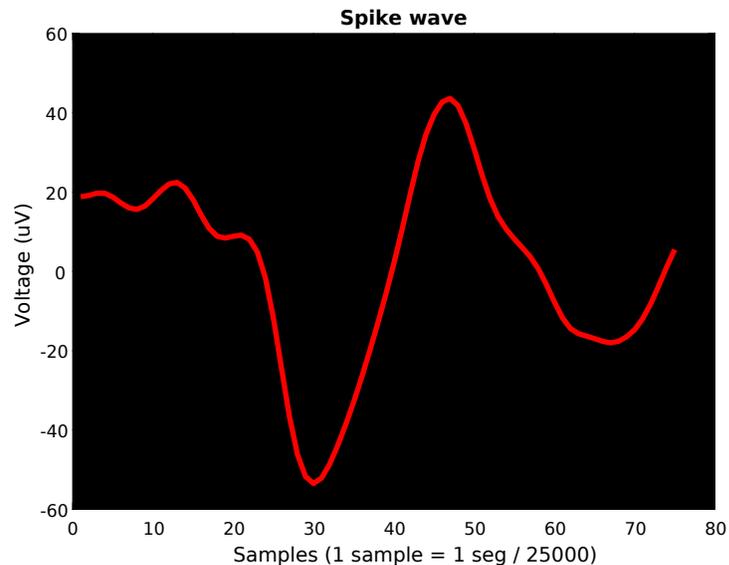


Figura 2.20: Forma de onda de un Spike registrada mediante el software MC_RACK.

2.4. Preprocesado de los datos

Los datos registrados son preprocesados para filtrar el ruido. Debido a la baja relación señal ruido es necesario configurar el software MC_RACK de forma que detecte mediante umbral aquellas señales eléctricas que superen el valor medio de la señal menos 2 desviaciones estándar. Sin embargo, dentro del proceso de registro se puede observar que se producen dos tipos de señales de ruido con características bien diferenciadas. Por un lado se encuentra el ruido electrostático debido a las oscilaciones eléctricas del medio de cultivo y los electrodos. Por otro lado, cada vez que sometemos al cultivo a una estimulación eléctrica, se generan oscilaciones eléctricas a lo largo del medio denominadas 'artefactos'. Estos son por lo general señales eléctricas que sobrepasan el umbral establecido y son detectados como potenciales de acción por el software. El mayor inconveniente es que se producen durante la estimulación del electrodo y durante un rango de tiempo entorno a $0 - 20ms$ tras el mismo, lo que produce el indeseable efecto de ocultar la actividad del cultivo durante dicho intervalo. Tal y como se mostrará más adelante, durante este tiempo ocurre un proceso de activación y propagación de la actividad en la red neuronal a través de las neuronas de activación cercanas al electrodo estimulado. El estimulador STG-1002 dispone de un mecanismo denominado 'blanking' que obliga a los electrodos a permanecer bajo un potencial eléctrico conectado a tierra durante el estímulo, sin embargo, esto no evita que los artefactos sigan propagándose durante un breve intervalo

de tiempo posterior. Dado que la información de la actividad durante dicho intervalo es altamente informativa sobre los procesos de activación que se producen en el cultivo, es necesario encontrar una metodología para eliminar dichos artefactos en tiempo real, sin embargo la información de la actividad durante el estímulo no es posible capturarla, esto tiene un efecto sobre la caracterización de la respuesta neuronal como se verá mas adelante.

El principal inconveniente para eliminar este ruido es que no se puede eliminar por umbral dado que en la mayoría de los casos su amplitud es similar a la de los potenciales de acción. A continuación vamos a mostrar la actividad registrada sobre el electrodo 21 tras un intervalo de $150ms$ tras un estímulo.

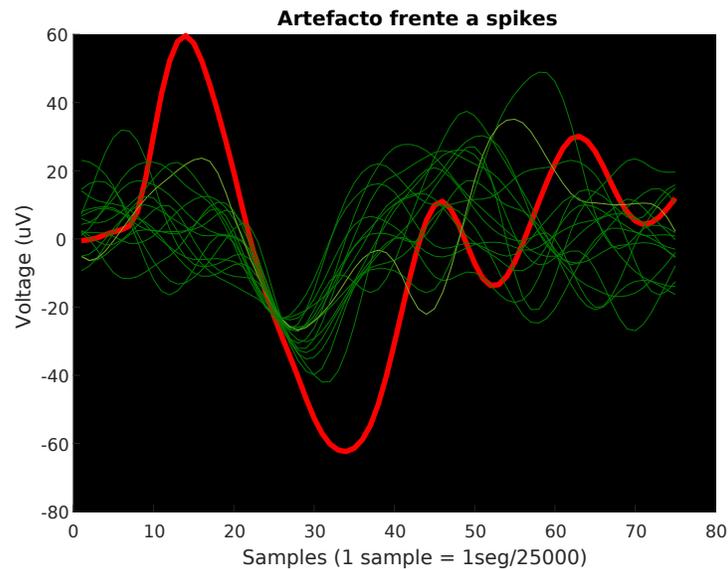


Figura 2.21: Se presenta la relación de forma y amplitudes entre un artefacto(rojo) y los potenciales de acción(verde) registrados para el 21 tras $150ms$ de la estimulación.

Para eliminar este tipo de artefactos se ha desarrollado una estrategia basada en el cálculo del Root Mean Square(RMS) en torno al intervalo de muestras $[10, 20]$.

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{n} (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2)} \quad (2.1)$$

En el primer paso, se calcula la media cuadrática (RMS) de cada dato en raw. La distribución de los valores RMS para todos los potenciales de acción es diferente de aquellos eventos que son más similares al ruido o a los artefactos generados por la estimulación. Los eventos con un valor de RMS que son 1,5 desviaciones estándar por encima o 2 por debajo del valor medio son descartados y no se consideran en el procesamiento, la razón de esta decisión se encuentra explicada más adelante mediante el estudio de la asimetría de la distribución de probabilidad de los valores RMS. El hecho de imponer un umbral superior respecto a las desviaciones estándar es para eliminar los artefactos, sin embargo el umbral inferior nos permite extraer señales ruidosas propias del medio, ruido aleatorio,

que poseen un área muy baja bajo la curva de la forma de onda.

El segundo paso en el preprocesamiento es eliminar los valores atípicos, esto es, se emplea una técnica de clustering que permita detectar outliers. Para llevar a cabo este análisis, los puntos centrales de la señal bruta de cada potencial de acción, se ajusta a un modelo de dimensionalidad reducida. La forma de una señal del potencial de acción suele tener un valle profundo seguido de una montaña, por lo que tiene dos máximos y dos mínimos y se ajusta bien a un polinomio de quinto grado. Para cada potencial de acción, los 50 puntos de su señal cruda comenzando después del punto 15 se utilizan para obtener seis coeficientes que lo representan. El vector de coeficientes de cada potencial de acción se emplea para obtener un espacio de puntos que describan la agrupación espacial de los clusters de potenciales de acción y el ruido. Se emplea el algoritmo Ester et al. [8] basado en análisis de densidades, que puede encontrar *outliers* respecto al grupo principal de modelos de potenciales de acción. Los potenciales de acción detectados como valores atípicos por el algoritmo DBSCAN también se descartan.

A continuación mostramos el histograma de los valores RMS obtenidos para un registro de lectura frente a uno de estimulación. En la siguiente figura podemos observar la distribución mediante un histograma del conjunto de valores de RMS obtenidos. Los datos que se muestran en la subfigura A corresponden a los potenciales de acción detectados durante 100 segundos sobre el electrodo 5. En la subfigura B podemos observar la distribución de los valores RMS para el mismo electrodo para un intervalo de 150 mili segundos tras los 200 estímulos. Como se puede observar en las distribuciones, ambas son asimétricas teniendo los datos esparcidos a la derecha, de hecho si medimos dicha dispersión mediante la expresión:

$$s = \frac{E(x - \mu)^3}{\sigma^3} \quad (2.2)$$

Obtenemos para el conjunto de valores RMS del registro de lectura $s = 0,94$ y para el registro de estimulación $s = 17,22$. Esto nos indica que existe un tipo de señal presumiblemente ruidosa cuya distribución de valores RMS se extiende hacia la derecha, tal y como se puede observar en la subfigura B donde hay un segundo pico en la parte derecha. Por último, tras aplicar el filtrado automático al registro de estimulación se representa en la subfigura C la distribución de los datos resultantes. En la subfigura C se observa como hemos despreciado el pico de la derecha presente en la subfigura B que presumiblemente corresponde al ruido generado por el estímulo.

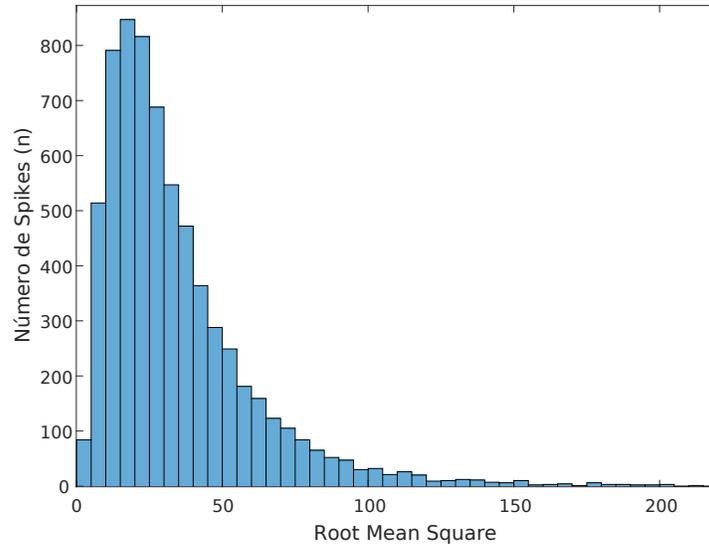


Figura 2.22: Histograma de los valores RMS obtenidos para un registro de lectura.

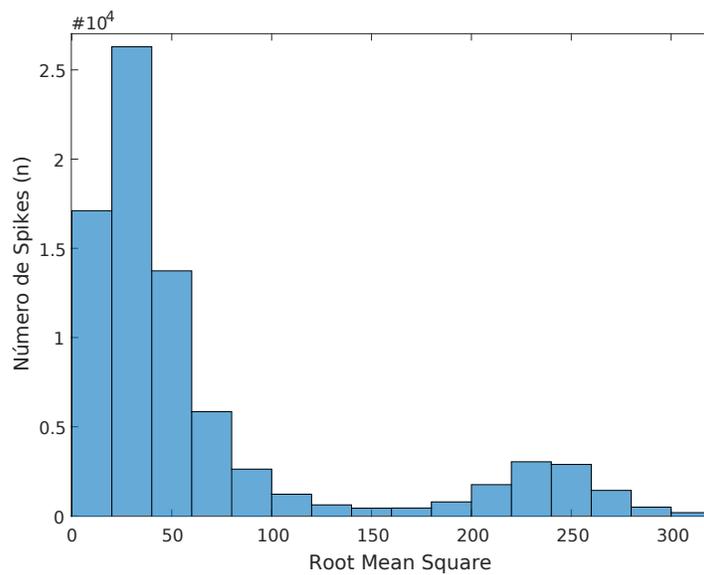


Figura 2.23: Histograma de los valores RMS obtenidos para el mismo registro de estimulación.

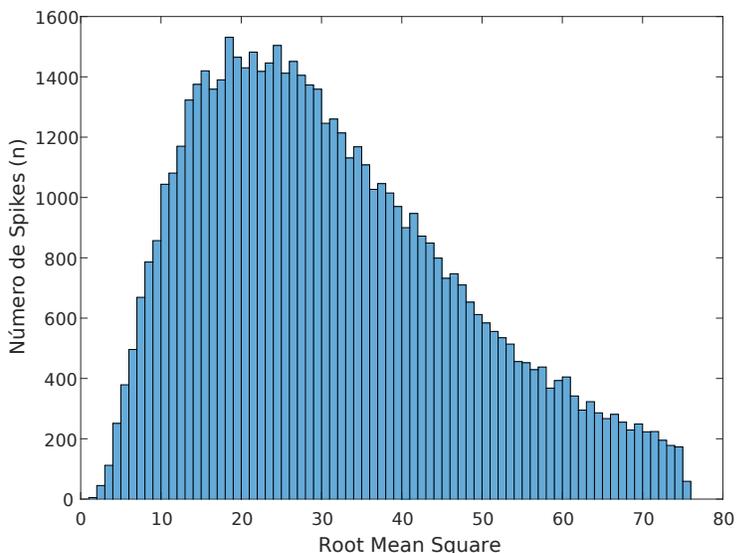


Figura 2.24: Histograma de los valores RMS resultantes del proceso de filtrado.

Para poder comprobar si realmente el filtrado está eliminando el ruido mostramos a continuación el conjunto de potenciales de acción del registro de estimulación, esto es, sus formas de onda superpuestas. La subfigura A nos muestra todos los potenciales de acción del conjunto anterior. En la subfigura B podemos observar lo que a través del filtrado se ha considerado como ruido y por último en la subfigura C tenemos lo que se ha filtrado como conjunto de potenciales de acción.

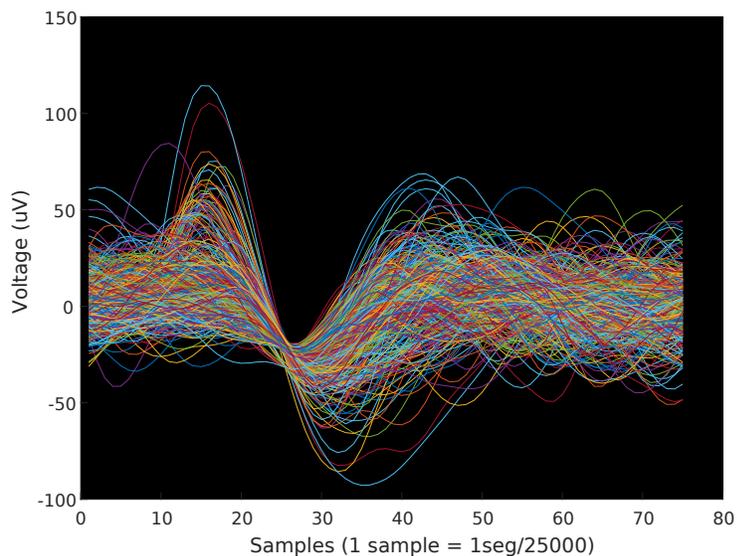


Figura 2.25: Histograma de los valores RMS obtenidos para un registro de lectura.

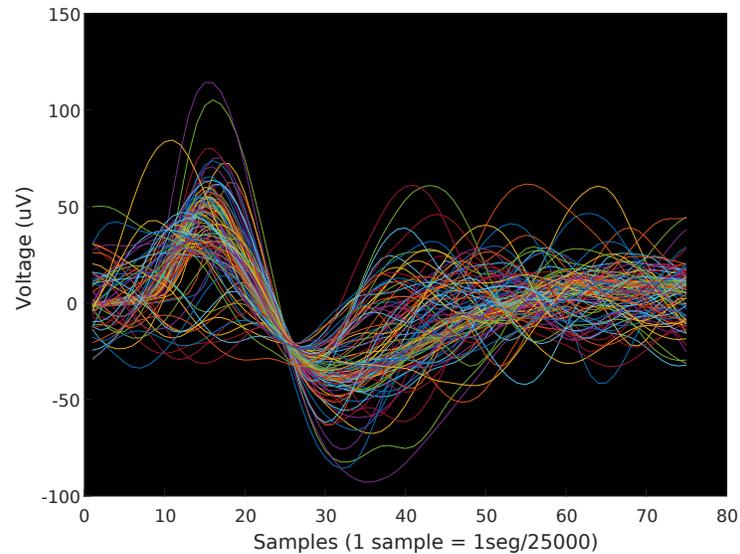


Figura 2.26: Histograma de los valores RMS obtenidos para el mismo registro de estimulación.

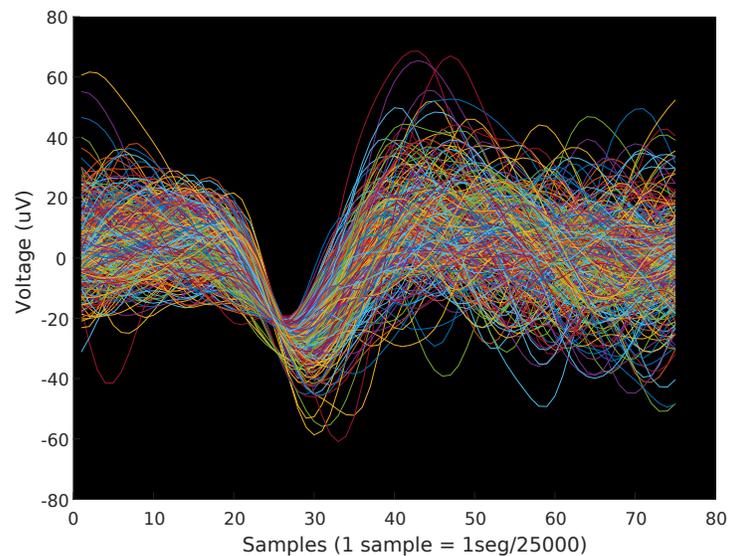


Figura 2.27: Histograma de los valores RMS resultantes del proceso de filtrado.

2.5. Estudio de tipos de análisis aplicables

El estudio de las posibles metodologías para caracterizar la actividad neural no ha sido inmediato, se ha dado un proceso de ensayo y error mediante el cual hemos ido proponiendo distintos análisis de la actividad neuronal del cultivo, estudiando las ventajas e inconvenientes de cada una hasta dar con la estrategia más adecuada a las planteadas por los distintos grupos de investigadores hasta el momento. Nuestra propuesta final y el resultado de esta investigación se centra en el análisis de las

frecuencias inter-spike IISI, sin embargo, queremos argumentar el proceso de investigación mediante los resultados y la discusión de las distintas alternativas propuestas para explicar el motivo de nuestra propuesta final, análisis IISI.

En las siguientes subsecciones se explican una a una y por orden cronológico las estrategias investigadas y se explican una serie de problemas que han tenido que ser enfrentados hasta dar con la solución propuesta. A continuación se listan las estrategias estudiadas:

- **Cables neuronales:** Se trata de encontrar pares de electrodos selectivos.
- **Centros de masas:** Se pretende analizar la actividad global del cultivo en función del cálculo del centro de masas de la actividad tras cada estimulación.
- **Tiempo-frecuencia:** Se estudian las características de la actividad global en términos de amplitudes y frecuencias instantáneas por medio de la herramienta NA_MEMD y la transformada de Hilbert.
- **Análisis de frecuencias inter-spike IISI:** Se analiza la actividad global tras cada estimulación, electrodo a electrodo, con el fin de caracterizar la pendiente de la curva de regresión caracterizada por las frecuencias inter-spike.

2.5.1. Cables neuronales

En esta estrategia Calvo et al. [6], se ha generado un estímulo en un subconjunto de electrodos de interés con el fin de medir en cuales de ellos se provocaba un incremento de la tasa de disparo sobre otras unidades neuronales. Este estímulo y su posterior análisis ha sido realizado en cada electrodo de uno en uno. El objetivo es encontrar un subconjunto de electrodos que posea las siguientes propiedades:

- La estimulación en los electrodos $\{E_1, E_2, \dots, E_n\}$, llamada E_t , provoca una respuesta neuronal en las neuronas interconectadas a los electrodos receptores, $\{E_k, E_{k+1}, \dots, E_{k+m}\}$, denominados E_r .
- El subconjunto de unidades neuronales registradas E_{r1} son activados por la estimulación en un electrodo particular E_{t1} . Dicho subconjunto es diferente del subconjunto de unidades neuronales E_{r2} activados tras la estimulación en un electrodo distinto E_{t2} . Dichos subconjuntos pueden solaparse en parte pero no totalmente.
- Las estimulaciones sobre el subconjunto E_r que evocan una respuesta sobre el electrodo E_t no han sido considerados en el experimento, dado que buscamos conexiones neuronales unidireccionales.

Si estas condiciones son cumplidas podemos asumir que tenemos circuitos neuronales independientes en el cultivo que podemos emplear como “cables neuronales”. En este primer experimento se realizaron una serie de 40 estimuciones para cada registro con un tren de 20 pulsos bifásicos de $500\mu V$ de amplitud y $1ms$ de periodo en intervalos de $4seg$.

Tras realizar varios registros se detectó para el día 12 de cultivo que la estimulación en los electrodos 10 y 36 cumplían los requisitos mencionados. Esto es, aplicados una serie de estímulos sobre el electrodo 10 y el 36, se obtenía un incremento en el número de potenciales de acción sobre los electrodo 25 y 39, siendo además un canal unidireccional dado que estimulando sobre el electrodo 25 la actividad en el electrodo 10 no se veía incrementada y de igual forma para los electrodos 36 y 39. En concreto en la figura 2.16 se pueden observar los PSTH tanto para el electrodo 25 como para el electrodo 10. En la subfigura A, se observa como en el intervalo temporal que comprende los $200ms$ tras el estímulo se da un incremento en la actividad del electrodo 25 tras aplicar el estímulo sobre el electrodo 10, sin embargo, al aplicar el estímulo en la dirección opuesta, estimulando sobre el electrodo 25, la actividad en el electrodo 10 no muestra ningún incremento significativo tras los estímulos. Lo mismo se puede observar en la figura 2.17 para los electrodos 36 y 39. Por último cabe destacar aunque no se muestre en gráficas que el electrodo 39 no sufría un incremento de actividad tras la estimulación en el electrodo 10 y de la misma forma el electrodo 25 tampoco lo hacía tras la estimulación en el 36.

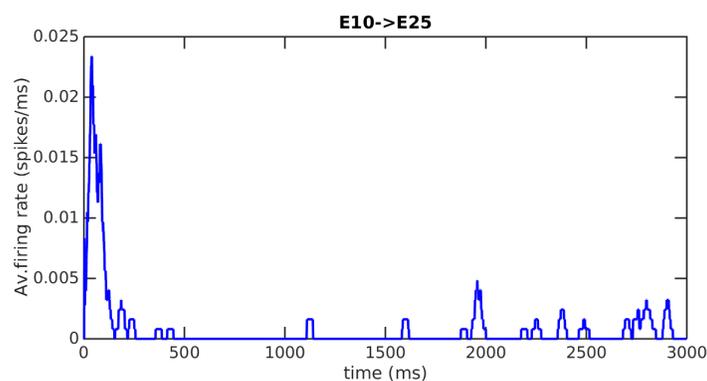


Figura 2.28: PSTH de la activadas promedio en el electrodo 25 tras las estimuciones en el electrodo 10.

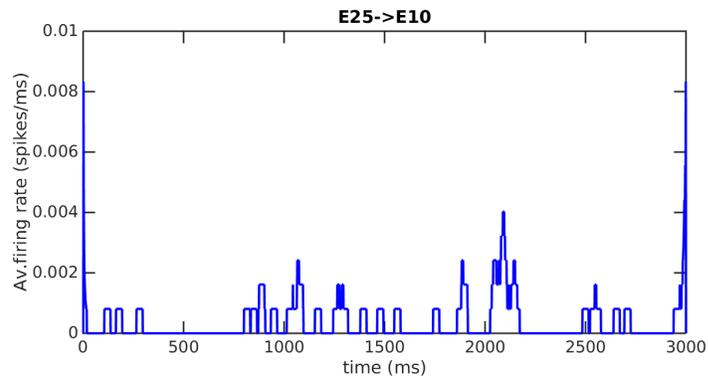


Figura 2.29: PSTH de la activadas promedio en el electrodo 10 tras las estimulaciones en el electrodo 25.

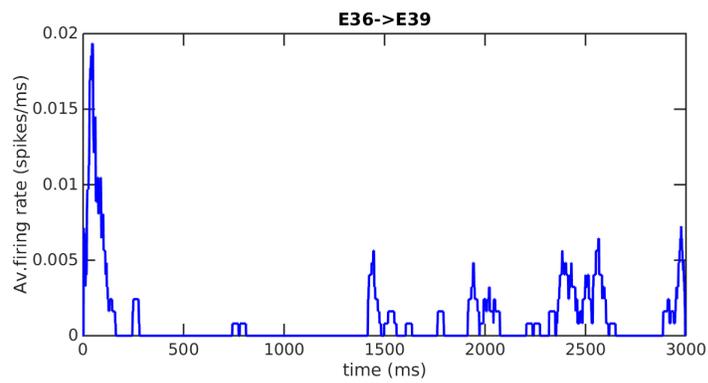


Figura 2.30: PSTH de la activadas promedio en el electrodo 39 tras las estimulaciones en el electrodo 36.

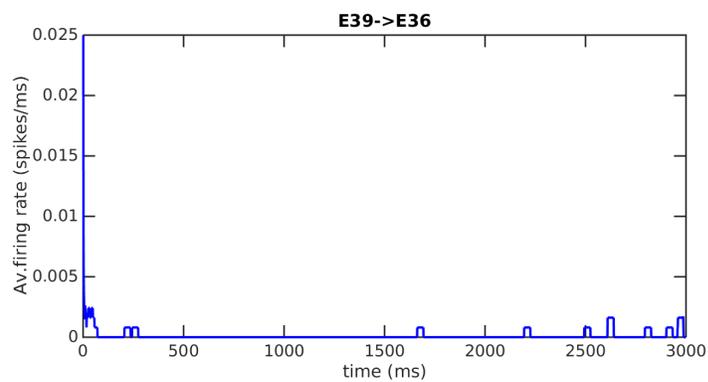


Figura 2.31: PSTH de la activadas promedio en el electrodo 36 tras las estimulaciones en el electrodo 39.

Por último se realizó un análisis para observar la comparativa conjunta del incremento de actividad antes y después de los estímulos para el conjunto de electrodos mencionados.

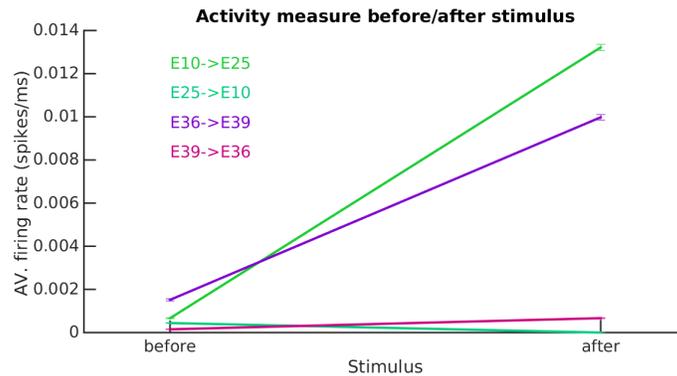


Figura 2.32: Comparativa del promedio de actividad antes y después de las estimulaciones.

Durante la realización de los experimentos se observó la falta de estabilidad de dichos 'cables neuronales', si se realizaba un registro a la mañana y se obtenían estos resultados, por la tarde el análisis podía cambiar totalmente, resultando en que no se pudieran encontrar pares de electrodos que cumplieran dichas condiciones o que la respuesta de los mismos dejaba de ser estable. Esta es en definitiva la estrategia principal empleada en los artículos mencionados en el estado del arte cuyos resultados prácticos a la hora de que el robot pueda desenvolverse por un entorno real provoque un comportamiento inestable, con bajo nivel de acierto en la acción a ejecutar por el robot. Es por esto por lo que se decide tratar de encontrar una estrategia más robusta que no dependa de conectividades locales sino de la actividad a nivel global bajo el supuesto de que los cambios en la conectividad sináptica locales no afecten de una forma tan brusca a la actividad neural de la estructura global.

2.5.2. Análisis centro de masas

La primera estrategia probada en términos de análisis de la actividad global del cultivo ha sido calcular el centro de masas de la actividad del cultivo tras cada estímulo. La forma en que se ha codificado la información obtenida de la actividad tras el estímulo es emplear la posición del electrodo en la rejilla del MEA como la posición en un eje de coordenadas discreto, donde la rejilla representa las posiciones en forma de matriz y cada posición es determinada por la fila y la columna a la que pertenecen en dicha matriz. Por otro lado, se establece la cantidad de potenciales de acción tras el estímulo como la masa de cada electrodo. La expresión para calcular el centro de masas de actividad del cultivo tras un estímulo por tanto es:

$$X_c = \frac{\sum_{i=1}^n X_i * C_i}{\sum C_i} \quad (2.3)$$

Siendo X_i la posición del electrodo y C_i el número de potenciales de acción.

En este segundo experimento se realizaron una serie de 200 estimulaciones para cada registro con un tren de 20 pulsos bifásicos de $2V$ de amplitud y $1ms$ de periodo en intervalos de $4seg.$ Se ha tomado en cuenta para el cálculo del centro de masas únicamente $150ms$ tras el estímulo. En la siguiente figura se observa en la parte superior izquierda los centros de masas del registro de lectura y en rojo los centros de masas del registro de estimulación sobre el electrodo 20. En la parte superior derecha se observa la misma información tras los estímulos en el electrodo 42. La zona inferior izquierda visualiza la distribución de los centros de masa de los registros de lectura, en azul antes de la estimulación en el electrodo 20 y en rojo previo a la estimulación en el electrodo 42. La última subfigura, en la esquina inferior derecho muestra las distribuciones de los CM tras las estimulaciones, en azul para el electrodo 42 y en rojo para el 20.

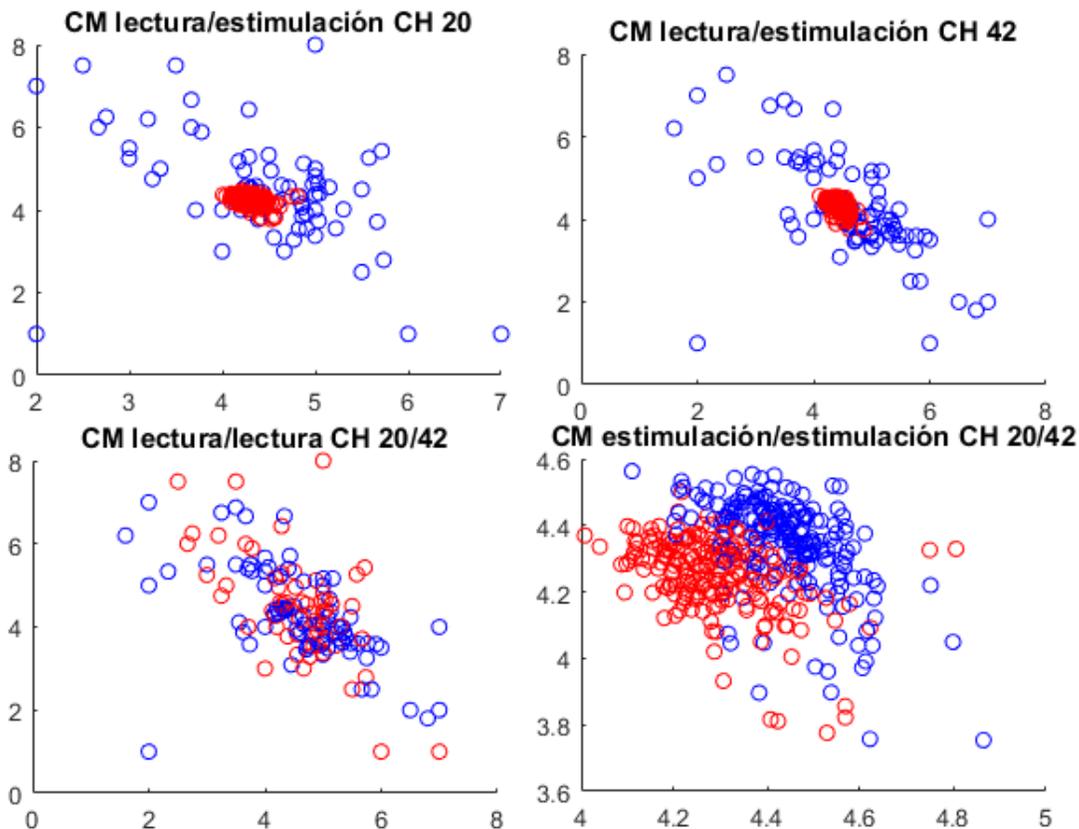


Figura 2.33: Distribución de centros de masas sobre la rejilla del MEA. El eje X representa la columna y el eje Y la fila, del MEA.

A continuación se ha empleado una red neuronal artificial con 5 neuronas en la capa oculta y función de entrenamiento Levenberg-Marquardt backpropagation. En la siguiente figura se observa la matriz de confusión.



Figura 2.34: Matriz de confusión para la clasificación de los CM.

El motivo por el que consideramos que esta estrategia, a pesar de sus aparentes buenos resultados, no es apropiada para nuestros objetivos es que es fuertemente dependiente de la topología de la red neuronal. En este caso, dado que la red se ha extendido y conectado correctamente a lo largo del MEA, la red presenta actividad a lo largo de la mayoría de electrodos, de hecho se tienen 28 electrodos de 60 donde la actividad tras el estímulo es significativo respecto de la actividad basal y dichos electrodos se encuentran repartidos más o menos homogéneamente a lo largo de la rejilla del MEA. El problema surge si para un cultivo dado dicha actividad no se distribuye homogéneamente y solo presentan actividad ciertos electrodos situados de forma cercana, lo que haría que se volviera muy complicado detectar diferencias en las distribuciones de los CM. De la misma manera puede ocurrir si uno de los electrodos tiene una actividad muy significativa respecto de los demás debido a que se tiene una población neuronal cercana al electrodo, dicha actividad dominaría el cálculo del CM imposibilitando el obtener una información adecuada de los procesos de activación del circuito. Por otro lado, esta aproximación sugiere que en términos de actividad global, se dan diferencias en cuanto a la propagación de la actividad a lo largo del cultivo en términos de la cantidad de potenciales de acción generados.

2.5.3. Análisis tiempo-frecuencia NA-MEMD

El análisis tiempo-frecuencia es realizado mediante el algoritmo NA-MEMD Rehman and Mandic [20], Mandic et al. [14], desarrollado para estudiar las propiedades intrínsecas de señales no estacionarias y no lineales formadas por múltiples canales. La clave se encuentra en el algoritmo EMD que tiene la ventaja de descomponer una señal no lineal y no estacionaria en una serie de funciones (modos), llamados IMFs, que cumplen la propiedad matemática de ser analíticas. Finalmente mediante la transformada de Hilbert Sharpley and Vatchev [23] podemos representar dichos modos en términos de variaciones de la amplitud y de las fases.

EMD genera una descomposición de la señal para distintos rangos de frecuencia en orden decreciente, así, cada IMF es la representación analítica de la señal original para una frecuencia dada. El problema es que está diseñado para obtener los IMF para una sola señal, de forma que cada señal puede ser descompuesta en un número de IMFs distintos, perteneciendo además las frecuencias en cada IMF a distintos rangos, lo que dificulta su posterior comparación. Para ello se diseñó el algoritmo Multivariate EMD que genera a partir de un conjunto de señales, el mismo número de IMFs para cada señal, de forma que los IMFs representen también los mismos rangos de frecuencia.

La forma en que esto se realiza en MEMD es situando una hiper-esfera unitaria de n direcciones y generando una proyección de los objetos sobre un espacio n -multidimensional de valores reales. Al proyectar los objetos (las señales) sobre dicho espacio, es posible calcular los extremos locales y realizar interpolaciones sobre ellos para obtener las curvas envolventes de tales extremos. Si las curvas envolventes se aproximan bajo un umbral de error máximo (criterio de parada), entonces almacenamos dicha envolvente como un modo IMF, sino, se vuelve a generar otra esfera unitaria desde la que proyectar y se itera sobre el proceso hasta cumplir el criterio de parada.

El algoritmo MEMD se basa por tanto en transformar la señal original a un sistema de coordenadas angulares uniformes y asume que la proyección de la señal sobre un espacio n -dimensional genera conjuntos de puntos de baja discrepancia (número de puntos proporcional a la longitud del intervalo) derivados de métodos quasi-montecarlo. De esta forma va situando en el origen distintas esferas unitarias hasta que la proyección de las señales cumpla dichas propiedades y el criterio de parada.

El motivo de describir la señal original mediante IMFs es porque dicha transformación es realizada en una representación de la señal en coordenadas polares $y(t) = r(t)\cos\theta(t)$, que tienen la propiedad de poder realizarse sobre ellas la transformada de Hilbert de una forma sencilla. La transformada de Hilbert es una función de convolución aplicada al modo IMF en cuestión con la función $g(t) = (1/\pi)*t$ y permite transformar la representación del IMF en frecuencias instantáneas, a representación en variación de amplitudes o variación de fases.

Sin embargo nosotros vamos a emplear el desarrollo de la herramienta denominada 'Noise Assisted Multivariate EMD'. Queda por tanto explicar porque se asiste el análisis con ruido gaussiano blanco. Esto se encuentra motivado por la necesidad de generar un bandeo de frecuencias homogéneo para todas las señales, tratando de evitar que en algunos casos se pueda dar que distintas bandas de

frecuencias en los IMF se encuentren solapadas mezclando, en cierta forma, la información.

Esta herramienta ha sido ampliamente utilizada para el análisis de las variaciones temporales de las señales en distintos campos de la biología Alegre-Cortés et al. [1], Li [12], Liang et al. [13] y han demostrado ser herramientas útiles para el estudio de distintos procesos biológicos dinámicos y complejos.

En nuestro caso, el proceso mediante el cual realizamos el análisis en tiempo frecuencia es como sigue:

1. Primero obtenemos los potenciales de acción de todos los canales tras un intervalo de 1s tras la estimulación y promediamos la actividad de los 60 canales, este proceso se realiza de forma independiente para cada intervalo de un segundo tras cada estimulación. Podemos observar en la figura siguiente el resultado del promediado de dicha actividad para una estimulación en el electrodo 20 y otra en el electrodo 42. De esta forma obtenemos una serie de señales no lineales y no estacionarias que son analizadas de forma conjunta mediante el algoritmo NA-MEMD, para que se generen el mismo número de IMFs y en el mismo rango de frecuencias, lo que nos permitirá tener conjuntos de datos comparables en la etapa de clasificación.

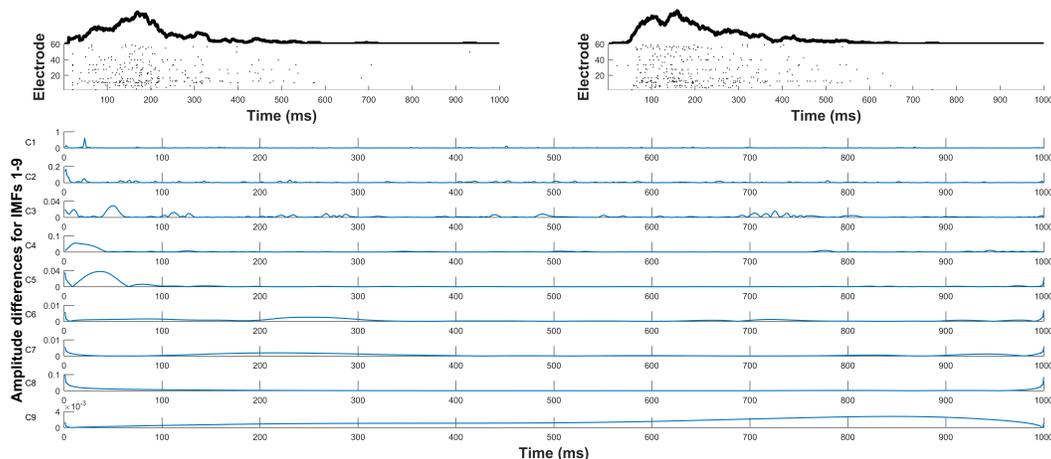


Figura 2.35: Visualización del PSTH de la actividad global tras el estímulo 1 en los electrodos 20 y 42, así como la visualización de la descomposición en modos IMFs mediante la transformada de Hilbert para obtener las diferencias de amplitud.

2. Una vez obtenidos los modos para cada señal, esta información será tratada en la etapa de clasificación mediante la transformada de Hilbert para generar un conjunto de entrenamiento y validación. El resultado de la clasificación se muestra en la siguiente figura. Se ha empleado una red neuronal con 15 neuronas en la capa oculta y función de entrenamiento Levenberg-Marquardt backpropagation. La información relativa a los modos IMFs a la cual se le ha aplicado la transformada de Hilbert ha sido presentada a la red en ventanas temporales de 100ms de forma que podemos observar en la figura como tras los $200ms$ iniciales es posible discriminar en torno al 70% de clasificación correcta los estímulos en cada electrodo. También

se observa como a medida que se le presentan a la red ventanas temporales posteriores hasta 1seg dicha caracterización deja de ser discriminativa, esto es, el cultivo vuelve a su estado basal progresivamente. Para contrastar la capacidad de clasificación, se realizó el proceso de entrenamiento 10 veces con los datos correctamente etiquetados y otras 10 veces con las etiquetas alteradas aleatoriamente para comprobar que el aprendizaje no es resultado de la acción del ruido o distribuciones aleatorias del conjunto de datos. Por tanto en la figura se observa en negro el porcentaje promedio de clasificación correcta para los datos correctamente etiquetados junto con la desviación estándar de dicho promedio, mientras que en rojo se muestra el promedio de clasificación correcta tras haber modificado aleatoriamente las etiquetas de los ejemplos de entrenamiento.

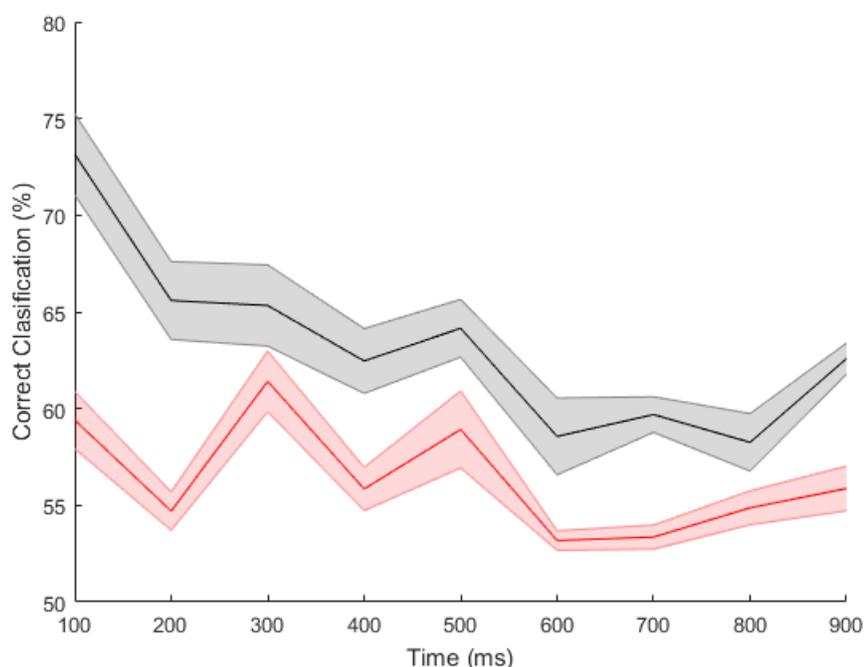


Figura 2.36: Resultado de la clasificación mediante una red neuronal artificial con 10 neuronas en la capa oculta y función de aprendizaje Levenberg-Marquardt backpropagation.

Una vez que hemos logrado entrenar una red neuronal artificial para caracterizar las oscilaciones debidas a la estimulación en cada electrodo, la intención es realizar el análisis en tiempo-frecuencias, del promedio de los potenciales de acción producidos en todos los canales tras una sola estimulación en tiempo real. Para ello si empleamos la función de análisis NA-MEMD obtendremos un tiempo de cómputo que no se puede ajustar a los requerimientos de tiempo real del robot en el espacio de experimentación. Por lo tanto, no es posible emplear esta técnica para el objetivo final de decodificar la actividad neural para el close-loop entre robot y cultivo, sin embargo, esta herramienta nos da una valiosa información relativa al análisis global de la actividad neural que sugiere que existe una información útil en términos de la frecuencia de disparo.

2.5.4. Análisis de frecuencias inter-spike inversas IISI

En esta última aproximación nos hemos centrado en estudiar la caracterización del cultivo teniendo en cuenta que la actividad neuronal tiene como propiedad fundamental en la codificación dos aspectos, por un lado, la propiedad digital de la actividad, dado que una neurona puede estar activada o no, esto es, presenta un comportamiento todo o nada, y por otro, la propiedad analógica de dicha actividad, que consiste en la frecuencia de disparo y la duración del mismo.

Teniendo en cuenta estos factores, vamos a tener en cuenta para cada electrodo y tras cada estimulación, la actividad generada tras los $150ms$ inmediatos al estímulo. Obtenemos por tanto una secuencia de instantes de tiempo para cada electrodo y tras cada estimulación. Esta secuencia de instantes de tiempo se convierte en una secuencia de valores inversos de intervalos inter-spike tras cada instante de los estímulos. De esta forma este proceso producirá 200 secuencias para cada electrodo activo en el MEA después de la estimulación en cada uno de los electrodos seleccionados. La figura muestra algunas muestras de la evolución en el tiempo de las secuencias de intervalos de inter-spike inversos (IISI) después del estímulo. En general, la tendencia evoluciona como una disminución en la tasa de disparo con el tiempo. Por lo tanto, para reducir los patrones, pero reteniendo información significativa, se realiza una regresión lineal sobre cada secuencia. Se ignoran las secuencias con un número bajo de potenciales de acción, ya que una regresión en ellas podría producir valores falsos. Entonces, la pendiente correspondiente, o variación en el tiempo, se obtiene como representación de la respuesta individual en el electrodo a ese estímulo.

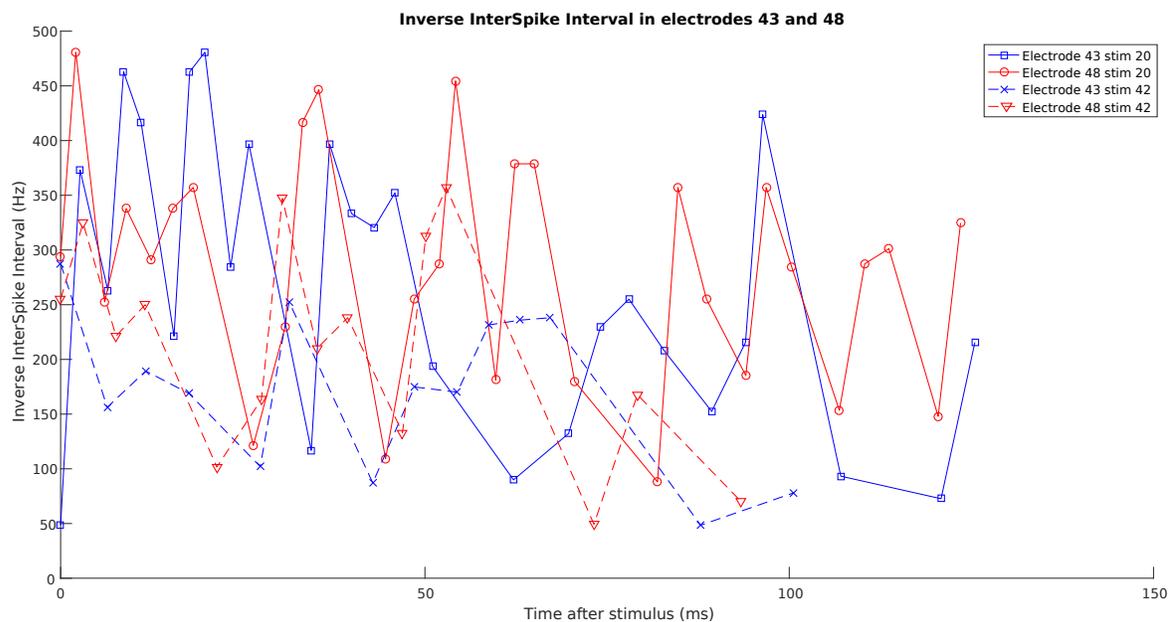


Figura 2.37: Muestras de evolución de secuencias de intervalos inter-spike inversos a partir de los electrodos 43 y 48 tras las estimulaciones en los electrodos 20 y 42.

Después de la representación de cada secuencia por la pendiente, y la eliminación de secuencias con muy pocos potenciales de acción, el patrón de respuestas de cada electrodo al estímulo en cada

electrodo seleccionado puede ser utilizado como una huella digital para caracterizar el cultivo. Las pendientes de la regresión lineal son principalmente negativas (indicando una disminución), pero pueden variar y tener valores muy grandes y aislados. Por lo tanto, en lugar de la pendiente, usamos el ángulo correspondiente, obtenido mediante una función que solo varía de para concentrar todas la información en un rango limitado de valores.

Tal y como se puede ver a continuación, la parte superior de la figura muestra un ejemplo de huella digital de actividad global después de un estímulo a través de la representación de los ángulos de variaciones IISI para todos los electrodos. Los dos gráficos de las partes central e inferior de la figura muestran gráficamente las estadísticas de distribución de los ángulos de IISI para las respuestas de cada electrodo después de las estimulaciones en los electrodos 20 y 42.

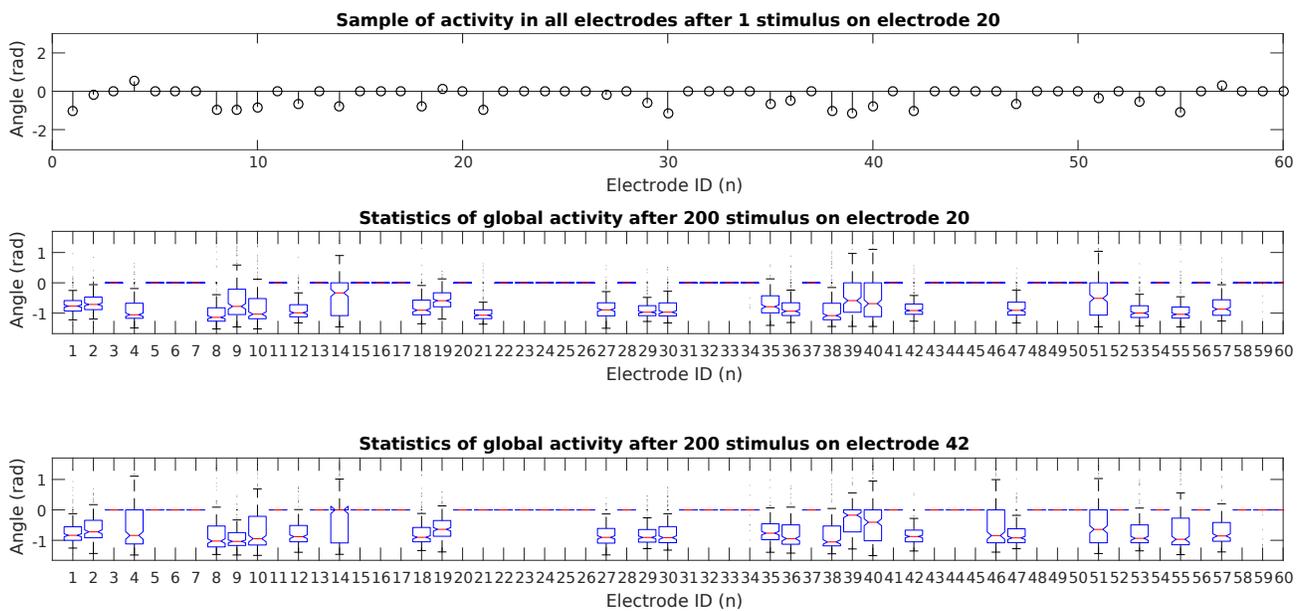


Figura 2.38: Un ejemplo de la huella digital generada por la actividad global después de un estímulo representado mediante las variaciones de ángulos IISI para todos los electrodos se muestra en la parte superior de la figura. Las dos distribuciones estadísticas de las respuestas descritas como ángulos de IISI para todos los electrodos, después de las estimulaciones en los electrodos 20 y 42, se muestran en los dos gráficos inferiores. El número de identificación del electrodo es el orden de cada electrodo según ha sido leído por el software, no la etiqueta (posición de fila de columnas) en el MEA.

2.5.4.1. Machine-learning

Finalmente, las huellas dactilares de los electrodos en la respuesta de cultivo a cada estimulación en dos electrodos seleccionados se utilizaron para formar una red neuronal artificial supervisada (RNA) para clasificar cuáles de los electrodos fueron estimulados. Los 31 electrodos que no mostraron actividad alguna en cualquier estimulación fueron descartados. Además, la respuesta de la actividad en los electrodos estimulados no se utilizaron, y los ángulos de la variación de la tasa de disparo de los electrodos restantes se utilizaron para construir el conjunto de datos.

La ANN fue un perceptrón multicapa estándar con 27 entradas (una para cada electrodo de variación, excepto las dos seleccionadas para la estimulación), una capa oculta de 7 neuronas con función de transferencia tangencial sigmoidea hiperbólica y una salida con función sigmoide estándar para clasificar la neurona estimulada para el patrón de entrada. La ANN fue entrenada con el algoritmo de backpropagation de Levenberg-Marquardt en Matlab usando valores por defecto para los parámetros $\mu = 0,001$, $\mu_{dec} = 0,1$, $\mu_{inc} = 10$, $\mu_{max} = 1e10$.

El conjunto de datos tiene 400 patrones después del preprocesamiento y filtrado, 200 de estimulaciones en el número de ID de electrodo 20 y 200 patrones en el electrodo 42. El entrenamiento se repitió diez veces usando diferentes inicializaciones de los pesos y ordenes de presentación de patrones, ambos aleatorios. El conjunto de datos fue dividido aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento formado por el 70 % de los patrones (uniformemente distribuidos en ambas clases de salida), un 15 % ha sido empleado en el conjunto de validación y el 15 % restante como conjunto de test. Después del entrenamiento, la clasificación media correcta fue de $(95,6 \pm 1,5)$ %.

Mediante una inspección visual comparando los dos diagramas en la parte inferior de la figura, se puede observar que hay dos electrodos que tienen una respuesta distintiva dependiendo del electrodo estimulado. Estos electrodos tienen un alto impacto en el entrenamiento, ya que hacen que sea "fácil" para que la ANN distinga entre ambas clases. Por lo tanto, se realizaron otras pruebas sin estos electrodos distintivos. Por supuesto, los resultados en este caso fueron menos robustos pero no catastróficos. Después de diez entrenamientos, la clasificación correcta media fue de (71 ± 3) % . Esto muestra que la información adicional sobre los electrodos de estimulación puede extraerse de la respuesta en otros electrodos diferentes de los distintivos.

Aunque los experimentos se realizaron offline, todos los cálculos son simples y podrían ser optimizados y adaptados para funcionar a bordo de un robot. El entrenamiento de la ANN puede hacerse previamente de forma offline y luego los pesos resultantes podrían congelarse y traducirse al robot para identificar la respuesta del cultivo neuronal on-line.

2.5.4.2. Evolución temporal de la caracterización del cultivo

Queremos observar y comprobar si la estrategia empleada es robusta durante la evolución de la vida del cultivo neuronal. Para ello se continuó realizando registros durante un total de 9 días. A continuación se muestra la evolución del porcentaje de caracterización mediante la estrategia IISI.

En la figura 2.39 podemos observar como teniendo en cuenta todos los electrodos con actividad significativa, el porcentaje de clasificación correcta no desciende por debajo del 80 %. Por otro lado, para la clasificación sin tener en cuenta los electrodos distintivos en cada conjunto de entrenamiento la clasificación no desciende del 60 %.

1. Se observa como aún sin tener en cuenta los electrodos distintivos, la información referente al análisis IISI sigue aportando información significativa.

2. Existe una clara correlación entre ambas curvas de clasificación, por lo que podemos suponer que el efecto del estímulo en ambos electrodos genera flujos de actividad neural diferentes en cada experimento y que la información aportada por el IISI por los diferentes electrodos nos brinda una valiosa información sobre dicho proceso.
3. El hecho de que el resultado de clasificación tenga bajadas y subidas a lo largo de los días puede ser debido a la migración celular así como a la generación de nuevas conexiones que se forman a lo largo del desarrollo del cultivo, alterando el flujo neural que se produce tras las estimulaciones. Esta migración puede ocurrir tanto en los electrodos de lectura como en los de estimulación, esto es, si uno o varios axones han migrado ligeramente en uno o ambos de los electrodos de estimulación, puede resultar que el estímulo no tenga el mismo impacto sobre la red, generándose propagaciones menos significativas.

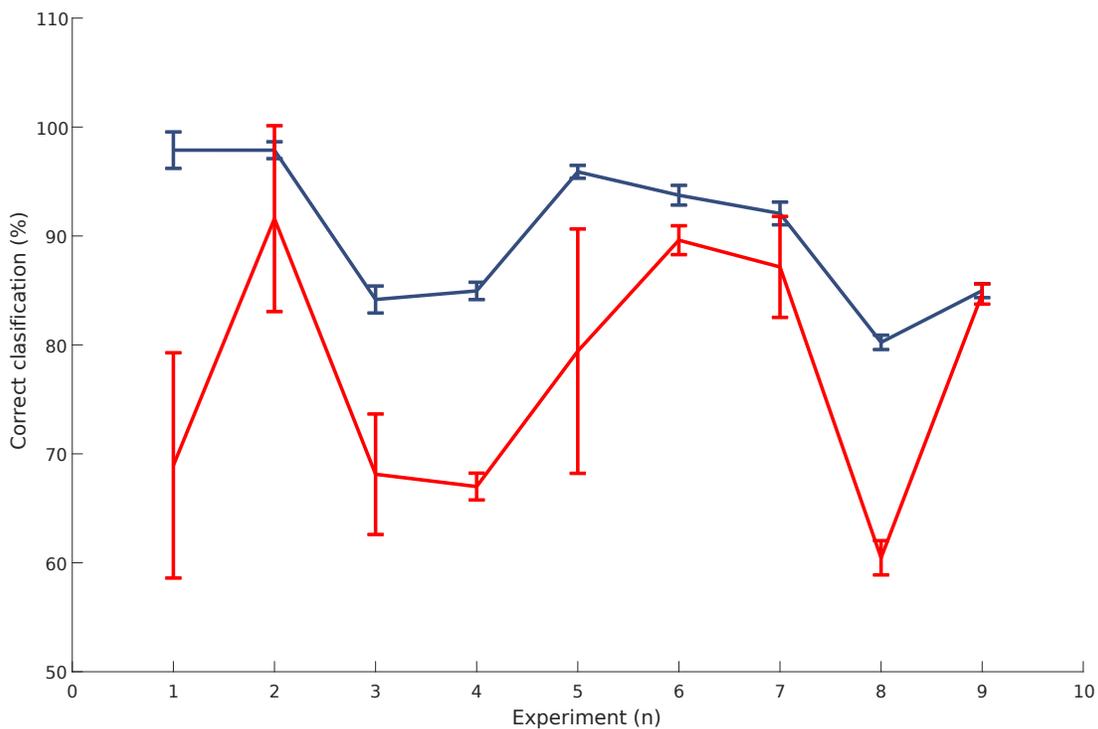


Figura 2.39: Evolución de la caracterización del cultivo a lo largo de 9 días. Se muestra en azul el resultado de la clasificación teniendo en cuenta todos los electrodos con actividad significativa, a excepción de los electrodos estimulados. En rojo se muestra el resultado de la clasificación sin tener en cuenta los electrodos distintivos para cada registro.

La ANN fue un perceptrón multicapa estándar con n entradas (una para cada electrodo de variación, excepto las dos seleccionadas para la estimulación), una capa oculta de 7 neuronas con función de transferencia tangencial sigmoidea hiperbólica y una salida con función sigmoide estándar para clasificar la neurona estimulada para el patrón de entrada. La ANN fue entrenada con el

algoritmo de backpropagation Bayesian Regularization que actualiza los parámetros de la red según la optimización Levenberg-Marquardt. Se han usado los valores por defecto para los parámetros $epochs = 1000$, $\mu = 0,001$, $\mu_{dec} = 0,1$, $\mu_{inc} = 10$, $\mu_{max} = 1e10$. El entrenamiento se repitió diez veces usando diferentes inicializaciones de los pesos y ordenes de presentación de patrones, ambos aleatorios.

2.6. Resumen de los resultados de investigación

En este apartado vamos a resumir las conclusiones obtenidas mediante los resultados de las distintas aproximaciones:

1. **Cables neuronales:** Durante la realización de los experimentos se observó la falta de estabilidad de dichos 'cables neuronales', si se realizaba un registro a la mañana y se obtenían estos resultados, por la tarde el análisis podía cambiar totalmente, resultando en que no se pudieran encontrar pares de electrodos que cumplieran dichas condiciones o que la respuesta de los mismos dejaba de ser estable. Esta es en definitiva la estrategia principal empleada en los artículos mencionados en el estado del arte cuyos resultados prácticos a la hora de que el robot pueda desenvolverse por un entorno real provoque un comportamiento inestable, con bajo nivel de acierto en la acción a ejecutar por el robot. Es por esto por lo que se decide tratar de encontrar una estrategia más robusta que no dependa de conectividades locales sino de la actividad a nivel global bajo el supuesto de que los cambios en la conectividad sináptica locales no afecten de una forma tan brusca a la actividad neural de la estructura global.
2. **Centros de masas:** El motivo por el que consideramos que esta estrategia, a pesar de sus aparentes buenos resultados, no es apropiada para nuestros objetivos es que es fuertemente dependiente de la topología de la red neuronal. En este caso, dado que la red se ha extendido y conectado correctamente a lo largo del MEA, la red presenta actividad a lo largo de la mayoría de electrodos, de hecho se tienen 28 electrodos de 60 donde la actividad tras el estímulo es significativa respecto de la actividad basal y dichos electrodos se encuentran repartidos más o menos homogéneamente a lo largo de la rejilla del MEA. El problema surge si para un cultivo dada dicha actividad no se distribuye homogéneamente y solo presentan actividad ciertos electrodos situados de forma cercana, lo que haría que se volviera muy complicado detectar diferencias en las distribuciones de los CM. De la misma manera puede ocurrir si uno de los electrodos tiene una actividad muy significativa respecto de los demás debido a que se tiene una población neuronal cercana al electrodo, dicha actividad dominaría el cálculo del CM imposibilitando el obtener una información adecuada de los procesos de activación del circuito. Por otro lado, esta aproximación sugiere que en términos de actividad global, se dan diferencias en cuanto a la propagación de la actividad a lo largo del cultivo en términos de la cantidad de potenciales de acción generados.

3. **Análisis tiempo-frecuencia:** Una vez que hemos logrado entrenar una red neuronal artificial para caracterizar las oscilaciones debidas a la estimulación en cada electrodo, la intención es realizar el análisis en tiempo-frecuencias, del promedio de los potenciales de acción producidos en todos los canales tras una sola estimulación en tiempo real. Para ello si empleamos la función de análisis NA-MEMD obtendremos un tiempo de cómputo que no se puede ajustar a los requerimientos de tiempo real del robot en el espacio de experimentación. Por lo tanto, no es posible emplear esta técnica para el objetivo final de decodificar la actividad neural para el close-loop entre robot y cultivo, sin embargo, esta herramienta nos da una valiosa información relativa al análisis global de la actividad neural que sugiere que existe una información útil en términos de la frecuencia de disparo.
4. **Análisis IISI:** Los resultados mediante esta estrategia han demostrado ser los más robustos, dado que para la caracterización de la actividad global teniendo en cuenta todos los electrodos, tras el entrenamiento, la clasificación media correcta fue de $(95,6 \pm 1,5) \%$ y por otro lado, teniendo en cuenta la actividad en el conjunto de electrodos no disjuntos, después de diez entrenamientos, la clasificación correcta media fue de $(71 \pm 3) \%$.

| Estrategia | Análisis empleado | Resultados |
|-------------------------------------|-------------------|--|
| Cables neuronales | PSTH | <ul style="list-style-type: none"> ■ Se encuentran dos cables neuronales. $\{E10, E25\}$ y $\{E36, E39\}$. ■ Problemas: Los cables neuronales son muy volátiles. |
| Centros de masas | CM | <ul style="list-style-type: none"> ■ Clasificación correcta $(83,3 \pm 4,1) \%$. ■ Problemas: Resultados dependientes de la configuración topológica. |
| Análisis tiempo-frecuencia | NA-MEMD | <ul style="list-style-type: none"> ■ Es posible discriminar en torno al 70% de clasificación correcta los estímulos en cada electrodo. ■ Problemas: No es posible implementar esta técnica en tiempo real. |
| Análisis de frecuencias inter-spike | IISI | <ul style="list-style-type: none"> ■ Es posible discriminar en torno al 96% de clasificación correcta los estímulos en cada electrodo. ■ Ventajas: Se puede implementar en tiempo real. |

Cuadro 2.2: Cuadro comparativo de métodos de análisis de la actividad del cultivo y resultados.

2.7. Comparativa de las estrategias

En este apartado vamos a realizar una comparativa de los métodos empleados en algunos de los artículos más relevantes. Posteriormente se visualiza en la tabla 2.2 un resumen de las técnicas y resultados obtenidos por cada grupo investigador y por nosotros mismos.

2.7.1. Controlling a mobile robot with a biological brain

En este artículo, Warwick et al. [26] propuso un "sistema híbrido que incorpora el control en bucle cerrado(Close-loop) de un robot móvil por un cultivo disociado de neuronas". Ellos desarrollaron un enfoque metodológico para caracterizar la tasa de disparo instantáneo del cultivo neuronal en varios electrodos con el fin de mapear las entradas y salidas del sistema en general.

- La estrategia de selección de entradas/salidas es realizada seleccionando 2 pares de electrodos $E_{est1}, E_{resp1}, E_{est2}, E_{resp2}$ tales que al estimular en E_{est1} se obtiene una respuesta en E_{resp1} con al menos un potencial de acción en $100ms$ tras el estímulo más del 60 % de las veces y no responde más del 20 % de las veces frente a la estimulación en el otro par E_{est2}, E_{resp2} de electrodos.
- El procesado de la información es analizado teniendo en cuenta únicamente el número de potenciales de acción tras la estimulación.
- Los resultados describen que el cultivo muestra un número bajo de giros debidos a la estimulación ($46 \pm 15\%$) y un número amplio de giros debidos a la actividad espontánea ($54 \pm 19\%$)

2.7.2. The Neurally controlled Animat: Biological Brains Acting with Simulated Bodies

Por medio de este otro artículo, DeMarse et al. [7] desarrolló un animat controlado neuralmente (animal artificial), donde estudiaron "cómo se procesa y codifica la información en las redes neuronales cultivadas vivas conectándolas a un animal generado por ordenador". Su principal objetivo fue estudiar la interacción entre las entradas sensoriales de estos animats a través de su entorno con el cultivo neuronal disociado en un MEA.

- Para la selección de entradas/salidas se seleccionan 5 electrodos, uno para la detección de colisión y los otros 4, uno por dirección. Se provee de feedback al cultivo mediante la estimulación en uno de estos electrodos tras $100ms$ para la detección de un patrón reconocido previamente.
- Se entrena un algoritmo de clustering para reconocer patrones espacio-temporales cada $200ms$ en la actividad del cultivo. Para cada electrodo el patrón se calcula mediante $A_n(t_i) =$

$An(t_{i-1})e^{-\beta(t_i-t_{i-1})} + 1$ y se normaliza $P_n(t_i) = \tanh(\delta A_n(t_i))$. Los patrones son agrupados en el cluster más cercano mediante el cálculo de la distancia euclídea y cada cluster tiene asociada una dirección de movimiento. Se entrena el algoritmo previamente al experimento durante 8 minutos.

- No se proporcionan resultados en términos de acierto o fallo del Animat al desplazarse por el entorno.

2.7.3. Towards an embodied in vitro electrophysiology: The NeuroBit project

En este proyecto Martinoia et al. [15] proponen el estudio de la 're-incorporación' de un cultivo junto a un robot para discutir los efectos en términos de la conectividad y la modificación de la actividad global debidos a dicha reincorporación.

- Se seleccionan como salidas aquellos electrodos que muestran un incremento en la actividad significativo tras los estímulos. Los entradas son seleccionados basándose en su capacidad para generar patrones espacio-temporales en los electrodos seleccionados como salidas. Emplean 16 salidas.
- Análisis de intervalos inter-burst (IBI) e histograma post-estímulo (PSTH). Análisis de intervalos inter-burst (IBI) e histograma post-estímulo (PSTH).
- No se proporcionan resultados.

2.7.4. Modular Neuronal Assemblies Embodied in a Close-Loop Environment: Toward Future Integration of Brain and Machines

Por último, en su artículo, Tessadori et al. [24] mejoraron los enfoques antes mencionados añadiendo un paso más en el experimento, donde después de cada colisión debido a una mala respuesta del cultivo celular, estimularon el circuito para aumentar la plasticidad sobre el material seleccionando electrodos de entrada-salida.

- Se observa la actividad espontánea para ver los electrodos que tienen mayor actividad en función de su tasa de disparo media. Se seleccionan varios candidatos y se estimula en ellos. A continuación se genera el PSTH de los 59 electrodos del MEA y se eligen como salidas aquellos conjuntos de electrodos que son disjuntos para la estimulación en cada electrodo seleccionado como entrada.
- Se emplea el análisis PSTH para determinar el conjunto de salidas ganadores asociados a cada movimiento del robot.

- Se proporcionan resultados en función de la distancia media entre choques del robot con obstáculos.

2.7.5. Análisis de variación de frecuencia en cultivos neuronales para la caracterización de la respuesta al estímulo

En nuestro proceso de investigación tratamos de encontrar un enfoque alternativo que nos permita mejorar la caracterización de la respuesta del cultivo ante distintos estímulos bajo las restricciones de un cálculo de bajo coste computacional y alto poder predictivo.

- Los electrodos a estimular se seleccionan comparando la actividad global tras el estímulo, en relación con la actividad global sin estímulo. La actividad después del estímulo en cada electrodo se compara con la actividad espontánea o basal, a través del test de Wilcoxon.
- Cálculo de intervalos de inter-spike inversos (IISI) tras $150ms$ para cada electrodo y tras cada estímulo.
- Teniendo en cuenta todos los electrodos con actividad significativa respecto de la espontánea tras el estímulo, la clasificación media correcta fue de $(95,6 \pm 1,5) \%$. Teniendo en cuenta el subconjunto de electrodos compartidos por ambos subconjuntos de electrodos seleccionados como salidas, la clasificación correcta media fue de $(71 \pm 3) \%$.

2.7.6. Cuadro de resumen comparativo

| | Selección de entradas/salidas | Análisis empleado | Resultados |
|--|--|--|---|
| Controlling a mobile robot with a biological brain. | Pares de electrodos selectivos. | Número de potenciales de acción tras la estimulación. | Giros debidos a la estimulación ($46 \pm 15\%$). Giros debidos a actividad espontánea ($54 \pm 19\%$). |
| The Neurally Controlled Animal: Biological Brains Acting with Simulated Bodies. | Selección arbitraria de 5 zonas de estimulación, 1 zona de colisión, 4 para las direcciones de movimiento del robot. Se escogen todos los electrodos como salidas. | Algoritmo de clustering para reconocer patrones espaciotemporales. | No se proporcionan. |
| Towards an embodied in vitro electrophysiology: The NeuroBIT project. | Electrodos con actividad significativa respecto de la actividad basal tras el estímulo. | Análisis de intervalos interburst (IBI) e histograma post estímulo (PSTH). | No se proporcionan. |
| Modular Neuronal Assemblies Embodied in a Closed-Loop Environment: Toward Future Integration of Brains and Machines. | Pares de electrodos selectivos. | PSTH | Resultados en función de la distancia media entre choques del robot con obstáculos. |
| Análisis de variación de frecuencia en cultivos neuronales para la caracterización de la respuesta al estímulo. | Dos electrodos que producen una respuesta más estable y discriminable entre sí. | Cálculo de intervalos de inter-spike inversos (IISI). | Teniendo en cuenta todos los electrodos ($95,6 \pm 1,5\%$). Teniendo en cuenta el subconjunto de electrodos compartidos por ambos subconjuntos ($71 \pm 3\%$). |

Cuadro 2.3: Cuadro comparativo de métodos de análisis de la actividad del cultivo y resultados.

Capítulo 3

Conclusiones y trabajos futuros

3.1. Conclusiones

Tal y como se ha podido observar durante el proceso de investigación, la variabilidad en los procesos de activación de los circuitos neuronales es alta, siendo además especialmente significativa la variabilidad en los electrodos que presentan actividad tras los estímulos a lo largo de los días. De hecho, para los nueve registros realizados, se obtuvo:

- Para el registro 1, la actividad tras el estímulo en el electrodo 83 se diferenciaba en generar respuesta significativa en los electrodos [12, 85], actividad que no se presentaba tras la estimulación en el electrodo 23, el resto de electrodos activos eran compartidos tras ambas estimulaciones.
- Para el registro 2, la diferencia se encontró para los electrodos [16, 63, 74].
- Para los registros 3, 4, 6 y 7, en los electrodos [16, 63].
- Para el registro 5, en los electrodos [16, 54, 63]
- Para el registro 8, en los electrodos [45, 16, 63, 67].
- Para el registro 9, en los electrodos [45, 63, 74, 58].

Esto demuestra que nuestro planteamiento de partida es correcto, atendiendo a la imposibilidad de tratar de realizar un análisis consistente atendiendo sólo a conjuntos de electrodos de pares estímulo respuesta distintivos.

Por otra parte, la suposición de que existen conexiones directas entre pares de electrodos es complicada de demostrar, dado que la conectividad es muy alta y los electrodos del MEA nos brindan una precisión muy pobre sobre los procesos de propagación y activación que se dan en el cultivo dado que cada electrodo recoge información de una, ninguna e incluso de una población neuronal, mientras que quedan amplias zonas del cultivo de las que no se puede observar la actividad.

Es por estas razones por las que sugerimos que un enfoque apropiado debe considerar el circuito neural como una entidad única, en la que variando la localización del estímulo se consigue generar una vibración particular y caracterizable, de la respuesta de activación global del cultivo. Esto es, una misma red parece ser capaz de generar distintos acordes en términos de las características del flujo neural como una guitarra según las cuerdas que se accionen.

Por tanto, la evidencia disponible acerca de las propiedades de disparo de las neuronas, indica que los trenes de pulsos son tanto analógicos (duración del pulso del tren), como digitales (comportamiento "todo o nada"), siendo además, capaces de gestionar información relativa a la densidad de los trenes de pulsos. Estas propiedades sugieren una fuerte dependencia del código neural en el dominio de la frecuencia y su variación en el tiempo.

La aproximación aquí presentada puede aprovechar estas propiedades para obtener una mejor caracterización de la respuesta del cultivo neuronal, haciendo así más útil la sinergia entre cultivos neuronales y robots. Además, este método permite explorar y extender el análisis para la caracterización de la respuesta global del cultivo, ya que no depende de la respuesta en electrodos específicos después de la estimulación, sino en procesos computacionales paralelos de las neuronas conectadas en el cultivo neuronal.

Los resultados muestran que el código neural puede ser modificado por las actividades moduladoras locales cuando se estimula el electrodo correcto y el flujo neural resultante puede ser utilizado para la caracterización, siendo además un análisis robusto en el tiempo y que además, nos permite una aproximación a los procesos internos del cultivo, esto es, desarrollo neuronal, migración, conectividad, aprendizaje tipo Hebbiano, etc.

3.2. Objetivos alcanzados

A continuación se listan una serie de objetivos alcanzados como resultado de la investigación:

1. Desarrollo de una interfaz gráfica para la supervisión y limpieza de registros de cultivos neuronales.
2. Implementación de un algoritmo de filtrado automático de ruido (artefactos).
3. Caracterización de la actividad global del cultivo neuronal por medio del análisis IISI y técnicas de Machine Learning.
4. Se ha publicado un poster explicando la metodología para encontrar cables neuronales en el congreso Meameeting 2016 Calvo et al. [6].
5. Actualmente se encuentra en proceso de revisión un artículo en la revista Frontiers explicando el análisis de variación de frecuencia en cultivos neuronales para la caracterización de la respuesta al estímulo.

3.3. Dificultades encontradas

Uno de los principales problemas detectados durante el proceso de investigación se encuentra ligado a la alta conectividad del cultivo neuronal en el MEA. Es interesante observar la actividad basal del cultivo mediante herramientas de visualización que permitan reproducir dicha actividad a 'cámara lenta'. Cuando observamos dicha actividad se puede observar como la actividad normalmente comienza en uno de los electrodos, acumulándose progresivamente hasta que 'carga' el resto del circuito donde llega un momento en el que se produce un efecto de propagación en cascada y la actividad se visualiza a lo largo de los electrodos del MEA.

Esta información sería especialmente útil para diferenciar y caracterizar la actividad del cultivo tras cada estimulación, dado que estimulando en zonas distintas del MEA, sería de esperar que dicha propagación quede determinada por la zona de estimulación, a partir de la cual, si se trata de una zona de la población neuronal con capacidad excitatoria se propagaría la actividad al resto del circuito.

Existen dos problemas referentes a este aspecto:

1. El primero tiene que ver con las capacidades de los dispositivos de estimulación y lectura empleados. En primer lugar, la estimulación a través de los electrodos genera ruido electrostático que oculta la información relevante de la actividad neural, para evitar la lectura de dicho ruido, el estimulador controla el potencial de los electrodos llevándolos a masa para evitar que se de la lectura de los artefactos (*blanking*), por lo que estamos perdiendo la lectura de una fase fundamental de la propagación de la señal a través del cultivo, cuyo origen en el MEA y dirección de propagación, serían completamente determinantes.
2. El segundo problema es debido a la alta conectividad del cultivo. Dada su alta conectividad y debido a los pulsos empleados, el proceso de 'carga' del cultivo se realiza de una forma brusca, esto es porque los estímulos, debido al tamaño de los electrodos, $30\mu m$, generan un campo eléctrico que afecta a una población neuronal. Esto es, dado su tamaño, grande respecto del tamaño de los axones y las dendritas, afecta a un subconjunto amplio de las mismas y acelera notablemente el proceso de 'carga' del circuito.

Esto supone que una vez terminado el estímulo, en el momento en que comienza la lectura real de la actividad, nos encontramos con el circuito totalmente activado, nos hemos perdido el proceso de propagación. Dado que el cultivo se encuentra altamente interconectado, cualquier estímulo, aunque por vías de conectividad distintas, acaba por activar prácticamente la mayoría del circuito, por lo que el resultado es que prácticamente en cualquier electrodo que se estimule, una vez que la propagación se ha llevado a cabo, se tiene el mismo subconjunto de electrodos con actividad.

Llegados a este punto, solo nos queda la posibilidad de observar el proceso de activación en sí del circuito, esto es, medirlo en términos de la actividad digital de cada electrodo, cuáles se encuentran activos, la frecuencia de disparo y la duración de los trenes de pulsos.

Esto nos obliga a poder estudiar únicamente el circuito en dichos términos, sin poder observar en detalle los aspectos de la propagación, el circuito biológico inherente y sus caminos, que sería de especial interés para observar como las dinámicas del circuito se ven influenciadas por las modificaciones de dichos caminos.

3.4. Trabajos futuros

Se enumeran a continuación una serie de propuestas dirigidas a profundizar en el estudio de las dinámicas que gobiernan la interactividad en los cultivos planos:

- Los experimentos se basaron en estimulaciones en un solo electrodo cada vez, lo que hace más difícil afectar las vías locales, por lo que esperamos que los resultados puedan ser mejorados teniendo en cuenta diferentes propiedades de estímulo, tales como la amplitud, frecuencia y duración, utilizando un subconjunto selectivo más grande de electrodos para la estimulación en cada experimento.
- Se propone emplear más de dos localizaciones de estímulos para estudiar los límites de representabilidad del cultivo, esto es, si un cultivo presenta una baja variabilidad en la respuesta ante un estímulo dado, podemos realizar un mapeado entre estímulo y respuesta, pero aún no está claro cual es la capacidad límite para un cultivo en términos de la cantidad de respuestas estables distintivas que puede proporcionar.
- Además, se podría aumentar el número de estímulos realizados para obtener suficientes datos para el proceso de caracterización a través del perceptrón multicapa.
- Queremos estudiar en un futuro la validez de esta estrategia de análisis para la caracterización en un entorno robótico real.
- Los experimentos que se han realizado consistían en una fase de lectura del cultivo de unos dos minutos, seguido de una fase de estimulación de cerca de cinco minutos por cada electrodo estimulado. Pensamos que no es suficiente para generar un aprendizaje de tipo Hebbiano en el circuito. De hecho la figura 2.39 nos muestra como empeora la caracterización a lo largo de los días de registro para finalmente mejorar un poco de nuevo. Esto sugiere que para reforzar los circuitos inherentes es necesario realizar registros de estimulación largos, probablemente de horas, cada día.

Es por tanto nuestro objetivo explorar las capacidades computacionales de los cultivos neuronales, en términos de dominio de la frecuencia interspike y respuesta de la actividad global, para obtener una cartografía más compleja del estímulo y la respuesta con el fin de crear comportamientos más complejos en un contexto robótico.

Bibliografía

- [1] Alegre-Cortés, J., Soto-Sánchez, C., Pizá, Á., Albarracín, A., Farfán, F., Felice, C., and Fernández, E. (2016). Time frequency analysis of neuronal populations with instantaneous resolution based on noise-assisted multivariate empirical mode decomposition. *Journal of Neuroscience Methods*, 267:35 – 44.
- [2] Ammermüller, J. and Kolb, H. (1995). The organization of the turtle inner retina. i. on-and off-center pathways. *Journal of Comparative Neurology*, 358(1):1–34.
- [3] Ammermüller, J., Weiler, R., and Perlman, I. (1995). Short-term effects of dopamine on photoreceptors, luminosity-and chromaticity-horizontal cells in the turtle retina. *Visual neuroscience*, 12(3):403–412.
- [4] Bakkum, D. J., Shkolnik, A. C., Ben-Ary, G., Gamblen, P., DeMarse, T. B., and Potter, S. M. (2004). *Removing Some 'A' from AI: Embodied Cultured Networks*, pages 130–145. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [5] Braitenberg, V. (1986). *Vehicles: Experiments in synthetic psychology*. MIT press.
- [6] Calvo, M. V., Ferrández-Vicente, J., de la Paz Lopez, F., Alvarez-Sanchez, J. R., Cuadra Troncoso, J. M., and Fernández, E. (2016). Functional connectivity graphs in hippocampal cultures using tetanic stimulation for real time robotic control. Number 104.
- [7] DeMarse, T. B., Wagenaar, D. A., Blau, A. W., and Potter, S. M. (2001). The neurally controlled animat: Biological brains acting with simulated bodies. *Autonomous Robots*, 11(3):305–310.
- [8] Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., Xu, X., et al. (1996). A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In *Kdd*, volume 96, pages 226–231.
- [9] Hodgkin, A. L. and Huxley, A. (1952a). Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 17, pages 43–52. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [10] Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952b). Propagation of electrical signals along giant nerve fibres. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, pages 177–183.

- [11] JIMBO, Y. (1998). Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures : Application of planar electrode arrays. *IEEE Trans. BME*, 45:1297–1304.
- [12] Li, X. (2006). Temporal structure of neuronal population oscillations with empirical model decomposition. *Physics Letters A*, 356(3):237 – 241.
- [13] Liang, H., Bressler, S. L., Desimone, R., and Fries, P. (2005). Empirical mode decomposition: a method for analyzing neural data. *Neurocomputing*, 65:801 – 807. Computational Neuroscience: Trends in Research 2005.
- [14] Mandic, D. P., ur Rehman, N., Wu, Z., and Huang, N. E. (2013). Empirical mode decomposition-based time-frequency analysis of multivariate signals: The power of adaptive data analysis. *IEEE Signal Processing Magazine*, 30:74–86.
- [15] Martinoia, S., Sanguineti, V., Cozzi, L., Berdondini, L., Van Pelt, J., Tomas, J., Le Masson, G., and Davide, F. (2004). Towards an embodied in vitro electrophysiology: the neurobit project. *Neurocomputing*, 58:1065–1072.
- [16] McCulloch, W. S., Arbib, M. A., Lettvin, J. Y., and Papert, S. A. (2016). *Embodiments of mind*. mit Press.
- [17] Meier, K. (2005). The facets project. <http://facets.kip.uni-heidelberg.de/>.
- [18] Neumann, J. V. (1956). Probabilistic logics and synthesis of reliable organisms from unreliable components. In Shannon, C. and McCarthy, J., editors, *Automata Studies*, pages 43–98. Princeton University Press.
- [19] Novellino, A., D'Angelo, P., Cozzi, L., Chiappalone, M., Sanguineti, V., and Martinoia, S. (2007). Connecting neurons to a mobile robot: An in vitro bidirectional neural interface. 2007:12725.
- [20] Rehman, N. and Mandic, D. P. (2010). Multivariate empirical mode decomposition. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 466(2117):1291–1302.
- [21] Rumelhart, D. E., Hinton, G. E., and Williams, R. J. (1988). Neurocomputing: Foundations of research. *JA Anderson and E. Rosenfeld, Eds*, pages 696–699.
- [22] Sanchez., V. L. (2014). *Estudio y realizacion de un neuroprocesador biologico: metodos de aprendizaje*. PhD thesis, UNIVERSIDAD POLITECNICA DE CARTAGENA DEPARTAMENTO DE ELECTRONICA, TECNOLOGIA DE COMPUTADORAS Y PROYECTOS.
- [23] Sharpley, R. C. and Vatchev, V. (2006). Analysis of the intrinsic mode functions. *Constructive Approximation*, 24(1):17–47.

- [24] Tessadori, J., Bisio, M., Martinoia, S., and Chiappalone, M. (2012). Modular neuronal assemblies embodied in a closed-loop environment: Toward future integration of brains and machines. 6:99.
- [25] Tessadori, J., Mulas, M., Massobrio, P., Martinoia, S., and Chiappalone, M. (2011). A bi-directional neuro-robotic system to study computational properties of cell assemblies. *BMC Neuroscience*, 12(1):P37.
- [26] Warwick, K., Xydas, D., Nasuto, S. J., Becerra, V. M., Hammond, M. W., Downes, J. H., Marshall, S., and Whalley, B. J. (2010). Controlling a mobile robot with a biological brain. *Defence Science Journal*, 60(1):5. Copyright - Copyright Defence Scientific Information & Documentation Centre Jan 2010; Ultima actualizacion - 2013-07-30.
- [27] Xydas, D., Norcott, D. J., Warwick, K., Whalley, B. J., Nasuto, S. J., Becerra, V. M., Hammond, M. W., Downes, J., and Marshall, S. (2008). Architecture for neuronal cell control of a mobile robot. In *European Robotics Symposium 2008*, pages 23–31. Springer.