

Projeto de Iniciação Científica

*Teoria da Informação
e redes neurais biológicas*

Rafael Tuma Guariento

Orientador: Reynaldo Daniel Pinto

IFSC-USP
2011

1. **Resumo/Objetivo**

O objetivo deste projeto de iniciação científica é estudar a codificação e a transmissão de informação em redes neurais biológicas utilizando neurônios de Centros Geradores de Padrões e ferramentas da Teoria da Informação. O principal aspecto que iremos abordar é a influência da escolha de um particular referencial de tempo local nos resultados obtidos com o cálculo da informação mútua média entre dois neurônios conectados por sinapses. Durante a execução deste projeto o estudante irá aprender as técnicas de dissecação e preparação de neurônios do siri azul *Callinectes sapidus*, sua interação em tempo real com computadores e análise de dados. Assim, ao final deste projeto o estudante terá recebido um bom treinamento em técnicas multidisciplinares fundamentais para o seu desenvolvimento no estudo de redes neurais biológicas, tanto em campo teórico como na realização de experimentos, sua análise e modelagem, constituindo uma boa base caso o estudante pretenda continuar seus estudos em programas de pós-graduação.

2. **A preparação biológica do sistema estomatogástrico de siris azuis *Callinectes sapidus***

Os crustáceos são artrópodes (decápodos) e estão entre os invertebrados mais populares em neurociência experimental devido à presença de Geradores de Padrões Centrais (CPGs), como o CPG pilórico do gânglio estomatogástrico (um circuito que produz um padrão de disparo trifásico com frequência típica da ordem de 1Hz), que tem sido estudado por mais de 30 anos (Mulloney & Selverston, 1974; Selverston et al., 1976; Selverston & Moulins, 1986). Estes circuitos são pequenas redes neurais especializadas em produzir de modo endógeno diversos padrões periódicos e robustos para controlar atividades rítmicas motoras (Marder and Calabrese, 1996; Stein et al., 1997), como mastigar, andar, voar, respirar, etc. Eles trabalham de modo quase autônomo em que a supervisão por centros superiores

consiste apenas em receber a informação sensorial e sintonizar os padrões e um propósito específico, através da neuromodulação aplicada ao CPG. O estudo de CPGs simples trouxe muitas das idéias que foram aplicadas com sucesso ao entendimento de como circuitos mais complicados (como o cérebro) produzem padrões espaço-temporais (Destexhe & Marder, 2004; Marder and Bucher, 2007).

O CPG pilórico dos siris azuis mesmo após ser dissecado do animal continua a produzir “in vitro” os mesmos padrões que gerava no animal intacto. Apesar da relativa simplicidade dos padrões e da maioria das propriedades fisiológicas deste CPG serem conhecidas, a gênese do padrão motor ainda não é rigorosamente entendida (Selverston et al., 2000). A razão é que mesmo um CPG simples como este, em que as propriedades sinápticas e celulares são conhecidas, é um sistema complexo não-linear (Izhikevich, 2000), o padrão é uma propriedade emergente do sistema, e é impossível aplicar uma abordagem reducionista.

A preparação biológica (dissecação) animal consiste de 4 partes:

- Anestésiar o animal em gelo (~30 minutos);
- Remover o estômago do animal (~20 minutos);
- Fixar do estômago em uma Placa de Petri (~5 minutos);
- Remover o sistema nervoso estomatogástrico do estômago e fixá-lo a outra placa de Petri (1-2 horas);
- Limpar os nervos e expor os neurônios removendo uma fina camada de tecido conectivo protetor com pinças e tesouras de microcirurgia (1 - 3 horas);

Uma foto da preparação pronta, após fixação em placa de Petri, é apresentada na figura 1.

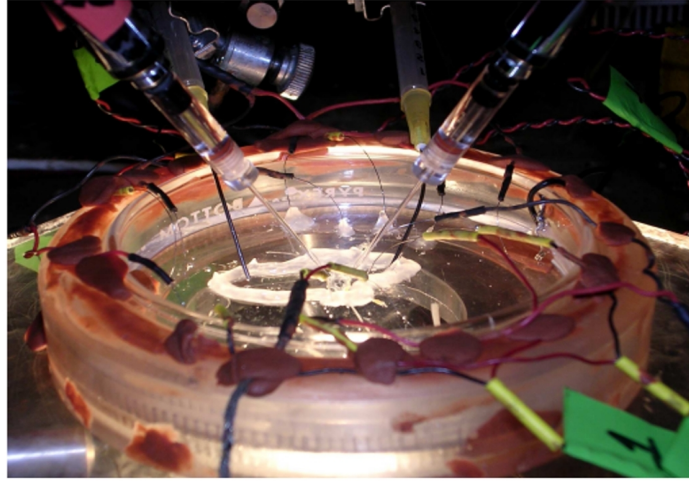


Fig. 1: Preparação biológica na placa de Petri, pronta para medidas intra- e extracelulares. Adaptada de Pinto, 2005

3. Teoria da informação aplicada ao estudo de redes neurais biológicas

A Teoria da Informação (Shannon, 1948) tem sido amplamente utilizada em diversas áreas do conhecimento, devido a sua característica de inferir a quantidade de informação contida em uma determinada mensagem, sem a necessidade de se conhecer o conteúdo desta. Diferentes abordagens são possíveis quando se aplica esta formulação matemática à neurociência (Borst *et. al.*, 1999). No caso deste projeto, iremos medir o fluxo e a capacidade de transmissão de informação entre dois neurônios específicos do gânglio estomatogástrico de siris azuis (Brochini *et al.*, 2011), utilizando os conceitos de Informação Mútua (AMI) e Entropia Informacional de Shannon (maiores detalhes no anexo 1).

O CPG pilórico possui um marca-passo formado por dois neurônios dilatadores pilóricos (PDs) e um interneurônio burster anterior (AB), todos conectados fortemente por sinapses elétricas. Este grupo marca-passo inibe todos os outros neurônios do circuito e recebe uma única sinapse de feedback do circuito através do neurônio lateral pilórico (LP). Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi estudado como a informação do neurônio LP passa para o neurônio PD através dessa sinapse, isto é, estudou-se como um padrão de disparos em uma rajada do LP afeta o padrão de disparos apresentado na próxima rajada do PD, usando como referência para cada par de rajadas o primeiro disparo do PD (marca-passo). Entretanto esta escolha não é única e pretendemos verificar durante a execução deste projeto qual os

efeitos de escolher outras referências para obter os padrões de tempos de disparo.

Em nossas análises de dados os padrões produzidos pelo neurônio LP serão considerados como estímulo, e o sinal do neurônio PD como a resposta. Além disso também podemos substituir o neurônio LP biológico por um neurônio artificial computacional simulado em tempo real (que tem seus padrões de disparos completamente controlados pelo experimentador) e conectado por sinapses artificiais ao circuito biológico através de uma técnica conhecida como dynamic clamp (Pinto *et al.*, 2001, Nowotny *et al.*, 2006, Brochini *et al.*, 2011).

Comparando os resultados obtidos com os padrões extraídos dos pares de rajadas originais (que tem relação de causalidade temporal) com os resultados que obtemos quando utilizamos pares de rajadas escolhidos aleatoriamente (método dos surrogados, Theiler *et al.*, 1992), podemos testar se os resultados são realmente devido a causalidade e a conexão entre os neurônios ou a propriedades das distribuições de padrões.

A análise de dados, utilizando a teoria da informação, começa com a discretização do sinal em intervalos de tempo finitos (Figura 2), definindo assim os chamados *bins*, que irão conter o valor 1 caso exista um disparo dentro deste intervalo e 0 caso contrário. Os *bins* são análogos às letras de um alfabeto, ou os caracteres de um código Morse (binário). Após feito isso, definimos uma *palavra* com certo número constante de *bins*, de tal maneira a definir uma variável aleatória cujos estados possíveis representam as diferentes palavras obtidas, com sua distribuição de probabilidades dada pelo histograma de frequências relativas obtido no experimento. Este procedimento é ilustrado na Figura 2.

Uma vez obtida a distribuição de probabilidade das palavras em cada posição possível dentro de cada rajada, fazemos uso da teoria da informação para determinar quais “partes” do rajada de um neurônio estão mais correlacionadas com “quais” partes da rajada do outro neurônios, evidenciando como é o fluxo de informação entre estes neurônios (Figura 3).

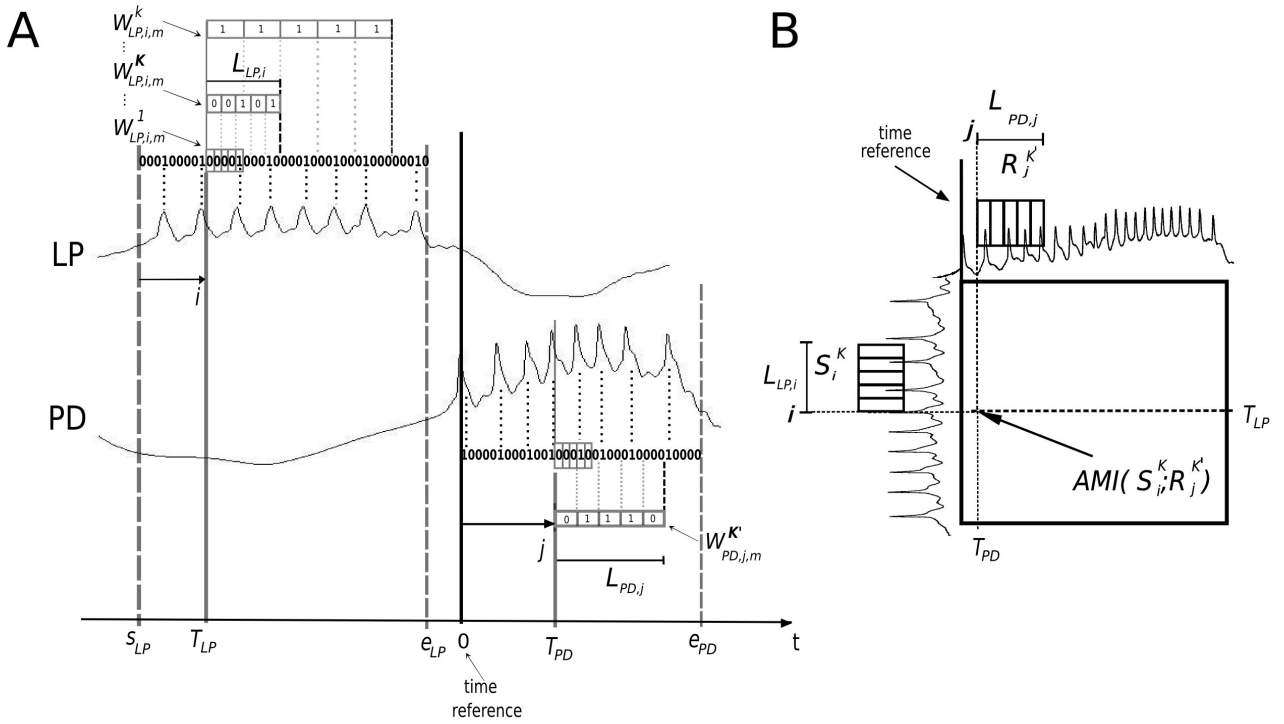


Fig. 2: Discretização das séries temporais do potencial de membrana dos neurônios, a maximização da entropia e a representação da AMI (Adaptada de Brochini et al., 2011). **A**, Ilustração do m -th par burst de estímulo (LP) seguido por burst de resposta (PD). As séries temporais são transformadas em duas strings binárias em que cada bit é escolhido 1 ou 0 de acordo com a ocorrência de spikes, representado sobre(sob) o traço do neurônio LP(PD). A referência temporal (linha vertical sólida) é colocada no primeiro spike do burst do PD. O início e fim de burst do LP (s_{LP} and e_{LP}), e o fim de burst do PD (e_{PD}) são escolhidos através de estatísticas sobre toda a série temporal. Palavras de 5 bits são formadas começando a partir do posição i ou j das strings. A primeira palavra de estímulo $W^1_{LP,i,m}$ é composta pela sequencia de 5 bits começando na posição do ponteiro i . O parâmetro de re-amostragem k é usado para selecionar palavras a partir de bins maiores ($W^1_{LP,i,m}, W^2_{LP,i,m}, \dots, W^K_{LP,i,m}, \dots$), representando uma porção maior do burst. Valores de k muito pequenos (grandes) produzem palavras onde quase todos os bits são 0 (1), gerando valores baixos de entropia. $k=K$ corresponde ao conjunto de estímulos $S_i^K = \{W^K_{LP,i,1}, W^K_{LP,i,2}, \dots, W^K_{LP,i,m}, \dots, W^K_{LP,i,N}\}$ que maximiza a entropia. $L_{LP,i}$ ($L_{PD,j}$) é a duração da palavra associada ao conjunto de estímulo (resposta), isto é, o trecho do burst que S_i^K (or R_j^K) representa e pode variar ao longo do burst. **B**, Representação esquemática de gráficos da AMI: $AMI(S_i^K; R_j^K)$ é computada para todos os possíveis pares de ponteiros (i, j) de acordo com o procedimento descrito em A.

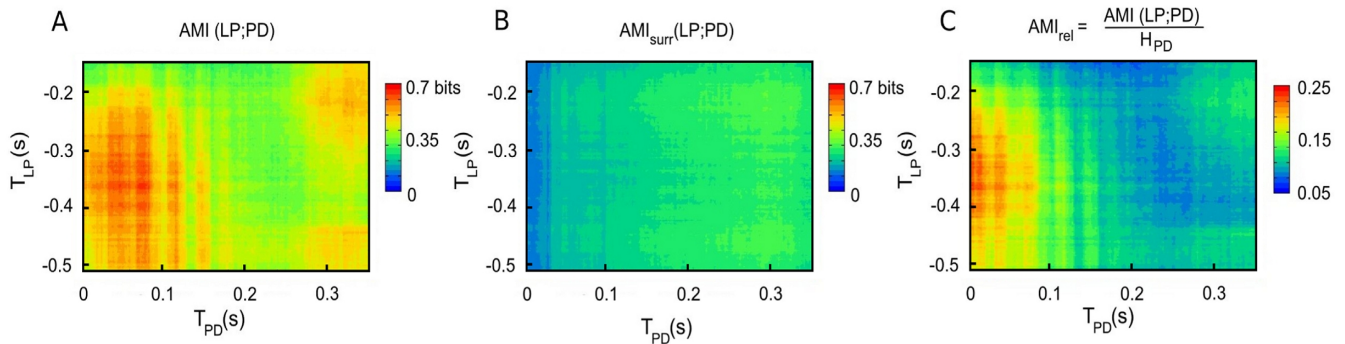


Fig. 3: Resultados preliminares de Informação Mútua Média (AMI). **A**, Matriz *AMI* obtida para LP → PD em bits. T_{LP} e T_{PD} (em segundos) são os índices que indicam a posição ao longo das rajadas dos neurônios. Como o primeiro disparo do PD é usado como referência de tempo, T_{PD} é sempre always positivo e T_{LP} negativo. Observa-se um pico de ~ 0.7 bits em (0.05, -0.35)s. **B**, *AMI* LP → PD usando dados surrogados, onde as rajadas do LP foram embaralhadas. A matriz obtida para o surrogado tem amplitudes muito menores, indicando que o pico observado em A é devido à causalidade entre as rajadas do LP e do PD: o PD altera seu padrão de disparo em uma rajada de acordo com o padrão da última rajada do LP. **C**, $AMI_{rel} = AMI/H_{PD}$ onde podemos observar que 25% da capacidade de codificação do PD é usada para codificar os estímulos do LP no pico de AMI. Extraída de Brochini et al., 2011.

As principais escolhas que tem que ser feitas neste protocolo de análise são:

- O número de bins que usaremos para construir as palavras;
- O tamanho dos bins (que é feita automaticamente);
- A referência local de tempo para se extrair as palavras.

Para um determinado número de bins, escolhamos o tamanho dos bins de modo a maximizar maximizar a entropia da distribuição de palavras. Isto pode ser interpretado como uma forma de maximizar a variabilidade deste conjunto, sem inserir bins redundantes (bins muito pequenos) nem causar perda de informação de spikes (bins muito longos). Tentamos assim obter conjuntos de palavras com a maior aleatoriedade possível, de modo a não introduzir nenhuma tendência durante a análise. Obtemos a entropia máxima deste conjunto para o número fixo de bins e dividimos este valor pela duração da palavra em tempo, obtendo assim o ganho de informação em bits/s. Repetimos a análise para diferentes

números de bits e escolhemos aquele que apresenta o maior ganho de informação. Infelizmente não conseguimos utilizar métodos baseados na maximização da entropia para determinar os melhores valores para outros parâmetros do problema, como é o caso da referência de tempo para extrair os padrões.

As oscilações do CPG pilórico biológico são apenas aproximadamente periódicas, o que significa que existe uma pequena variabilidade no “período” de um “ciclo” pilórico a cada rajada. Como o início do disparo do marca-passo é importante para várias partes do CPG, resolvemos adotá-lo inicialmente como uma “referência natural” no processo de análise. Entretanto, adotando esta referência a distribuição de disparos do PD apresenta uma grande reprodutibilidade inicial que vai diminuindo a cada novo disparo (Figura 4A), enquanto a distribuição de disparos do LP não apresenta nenhuma estrutura bem definida (Brochini et al., 2011). Tal comportamento seria exatamente o oposto se colocássemos a referência no primeiro disparo do LP (Figura 4B). Ou seja, o neurônio que não é usado como referência tem sua distribuição de disparos distorcida pela variabilidade do intervalo entre o primeiro disparo do LP do PD.

Em um trabalho recente foi introduzido o conceito de “centro de massa” de uma rajada de disparos (Lago-Fernández *et al.*, 2009). O centro de massa seria uma referência local, na qual o se obteria o melhor alinhamento de disparos entre as diversas rajadas de um mesmo neurônio (Figura 4C e 4D). Assim, este referencial é calculado de forma a maximizar a qualidade do alinhamento, evitando a deterioração da distribuição de disparos que acontece ao se alinhar diversas rajadas a partir do primeiro disparo de cada uma. Esta maximização é feita com uma mudança de referencial, ou seja, o novo referencial da i -ésima rajada será dado em termos do antigo por:

$$t_i^{novo} = t_i^{antigo} + O_i$$

Em termos matemáticos, são definidos como variáveis aleatórias os tempos de ocorrência do j -ésimo disparo em relação a uma referência previamente escolhida, e encontra-se a mudança de referencial necessária para minimizar a soma do desvio padrão destas variáveis aleatórias:

$$S = \sum_{j=1}^k \sigma_{\hat{t}(j)} \cdot$$

No caso de um número constante de disparos/rajada, o “deslocamento temporal” encontrado é simplesmente a mudança de coordenadas para o “centro de massa” do sistema, considerando cada disparo como uma partícula de massa m . Em um caso mais geral, é definida um “rajada ideal”, que deve conter o maior número possível de spikes, e subtraímos o tempo de cada disparo da média do disparo respectivo da “rajada ideal”, caso este exista. A correção temporal da i -ésima rajada é dada por:

$$o_i = \frac{1}{k_i} \sum_{j=1}^{k_i} t_i^{(j)} - \frac{1}{k_i} \sum_{j=1}^k z_j \mu_j .$$

Sendo:

- k_i : número de disparos da i -ésima rajada;
- k : número de disparos da rajada ideal;
- $t_i^{(j)}$: instante do j -ésimo disparo da i -ésima rajada no referencial antigo;
- z_j : vale 1 caso o j -ésimo disparo exista, 0 caso contrário;
- μ_j : instante do j -ésimo disparo na rajada ideal.

Neste projeto de IC iremos alterar as rotinas de codificação e extração de padrões para obter os resultados de AMI utilizando o referencial do centro de massa das rajadas dos neurônios e comparar estes resultados com os previamente obtidos usando o primeiro disparo do marca-passo como referência. Nessa nova análise aparecerá um novo resultado a ser considerado: a distância entre os centros de massa das rajadas do LP e do LP em cada par de rajadas.

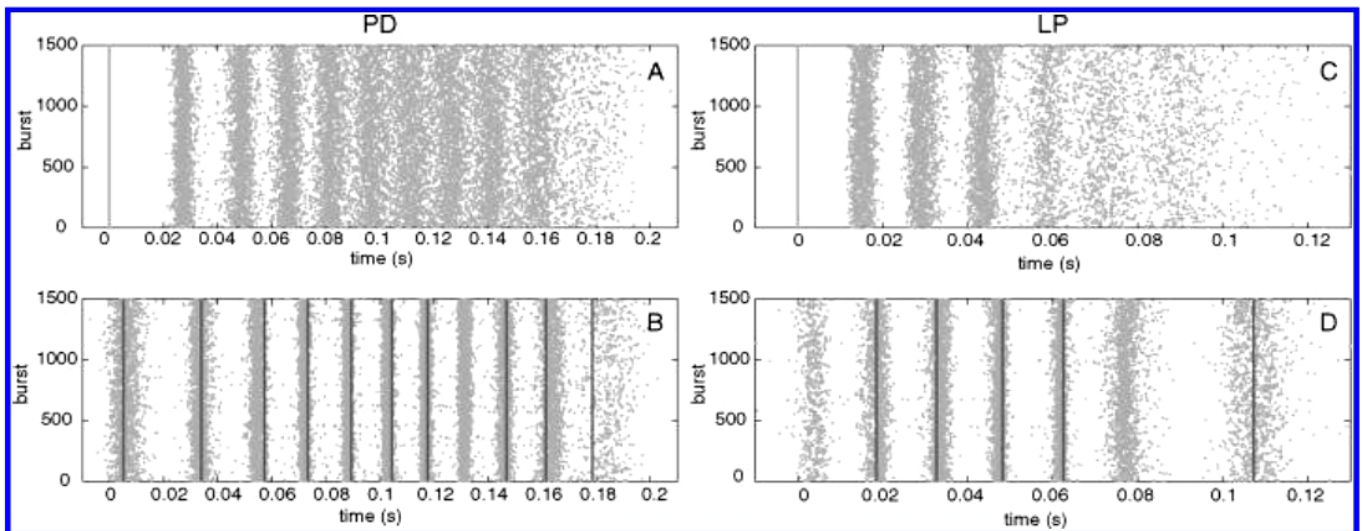


Fig. 4: Raster-plot obtido com 1500 rajadas dos neurônios LP e PD. Em A e C foi utilizado o método de alinhamento pelo primeiro disparo da rajada. Em B e D as rajadas foram alinhadas usando o método do centro de massa. (Adaptada de Lago-Fernández *et al.*, 2009).

4. Proposta de Trabalho e Cronograma (agosto/2011 a dezembro/2012)

O estudante encontra-se no quarto ano do curso de Bacharelado em Ciências Físicas e Biomoleculares e deverá concluir sua graduação ao final de 2012, de acordo com o planejamento realizado entre orientador e aluno. O presente projeto foi redigido para ser executado de agosto/2011 ao final de 2012.

No primeiro semestre, o aluno se dedicará principalmente ao aprendizado da preparação biológica, sendo que, ao final deste período, deve ser capaz de adquirir os próprios dados para posterior análise.

No segundo semestre, de acordo com o planejamento realizado, o aluno estará em São Paulo realizando disciplinas optativas relacionadas à Neurociência e Modelagem Matemática de sistemas, e irá alterar os programas de análise de dados para analisar os dados obtidos no primeiro semestre.

No terceiro semestre, o estudante deverá concluir suas análises e participar da elaboração de um artigo científico com seus resultados.

5. Referências

- Borst, A., & Theunissen, F. E. (1999) Information theory and neural coding. *Nat. Neurosci.* **2**, 947-57.
- Brochini, L., Carelli, P. V. , and Pinto, R. D. (2011) Single synapse information coding in intraburst spike patterns of Central Pattern Generator motor neurons. *J. Neurosci*, submetido – fase final de revisão c/ referees.
- Destexhe A, Marder E. (2004) Plasticity in single neuron and circuit computations. *Nature* **431**, 789-95.
- Izhikevich EM. (2000) Neural excitability, spiking and bursting, *Int. J. Bif. and Chaos* **10**, 1171-1266.
- Lago-Fernández LF, Szücs A, Varona P. (2009) Determining Burst Firing Time Distributions from Multiple Spike Trains. *Neural Comput* **21**, 973-990.
- Marder E, Calabrese RL. (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* **76**, 687-717.
- Marder E, and Bucher D. Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs. *Annu. Rev. Physiol.* **69**:291-316, 2007.
- Mulloney B, and Selverston AI. Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. *J. Comp. Physiol.* **91**:1-32,1974.
- Nowotny T, Szücs A, Pinto RD, Selverston AI (2006) StdpC: A modern dynamic clamp. *J Neurosci Methods* **158**, 287–299.
- Pinto RD, Elson RC, Szücs A, Rabinovich MI, Selverston AI, Abarbanel HDI (2001) Extended dynamic clamp: controlling up to four neurons using a single desktop computer and interface. *J Neurosci Methods* **108**, 39-48.
- Pinto, RD (2005), “Do Caos a Dinâmica Não Linear de Redes Neurais Biológicas: a implantação de uma nova linha de pesquisa no LFNL-IFUSP”, Tese de livre docência. Universidade de São Paulo – Instituto de Física.
- Selverston AI, Russell DF, Miller JP, King DG (1976) The stomatogastric nervous system: structure and function of a small neural network. *Prog Neurobiol.* **7**:215–290.

Selverston AI, Moulins, M. (1985) Oscillatory neural networks. *Annu Rev Physiol*, **47**, 29-48.

Selverston AI, Rabinovich MI, Abarbanel HD, Elson R, Szucs A, Pinto RD, Huerta R and Varona P. (2000) Reliable circuits from irregular neurons: a dynamical approach to understanding central pattern generators. *J Physiol Paris* **94**, 357-374.

Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Systems Tech J* 27:379-423.

Stein PSG, Grillner S, Selverston AI and Stuart DG (1997) *Neurons, Networks, and Behavior*. Cambridge, MA, MIT Press.

Theiler J, Eubank S, Longtin A, Galdrikian B, Farmer JD (1992) Testing for nonlinearity in time series: the method of surrogate data. *Physica D* **58**: 77-94.

São Paulo, 12 de julho de 2011

Rafael Tuma Guariento

Reynaldo Daniel Pinto

orientador

Anexo 1 – Expressões básicas da Teoria da Informação:

Apesar de terem adquirido sua popularidade com o emblemático trabalho de Claude Shannon, em 1948, os conceitos que originaram a teoria da informação foram sendo desenvolvidos de maneira gradual desde 1928, por R. V. L. Hartley. Alguns anos mais tarde, Norbert Wiener percebeu um aspecto fundamental da comunicação que está presente em todo o trabalho de Shannon: A comunicação é um processo intrinsecamente probabilista, ou seja, a informação está contida nas mensagens menos prováveis. Esta observação permite medir a informação que é transmitida em um dado canal por meio de análises estatísticas.

Em termos de definições matemáticas, o *conteúdo de informação* de uma variável aleatória é dado por:

$$i(x) \stackrel{\text{def}}{=} \log_2 \frac{1}{P(x)} .$$

Há dois pontos importantes que devem ser observados nesta definição:

- Ela satisfaz a noção intuitiva de mensagens mais improváveis conterem mais informação
- O conteúdo de informação de duas variáveis aleatórias (mensagens) independentes é aditivo:

$$i(x, y) = \log_2 \frac{1}{P(x, y)} = \log_2 \frac{1}{P(x)P(y)} = \log_2 \frac{1}{P(x)} + \log_2 \frac{1}{P(y)} = i(x) + i(y) .$$

A base do logaritmo é arbitrária. O uso da base binária se deve a uma maior facilidade no tratamento computacional. Nesta base, a unidade de informação é denominada *bit*.

Outro conceito de fundamental importância da teoria da informação é a chamada *entropia*

informacional de Shannon. A entropia de uma variável aleatória possui diversas interpretações:

- O número de bits necessários para escrever qualquer estado possível desta variável. (Ex: Uma moeda tem 2 estados possíveis $\rightarrow H(X) = 1$);
- A variabilidade dos estados possíveis;
- A informação média obtida da observação da variável aleatória.

Esta última interpretação fornece justamente a definição matemática da entropia informacional:

$$H \stackrel{\text{def}}{=} \langle i(x) \rangle = - \sum_i p_i \log_2 p_i .$$

Na aplicação da teoria da informação proposta neste projeto, iremos considerar o sinal do neurônio LP como um sinal de “estímulo” ou “pergunta” e o sinal do neurônio PD como “resposta” (conjuntos S e R obtidos com os padrões extraídos dos disparos das rajadas, conforme representado na Figura 2). Assim, é conveniente também utilizar o conceito de informação mútua, como forma de encontrar como o padrão produzido por um neurônio é capaz de modificar o comportamento do neurônio subsequente. A *Informação mútua* entre um estímulo s e uma resposta r é dado por:

$$i(s, r) \stackrel{\text{def}}{=} \log_2 \left(\frac{P(s, r)}{P(s)P(r)} \right) .$$

Observe que nesta definição, no caso em que a resposta é completamente independente do estímulo, a informação mútua entre eles é nula, conforme esperado.

Assim, também podemos definir o conceito de *Informação mútua média* (AMI) entre todos os possíveis pares de estímulo e resposta:

$$AMI(S, R) = \sum_{s,r} p(s, r) i(s, r) .$$