

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**Analisi con tecniche lineari e non
lineari di segnali elettrofisiologici
del bulbo olfattivo in un modello
murino di disabilità intellettiva**

Laureando:

Francesco Bettin

Relatore:

Ch.mo Prof. Giovanni Sparacino

Correlatori:

Ch.ma Prof.ssa Claudia

Lodovichi

Dott.ssa Maria Rubega

MCCXXII

Anno Accademico 2019/2020

"Non il possesso della conoscenza, della verità irrefutabile, fa l'uomo di scienza, ma la ricerca critica, persistente e inquieta, della verità."

Karl Popper

Sommario

Tra i geni associati alla disabilità intellettiva, l'Oligofrenina-1 (OPHN1) codifica per una proteina che regola diversi processi di sviluppo cellulare. Le oscillazioni neuronali hanno un ruolo chiave nei processi sensoriali e cognitivi ed una loro alterazione è spesso associabile a deficit cognitivi. In questo lavoro di tesi, svolto nell'ambito di una collaborazione tra il Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione (DEI) e l'Istituto Veneto di Medicina Molecolare (VIMM), si sono analizzate delle registrazioni elettrofisiologiche in vivo di Local Field Potentials (LFP) nel bulbo olfattivo in un modello murino portatore di una specifica mutazione genetica (OPHN1) e nei relativi casi di controllo non portatori della mutazione. In tali animali il bulbo olfattivo presenta una vasta gamma di fenomeni oscillatori osservabili e presenti sia durante l'attività neuronale spontanea sia in risposta a stimoli sensoriali, in cui si possono provare e quantificare le conseguenze della mutazioni di OPHN1. Lo scopo ultimo del progetto in cui la tesi si inserisce è comprendere l'impatto di OPHN1 sull'attività dei circuiti neuronali, a livello sistemico, in vivo. Per raggiungere questo obiettivo si sono studiate le oscillazioni nel bulbo olfattivo, in animali svegli e liberi di muoversi, sia in fase di riposo (resting) sia mentre l'esemplare annusava l'ambiente circostante (sniffing). Si sono analizzate registrazioni elettrofisiologiche relative a quattro animali sani e tre portatori della mutazione. L'analisi quantitativa delle registrazioni è stata effettuata utilizzando due approcci complementari: l'analisi lineare (densità spettrale di potenza, centroide e potenza relativa) e l'analisi non lineare con indici di entropia (Lempel-Ziv, Sample Entropy, Empirical Permutation Entropy) ed indici frattali (la dimensione frattale di Higuchi, i Residui e la Tortuosità). L'analisi dei risultati ha mostrato che l'attività di sniffing comporta, sia negli animali sani sia nei mutati, un incremento della complessità del segnale rispetto al resting. Gli indici di Lempel-Ziv e Sample Entropy, come l'analisi delle potenze relative, si sono dimostrati capaci di evidenziare le differenze tra le due classi di modelli animali, mostrando come il modello murino portatore della mutazione abbia più difficoltà nell'eseguire i task, rispetto al sano. La tesi è strutturata in cinque capitoli. Nel primo capitolo, si introducono il bulbo olfattivo ed i LFP che lo caratterizzano. Nel secondo capitolo, si descrive il database, il setup sperimentale utilizzato e gli algoritmi di pre-elaborazione dei dati. Nel terzo capitolo, si presentano le tecniche di analisi lineare. Nel quarto capitolo, si illustrano le tecniche di analisi non lineare. Infine, nel quinto capitolo si presentano i risultati ottenuti e se ne propone un'interpretazione biologica.

Indice

1	I Local Field Potentials (LFP) per lo studio del sistema olfattivo mediante modello animale	7
1.1	I Local Field Potentials (LFP)	7
1.2	Il sistema olfattivo	8
1.2.1	L'epitelio olfattivo	9
1.2.2	Il bulbo olfattivo	9
1.3	Descrizione dei Local Field Potentials e divisione in bande di frequenza	14
1.4	Disabilità intellettiva e ruolo del gene OPHN1	16
1.5	Scopo della tesi	17
2	Protocollo sperimentale e Pre-processing	19
2.1	Setup sperimentale	19
2.2	Pre-elaborazione dei dati	23
2.2.1	Primo step	23
2.2.2	Secondo step	27
3	Analisi lineare: metodi e risultati	31
3.1	Metodologie utilizzate	31
3.2	Metodo di Welch	34
3.3	Risultati	37
3.4	Conclusioni sull'analisi lineare	41
4	Analisi non lineare: metodi e risultati	43
4.1	Indice di Lempel-Ziv	43
4.2	Indice di Sample Entropy	44
4.3	Indice di Empirical Permutation Entropy	45
4.4	Indici frattali	47
4.5	Risultati	49
4.6	Conclusioni sull'analisi non lineare	56
5	Conclusione e sviluppi futuri	57
5.1	Conclusione	57
5.2	Sviluppi futuri	58
	Bibliografia	61

Capitolo 1

I Local Field Potentials (LFP) per lo studio del sistema olfattivo mediante modello animale

1.1 I Local Field Potentials (LFP)

L'attività elettrica cerebrale può essere monitorata con vari metodi quali Elettroencefalogramma (EEG), Elettrocorticogramma (EcoG). Queste tecniche hanno una risoluzione spaziale contenuta, che può essere incrementata in funzione del numero di elettrodi utilizzati per l'acquisizione. I Local Field Potentials (LFP), invece, sono segnali ottenuti da una registrazione elettrofisiologica del potenziale in una specifica area cerebrale, in vivo. Sono frutto della sovrapposizione di più contributi, quali flussi ionici attribuibili a potenziali d'azione, fluttuazioni del potenziale di membrana di più modesta entità e contributi extracellulari [1,27].

Negli anni '50 si sono iniziati a studiare i LFP. In diversi studi svolti negli ultimi vent'anni si è dibattuto circa la loro vera natura ed è stato scoperto che il segnale risultante misurato dagli elettrodi impiantati è influenzato dalla funzione di filtri passa-basso e passa-alto dei neuroni che modulano il segnale finale [12]. Le maggiori differenze rispetto all'EEG, o all'EcoG, sono le dimensioni e il posizionamento degli elettrodi. EEG ed EcoG fanno uso di macro-elettrodi posizionati sullo scalpo e sulla superficie cerebrale rispettivamente, mentre per i LFP si impiegano dei micro-elettrodi impiantati in profondità nel tessuto cerebrale ed il segnale acquisito non si riferisce dunque ad un'ampia regione neuronale, bensì ad un volume sferico dal raggio di circa $200 \mu m$ attorno all'elettrodo [18].

1.2 Il sistema olfattivo

In questo studio si è studiata l'attività elettrica neuronale e le oscillazioni di un'area cerebrale specifica, il bulbo olfattivo, mediante registrazioni di LFP ed analisi del segnale, in condizioni fisiologiche ed in modelli patologici. Il bulbo olfattivo presenta un'organizzazione in strati ben definiti, in cui gli input, output ed interneuroni possono essere facilmente identificati. Il bulbo olfattivo offre pertanto un modello in cui l'analisi dell'attività elettrica neuronale può essere dissezionata a fondo. Il sistema olfattivo nei roditori, come per la

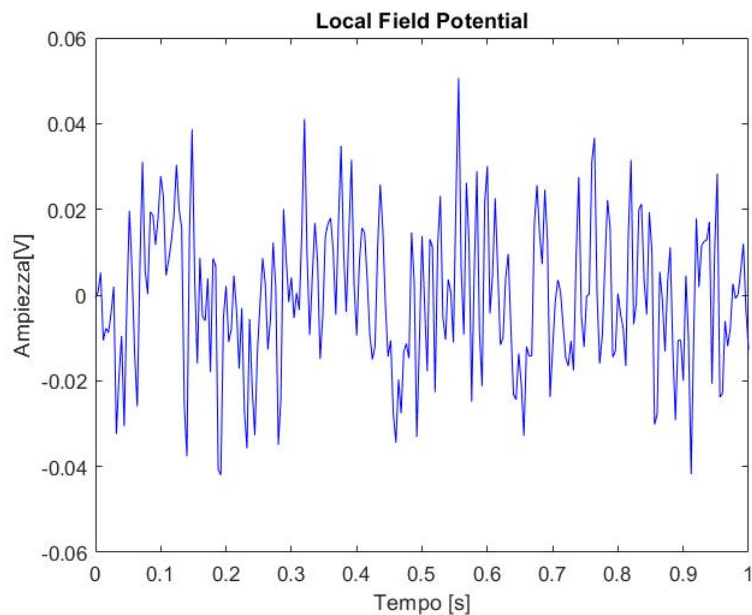


Figura 1.1: Frammento di 1 s di un Local Field Potential registrato durante lo stato di riposo (*resting*) (filtrato e ripulito dagli artefatti).

maggior parte degli animali, è un sistema altamente sviluppato e sofisticato, in grado di rilevare e discriminare migliaia di odori presenti nell'ambiente anche a concentrazioni molto basse. La maggior parte degli animali si basa sugli odori per funzioni vitali, quali procacciarsi il cibo, identificare prede e predatori. Nell'uomo l'olfatto è molto meno sviluppato, ma rimane una modalità sensoriale di notevole interesse per studiare il cervello e le sue patologie, per numerose ragioni:

- La struttura anatomico-funzionale del sistema olfattivo è altamente conservata tra specie anche molto lontane, dalla *Drosophila* all'uomo [1,26];
- Il bulbo olfattivo ha un notevole grado di plasticità [1,27];
- Molti dei geni associati a patologie umane sono altamente espressi nel sistema olfattivo [17,25,27];
- Permette di studiare sia processi sensoriali sia cognitivi. Gli odori sono infatti in grado di richiamare vivide memorie di eventi passati anche nell'uomo, date le estese connessioni tra bulbo olfattivo, aree olfattive ed ippocampo [14,27].

1.2.1 L'epitelio olfattivo

L'epitelio olfattivo, situato nella parte posteriore della cavità nasale, contiene i neuroni sensoriali olfattivi. Il neurone sensoriale è un neurone bipolare che comprende un unico dendrita il quale presenta delle cilia che protrudono nelle cavità nasali. Sulla superficie di queste strutture filiformi sono espressi i recettori olfattivi che vengono in contatto con gli odori trasportati per via aerea all'interno della cavità nasale. Questi neuroni hanno un soma piccolo ($[10-15]$ μm) da cui si diparte l'assone che raggiunge il bulbo olfattivo, la prima stazione di rielaborazione dell'informazione sensoriale.

Ogni neurone sensoriale olfattivo esprime un solo tipo di recettore olfattivo, in un repertorio di più di mille recettori. A livello di epitelio olfattivo non vi è una vera e propria organizzazione topografica, ma neuroni esprimenti lo stesso recettore sono confinati in una certa area dell'epitelio, assieme a neuroni esprimenti recettori olfattivi diversi.

È importante notare che i neuroni sensoriali olfattivi si rigenerano costantemente, per tutta la vita dell'individuo a partire da precursori, le cellule basali, poste nella porzione più profonda dell'epitelio olfattivo [13,22].

1.2.2 Il bulbo olfattivo

Il bulbo olfattivo, una protuberanza del prosencefalo, è la prima stazione di ritrasmissione dell'informazione olfattiva. Ha una struttura organizzata in strati ben definiti, in cui possono essere facilmente identificati gli input, gli output e gli interneuroni. Questo facilita lo studio delle dinamiche dei circuiti neuronali sottese all'elaborazione dell'informazione sensoriale e come queste possano essere alterata in caso di patologia.

Da un punto di vista sperimentale, il facile accesso al bulbo olfattivo, che nei roditori è posto tra gli occhi, costituisce un vantaggio ulteriore. Con una chirurgia piuttosto semplice è possibile esporre la superficie dei bulbi olfattivi e inserire elettrodi alla profondità desiderata in base ai segnali neuronali di interesse.

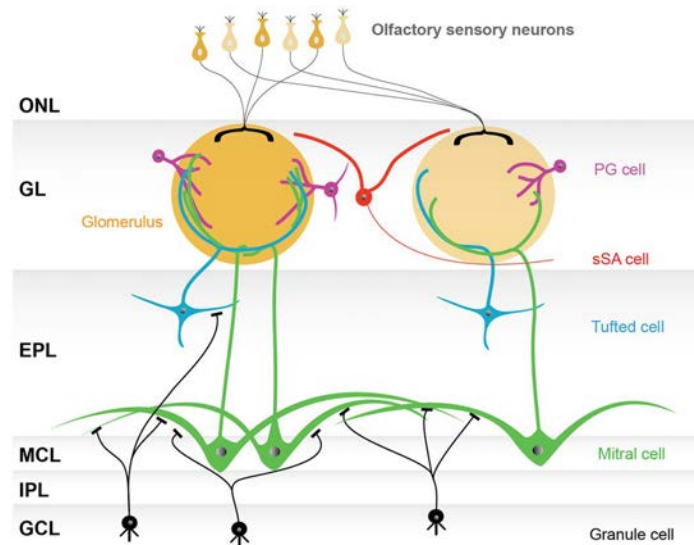


Figura 1.2: Configurazione stratificata del bulbo olfattivo, nel quale si possono riconoscere i principali componenti di input/output (tratta da [Nagayama & al, 2014]).

In figura 1.2 si può osservare la struttura del bulbo olfattivo, dove i diversi tipi cellulari sono organizzati in strati e zone ben definiti. Questa struttura rende piuttosto agevole la registrazione di segnali elettrici da una o più specifiche popolazioni cellulari, mediante il posizionamento di elettrodi nell'area di interesse [28].

Gli strati di cui è composto il bulbo olfattivo sono, dall'esterno verso l'interno:

- Lo strato del nervo olfattivo (ONL);
- Lo strato dei glomeruli (GL);
- Lo strato plessiforme esterno (EPL);
- Lo strato delle cellule mitrali (MCL);
- Lo strato plessiforme interno (IPL);
- Lo strato delle cellule dei granuli (GCL);

Si possono individuare nella configurazione morfologica del bulbo tre categorie di elementi: input, output ed interneuroni.

Gli elementi di input sono rappresentati dagli assoni dei neuroni sensoriali che nell'insieme costituiscono il nervo olfattivo (ONL), il quale occupa lo strato più esterno del bulbo. Mentre nell'epitelio olfattivo non vi è una vera e propria organizzazione topografica, una specifica distribuzione spaziale si ha invece nel bulbo olfattivo, dove tutti i neuroni che esprimono lo stesso tipo di recettore olfattivo convergono a formare glomeruli in specifiche posizioni del bulbo olfattivo, dando luogo ad una vera mappa topografica.

I glomeruli sono strutture sferiche formate dai contatti sinaptici tra gli assoni dei neuroni sensoriali e i dendriti delle cellule post-sinaptiche del bulbo.

Gli elementi di output sono costituiti dalle cellule mitrali e *tufted*. Le cellule mitrali sono i principali output del bulbo ed i loro corpi cellulari occupano uno

strato ben definito (MCL), situato tra 200 e 400 μm di profondità nel bulbo. Ciascuna cellula mitrale presenta un singolo dendrita apicale che si estende all'interno di un solo specifico glomerulo, e dendriti laterali che si estendono lungo lo strato plessiforme esterno (EPL). I loro assoni formano invece il tratto olfattivo laterale e si diramano in regioni cerebrali più elevate [35].

Le cellule *tufted* si distinguono a seconda della posizione del loro corpo cellulare che può essere vicino alle mitrali, vicino ai glomeruli o nel EPL. Anch'esse hanno un unico dendrita apicale dentro un unico glomerulo e dendriti laterali che si estendono nel EPL. Gli assoni delle *tufted cell* contribuiscono a formare il tratto laterale olfattivo e si portano ad aree cerebrali più elevate, quali la corteccia [35].

Gli interneuroni sono rappresentati dalle cellule periglomerulari, una famiglia di cellule mista sia in termini morfologici che in termini di neurotrasmettitore e dalle *granule cell*. Le cellule periglomerulari sono rappresentate dalle cellule omonime e dalle *short-axon cells* e sono organizzate attorno ai glomeruli. Le cellule periglomerulari si rigenerano costantemente a partire da precursori localizzati lungo la parete dei ventricoli laterali.

Le *granule cell* sono la classe più grande di neuroni inibitori GABAergici del bulbo olfattivo, anch'esse si rigenerano costantemente dai precursori situati nei ventricoli laterali. Sono prive di assone, ma presentano dendriti apicali e basali. Hanno un corpo cellulare da cui si diramano dendriti basali. I loro dendriti sono provvisti delle cosiddette spine dendritiche, a differenza dei dendriti delle cellule mitrali e *tufted*, che non ne hanno [24].

I glomeruli olfattivi rappresentano delle unità funzionali che ricevono l'informazione sensoriale da uno specifico sottogruppo di neuroni sensoriali olfattivi, per poi trasferirla alle cellule post sinaptiche mitrali e *tufted*. Le cellule periglomerulari sono un primo livello di modulazione dell'informazione olfattiva, sebbene molto rimanga da capire di questo meccanismo. Le *granule cell* formano sinapsi dendo-dendritiche con i dendriti laterali delle mitrali e delle *tufted*; grazie a questa funzione, si verifica un processo di inibizione laterale che aumenta la specificità dell'elaborazione da parte della "colonna odorosa" definita dal glomerulo attivato. Le *granule cell* hanno inoltre un ruolo importante nella generazione delle oscillazioni Gamma; è stato visto infatti che il formarsi di queste oscillazioni avviene proprio alle sinapsi dendo-dendritiche tra cellule mitrali e *granule cell* [35,36].

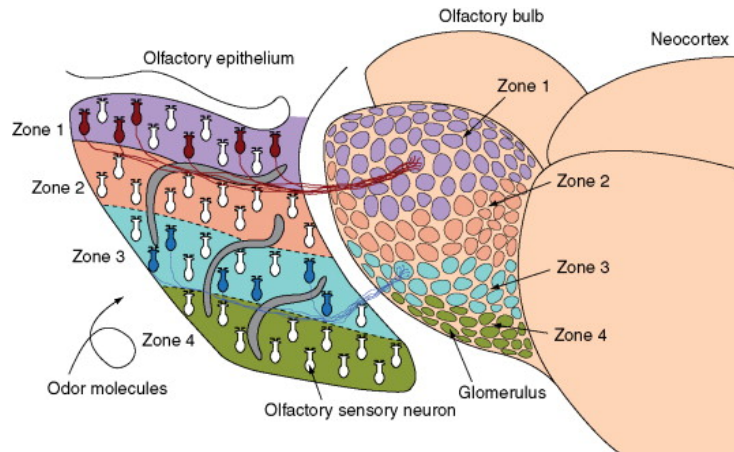


Figura 1.3: Schema generale della struttura anatomica della regione bulbare con dettaglio sulla zona dei neuroni sensoriali. Si può riconoscere inoltre, dalla mappa colori, come nell'epitelio non sia presente una vera organizzazione topografica, ma solo una grossolana suddivisione in zone lungo l'asse dorso-ventrale che hanno un loro corrispettivo in zone del bulbo. Una vera mappa topografica si ha solo nel bulbo olfattivo, dove assoni di neuroni sensoriali esprimenti uno stesso recettore olfattivo formano glomeruli in specifiche posizioni di ciascun bulbo olfattivo (tratta da [Mori & al, 2005]).

A prova dell'incredibile livello di interconnessione presente all'interno del bulbo olfattivo, è stato visto che, come ogni neurone sensoriale che entra nello stesso glomerulo esprime lo stesso recettore sensoriale, così le cellule mitrali collegate allo stesso glomerulo, e che sono solitamente spazialmente vicine tra loro, tendono ad avere un comportamento simile in termini di risposta agli stimoli. Questo può quindi creare delle zone ben definite di attivazione che entrano in funzione solo in seguito ad uno specifico input sensoriale. Grazie a questo è dunque possibile studiare delle specifiche zone del bulbo, attivandole con l'input desiderato [12].

È facile dunque intuire la complessità dell'organizzazione sinaptica del bulbo e pertanto, anche una piccola anomalia della rete neuronale, come nel caso dei modelli animali portatori della mutazioni, può portare ad una situazione di malfunzionamento di tutto il distretto anatomico, osservabile mediante lo studio dei LFP [1,3,14].

Fino ad ora è stato illustrato quello che può definirsi meccanismo "down-top", ovvero che parte dallo stimolo odoroso captato dal nervo olfattivo e poi trasportato in profondità, attraverso i glomeruli e fino alla corteccia. Esiste tuttavia anche una componente "top-down", nella quale diverse afferenze da più parti della corteccia giungono nella regione bulbare ed influenzano l'elaborazione dello stimolo olfattivo.



Figura 1.4: In questa immagine si può vedere chiaramente la corteccia con, alla sua estremità superiore, la protuberanza del bulbo olfattivo. Durante l'operazione chirurgica una piccola porzione d'osso viene rimossa dalla zona sopra il bulbo olfattivo (tratta da [Pathbase, Necropsy of the Mouse]).

1.3 Descrizione dei Local Field Potentials e divisione in bande di frequenza

In riferimento a molti studi svolti negli ultimi dieci anni che definiscono il LFP come un segnale non propriamente "locale", il Local Field Potential è un segnale registrato extracellularmente, che riflette l'attività neuronale a livello di popolazione; misura l'attività cerebrale generata dalla somma di potenziali di membrana sotto soglia e potenziali post-sinaptici. Il segnale è quindi la misura di un voltaggio extracellulare che diminuisce in intensità all'aumentare della distanza dall'elettrodo [12,18].

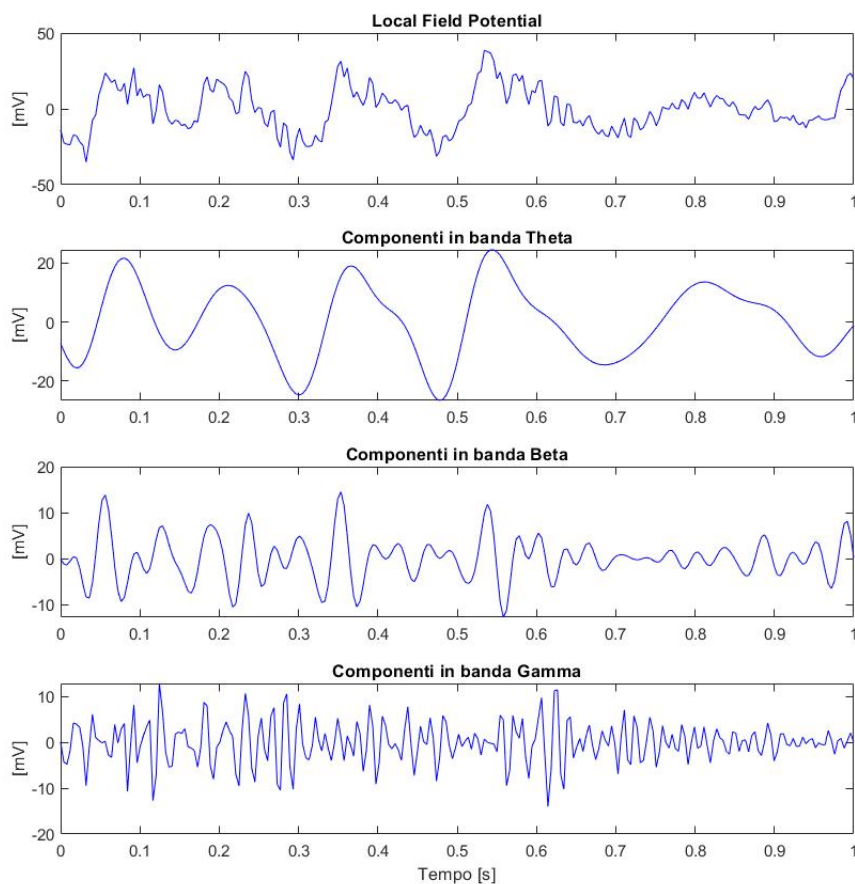


Figura 1.5: Divisione del LFP nelle sue bande di frequenza principali. Partendo dall'alto: segnale non filtrato, segnali in banda Theta ($[4-12]$ Hz), Beta ($[15-35]$ Hz), Gamma($[35-95]$ Hz).

Come si vede nella figura 1.5, un segnale misurato nel cervello presenta una vasta gamma di oscillazioni (attività coordinata di un gruppo di neuroni), nelle varie aree corticali e sottocorticali, storicamente distinte in base alla loro banda di frequenza in oscillazioni Delta, Theta, Alpha, Beta e Gamma.

Nell'uomo, le frequenze principali individuate sono le onde Delta ($[1-4]$ Hz), le onde Theta ($[4-8]$ Hz), le onde Alpha ($[8-13]$ Hz), le onde Beta ($[13-30]$ Hz) e le onde Gamma, divise in Gamma a bassa frequenza ($[30-70]$ Hz) e ad alta frequenza ($[70-150]$ Hz). Ognuna di queste "regioni di funzionamento" della rete neuronale sottende processi fisiologici di tipo sensoriale, cognitivo, motorio o esecutivo.

Nel bulbo olfattivo, oggetto di questo studio, si distinguono tre tipi di oscillazioni, riportate di seguito [1,4,15,27]:

- Onde Theta ($[4-12]$ Hz): queste oscillazioni riflettono il ritmo respiratorio dell'animale. Quando l'animale si trova in uno stato di riposo, corrispondente ad un ritmo respiratorio basale, queste oscillazioni si aggirano nel range $[1-4]$ Hz; si può notare invece l'aumento del ritmo respiratorio, fino a 12 Hz, quando l'animale annusa l'ambiente circostante. Sebbene sia noto che il ritmo Theta segua appunto il ciclo respiratorio, è poco chiaro il modo in cui esso si relazioni agli input sensoriali.
- Onde Beta ($[15-35]$ Hz): queste oscillazioni sono presenti in tutti quei processi che implicano la discriminazione ed il riconoscimento di odori. Per quanto concerne le loro origini, non è ben noto quale sia la regione anatomica che le genera, ma è noto che la rete neuronale che le origina si dirama oltre il bulbo e comprende anche la corteccia. Eliminando infatti le connessioni neuronali con quest'ultima, si osserva la scomparsa di tali oscillazioni.
- Onde Gamma ($[35-95]$ Hz): sono oscillazioni implicate in attività di apprendimento, discriminazione e memoria dello stimolo sensoriale. Sono suddivise principalmente in due gruppi. Le onde Gamma-2 ($[35-70]$ Hz) sono presenti in stati di vigilanza e comportamenti quali il grooming (atteggiamento ripetitivo con cui tendono a pulirsi). Le onde Gamma-1 ($[70-95]$ Hz) sono invece quelle evocate dallo stimolo olfattivo. È tuttavia opportuno essere cauti nel fare divisioni eccessivamente nette in frequenza perché le onde Beta e Gamma sono associate comunque all'elaborazione dello stimolo sensoriale ed a seconda del tipo di comportamento, del contesto e dello stato emotivo dell'animale, le frequenze di rilevanza possono variare. Anche per le Gamma, come per le Beta non è ben nota l'origine, ma sono implicate le sinapsi dendo-dendritiche tra cellule mitrali e *granule cell* [27,37]. Nonostante lo studio delle oscillazioni Gamma sia quello più approfondito dalla comunità scientifica, l'analisi di queste onde in un modello murino non anestetizzato è complessa perché in stato cosciente, il bulbo olfattivo esercita una maggior quantità di funzioni di captazione e cognitive [30].

1.4 Disabilità intellettiva e ruolo del gene OPHN1

Il gene Oligophrenin-1 (OPHN1) codifica per una proteina che regola le Rho-GTPasi. Queste sono una famiglia di proteine che esistono in due stati, uno inattivo che si realizza quando esse sono legate al guanosindifosfato (GDP), ed uno attivo, quando sono legate al guanosintrifosfato (GTP). Il passaggio tra lo stato attivo e lo stato inattivo di queste proteine è finemente regolato da molte proteine, tra cui OPHN1, come si può vedere in figura 1.6.

Le Rho-GTPasi ricoprono un importante ruolo nella regolazione dell'actina del citoscheletro cellulare, la quale è importante nei processi che regolano la morfologia del neurone in ogni suo aspetto.

Il gene OPHN1 è altamente espresso, sia in epoca natale che post-natale, in aree cerebrali caratterizzate da un'elevata plasticità sinaptica [17]. Mutazioni a carico di OPHN1 sono note portare ad alterazioni della morfologia neuronale ed in particolare delle spine dendritiche, siti di formazione di contatti sinaptici. Le alterazioni del numero e della forma delle spine dendritiche sono state riscontrate sia nei tessuti dei pazienti, che in modelli animali che esprimono mutazioni di OPHN1 [35,36]. Questi ultimi ricapitolano in gran parte le alterazioni neuronali osservate nei pazienti ed offrono uno strumento prezioso per capire l'impatto della perdita di funzione di OPHN1 a livello cellulare ed a livello di circuito neuronale. Alterazioni della connettività neuronale sono legate non solo ad alterazioni della struttura dei dendriti, ma anche a quella dell'assone, alla migrazione cellulare ed alla maturazione neuronale.

È stato inoltre riportato che la perdita di OPHN1, in un validato modello murino di OPHN1, porta a significative alterazioni del numero, della morfologia e della funzione dei neuroni GABAergici generati in epoca post-natale [26].

Sebbene siano molte le alterazioni associate alla perdita di OPHN1, il meccanismo sotteso alla disabilità intellettiva rimane in gran parte da chiarire.

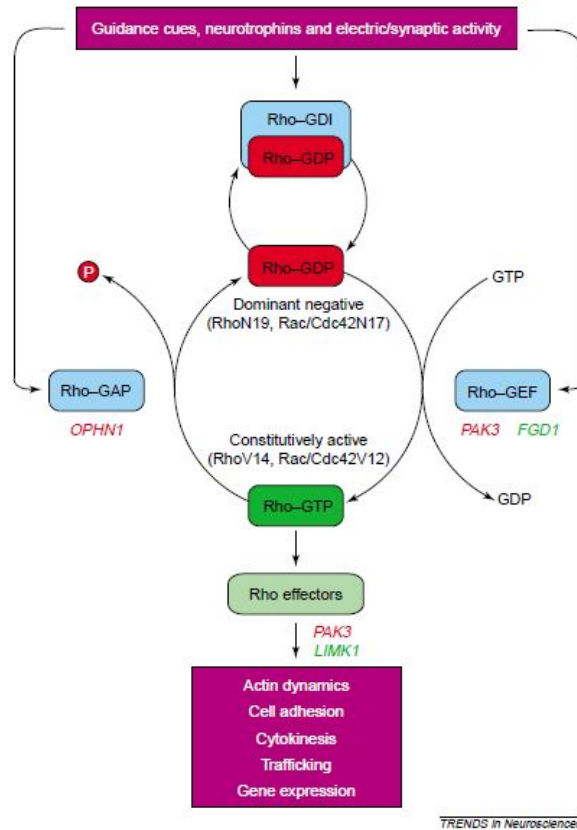


Figura 1.6: Schema riassuntivo del funzionamento delle Rho-GTPasi, con passaggio ciclico da stato attivo (Rho-GTP) a stato inattivo (Rho-GDP) [35].

1.5 Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è analizzare l'impatto che la mutazione di OPHN1 ha sull'attività e sulle oscillazioni neuronali. Si analizzeranno in particolare questi aspetti nel bulbo olfattivo di un modello murino di disabilità intellettiva (OPHN1). Si vuole in particolare osservare le differenze tra modelli murini portatori della mutazione di OPHN1 e rispettivi animali sani durante il resting, ovvero lo stato di riposo e lo sniffing, quando l'animale annusa l'ambiente. Per raggiungere questo scopo sono state effettuate registrazioni elettrofisiologiche di LFP, alle quali sono poi state applicate tecniche di analisi lineare e non lineare. L'analisi lineare è stata l'analisi spettrale con particolare dettaglio alle onde Gamma, perché sono le oscillazioni coinvolte nell'elaborazione sensoriale e cognitiva dell'informazione olfattiva, mentre l'analisi non lineare ha guardato l'utilizzo di indici di entropia ed indici frattali.

Capitolo 2

Protocollo sperimentale e Pre-processing

2.1 Setup sperimentale

Gli animali sono stati anestetizzati per effettuare l'impianto degli elettrodi con strumenti di precisioni in grado di impiantarli nel bulbo olfattivo alla profondità desiderata; questo è l'unico momento della fase sperimentale in cui l'animale viene trattato con anestetico. Dopo tre giorni necessari al recupero dall'operazione, è stato dato inizio alle registrazioni. Gli elettrodi sono stati collegati con una testina pre-amplificata, connessa poi ad un convertitore analogico/digitale e infine al computer che registrava il tracciato. La zona dell'impianto viene poi isolata al meglio e cementata, in modo che non possa essere intaccato o rimosso nulla durante la registrazione.

Le registrazioni elettrofisiologiche sono state effettuate in sessioni quotidiane di due ore al mattino e due al pomeriggio. Nell'analisi non si è fatta distinzione tra registrazioni effettuate in diverse ore del giorno, mentre si è fatta distinzione tra due comportamenti dei modelli murini: lo stare fermi (resting) e l'atto di annusare associato a stazionarietà o movimento (sniffing). Nessuna registrazione è stata effettuata nel periodo notturno.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva relativa ai modelli murini utilizzati con relativi giorni di registrazioni (in alcuni casi il topo è stato utilizzato per le registrazioni per più giorni di seguito) e il numero delle registrazioni conservate ed utilizzate; queste ultime sono indicate da un numero progressivo ed i numeri mancanti rappresentano registrazioni eliminate integralmente a causa di fattori che ne rendevano inutile l'utilizzo:

Topo	Giorno	Registrazione	Topo	Giorno	Registrazione
WT-1	30/10/19	[1,2,3]	OPHN1-1	29/07/19	[1,5]
	31/10/19	[1,2,5,6]		30/07/19	[3,5]
WT-2	11/11/19	[1,3]	OPHN1-2	31/07/19	[4,6]
	12/11/19	[3,5]		29/07/19	[4,6]
	13/11/19	[3,6]		30/07/19	[2,4]
WT-3	11/11/19	[2,4]	OPHN1-3	31/07/19	[3,5]
	12/11/19	[4]		26/08/19	[2,5]
	13/11/19	[5,7]		27/08/19	[1,3,4]
WT-4	18/11/19	[4,12]	OPHN1-4	18/11/19	[3,11]
	19/11/19	[2,5]		19/11/19	[3,7]
	20/11/19	[6]		20/11/19	[5,7]

Tabella 2.1: Schema riassuntivo dei modelli murini utilizzati. Nella colonna di sinistra i modelli sani (WT), nella colonna di destra i portatori della mutazione (OPHN1).

Iniziate le sessioni di registrazione dopo il periodo di recupero dall'operazione, il modello murino è stato collocato all'interno di una piccola arena cubica in metacrilato i cui lati sono stati oscurati in modo che in fase di registrazione il modello murino non venisse distratto, influenzato o spaventato dall'ambiente circostante. Al di sopra dell'arena è stata collocata, con un sostegno, una videocamera utilizzata per inquadrare dall'alto e registrare i movimenti del modello murino per tutta la durata della registrazione, mentre il suo impianto è stato collegato agli strumenti di acquisizione dei dati.

Tra questi si ha un amplificatore di segnale e un software creato ad hoc, installato all'interno di un pc predisposto alle registrazioni elettrofisiologiche. Il software, creato con l'utilizzo del programma "LabVIEW", consente di osservare in tempo reale il segnale in acquisizione e permette eventualmente di interrompere l'operazione in caso si notino andamenti strani o affetti da troppo rumore.



Figura 2.1: setup sperimentale iniziale.

In figura 2.1 è possibile osservare il setup sperimentale adottato. Nel corso delle sperimentazioni sono stati adottati dei progressivi miglioramenti al fine di ottenere dei tracciati elettrofisiologici il più possibile privi di artefatti. Tra questi accorgimenti c'è stata una maggior attenzione nell'isolamento degli impianti nel bulbo in fase di chirurgia ed una maggior attenzione al posizionamento dei cavi di collegamento. Si è deciso poi di utilizzare una gabbia di Faraday costruita su misura dell'arena, in modo che al suo interno non ci fossero fenomeni elettrici che generassero artefatti nel segnale acquisito. La decisione di cementare l'impianto sulla testa dell'animale ha limitato gli artefatti da movimento.

La gabbia di Faraday è un sistema generico, costituito da un materiale conduttore di corrente (nel caso del setup, lega d'acciaio) in grado di isolare una zona volumetrica determinata. L'applicazione del teorema di Gauss ai campi elettrici evidenzia che se all'interno della cavità circoscritta dalla gabbia non sono presenti cariche elettriche, il flusso del campo elettrostatico sulla superficie interna della gabbia dev'essere nullo e quindi è nullo il campo elettrostatico all'interno della cavità.



Figura 2.2: Setup sperimentale definitivo.

In figura 2.2 si può osservare come la gabbia di Faraday isola l'arena al suo interno. In aggiunta, tutta la strumentazione è stata trasferita su un banco da laboratorio con funzione di assorbimento delle vibrazioni, in modo che ogni elemento, in particolare la strumentazione di acquisizione, fosse isolato dall'ambiente circostante in termini di sollecitazioni meccaniche.

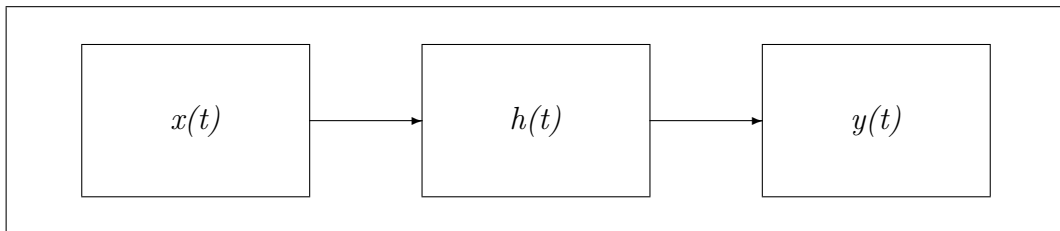
2.2 Pre-elaborazione dei dati

L'attività di pre-elaborazione dei dati acquisiti dagli strumenti di laboratorio può essere divisa in due punti.

Ogni registrazione ha la durata media di circa *90 min*, ma il software di acquisizione, man mano che registra il segnale elettrofisiologico, lo suddivide in pacchetti denominati "*Rec_*.dat*", ove l'asterisco è un numero intero progressivo; ogni frammento ha la durata di un minuto ed essendo la frequenza di campionamento $F_s=10\text{ kHz}$ si hanno frammenti di *600000* campioni.

2.2.1 Primo step

Il primo passo è quello di ricostruire integralmente la registrazione riunendo tutti i frammenti generati dal software. In aggiunta, prima dell'unione, ogni segmento viene filtrato e sotto-campionato. Il filtro applicato è un filtro di tipo passa-banda realizzato con la messa in cascata di un filtro passa-basso ed un passa-alto [6]. Una volta specificate le proprietà desiderate, si calcola l'ordine ottimo del filtro e successivamente numeratore e denominatore della funzione di trasferimento che lo definisce.



Un filtro è rappresentabile con lo schema appena proposto e, nota la funzione $x(t)$, il risultato del filtraggio $y(t)$ è definito dal prodotto di convoluzione con la funzione $h(t)$.

La risposta in frequenza dei filtri progettati è quindi la seguente:

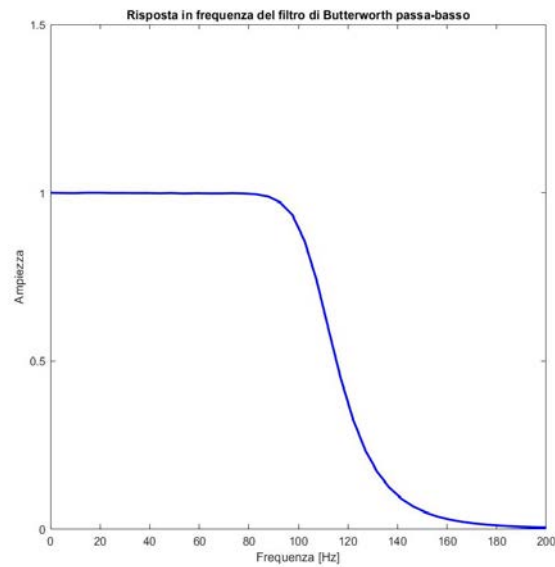


Figura 2.3: Risposta in frequenza del filtro di Butterworth passa-basso con taglio a 100 Hz e diminuzione graduale fino a 150 Hz. L'andamento decrescente è poco accentuato per evitare ordini del filtro troppo elevati; inoltre le componenti a frequenze superiori ai 100 Hz sono di poco interesse e comunque attenuate.

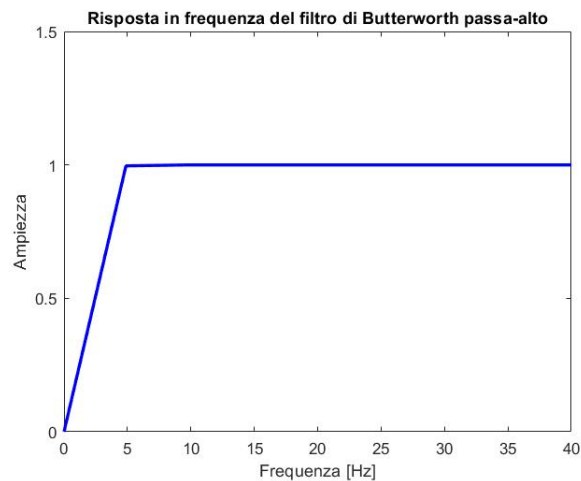
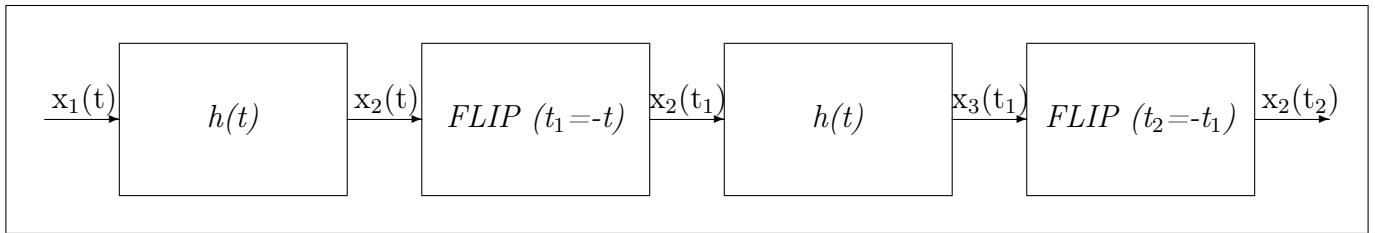


Figura 2.4: Risposta in frequenza del filtro di Butterworth passa-alto con taglio a 4 Hz. Il frangente di taglio in questo caso è stato più restrittivo del precedente perché si è cercato di eliminare componenti ad alta potenza rumorose in modo che non andassero ad inficiare la bontà dei risultati.

I due filtri sono stati combinati in cascata, applicando inoltre un filtraggio di tipo Forward-Backward, per ottenere un filtro risultante a fase nulla che impedisse le distorsioni di fase del segnale risultante, secondo questo schema:



La Risposta in frequenza del filtro è dunque la seguente:

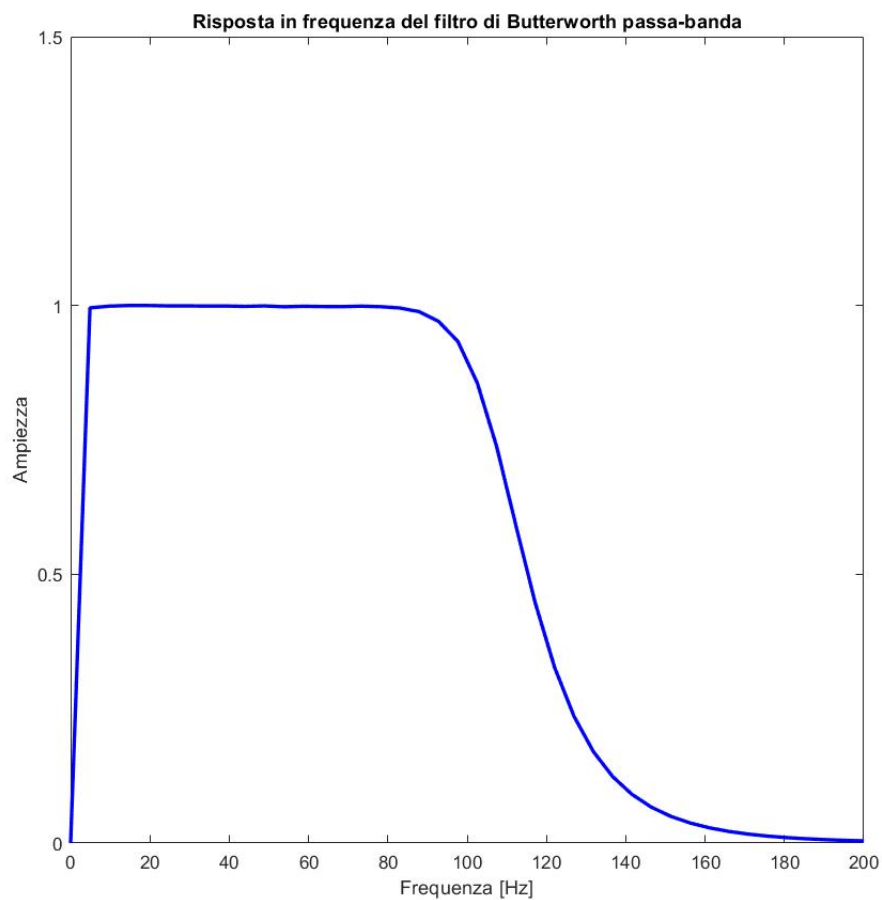


Figura 2.5: Risposta in frequenza del filtro di Butterworth passa-banda con taglio a 4 Hz e 100 Hz. Grazie alla modalità con cui è stato implementato, questo filtro ha fase nulla.

I frammenti di segnali non filtrati (figura 2.6) vengono quindi filtrati (figura 2.7) e in seguito sotto-campionati, passando da $F_{s1}=10\text{ kHz}$ a $F_{s2}=250\text{ Hz}$; vengono poi concatenati a formare la registrazione completa.

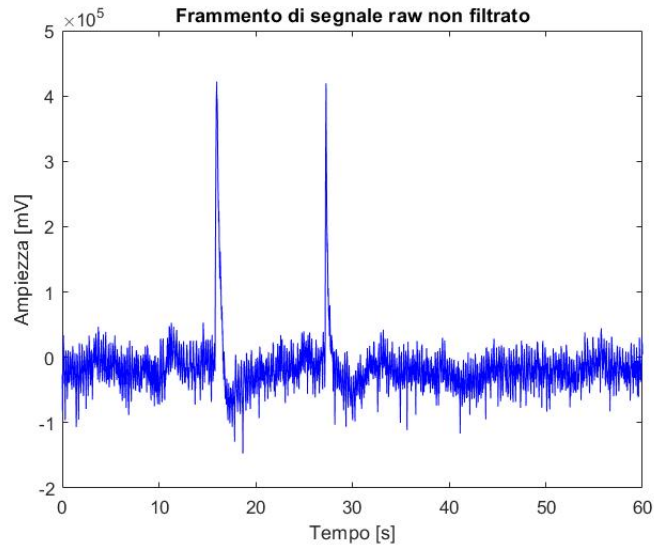


Figura 2.6: Frammento di un minuto di LFP non filtrato.

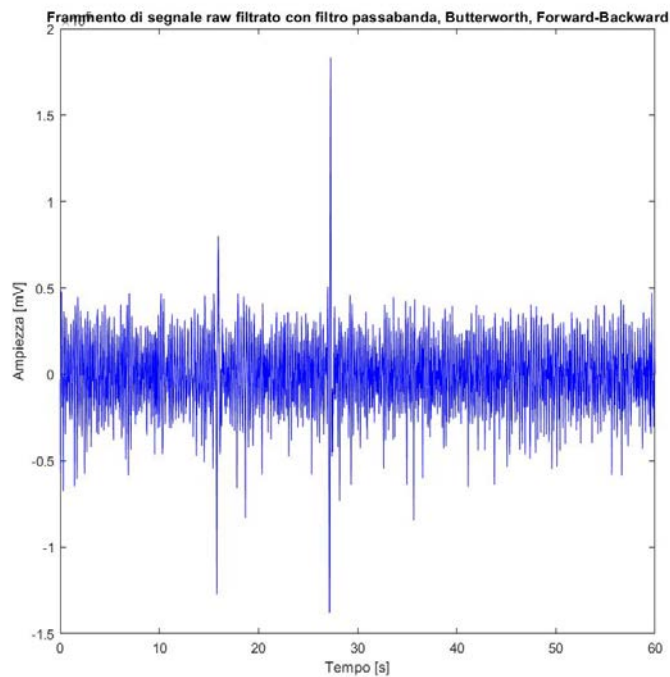


Figura 2.7: Frammento di un minuto di LFP filtrato con filtro Forward-Backward passa-banda di Butterworth.

2.2.2 Secondo step

Nel secondo passo viene effettuata la rimozione di eventuali artefatti presenti nel segnale e vengono poi estratti i frammenti corrispondenti agli intervalli temporali in cui il modello murino compie i task desiderati.

Al termine di ogni registrazione elettrofisiologica, il filmato ripreso dalla videocamera viene visionato nella sua interezza e vengono annotati gli istanti temporali iniziali e finali ogni qualvolta il modello murino compie un task che sia resting o sniffing. Questi tag vengono poi digitalizzati, realizzando un file di testo che può essere letto da un codice sorgente del software "MATLAB" [26].

Per ciascun segnale, si calcolano media e varianza:

$$\mu[x(t)] = \sum_{i=1}^n \frac{[x_i(t)]^2}{n} \quad (2.1)$$

$$v[x(t)] = \sum_{i=1}^n \frac{\{x_i(t) - \mu[x(t)]\}^2}{n} \quad (2.2)$$

Si impostano poi tre parametri: ampiezza di una finestra temporale mobile, limiti superiore ed inferiore di un intervallo di confronto. In maniera ciclica viene quindi calcolata la varianza del segnale individuato dalla sola finestra temporale (rettangolare) e valutato il rapporto tra quest'ultima e la varianza del segnale intero; se questo rapporto non appartiene all'intervallo definito dai parametri inseriti, allora il segnale identificato dalla finestra mobile è classificato come artefatto e con esso 200 campioni prima e dopo la finestra temporale. Ad ogni artefatto trovato, vengono eliminati quindi 400 campioni aggiuntivi all'ampiezza della finestra. In figura 2.8 si vede il risultato della ricerca automatica degli artefatti su un frammento di LFP.

Terminata la ricerca automatica degli artefatti, è stata aggiunta la possibilità di effettuare un'ulteriore rimozione manuale una volta visto il risultato della prima pulizia [15]. La figura 2.9 mostra lo stesso frammento della figura precedente con l'aggiunta di una rimozione manuale.

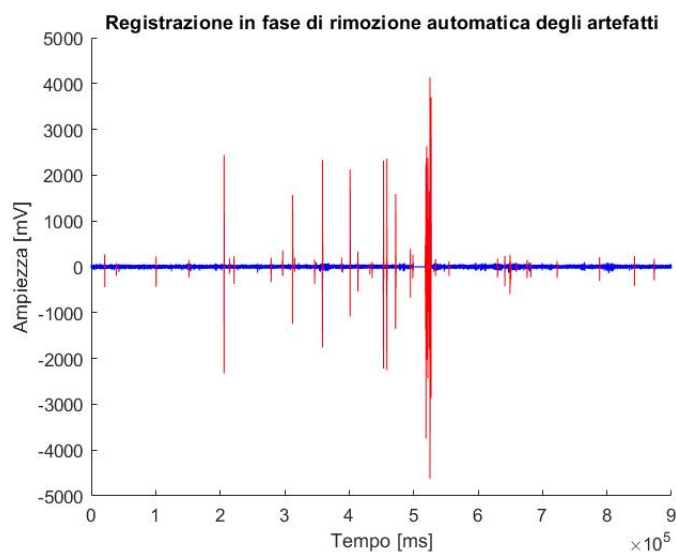


Figura 2.8: LFP dopo la ricerca automatica che richiede anche una rimozione manuale. In rosso è indicata tutta la porzione di segnale classificata come artefatto.

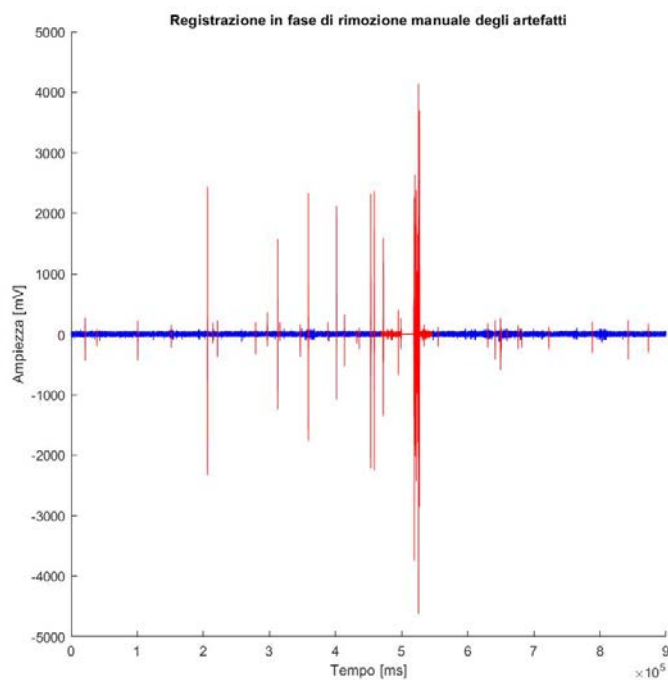


Figura 2.9: LFP risultante dopo la rimozione manuale. In rosso è indicata tutta la porzione di segnale classificata come artefatto.

Dopo la rimozione degli artefatti, i tag vengono rielaborati in modo che non comprendano anche parti rumorose del segnale; vengono quindi troncati, se la parte iniziale o finale è inutilizzabile; conservati, se non presentano artefatti, o spezzati, se contengono interamente uno o più artefatti.

I frammenti di segnale ottenuti vengono salvati in una cartella a parte ed utilizzati per le operazioni successive.

Si sono poi creati dei frammenti aventi una durata fissa e prestabilita (5 minuti) per garantire che gli algoritmi abbiano un tipo di input coerente e forniscano dati tra loro confrontabili [26]. Sono stati inizialmente eliminati tutti i frammenti di durata inferiore ai $2 s$; i frammenti rimasti sono stati troncati in modo che la loro durata fosse un multiplo di $2 s$ e sono stati tutti uniti. Dal segmento risultante sono stati estrapolati frammenti tutti della stessa durata prestabilita e salvati per le analisi successive.

Capitolo 3

Analisi lineare: metodi e risultati

3.1 Metodologie utilizzate

Il primo approccio all'analisi di un segnale è spesso rappresentato dalla sua valutazione nel dominio delle frequenze con metodi lineari [31]. I metodi che è possibile applicare sono molti, ma tutti fanno riferimento alla trasformazione che permette di trasportare un segnale $x(t)$ dal dominio del tempo al dominio delle frequenze, ottenendo il segnale $X(\omega)$: la trasformata di Fourier; è così definita:

$$X(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)e^{-j\omega t} dt \quad (3.1)$$

Dall'analisi dei segnali risulta poi che la densità spettrale di potenza (PSD) è definita come

$$PSD(\omega) = \frac{1}{2\pi} \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \left| \int_{-T}^{+T} x(t)e^{-j\omega t} dt \right|^2 \quad (3.2)$$

L'approccio inizialmente più usato per valutare la PSD di segnali temporali discreti è il metodo del periodogramma, esprimibile con la seguente

$$PSD_{PER}(k) = \frac{1}{N} \left| \sum_{n=0}^{N-1} x(n)e^{-j\frac{2\pi}{N}nk} \right|^2 \quad (3.3)$$

con N la dimensione del segnale $x(n)$.

Si sa che i metodi di calcolo "diretti" che forniscono la PSD in un passaggio, a partire dai dati, soffrono di alcuni problemi implementativi che possono influenzare il risultato [31]:

- Primo tra questi è il cosiddetto *leakage*, illustrato in figura 3.1, ovvero la perdita di potenza della frequenza centrale dello spettro, la quale di solito contiene la maggior parte della potenza del segnale, con il conseguente aumento di potenza delle bande di frequenze vicine.
- Nella stima dello spettro si rischia anche di occultare frequenze a potenza ridotta, come si vede in figure 3.2, poiché queste ultime potrebbero essere confuse con l'effetto di *leakage* appena descritto e quindi non notate.

- Il problema più impegnativo resta però la gestione della risoluzione in frequenza della PSD; essa è proporzionale al reciproco dell'incremento temporale utilizzato per rappresentare la serie temporale. Se si suppone di avere una risoluzione troppo alta, si è in grado di analizzare ogni componente spettrale, ma al prezzo di veder aumentare i costi computazionali; al contrario, una risoluzione più bassa favorisce il costo computazionale, ma può compromettere la codifica di alcune componenti spettrali che potrebbero non essere identificate.

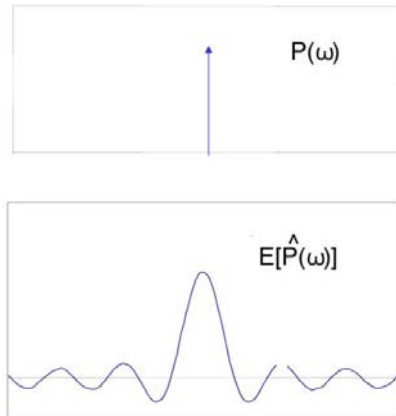


Figura 3.1: Effetto del leakage con perdita di potenza e creazioni di picchi spuri [31].

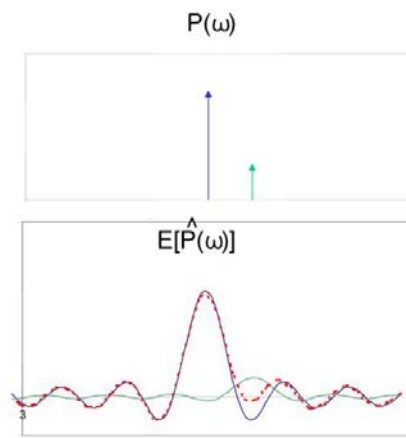


Figura 3.2: Esempio di mascheramento di componenti spettrali deboli; in questo caso la freccia verde, nella stima, viene completamente nascosta ed è impossibile da riconoscere [31].

Gli accorgimenti adottabili per diminuire l'impatto di questi problemi sul risultato sono almeno tre [32].

L'aumento della frequenza di campionamento permette di avere una serie temporale più fitta che permette una stima della PSD più regolare ed omogenea. Il primo cambiamento dal metodo del periodogramma è quello adottato dal calcolo della media dei periodogrammi (Bartlett). Esso prevede di frammentare la serie temporale in più segmenti di egual durata, calcolarne la PSD di ognuno con il metodo del periodogramma e dunque valutarne la media. Questa è nota come tecnica dell'*averaging* e permette di ridurre la varianza della PSD, la quale risulta essere inversamente proporzionale al numero di segmenti in cui la serie viene frammentata. Il limite di questa tecnica è che per renderla utile è necessario suddividere il segnale in tanti segmenti, i quali risultano di breve durata, ma al contempo tali segmenti, a causa della loro brevità, peggiorano la risoluzione in frequenza. Bisogna quindi cercare un compromesso tra l'esigenza di ridurre la varianza e la necessità di avere una buona risoluzione. In formule, l'approccio di Bartlett si traduce con

$$PSD_{BAR} = \frac{1}{k} \sum_{k=1}^{N/D} PSD_{PER}^k \quad (3.4)$$

avendo supposto di dividere la serie temporale di dimensione N in k frammenti di dimensione D . PSD_{PER}^k si riferisce alla formula (3.3) e rappresenta il periodogramma del k -esimo segmento della serie temporale.

La tecnica utilizzata dal metodo di Welch fa uso di finestre temporali dalla geometria particolare (gaussiana, triangolare, di Hamming, di Hann) per attribuire, di volta in volta, a ciascun segmento in cui la serie temporale viene divisa, una pesatura. Grazie a questo viene ridotto fortemente il problema del *leakage* [32]. Il compromesso sulla dimensione dei segmenti viene affrontato introducendo la possibilità di definire un fattore di sovrapposizione delle finestre temporali. Ipotizzando una sovrapposizione al 50%, ogni finestra conterrà, nella sua prima metà, l'ultima metà della finestra precedente e così via. Grazie a questo cambiamento è possibile ottenere molti segmenti, riducendo così la varianza della serie temporale, mantenendo delle finestre abbastanza ampie da avere una buona risoluzione. In formule, detta $w(t)$ la finestra temporale ed $x_k(t)$ la porzione di segnale selezionata dalla finestra,

$$PSD_{PER}(\omega) = \frac{1}{DP} \left| \sum_{t=1}^D w(t)x_k(t)e^{-j\omega t} \right|^2 \quad (3.5)$$

con D la dimensione della finestra temporale e P la sua potenza, definita come

$$P[v(t)] = \frac{1}{D} \sum_{t=1}^D |v(t)|^2 \quad (3.6)$$

Sostituendo la formula (3.6) nella (3.5) e mediando i risultati di ogni finestra, si ottiene

$$PSD_{WEL}(\omega) = \frac{1}{A} \sum_{i=1}^A PSD_{PER}^i(\omega) \quad (3.7)$$

con $A = \frac{N}{D}$.

3.2 Metodo di Welch

In questa tesi, per il calcolo della PSD è stato utilizzato il metodo di Welch con finestra mobile di Hann. La sua ampiezza è stata determinata a partire dall'intervallo di frequenze che si voleva analizzare. Generalizzando, dato un intervallo di tipo $[f_1, \dots, f_{end}]$, l'ampiezza della finestra di Hann è

$$T = \frac{2.5}{f_1} \quad (3.8)$$

Nel caso delle bande di frequenza individuate per il modello murino, si ha $T_{Theta} = \frac{2.5}{4} = 625 \text{ ms}$, $T_B = \frac{2.5}{15} = 167 \text{ ms}$, $T_g = \frac{2.5}{35} = 71 \text{ ms}$. La finestra di Hann, co-

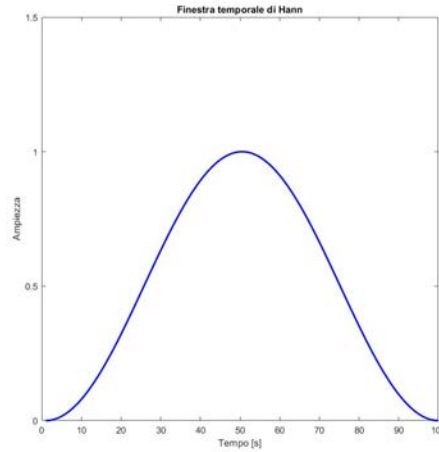


Figura 3.3: Finestra di Hann utilizzata per il calcolo delle densità di potenza spettrali con il metodo di Welch.

me quella di Hanning, appartiene alla famiglia delle finestre "a coseno rialzato" ed è esprimibile come

$$w(n) = \frac{1}{2} \left(1 - \cos\left(\frac{2\pi n}{N-1}\right) \right) \quad (3.9)$$

A partire dalla PSD, sono state analizzate le potenze relative in banda Gamma. Nonostante si sappia che la maggior parte della potenza del segnale è situata alle basse frequenze, è utile capire come varia la quantità di potenza presente in questa banda. L'utilizzo della potenza relativa è giustificato dal fatto che la potenza assoluta sarebbe poco indicativa perché ogni modello murino è diverso da un altro ed così pure ogni registrazione, pertanto si è deciso di normalizzare per quanto possibile il risultato al fine di renderlo confrontabile. Si è fatto uso della funzione di "MATLAB" *trapz* per calcolare le quantità

$$P_{band}(f) = \int_a^b PSD_{WEL}(f) df \quad (3.10)$$

$$P_{tot}(f) = \int_c^d PSD_{WEL}(f)df \quad (3.11)$$

ed ottenere quindi la potenza relativa

$$P_{rel}(f) = \frac{P_{band}(f)}{P_{tot}(f)} \quad (3.12)$$

nel caso in esame, $a=35$, $c=4$, $b=d=95$.

Si è poi analizzato il centroide in banda Gamma. Esso è definibile come il baricentro dell'area sottesa dalla curva della PSD e delimitata dalla banda di frequenza indicata. A differenza della potenza relativa, il centroide può dare informazione in merito alla frequenza che ha subito un maggior aumento (o decremento) di potenza nella banda. In formule si esprime come

$$C = \frac{\int_a^b f PSD_{WEL}(f)df}{\int_a^b PSD_{WEL}(f)df} \quad (3.13)$$

con a e b gli estremi della banda di frequenza per la quale si vuole calcolare il centroide. Anche per questo scopo si è fatto uso della funzione *trapz*.

L'analisi dei picchi delle PSD è stata lasciata in secondo piano a causa della loro variabilità e poca affidabilità, anche se, a prima vista, sembrano essere riconfermati i risultati ottenuti da studi svolti negli ultimi dieci anni [14], ovvero che il picco tende a spostarsi verso le frequenze più alte quando il soggetto murino passa dal resting allo sniffing, compiendo un compito complesso.

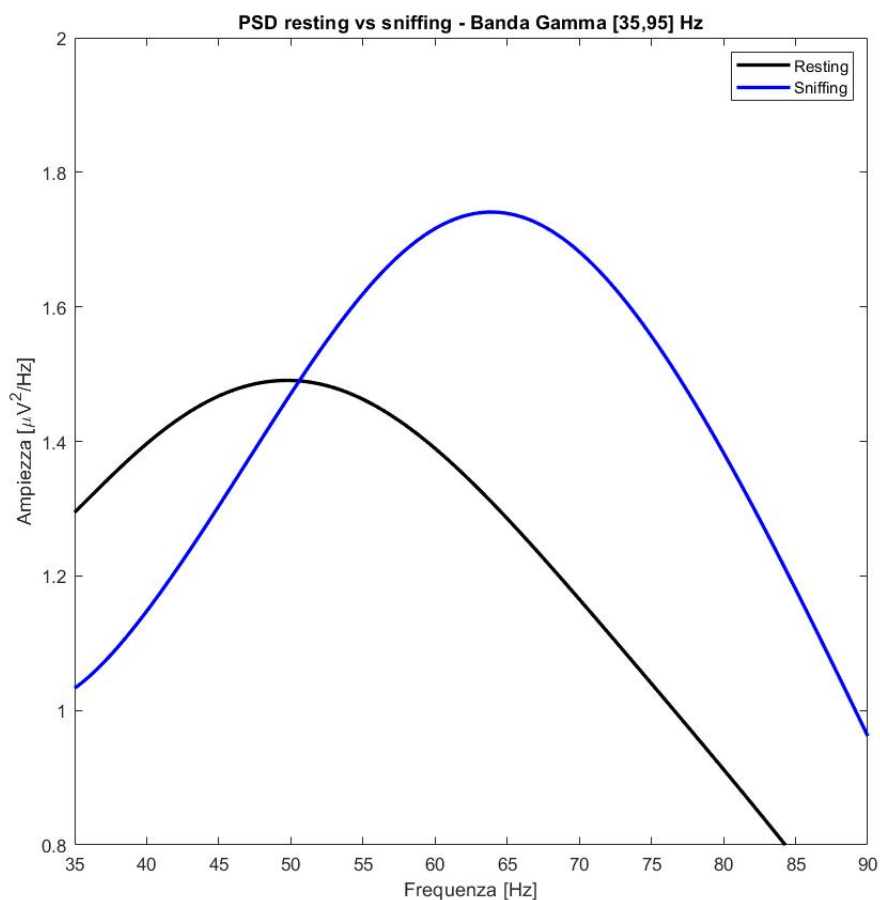


Figure 3.4: Densità spettrale di potenza (PSD) calcolata per frammenti di segnale relativi a resting e di sniffing.

In figura 3.4 è possibile osservare il risultato ottenuto con l'utilizzo del metodo di Welch per il calcolo della densità spettrale di potenza. La linea nera indica la PSD di un frammento elettrofisiologico di resting, mentre la linea blu indica un frammento di sniffing. Il tracciato utilizzato per ottenere questo risultato è stato acquisito da un modello murino non portatore della mutazione. Si osserva che la fase di sniffing comporta uno spostamento verso destra della curva della PSD, verso frequenze più alte e si vede un lieve aumento in termini di ampiezza; queste caratteristiche sono già state riscontrate ed evidenziate in altri studi scientifici [14].

3.3 Risultati

L'osservazione delle frequenze a cui corrisponde il picco della PSD in banda Gamma (figura 3.7) fa notare che sia nei modelli murini con la mutazione, sia nei sani, c'è una significativa variazione di valori; in particolare nel momento di sniffing viene registrato un aumento di frequenza di una decina di Hz, tuttavia questo non fornisce una significatività statistica al confronto inter-classe, bensì solo intra-classe. L'analisi di questa caratteristica è considerata tuttavia a livello marginale, in quanto l'esperimento è effettuato su modelli animali svegli e pertanto nell'azione definita "sniffing" viene raccolta una gran quantità di informazioni e comportamenti, tanto che potrebbe essere meglio definita come "non-resting".

Informazioni più dettagliate vengono dall'osservazione del boxplot delle potenze relative in banda Gamma (figura 3.5). Si nota che quando il modello murino, sano o mutato che sia, passa dallo stato di resting allo sniffing, si verifica un significativo aumento di potenza relativa in banda Gamma. Nonostante durante il resting non vi siano variazioni tra modelli mutati e non, durante lo sniffing si nota che il modello OPHN1 presenta un statisticamente significativo aumento di potenza relativa.

In aggiunta, nonostante il precedente boxplot informi solo sull'aumento in potenza, l'osservazione del boxplot dei centroidi in banda Gamma (figura 3.6) informa in merito a quali frequenze sono state soggette all'aumento, mostrando dunque che in fase di sniffing, per entrambe le categorie di modelli murini considerati, le frequenze interessate all'aumento di potenza sono state più elevate in fase di sniffing, rispetto alla fase di resting, presentando una significatività statistica.

Per tutti i metodi si è deciso di impiegare una finestra scorrevole di durata $2s$, quindi $T_w = 2s = 2s \cdot 250 \text{ Hz} = 500$ campioni.

Come parametri di input sono stati scelti i valori suggeriti negli studi, quindi per gli indici frattali è stato scelto $k_{lin}=3$ e $k_{max}=50$, mentre per Permutation Entropy si è scelto un ordine $d=4$, mentre per l'algoritmo di Lempel-Ziv si è usata come soglia di conversione in stringa binaria la mediana del segmento [2,7,17,19].

Ogni boxplot è raffigurato come segue: la linea rossa rappresenta la mediana dei dati; il rettangolo blu definisce il quartile superiore ed inferiore, mentre le linee nere esterne al rettangolo definiscono il range totale della distribuzione. In sovrapposizione al boxplot sono stati rappresentati con dei puntini neri i dati effettivi che lo hanno generato.

La dicitura in alto è riferita ai test statistici di Wilcoxon eseguiti sui dati, considerando i seguenti risultati:

- $p_{value} < 0.5 = *$
- $p_{value} < 0.01 = **$
- $p_{value} < 0.001 = ***$
- test non significativo = N.S.

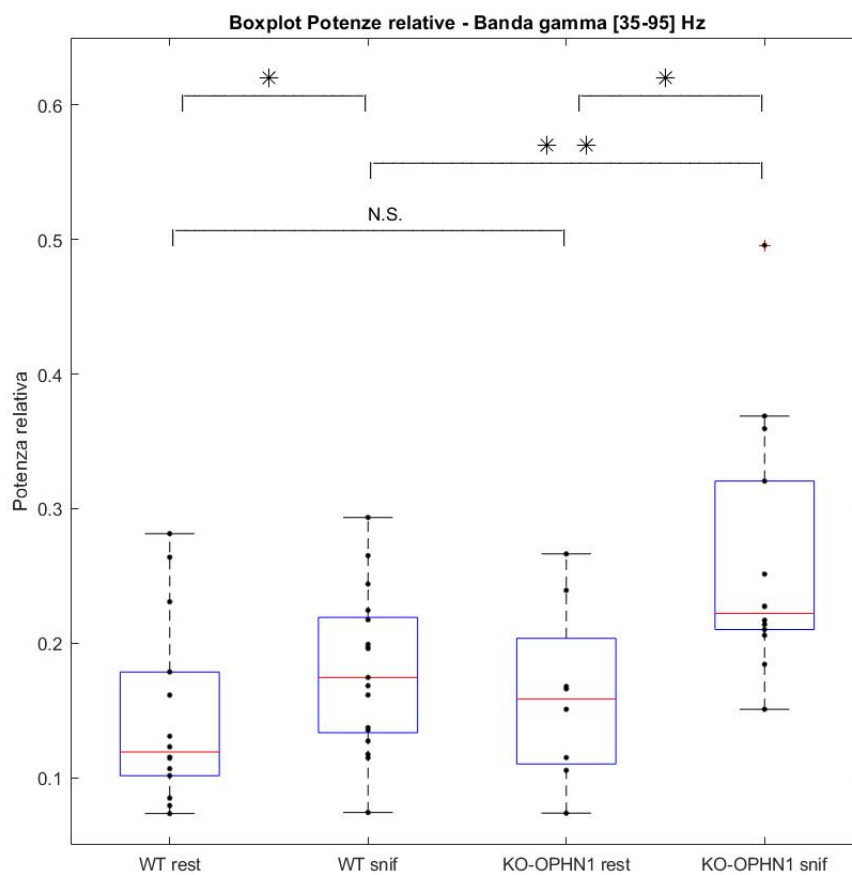


Figura 3.5: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi delle potenze relative. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

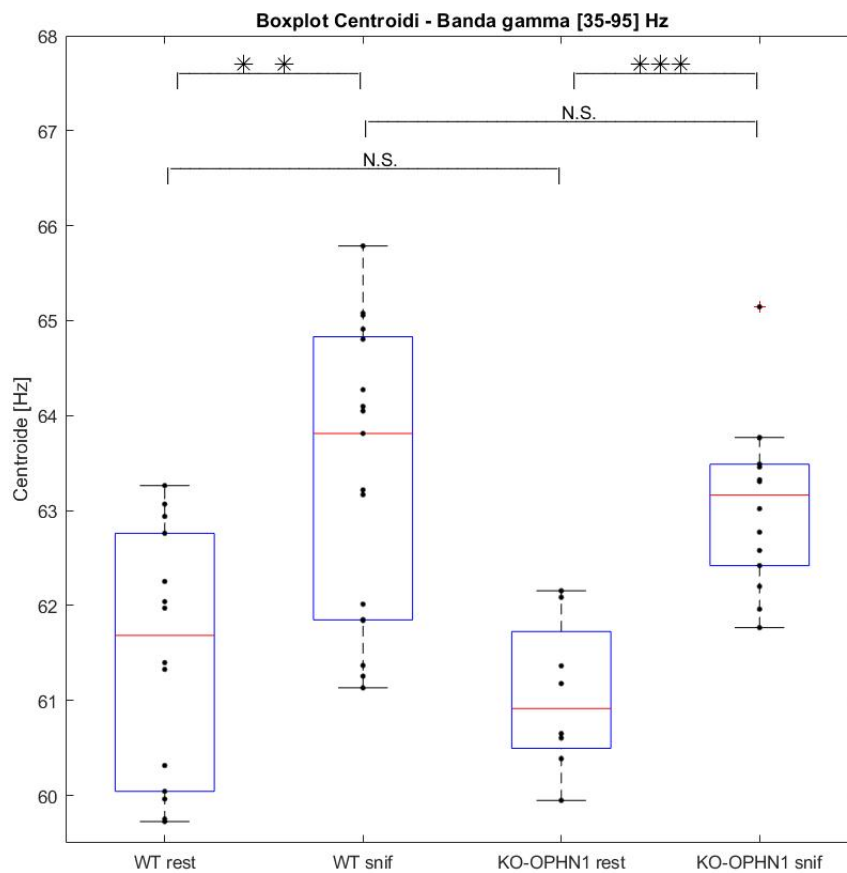


Figura 3.6: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi dei centroidi. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

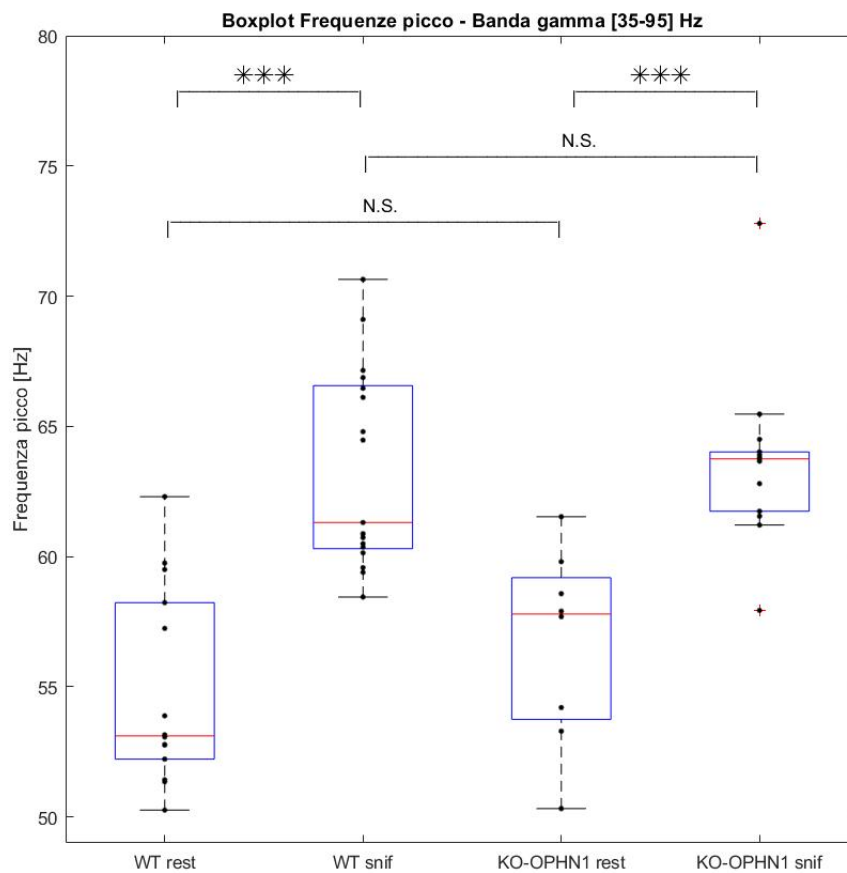


Figura 3.7: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi delle frequenze. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

3.4 Conclusioni sull'analisi lineare

I metodi lineari applicati hanno evidenziato differenze tra il resting e lo sniffing sia per i modelli murini OPHN1 sia per quelli sani. Si è notato che la frequenza di picco della PSD aumenta nel passaggio da resting a sniffing, così come aumenta il centroide. Dal boxplot della potenza relativa si osserva che lo sniffing comporta l'aumento di potenza rispetto al resting e che, confrontando i due animali, il modello OPHN1 subisce un aumento significativamente maggiore rispetto all'animale sano. Allo "shift" delle frequenze si accompagna quindi un aumento di potenza relativa e il boxplot del centroide mostra a quali frequenze questo aumento è più elevato.

Capitolo 4

Analisi non lineare: metodi e risultati

Dall'analisi lineare nessuna informazione è data sulla forma del tracciato, sulla ripetitività e andamento temporale.

Nell'ultimo trentennio è stata posta molta attenzione a due caratteristiche dei segnali, ovvero il loro grado di complessità e il livello di "disordine". In biologia i segnali elettrofisiologici non sono perfettamente periodici, pertanto è utile identificarne quantitativamente le caratteristiche non lineari.

4.1 Indice di Lempel-Ziv

L'algoritmo di Lempel-Ziv originariamente fu formulato come tecnica di compressione di dati *loss-less*, permettendo la ricostruzione integrale del dato, senza alcuna perdita.

Questo algoritmo scorre progressivamente una serie temporale, individuandone i pattern ricorrenti e salvandoli in memoria con un'etichetta specifica, quindi identificando quali e quanti pattern sono ripetuti e quanto spesso appaiono nella serie. Questo algoritmo è stato applicato anche a serie temporali di origine biologica, come ad esempio nello studio delle funzioni cerebrali tramite l'analisi dell'EEG in pazienti patologici o nella valutazione del livello di complessità del DNA [10,11].

Il funzionamento dell'algoritmo è sinteticamente illustrato di seguito:

Si consideri una generica serie temporale $X=\{x_n\}$; essa viene trasformata in una sequenza binaria $P=\{p_n\}$ di pari lunghezza con in seguente criterio:

$$p_i = \begin{cases} 0 & \text{se } x_i < T_d \\ 1 & \text{altrimenti} \end{cases} \quad (4.1)$$

dove T_d è un valore di soglia generalmente identificato con la mediana della serie X .

Nella procedura di scorrimento della sequenza binaria, si identificano un contatore $c(n)$ e due sotto-sequenze di P : S e Q . Posto che SQ è la concatenazione delle due sotto-sequenze, che SQ_π è la concatenazione privata dell'ultimo carattere e che $d(SQ_\pi)$ è il dizionario di tutte le sotto-sequenze di SQ_π , si ha in

generale che:

$$S = \{p_1, p_1, \dots, p_r\} \text{ e } Q = p_{r+1}, \text{ dunque } SQ_\pi = \{p_1, p_1, \dots, p_r\}.$$

Se $Q \in d(SQ_\pi)$, allora Q è già una sotto-sequenza di SQ_π .

In tal caso diventa $Q = \{p_{r+1}, p_{r+2}\}$ e viene fatto il medesimo controllo. Proseguendo con questo criterio si arriverà ad una situazione in cui $Q = \{p_{r+1}, p_{r+2}, \dots, p_{r+i}\}$ non è una sotto-sequenza di $SQ_\pi = \{p_1, p_2, \dots, p_{r+i-1}\}$. A questo punto il contatore $c(n)$ viene incrementato di uno, si pone $S = \{p_1, p_1, \dots, p_{r+i}\}$, $Q = \{p_{r+i+1}\}$ e l'algoritmo riparte finché Q corrisponde all'ultimo carattere della serie.

A questo punto il contatore $c(n)$ contiene il numero di sotto-sequenze diverse tra loro presenti nella serie P . Viene calcolato dunque

$$b(n) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{n}{\log_2(n)} \quad (4.2)$$

per ottenere la complessità di Lempel-Ziv normalizzata

$$LZ(n) = \frac{c(n)}{b(n)} \quad (4.3)$$

4.2 Indice di Sample Entropy

L'indice di Sample Entropy (SampEn) è, come l'indice di Lempel-Ziv, una misura di complessità; ricavata dall'indice Approximate Entropy.

Questo indice assume valori, per sua definizione, mai negativi. Valori prossimi allo zero indicano che la serie temporale ha un grado di complessità ed irregolarità molto basso; lo zero indica che la serie è periodica. Al contrario, all'aumentare di questo indice, aumenta la complessità del segnale [2,28].

Si consideri la serie temporale $X(n) = \{x_1, x_2, \dots, x_N\}$ che si vuole analizzare e, detti m e τ due interi positivi, si definiscono le $(N-m+1)$ sotto-sequenze di dimensione m come

$$P_i = \{x_i, x_{i+1}, \dots, x_{i+m-1}\} \quad (4.4)$$

Si introduce quindi il concetto di distanza di Chebichev, ovvero

$$d[P_i, P_j] = \max_{k=1, \dots, N} |x_{i+k-1} - x_{j+k-1}| \quad (4.5)$$

Si definisce dunque il concetto di vicinanza: considerate due sotto-sequenze P_i e P_j , esse si dicono vicine se vale la seguente

$$d[P_i, P_j] \leq \tau \quad (4.6)$$

A questo punto si calcola

$$C_i^m(\tau) = \frac{\# j \mid d[P_i, P_j] \leq \tau}{N - m + 1} \quad (4.7)$$

mediando il risultato si ottiene

$$C^m(\tau) = \frac{1}{N-m} \sum_{i=1}^{N-m} C_i^m(\tau) \quad (4.8)$$

Allo stesso modo, si definiscono le $N-m$ sotto-sequenze di dimensione $m+1$ come,

$$P_i = \{x_i, x_{i+1}, \dots, x_{i+m}\} \quad (4.9)$$

per valutare la quantità

$$C_i^{m+1}(\tau) = \frac{\#\{j \mid d[P_i, P_j] \leq \tau\}}{N-m} \quad (4.10)$$

dalla quale segue che

$$C^{m+1}(\tau) = \frac{1}{N-m} \sum_{i=1}^{N-m} C_i^{m+1}(\tau) \quad (4.11)$$

Risulta quindi, infine, che

$$SampEn(m, \tau) = -\log\left(\frac{C^{m+1}(\tau)}{C^m(\tau)}\right) \quad (4.12)$$

4.3 Indice di Empirical Permutation Entropy

Questo indice, a differenza dei precedenti, valuta la distribuzione all'interno della serie temporale dei pattern ordinali (ordinal pattern) [5,8,19].

Si dice che un vettore

$$(x_t, x_{t-\tau}, x_{t-2\tau}, \dots, x_{t-d\tau})$$

ha ordinal pattern

$$(i_1^\tau(t), \dots, i_d^\tau(t))$$

di ordine d e intervallo τ se vale che

$$i_k^\tau(t) = \#\{r \in \{0, 1, \dots, k-1\} \mid x_{t-k\tau} \geq x_{t-r\tau} \quad k = 1, \dots, d \quad (4.13)$$

per ogni ordine d possono definirsi $(d+1)!$ ordinal pattern ed a ciascuno viene assegnato un numero intero con la seguente

$$n_d^\tau(t) = \sum_{k=1}^d i_k^\tau(t) \frac{(d+1)!}{(k+1)!} \quad (4.14)$$

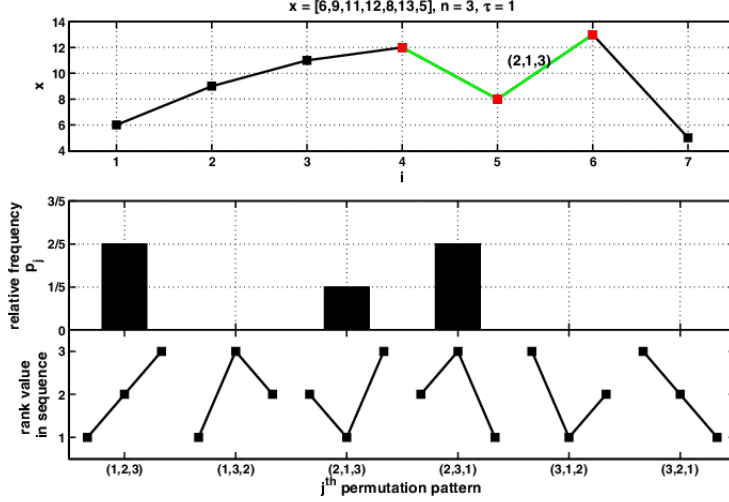


Figura 4.1: Illustrazione del funzionamento dell' algoritmo Empirical Permutation Entropy con $d=2$.

Come si può vedere in figura, data quindi una serie temporale e definito un ordine d , l'algoritmo cerca in tutta la serie gli ordinal pattern di ordine d . Più la serie temporale è complessa, più diversi tra loro saranno gli ordinal pattern necessari a descriverla.

ePE è definito come segue:

$$ePE[d, \tau, \{x_i\}_{i=1}^N] = -\frac{1}{d} \sum_{j=0}^{(d+1)!-1} p_j \ln p_j \quad (4.15)$$

dove

$$p_j = \frac{\#\{i = (d\tau + 1, d\tau + 2, \dots, N) \mid (x_i, x_{i-\tau}, \dots, x_{i-d\tau}) \text{ ha ordinal pattern } j\}}{N - d\tau} \quad (4.16)$$

con $\ln(0)=0$. Il risultato che si ottiene da questa formula è, come per Sample Entropy, uno scalare. Se la complessità del segnale aumenta, aumenta la variabilità degli ordinal pattern utilizzati per codificarlo e quindi aumenta il valore di ePE [33,34].

La scelta dei parametri risulta da un compromesso tra qualità della stima e bias nel risultato. Un valore dell'ordine d molto alto, permette una stima eccellente, essendo molti gli ordinal pattern impiegati, ma si rischia al contempo di sottostimare il risultato perché non è detto che tutti i pattern definiti servano a codificare la serie. Alcuni studi [5,19] suggeriscono di scegliere d tale che

$$5(d+1)! < N \quad (4.17)$$

l'intervallo τ è di più difficile interpretazione e viene spesso suggerito di adottare $\tau=1$ [5,19].

4.4 Indici frattali

Gli indicatori di entropia risultano computazionalmente onerosi ($O(n)$ o più) ed il loro valore dipende fortemente dai parametri impostati a priori. Gli indici frattali sono stati applicati di recente a serie temporali di origine biologica per valutarne la complessità riducendone il costo computazionale.

L'algoritmo di Higuchi restituisce uno scalare, detto dimensione frattale di Higuchi, che rappresenta il coefficiente angolare di una retta di regressione.

Nello specifico, questo indicatore frattale dà informazioni sulle caratteristiche di una curva generata a partire dai dati, detta $L(k)$ [5,7].

Si consideri di voler analizzare la serie temporale $X=\{x_1, x_2, \dots, x_M\}$.

Se ne consideri allora una sua epoca, detta

$$S = \{s_1, s_2, \dots, s_N\}$$

di lunghezza $N < M$.

Per ogni elemento di S , vengono calcolate le differenze assolute tra s_i e s_{i-k} con $k=1, \dots, k_{max}$.

A questo punto le differenze assolute calcolate vengono moltiplicate per un fattore di normalizzazione che permette di tener conto della variabile quantità di campioni disponibili per il calcolo delle differenze assolute, al variare di k . A questo punto la curva sopra citata viene calcolata al variare dal punto di partenza $m=1, \dots, k$ come

$$L_m(k) = \frac{(N-1)}{qk^2} \sum_{i=1}^q |s_{m+ik} - s_{m+(i-1)k}| \quad (4.18)$$

per poi ottenere l'equazione della curva, mediando su k i valori ottenuti per $L_m(k)$

$$L(k) = \frac{1}{k} \sum_{m=1}^k L_m(k) \quad (4.19)$$

Risulta che se la curva $L(k)$ è proporzionale a k^{-D} , ovvero $\log(k)$ e $L(k)$ sono in rapporto di linearità tra loro, per $k=1, \dots, k_{lin}$, la curva è frattale ed ha dimensione D .

k_{lin} è il massimo valore di k per cui la curva può essere elaborata tramite uno stimatore lineare ai minimi quadrati, ottenendo il coefficiente angolare della regressione lineare risultante, ovvero la dimensione frattale D .

Risulta quindi che se il segnale aumenta in complessità, la dimensione frattale di Higuchi, quindi l'inclinazione della regressione lineare, aumenta [34]. Al fine di analizzare anche la sezione di curva per $k > k_{lin}$ non considerata dalla dimensione frattale di Higuchi, si sono calcolati: 1) i Residui tra la curva e la regressione lineare estesa alla parte per $k > k_{lin}$ e 2) la Tortuosità che valuta quanto velocemente la curva subisce variazioni nella sua parte non-lineare, rispetto alla variazione delle sue coordinate.

Definiti

$$x = \log(k) \text{ e } y = \log[L(k)]$$

si ha che la tortuosità di $L(k)$ può essere espressa dalla seguente formula

$$\tau_{l_k} = \sum_{n=3}^{k_{max}} \left| \frac{\Delta x(n)\Delta^2 y(n) - \Delta^2 x(n)\Delta y(n)}{[(\Delta x(n))^2 + (\Delta y(n))^2]^{\frac{3}{2}}} \right| \quad (4.20)$$

Al contrario della dimensione frattale di Higuchi, i Residui e la Tortuosità aumentano all'aumentare della sua regolarità e diminuire della sua complessità. Ci si aspetta che Residui e Tortuosità abbiano un comportamento opposto all'indice frattale [5,34].

4.5 Risultati

In figura 4.2 il boxplot relativo all'indice di complessità di Lempel-Ziv mostra che, statisticamente, la complessità del tracciato aumenta nel passaggio da fase di resting a sniffing sia per i modelli OPHN1, sia per i modelli murini sani. Per i primi l'incremento in complessità è più significativo rispetto ai modelli sani. La fase di sniffing evidenzia inoltre una differenza statistica inter-classe, tra modelli OPHN1 e sani, mostrando che la complessità dei modelli mutati è superiore rispetto agli altri; in fase di resting la complessità è minore tra la prima e la seconda classe, seppur il confronto non sia significativo.

In figura 4.3 è illustrato il boxplot relativo all'indice Sample Entropy che, se per i modelli sani non mostra significatività statistica, per i modelli OPHN1 evidenzia un aumento di complessità tra fase di resting e fase di sniffing, anche con differenza statistica tra resting delle due classi.

L'ultimo indice di entropia (figura 4.4), l'Empirical Permutation Entropy, mostra significatività statistica intra-classe ed un aumento in complessità del segnale quando il modello murino esegue lo sniffing, rispetto al resting-state. Nessuna significatività inter-classe viene evidenziata.

Segue l'indice relativo alla dimensione frattale di Higuchi (figura 4.5) che ben evidenzia, particolarmente nei modelli OPHN1, un significativo incremento, ovvero la diminuzione della regolarità del tracciato elettrofisiologico quando OPHN1 passa da fase di resting a sniffing. Anche in questo caso non viene evidenziata alcuna significatività statistica tra le due classi di modelli murini analizzati.

Assieme al precedente, vengono visualizzate le altre due caratteristiche estraibili dalla curva $L(k)$. I Residui hanno un andamento coerente con la dimensione frattale ed evidenziano una differenza statistica tra le due classi in fase di resting, mentre per i modelli OPHN1 non viene evidenziata significatività.

L'ultimo boxplot, relativo alla Tortuosità, non ha evidenziato significatività statistica di alcun tipo, ma il suo andamento è, in termini di mediana, coerente con Residui ed indice di Higuchi; permette quindi di validare ulteriormente l'andamento della dimensione frattale.

Ogni boxplot è raffigurato come segue: la linea rossa rappresenta la mediana dei dati; il rettangolo blu definisce il quartile superiore ed inferiore, mentre le linee nere esterne al rettangolo definiscono il range totale della distribuzione. In sovrapposizione al boxplot sono stati rappresentati con dei puntini neri i dati effettivi che lo hanno generato.

La dicitura in alto è riferita ai test statistici di Wilcoxon eseguiti sui dati, considerando i seguenti risultati:

- $p_{value} < 0.5 = *$
- $p_{value} < 0.01 = **$
- $p_{value} < 0.001 = ***$
- test non significativo = N.S.

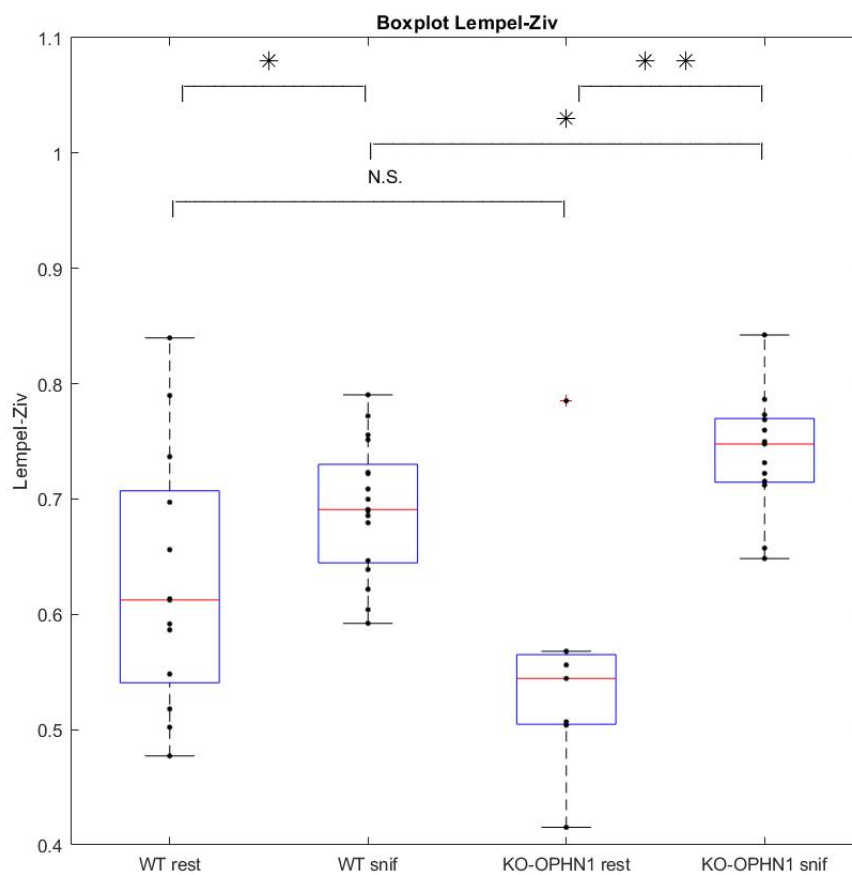


Figura 4.2: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi dell'indice di complessità di Lempel-Ziv. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

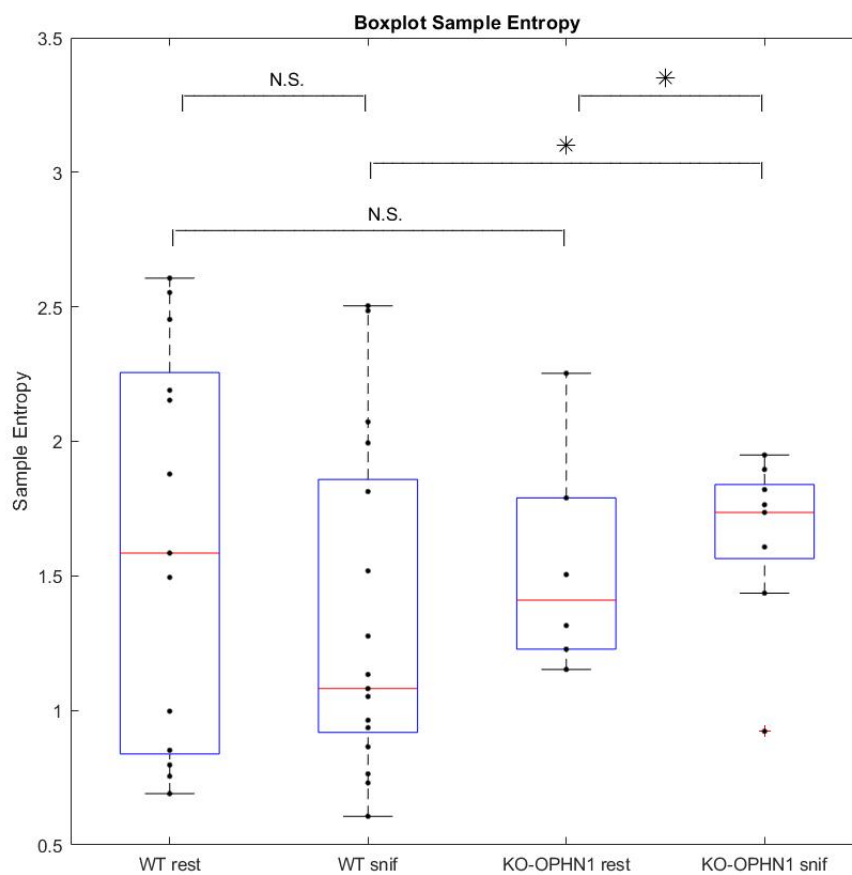


Figura 4.3: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi dell'indice Sample Entropy. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

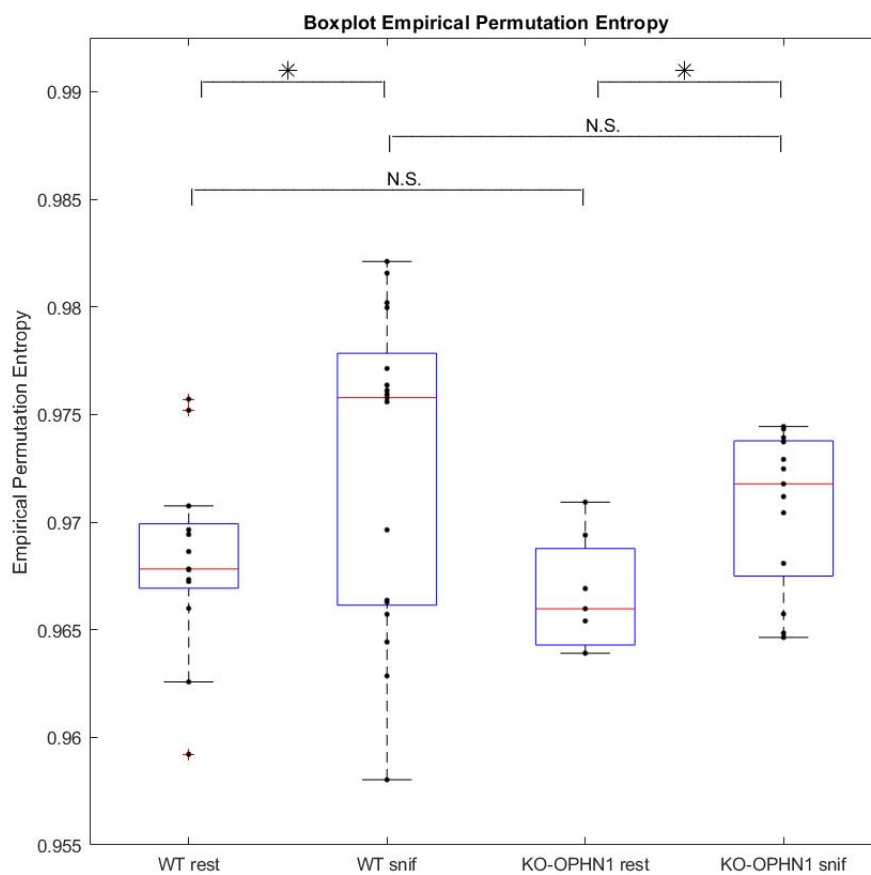


Figura 4.4: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi dell'indice di Permutation Entropy. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

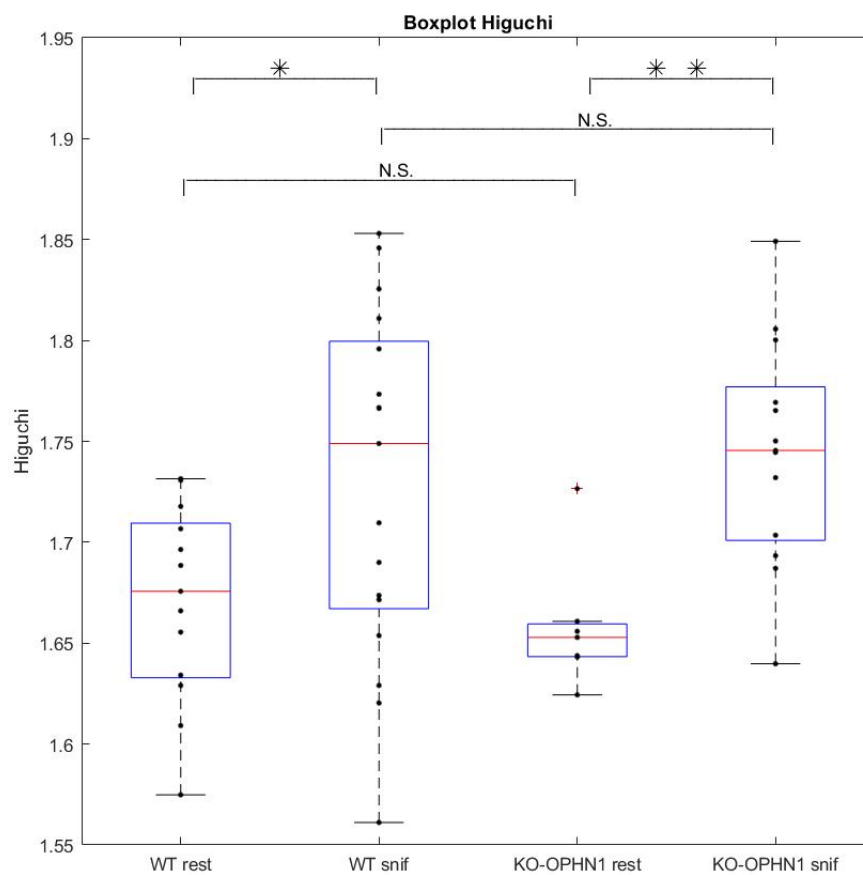


Figura 4.5: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi della dimensione frattale di Higuchi. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

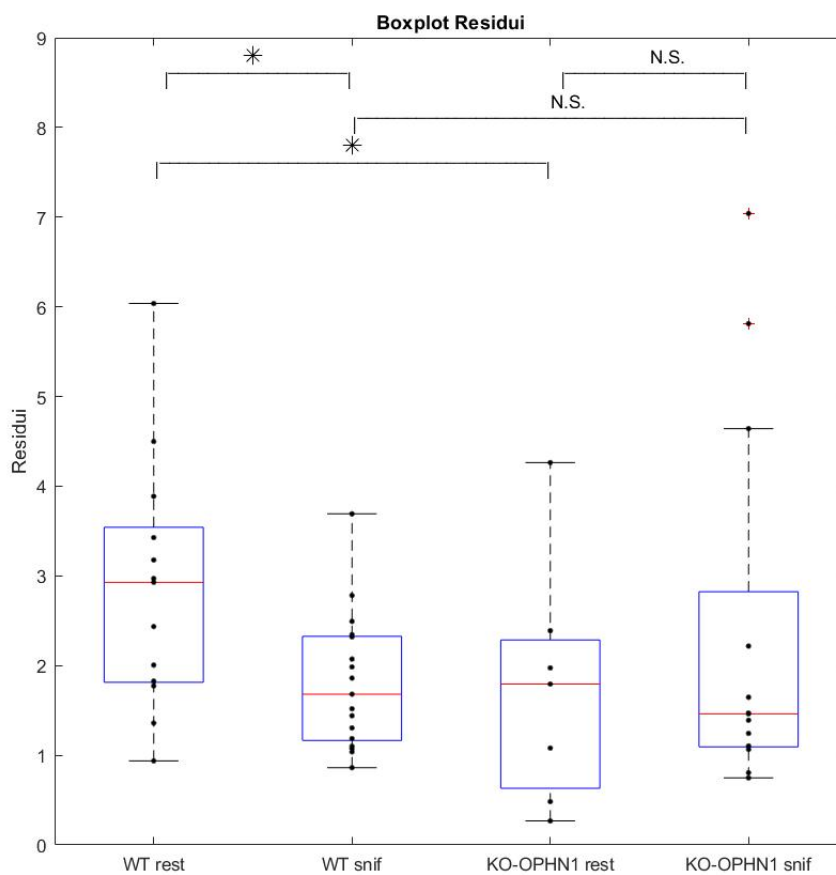


Figura 4.6: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi dei Residui dell'algoritmo frattale. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

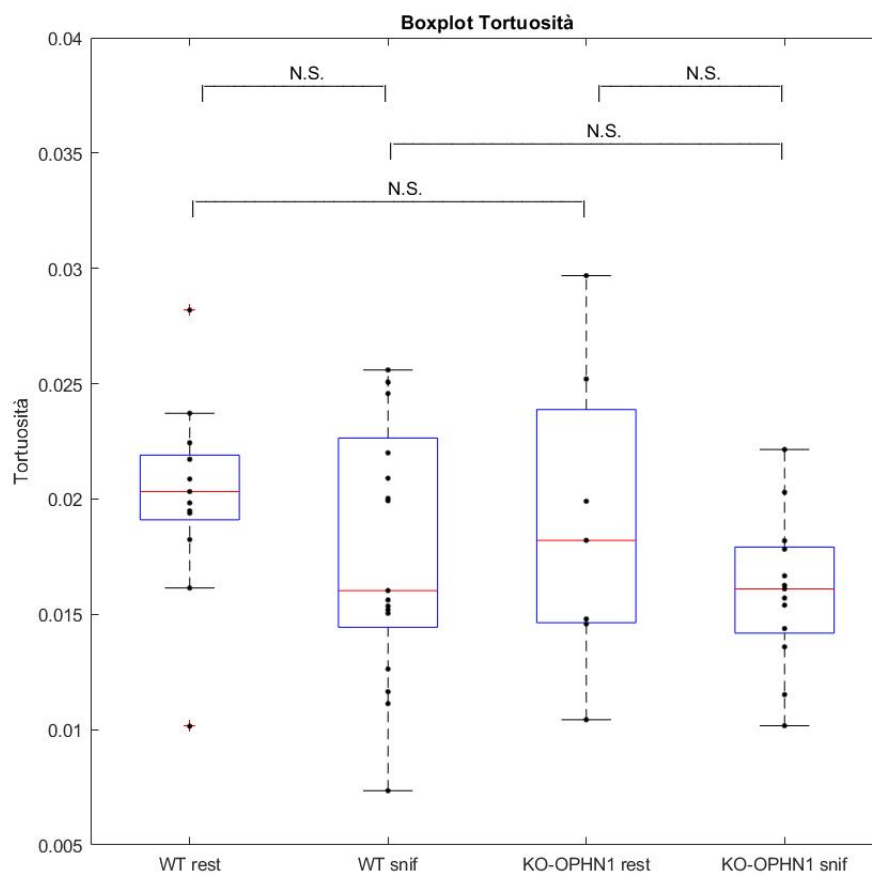


Figura 4.7: Si possono osservare quattro boxplot rappresentativi della Tortuosità della curva $L(k)$. Da sinistra verso destra, i boxplot fanno riferimento a modelli murini sani (WT) in fase di resting, modelli sani in fase di sniffing, modelli murini portatori della mutazione (OPHN1) in fase di resting e modelli mutati in fase di sniffing.

4.6 Conclusioni sull'analisi non lineare

I metodi di analisi non lineare applicati hanno evidenziato differenze tra i modelli OPHN1 ed i sani. Gli indici di entropia hanno mostrato che lo sniffing comporta l'incremento di complessità del segnale, rispetto al resting. Gli indici di Lempel-Ziv e Sample Entropy hanno mostrato anche una differenza statisticamente significativa tra le due classi di animali studiate. Si è visto, osservando i boxplot degli indici di entropia, che lo sniffing comporta la diminuzione della regolarità del segnale. la dimensione frattale di Higuchi non evidenzia differenze inter-classe, ma solamente intra-classe. I boxplot dei Residui e della Tortuosità hanno andamento, come noto, opposto alla dimensione frattale.

Capitolo 5

Conclusione e sviluppi futuri

5.1 Conclusione

Scopo di questo lavoro di tesi era verificare se la mutazione di OPHN1 possa alterare il funzionamento della rete neuronale del modello animale. Per fare questo si sono studiate 46 registrazioni di LFP nel bulbo olfattivo di un modello animale (23 OPHN1, 23 sani), essendo quest'area dotata di un'elevata espressione di OPHN1 e di una fisiologica capacità plastica.

L'approccio elettrofisiologico in animali svegli ha comportato ulteriori difficoltà operative, tra cui gli artefatti da movimento, che si è però riusciti ad isolare ed escludere. Si è scelto dunque di riassumere l'intero comportamento in due grandi categorie, dette di resting-state (riposo) e di sniffing, momenti in cui il modello murino annusava l'ambiente circostante. È chiaro che con questa generalizzazione, e con il fatto che gli istanti di resting o sniffing sono stati identificati tramite ispezione integrale e manuale della videoregistrazione, i risultati non possono essere precisi tanto quanto i medesimi ottenuti con analisi su modello animale sedato.

Gli indici analizzati, sia lineari che non, hanno mostrato una differenza significativa tra lo stato di resting e sniffing: durante quest'ultimo task, il segnale subisce un incremento di complessità e potenza. Quattro indici (Sample Entropy, Lempel-Ziv, Residui e potenze relative) hanno evidenziato anche differenze inter-classe, ovvero tra modelli OPHN1 e sani, suggerendo che quando il modello portatore di mutazione tenta di eseguire il task di sniffing aumenta la complessità del tracciato (e aumenta maggiormente la potenza) rispetto al modello sano, nel probabile tentativo di sopperire alla disfunzione cerebrale causata dalla mutazione.

5.2 Sviluppi futuri

Nel corso di questo studio è stato visto che le oscillazioni Gamma hanno subito, nel modello OPHN1, delle alterazioni. In un futuro ambito di analisi, ci si potrà chiedere quali altre metodologie possono essere applicate per affinare l'analisi. Si potrà poi valutare di effettuare l'analisi ad un livello di dettaglio maggiore, con tecniche di precisione quale ad esempio il *two photon imaging*, per capire a livello cellulare come agisca la mutazione e quali sono le componenti che contribuiscono all'alterazione dei ritmi neuronali.

In future analisi si dovrà cercare di valutare anche gli effetti fisiologici dell'impianto degli elettrodi sull'animale e in che modo il segnale ne viene influenzato. Come noto, la scelta dei parametri degli algoritmi è problematica, pertanto in futuro si dovrà valutare anche l'effetto del cambiamento dei parametri scelti a priori per gli algoritmi utilizzati.

Ringraziamenti

Un primo, sentito ringraziamento al Prof. Giovanni Sparacino per essere stato artefice e promotore di questo lavoro di tesi, ma soprattutto grazie perché da lui, come relatore e come professore, ho appreso cosa vuol dire essere un ingegnere e cosa vuol dire mettersi in gioco.

Un grazie di cuore alla Prof.ssa Claudia Lodovichi alla quale, nonostante le sue richieste, non sono mai riuscito a dare del "tu". Grazie di avermi accolto al VIMM e sopportato per un intero inverno, tra lab-meeting, problemi da risolvere e topolini da mettere in riga.

Un grazie speciale alla Dott.ssa Maria Rubega, per la quale credo di essere divenuto l'incubo peggiore degli ultimi due mesi. Con tutte le mail che le ho mandato potrei scrivervi un libro. Grazie per la pazienza infinita ed i consigli preziosi che mi hanno spesso tirato fuori dai guai.

Un grazie doveroso ai ragazzi del VIMM: Andrea Maset, Andrea Panontin e Antonio Di Soccio che hanno lavorato giorno e notte come precari sottopagati per farmi avere i dati da elaborare. Senza di voi questa tesi non sarebbe giunta alla fine.

Un grazie senza fine a mia madre, Marilena, e mio padre, Massimo, per avermi permesso, fin dal mio primo giorno di scuola, di seguire la mia strada e perseguire le mie idee. Grazie, dopotutto, di aver sostenuto il peso economico dei miei studi e condiviso le gioie dei successi e le pene dei fallimenti. Ora che sono giunto alla fine, potete stare tranquilli.

Un grazie nostalgico a mia nonna, Maria, che teneva moltissimo ai miei studi, ma che ora non può essere qui per dividerne con me il risultato e grazie a mio nonno, Angelo, che ho conosciuto poco, ma che sono certo essere fiero di me.

Un grazie a tutti i miei amici e compagni di università, triennale e magistrale. Grazie a chi c'è stato e a chi c'è tutt'ora. Grazie a tutti coloro che hanno condiviso con me questo arduo cammino fino al sudato traguardo.

Un grazie agli amici di sempre, quelli con cui ho condiviso l'adolescenza:

Nicola, Andrea, Francesco, Eleonora, Alessia, Linda, Angela, Gioele.

Per ultimo, un grazie sincero a Valentina che, quasi da due anni, sopporta tutte le mie lamentele, ascolta pazientemente tutti i miei discorsi e, con pacata gentilezza, mitiga il mio essere Francesco con il suo essere Valentina. Grazie di essermi sempre accanto e di preoccuparti forse più per me che per te. Sono certo che questo è solo un piccolo, indimenticabile inizio.

Bibliografia

- [1] Kay L., Beshel J., Brea J., Martin C., Rojas-Libano D., Kopell N. (2009). *Olfactory oscillations: the what, how and what for*. Cell Press, 207:214.
- [2] Richman J., Moorman J. (2000). *Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy*. Am. J. Physiol Heart Circ Physiol 278:H2039–H2049.
- [3] Buzsáki G., Anastassiou C., Koch C. (2012). *The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes*. Nature Reviews, Neuroscience, 13, 407:420.
- [4] Buzsáki G., Draguhn A. (2004). *Neuronal Oscillations in Cortical Networks*. Science 304, 1926:1929.
- [5] Rubega M., Scarpa F., Teodori D., Sejling A., Frandsen C., Sparacino G. (2019). *Detection of hypoglycemia using measures of EEG complexity in type 1 diabetes patients*. Entropy, 21.
- [6] Mohammed Salah Hamza Al-Radhi. (2012). *Design of Finite Impulse Response Digital Filters using Optimal Methods*. Master thesis. Budapest University of Technology and Economics.
- [7] Scarpa F., Rubega M., Zanon M, Finotello F., Sejling A., Sparacino G. (2007). *Hypoglycemia-induced EEG complexity changes in Type 1 diabetes assessed by fractal analysis algorithm*. Biomedical Signal Processing and Control, 38, 168-173.
- [8] Keller K., Mangold T., Stolz I., Werner J. (2017). *Permutation Entropy: New Ideas and Challenges*. Entropy, 19.
- [9] Aboy M., Abasòlo D., Hornero R., Alvarez D. (2006). *Interpretation of the Lempel-Ziv Complexity Measure in the Context of Biomedical Signal Analysis*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 53, 11, 2282:2288.
- [10] Tsoulfas G., Musallam S., Talebinejad M. (2015). *Lempel-Ziv complexity for analysis of neural spikes*. Researchgate.
- [11] Herreras O. (2016). *Local Field Potentials: Myths and Misunderstandings*. Frontiers in Neural Circuits, 10, 101.

- [12] Rubega M., Fontana R., Vassanelli S., Sparacino G. (2016). *A tunable local field potentials computer simulator to assess minimal requirements for phase-amplitude cross-frequency-coupling estimation*. Network: Computation in Neural System.
- [13] Kay L. *Circuit Oscillations in Odor Perception and Memory*. Progress in Brain Research, 208, 223:251.
- [14] Martin C., Ravel N. (2014). *Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks?* Frontiers in Behavioral Neuroscience, 8, 218.
- [15] Urigüen J., Garcia-Zapirain B. (2015). *EEG artifact removal: State of the art and guidelines*. Journal of Neural Engineering.
- [16] Scalon A. (2016). *Sviluppo di metodologie di analisi delle oscillazioni spontanee in segnali elettrofisiologici in un modello murino di disabilità intellettiva*. Master thesis. Università degli studi di Padova.
- [17] Maset A. (2019). *Altered migration of forebrain inhibitory interneurons in a mouse model of intellectual disability*. Doctoral thesis. Università degli studi di Padova.
- [18] Teodori D. (2019). *Hypoglycemia detection in patients with type 1 diabetes using EEG signals*. Master thesis. Università degli studi di Padova.
- [19] Lezziero G. (2015). *Sviluppo di un sistema software per la rilevazione e analisi di Local Field Potentials nel modello animale*. Master thesis. Università degli studi di Padova.
- [20] Casagrande G. (2014). *Tecniche per la stima del Cross Frequency Coupling di oscillazioni cerebrali in modello animale: studi di simulazione*. Master thesis. Università degli studi di Padova.
- [21] Fontana R., Agostini M., Murana E., Mahmuda M., Scremin E., Rubega M., Sparacino G., Vassanelli S., Fasolato C. (2017). *Early hippocampal hyperexcitability in PS2APP mice: role of mutant PS2 and APP*. Neurobiology of Aging, 550, 64:76 .
- [22] Shipley M., Ennis M. (1996). *Functional organization of olfactory system*. Journal of neurobiology, 30, 123:176.
- [23] Winner B., Kohl Z., Gag, F. (2011). *Neurodegenerative disease and adult neurogenesis*. The European Journal of Neuroscience, 33, 1139:1151.
- [24] Tolia K., Duma, J., Um K. (2011). *Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins*. Progress in Neurobiology, 94, 133:148.
- [25] Tan J., Savigner A., Ma M., Luo M. (2010). *Odor information processing by the olfactory bulb analyzed in gene-targeted mice*. Neuron, 65, 912:926.

- [26] Redolfi N., Galla L., Maset A., Murru L., Savoia E., Zamparo I., Gritti A., Billuart P., Passafaro M., Lodovichi C. (2016). *Oligophrenin-1 regulates number, morphology and synaptic properties of adult-born inhibitory interneurons in the olfactory bulb*. Human molecular genetics, 25, 5198:5211.
- [27] Lepousez G., Lledo P.M. (2013). *Odor discrimination requires proper olfactory fast oscillations in awake mice*. Neuron, 80, 1010:1024.
- [28] Huttenlocher P. (1991). *Dendritic and synaptic pathology in mental retardation*. Pediatric Neurology, 7, 79:85.
- [29] Buzsaki G, Silva F. (2012). *High frequency oscillations in the intact brain*. Progress in Neurobiology, 98, 241:249.
- [30] Kay S. (1981). *Spectrum Analysis - A Modern Perspective*. Proceedings of the IEEE, 69, 1380:1419.
- [31] Toffolo G. (2018), *Dispense dall'insegnamento di Elaborazione dei Segnali Biologici*. Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, Università degli Studi di Padova.
- [32] Zanin M., Zunino L, Rosso O., Papo D. (2012). *Permutation entropy and its main biomedical and econophysics applications*. Entropy, 14, 1553:1577.
- [33] Amigo J. (2010). *Permutation complexity in dynamical systems. Ordinal patterns, permutation entropy and all that*. Book, 49:67, Springer.
- [34] Finotello F., Scarpa F., Zanon M. (2015). *EEG signal features extraction based on fractal dimension*. Conference: Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2015 37th Annual International Conference of the IEEE, Milan, Italy, 4154:4157
- [35] Ramakers J. (2002). *Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition*. Trends in Neurosciences, 25, 4, 191:199
- [36] Lagier S., Panzanelli P., Russo R., Nissant A., Bathellier B., Sassoè-Pognetto M., Fritschy J., Lledo P. (2007). *GABAergic inhibition at dendrodendritic synapses tunes Gamma oscillation in the olfactory bulb*. PNAS, 104, 17, 7259:7264
- [37] Lagier S., Carleton A., Lledo P. (2004). *Interplay between Local GABAergic Interneurons and Relay Neurons Generates Gamma Oscillations in the Rat Olfactory Bulb*. The Journal of Neuroscience, 24, 18, 4382:4392