

## Trabajo Práctico 2

### Redes cerebrales en distintos estados de sueño

Verónica Lombardo

VERONICA.LOMBARDO.DM@GMAIL.COM

Mauro Bringas

MAUBRINGAS@GMAIL.COM

Magdalena Fernández

MFERNAND@AGRO.UBA.AR

#### Abstract

El análisis de redes cerebrales proporciona información vital sobre la organización funcional de distintas regiones cerebrales. Nos inspiramos en la investigación de Tagliazucchi y colaboradores(2013) sobre cambios en la modularidad de las redes construidas a partir de la señal de resonancia magnética funcional (fMRI) y los distintos estados de vigilia y sueño. Se buscó explorar los cambios en la red cerebral en relación con la profundidad del sueño, examinar los cambios asociados a la modularidad en función de los estados e identificar los nodos cerebrales en los que se producen estos cambios.

La exploración de características de los grafos, como el tamaño de la componente gigante, el coeficiente de clustering y la eficiencia global, nos proporcionó insights sobre la dinámica de la conectividad cerebral en función de la densidad de enlaces. La modularidad obtenida tiene diferencias significativas contra el modelo nulo indicando una organización no aleatoria de las comunidades cerebrales durante el sueño. Los métodos de Louvain y Girvan-Newman proporcionaron resultados coherentes y comparables con la investigación previa en relación a la variación en el número de módulos y la distribución de la modularidad. La cantidad de comunidades y la modularidad no mostraron diferencias significativas entre la vigilia y el sueño, sugiriendo estabilidad en la partición modular, en discrepancia con lo obtenido por Tagliazucchi.

Cuando observamos los roles de cada nodo dentro de las comunidades y sus cambios de comunidad o rol, conforme se avanza en los estados de sueño, los hubs parecieran desplazarse de la región cerebral central hacia la región cerebral frontal/parietal y el cerebelo. Del mismo modo ocurre con las comunidades según la partición de módulos de Louvain para una densidad prefijada de 0.07.

#### 1. Introducción

El campo de la neurociencia ha experimentado un crecimiento significativo en la comprensión de la actividad cerebral humana mediante el análisis de redes y grafos, especialmente en la investigación de los estados de sueño [1, 2]. La aplicación de estas herramientas para estudiar la actividad cerebral a través de registros de resonancia magnética funcional (fMRI) y electroencefalograma (EEG) se ha convertido en un área de constante desarrollo e interés científico.

La investigación neurocientífica ha demostrado que el análisis de redes cerebrales proporciona información vital sobre la organización funcional de distintas regiones cerebrales [1, 3]. Este trabajo está inspirado en la investigación de Tagliazucchi y colaboradores (2013) que se enfoca en la relación entre cambios en la modularidad de las redes construidas a partir de la señal de resonancia magnética funcional (fMRI) y los distintos estados del sueño, detectados a partir de los ritmos de onda lenta en la señal del electroencefalograma (EEG) [4]. Los estados de sueño explorados excluyen el sueño REM (rapid eye movements)

y fueron determinados manualmente por un experto siguiendo el criterio de la American Academy of Sleep Medicine (AASM)[5].

En este trabajo haremos un reanálisis de las determinaciones obtenidas por Tagliazzuchi et al. [4] e intentaremos interpretarlos en el contexto de los contenidos abarcados en la materia.

## 2. Objetivos

Este trabajo se enfoca en tres objetivos principales: explorar los cambios en la red cerebral en relación con la profundidad del sueño, examinar específicamente los cambios asociados a la modularidad en función de los estados de sueño, e identificar los nodos cerebrales en los que se producen estos cambios. Los datos utilizados en este análisis se encuentran estructurados en archivos separados por sujeto y estadio de sueño, y se basan en un total de 116 regiones cerebrales definidas por el atlas Automatic Anatomical Labeling (AAL) [6]. Para el mismo, se seguirán procedimientos de análisis exploratorio que involucran la construcción de grafos a partir de la señal cerebral, la visualización de matrices de adyacencia ponderadas, y la aplicación de medidas de densidad de enlaces para generar grafos binarios. Además, se explorarán aspectos como el tamaño de la componente gigante en los grafos, el coeficiente de clustering, la eficiencia global y la centralidad de los nodos en función de la densidad de enlaces. Posteriormente, se analizará la modularidad de las redes cerebrales en diferentes estados de sueño, utilizando algoritmos como Louvain y Girvan–Newman para la detección de comunidades. El objetivo final es comparar los resultados obtenidos con los presentados en la investigación de Tagliazzuchi y colaboradores (2013).

## 3. Métodos

### 3.1. Dataset: fuente, preprocesamiento y estructura

#### FUENTE

El trabajo se basa en un subset de los datos obtenidos por Tagliazzuchi y colaboradores (2013) que buscan relacionar cambios en la modularidad de las redes construidas a partir de la señal de resonancia magnética funcional (fMRI) con los distintos estadios del sueño . Se cuenta con información de individuos durante vigilia y distintos estadios de sueño. Cada estadio está caracterizado a través de una matriz de correlaciones que indica los enlaces presentes entre las 116 regiones cerebrales definidas.

#### PREPROCESAMIENTO Y ESTRUCTURA

El dataset trabajado cuenta con información de 18 individuos para 4 estadios de sueño. Los estadios de sueño están identificados como despierto "W", sueño leve "N1", sueño intermedio "N2" y sueño profundo "N3". En cada caso, se obtiene una matriz de correlaciones de dimensiones 116x116 que indica los enlaces presentes entre las 116 regiones cerebrales. Adicionalmente se cuenta con un archivo de atributos asociado a las distintas regiones cerebrales (aal extended withCoords.csv), donde se amplia información sobre nombre de las subregiones cerebrales, region cerebral a la que pertenecen, hemisferio y coordenadas x, y, z.

## 4. Resultados

### 4.1. Exploración de características de grafos según densidad y estadío

Inicialmente se comparó cómo varía el tamaño de la componente gigante en función de la densidad para todos los estadios. El tamaño de la componente gigante está directamente relacionado con la densidad de enlaces presentes, la estructura y propiedades. A medida que se incrementa la densidad, es decir, el porcentaje de enlaces presentes, el tamaño de la componente gigante aumenta hasta que alcanza a conectar todos los nodos activos para un estadio del sueño específico. Es de esperar que distintos estadios alcancen distintos valores máximos de la componente gigante. La forma en la que va creciendo la componente con la densidad es una característica relacionada con la estructura de la red formada por esos enlaces. En la figura 1 se puede observar que los distintos estadios del sueño tienen comportamientos diferentes. La curva N3 alcanza más rápidamente una componente con más de 90 nodos a menores densidades (0.04 apróx.). El caso contrario ocurre con N2 donde a bajas densidades es el estadio que más demora en aumentar el tamaño de su componente gigante, luego a partir de 0.02 alcanza el crecimiento de los otros estadios para luego entrar en un plató hasta densidades cercanas a 0.09 donde vuelve a crecer y alcanza junto a N3 el tamaño máximo de componente gigante observado entre los 4 estadios para la ventana de densidades exploradas (0 a 0.15). Tanto W como N1 tienen comportamientos intermedios y finalmente alcanzan componentes cercanas a 100 nodos pero de tamaño inferior a las alcanzadas por N2 y N3.

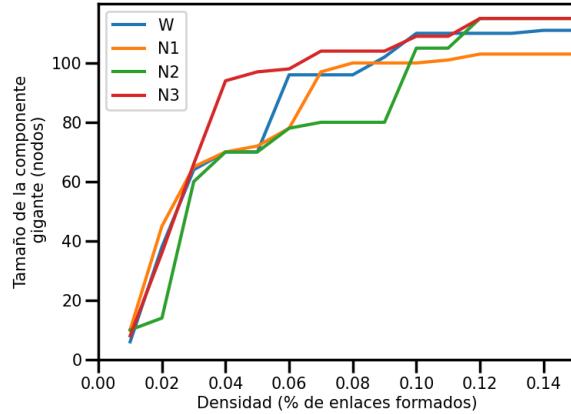


Figure 1: Tamaño de la componente gigante en función de la densidad para W y distintos estadios de sueño.

A partir de las curvas de la figura 1, elegimos un estadio y visualizamos los grafos correspondientes para valores justo antes y después de cambiar la densidad. Tomamos N2 con densidades entre 0.02 y 0.03. Se observa que antes del salto la componente gigante era menor a la del momento del salto. La componente gigante para densidades de 0.02 resulta de 14 nodos mientras que para 0.03 la componen 60. En la figura 2 se puede observar claramente como el incremento de la densidad en un centésimo cambia el tamaño de la componente gigante uniendo pequeñas componentes aisladas presentes en la densidad anterior al salto.

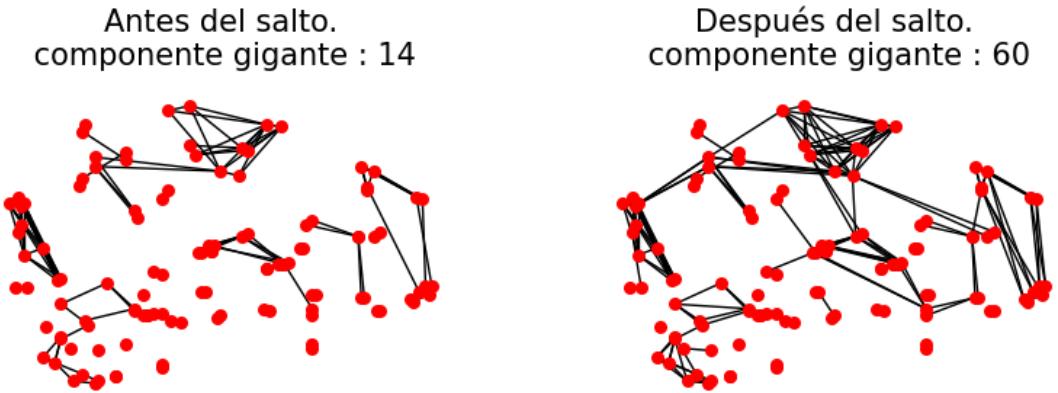


Figure 2: Cambio en la componente gigante para dos densidades (0.02 y 0.03) en el estadio N2.

Seguido se evalúa como varía el grado medio, el coeficiente de clustering medio y la eficiencia global en función de la densidad realizamos la figura 3. La relación entre el grado medio y la densidad tienen una correlación positiva ya que ambas se construyen a partir de la cantidad de nodos y enlaces, la densidad de un grafo se incrementa al aumentar el número de enlaces y lo mismo ocurre con el grado medio. Como la estructura y propiedades del grafo no se consideran en el cálculo de las dos variables, los distintos estadíos del sueño tienen la misma relación lineal dado el mismo número de nodos y cantidad de enlaces, es decir, en este caso la recta representada constituye a 116 regiones cerebrales por la densidad. Cuando observamos la evolución del coeficiente de clustering medio en relación a la densidad, a mayor densidad aumenta el coeficiente de clustering debido a que es más probable obtener nodos con tendencia al clustering en grafos más densos. Sin embargo, la topología del grafo también es determinante en esta relación y los distintos estadíos del sueño se diferencian entre curvas por este motivo. N3 es el estadío que a partir de densidades de 0.03 aprox., lidera el mayor coeficiente de clustering medio para la mayoría de las densidades exploradas. La eficiencia global también tiene una correlación positiva con la densidad, es de esperar que grafos más densos tengan mayor conectividad entre sus nodos. La eficiencia global alcanzada para estas densidades está cercana a 0.4 para los 4 estadíos, aunque N3 es levemente superior a los otros.

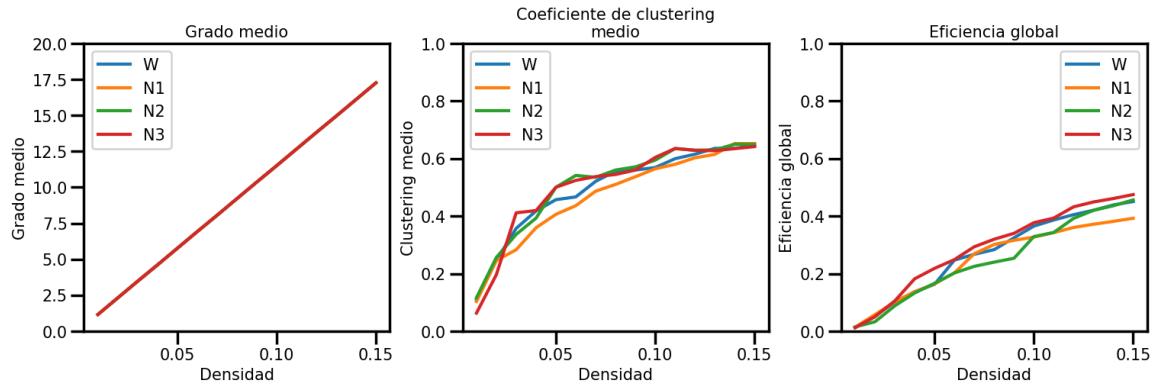


Figure 3: Grado medio, el coeficiente de clustering medio y la eficiencia global en función de la densidad para W y estadios de sueño.

Para una densidad de 0.12 , se visualizaron los grafos de cada estadio con sus coordenadas espaciales (figura 4). Los nodos están identificados con su centralidad de autovector: nodos en colores verdes tienen mayor centralidad, pues sus nodos vecinos también tienen una alta conectividad. Entre los distintos estadios, la estructura de centralidad de autovector en nodos cambia en función de la conectividad que varía. Se puede observar como desde el estadio W los nodos en las regiones del cerebelo y subcortical empiezan a perder centralidad a medida que se entra en N1 y más aún en N2. En N3 los nodos cercanos a la región del cerebro recuperan centralidad de autovector.

Nuestro gráfico coincide con las conexiones observadas en los gráficos de la publicación de Tagliazucchi y colaboradores: en N1 y N2 la centralidad de autovector es menor en el cerebelo y es mayor en los estadios N3 y W; la conexión de subcortical va disminuyendo desde W hasta el estadio N3, y va aumentando conforme pasan los estadios las conexiones frontal/parietal.

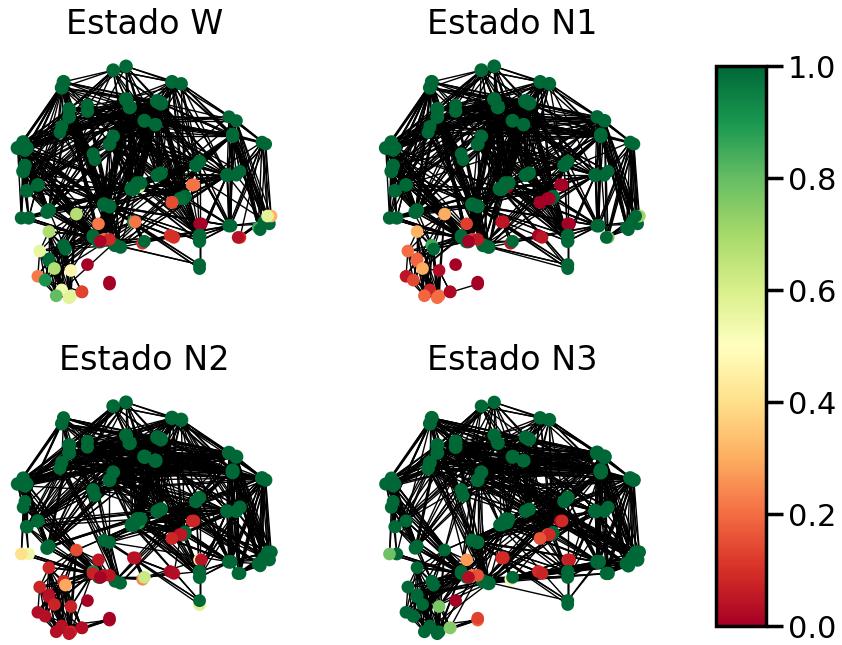


Figure 4: Grafos para W y estadío de sueño con nodos identificados en función de su centralidad de autovector.

#### 4.2. Modularidad

Se analizó como varía la modularidad entre los sujetos en cada estadio y en función de la densidad. Se determinaron comunidades para cada grafo utilizando el algoritmo de Louvain [7]. Para cada estadio de sueño y en función de la ventana de densidades explorada, graficamos el coeficiente de modularidad de Louvain de los grafos y de un modelo nulo a partir de grafos random, comparable en nodos totales y densidad. Para evaluar la significancia de la diferencia entre las curvas de nuestro dataset y el modelo nulo, utilizamos el test no paramétrico de wilcoxon, ya que si bien en la mayoría de los estadios y densidades se cumple la homogeneidad de varianzas, esto mismo no ocurre con el supuesto de normalidad. En la figura 5 se muestran los gráficos. Las diferencias observadas son significativas para todas las densidades y estadios , salvo para N2 en densidad 0.01. En conclusión, la media de la modularidad calculada mediante el algoritmo de Louvain difiere de la media de un modelo nulo para cada estadio del sueño, ya que se observa que el test de wilcoxon resulta significativo en las 15 densidades analizadas en los estadios W, N1 y N3. Para el estadio N2 dió significativo en 14 de las 15 densidades comparadas.

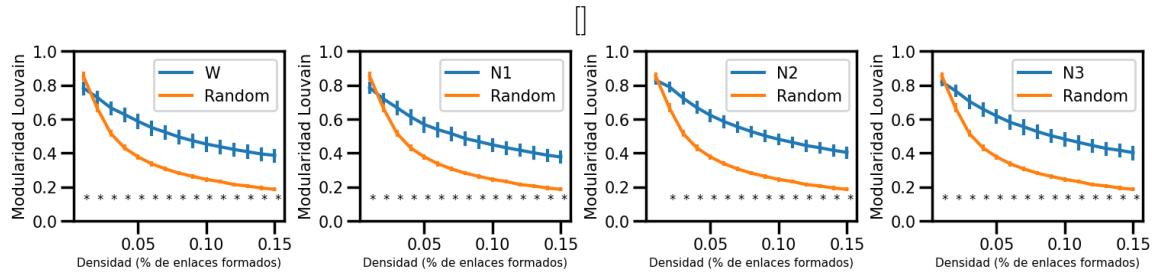


Figure 5: Modularidad de Louvain para distintos estadíos y modelo nulo (random) en función de la densidad.

Repetimos el análisis anterior, pero en este caso se tomó la cantidad de módulos en función de la densidad. La figura obtenida 6 muestra que a medida que aumenta la densidad, la cantidad de módulos disminuye. Mientras que en W y N1 esa caída es más suave, en N2 y N3 es levemente más marcada, pero en ninguno de los estadios se observa una caída tan abrupta como en el modelo nulo. Las diferencias con el modelo nulo fueron evaluadas con el test de wilcoxon que indicó significancia para todas las densidades de W y N1. En el caso de N2 y N3, la mayoría de las densidades fueron significativas. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el trabajo de Tagliazucchi et al., la cantidad de módulos de origen a bajas densidades para cualquiera de los estadios de sueño resulta inferior a los obtenidos en la investigación. Dichas diferencias es posible que se deban a la metodología de cálculo utilizada o a que nuestros individuos son una muestra de los individuos originales.

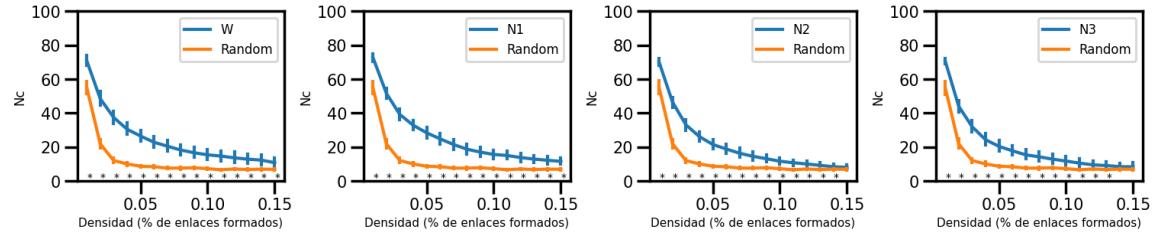


Figure 6: Cantidad de módulos ( $N_c$ ) para distintos estadíos y modelo nulo (random) en función de la densidad.

Si nos centramos en el coeficiente de modularidad de Louvain, ahora comparamos el estadio W (despierto) con cada uno de los restantes estadios (figura 7). Se analizaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, para todas las densidades en cada comparación de W con cada estadio  $N_x$  se cumple la homogeneidad de varianzas, sin embargo para 8 densidades de las 15 no se cumple el supuesto de normalidad. En caso de seguir con el test sabiendo las limitaciones, no se observan diferencias en la distribución de la media de W respecto a cada estadio del sueño. Para la comparación W-N2 sólo dieron significativas las diferencias de medias para las densidades 0.02 y 0.03, pero más allá de eso globalmente no consideramos diferencia en las medias de W respecto al estadio N2 ya que establecimos como punto de corte el 80% de los test por densidad significativos para considerar la significancia

global, es decir, debía dar significativo en 12 o más densidades para establecer diferencias. En ese punto consideramos que no es necesario realizar ningún tipo de corrección a las múltiples comparaciones ya que no nos basamos en al menos una densidad significativa sino el 80% como mínimo. Al igual que en los test realizados anteriormente se complementa el test de Wilcoxon, en este caso pareado, como versión no paramétrica arrojando los mismo resultados que el test paramétrico. Si bien la distribución de la modularidad en función a las distintas densidades resulta similar a la presentada en el paper, allí la media entre despierto (W) y los estadios N2 y N3 resultan significativos.

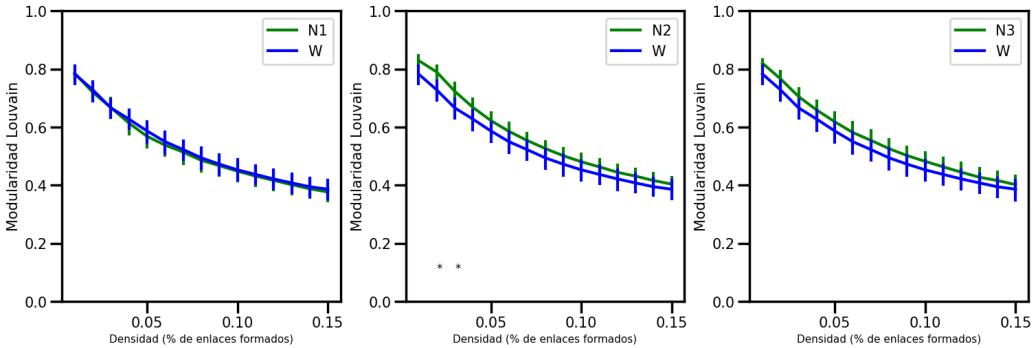


Figure 7: Modularidad de Louvain para vigilia (W) con cada estadio de sueño en función de la densidad.

Si comparamos el número de comunidades entre W y cada estadio del sueño (figura 8) , en N1 no hay densidades con diferencias significativas, en N2 en las densidades más altas (0.11 a 0.14) resultan significativas las diferencias y en N3 para 8 comparaciones, sin embargo tomamos como punto de corte que la diferencia sea significativa en al menos 12 densidades (80%). Para concluir, no hay evidencia suficiente para suponer diferencia en el número de comunidades de W y cada estadio.

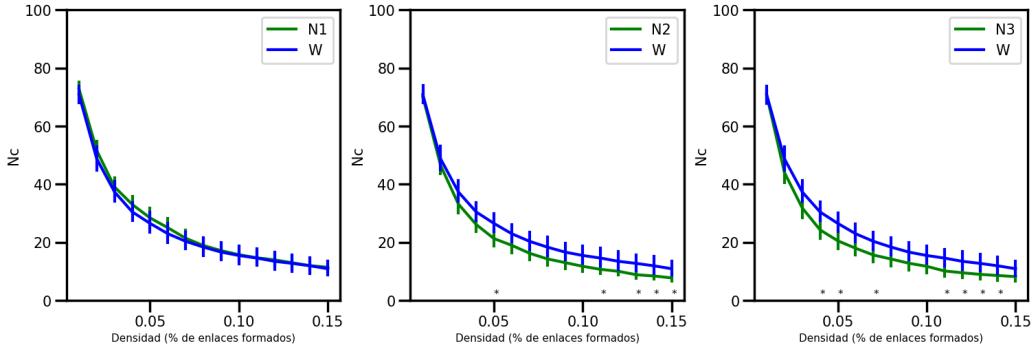


Figure 8: Número de módulos de Louvain para vigilia (W) con cada estadio de sueño en función de la densidad.

En la figura 9 se muestra como es la partición en módulos de Louvain para una densidad 0.07 (se considera dicha densidad tomando como referencia la densidad utilizada en la fig 9

del paper) en los distintos estadíos, donde nodos del mismo color pertenecen a la misma comunidad. Si bien en los puntos anteriores concluimos que no existen diferencias en la cantidad de módulos entre W y cada estadio de sueño, en esta imagen se puede ver que la importancia de cada módulo (entendida por la cantidad de nodos) varía. En W y N3 pareciera que no se identifican un módulo fuertemente predominante, mientras que en N1 y N2 el módulo verde se destaca por sobre los demás. En el caso de N1 con un módulo fuertemente predominante, como observación, presenta una componente gigante menor a la presente en W y los estadios restantes.

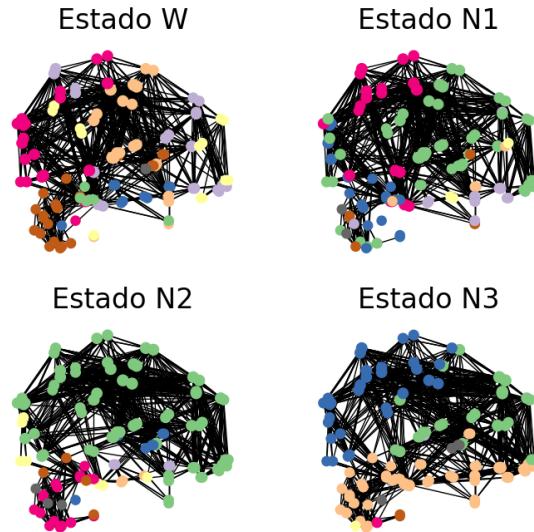


Figure 9: Partición en módulos de Louvain para una densidad 0.07 en los distintos estadios.

Opcional 1: Adicionalmente y para comparar el análisis de la modularidad y detección de comunidades aplicadas con el algoritmo de Louvain, se realizó el mismo análisis a partir del algoritmo de Girvan Newman (fig. 10). Si bien el costo computacional de Girvan Newman resulta mayor al algoritmo de Louvain ambos métodos tienen una performance similar en la detección de comunidades.

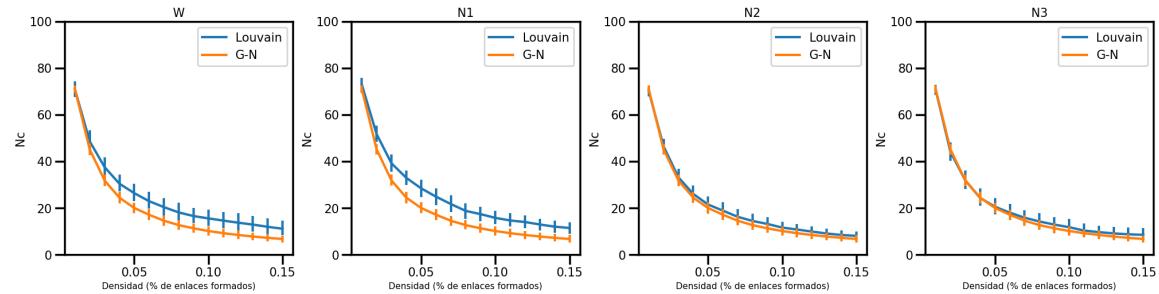


Figure 10: Modularidad de Louvain y Girvan-Newman para distintos estadios en función de la densidad

A continuación, se detallan las comparaciones realizadas a partir de la implementación del algoritmo de Girvan Newman:

1. En la comparación con un modelo nulo cada estadío del sueño posee diferencia significativa para más del 80% de las densidades, salvo el estadío N2 que resulta significativo en sólo 7 densidades de las 15 comparaciones realizadas.
2. Si se compara la modularidad obtenida por el algoritmo en el estado Wake con los restantes estadíos del sueño, no se observan diferencias significativas en ninguno de los tres análisis, al igual que en los resultados obtenidos en Louvain. Resulta importante aclarar que no es posible comparar la modularidad obtenida por estadío y densidad entre métodos ya que Girvan Newman realiza un división jerárquica, mientras que Louvain optimiza el valor iteración a iteración hasta encontrar la mejor partición. Es decir, el algoritmo de Girvan-Newman se centra en los enlaces que son más probable ”entre ” comunidades.
3. Si se compara el número de comunidades obtenidos por el algoritmo en vigilia (W) con los restantes estadíos del sueño, no se observan diferencias significativas en más del 80% de las densidades analizadas, por lo que al igual que en Louvain consideramos que no hay diferencias en la media de W respecto a cada estadío del sueño. Para la comparación W-N2 resultó significativo en 6 densidades, de 0.10 en adelante, performance similar a la obtenida en Louvain que resultó significativa en las densidades de 0.11 a 0.14. En el caso de W respecto a N3, en 11 de las 15 comparaciones resultó significativa la diferencia de medias, mientras que en Louvain la significatividad corresponde a 8 comparaciones de las 15 densidades.

Opcional 2: A partir del uso de las pruebas estadísticas, se reflexionó sobre si es necesario la corrección por comparaciones múltiples para no cometer errores de tipo I. Sobre este punto concluimos que, al no considerar diferencia de medias por la significatividad obtenida en al menos una de las comparaciones, sino que establecimos como punto de corte al menos 12 de las 15 comparaciones significativas, entonces no resulta necesario realizar corrección por comparaciones múltiples, ya que no se considera la significatividad en cada comparación sino en todo su conjunto.

#### 4.3. Diferencias entre comunidades

Con el objetivo de identificar diferencias en las particiones de comunidades entre vigilia (W) y los diferentes estadíos de sueño, se utilizó el procedimiento de Alexander-Bloch y colaboradores [8].

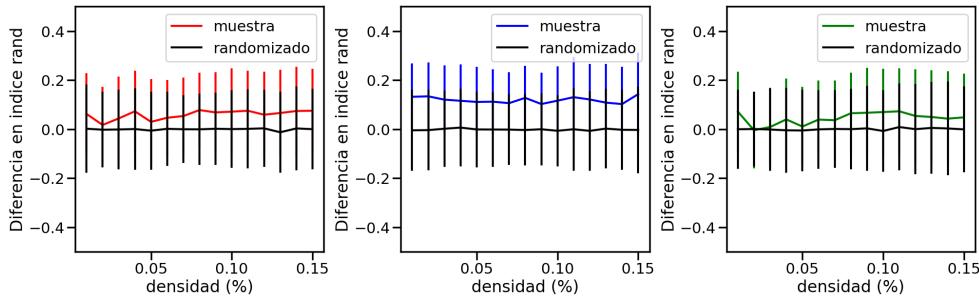


Figure 11: Diferencia en indice rand entre estados del sueño y estado despierto comparado contra randomizado (se randomiza la mitad de los sujetos en promedio) en función de la densidad de enlaces. Se marca con un asterisco aquellas densidades donde la diferencia resulta significativamente distinta de cero a nivel 0.95.

Según esta estrategia, se calculan los índices de rand en cada estadio para cada sujeto, se los promedia, y se toma la resta entre un estado de sueño y el estado de vigilia para detectar diferencias. En paralelo, se lleva adelante el mismo procedimiento realizando previamente una randomización de etiquetas (cada estado de sueño versus la vigilia) dentro de un mismo sujeto. Esto permitirá saber si, para los sujetos estudiados, tomar la medición en un estado de sueño o en vigilia efectivamente aporta de una manera significativa al promedio global y, por consecuencia, a la diferencia entre estados. Se presentan estos resultados en la figura 11. Como puede observarse, en los tres estados la diferencia en índice de rand promedio del estado vs vigilia está por encima del cero, y la media de las estimaciones randomizadas se encuentra sobre el cero.

Se evaluó la significatividad de las mediciones no randomizadas calculando la fracción de diferencias randomizadas que exceden a la determinación con las etiquetas originales. Si estas fracciones resultan menores que el 5%, consideraremos que en dicha densidad y dicho estado la diferencia es significativamente distinta de cero. En el caso particular de las mediciones analizadas, no hemos encontrado en ningún estadio y ninguna densidad valores que resulten significativos a nivel de confianza 95%. Las fracciones de intentos randomizados que calculamos oscilan entre 17 y 48%.

Opcional 3: Para definir los roles que cumple cada nodo dentro de las comunidades e identificar cuáles cambian de comunidad o de rol, clasificamos los nodos para cada estadio según el coeficiente de participación ( $P_i$ ) y el z-score del grado intra-comunidad de acuerdo a los criterios de Tagliazucchi y colaboradores considerando los umbrales  $PC = 0,05$  y  $zC = 1$ . Como se observa en la figura (fig. 12) la cantidad de Hubs aumenta conforme va aumentando la densidad de enlaces, en concordancia con la investigación previa, en contraposición disminuyen los provincial hubs acrecentándose la brecha entre estado de vigilia (W) y el estadio del sueño conforme avanzan los estadios. De mismo modo, se observa un decrecimiento de los nodos provinciales en todas las comparaciones de estadios respecto a vigilia conforme aumenta la densidad de enlaces. En cuanto a los nodos conectores, si bien se observa un crecimiento en su cantidad en función de la densidad de enlaces al igual que en la investigación previa, la forma de la distribución difiere.

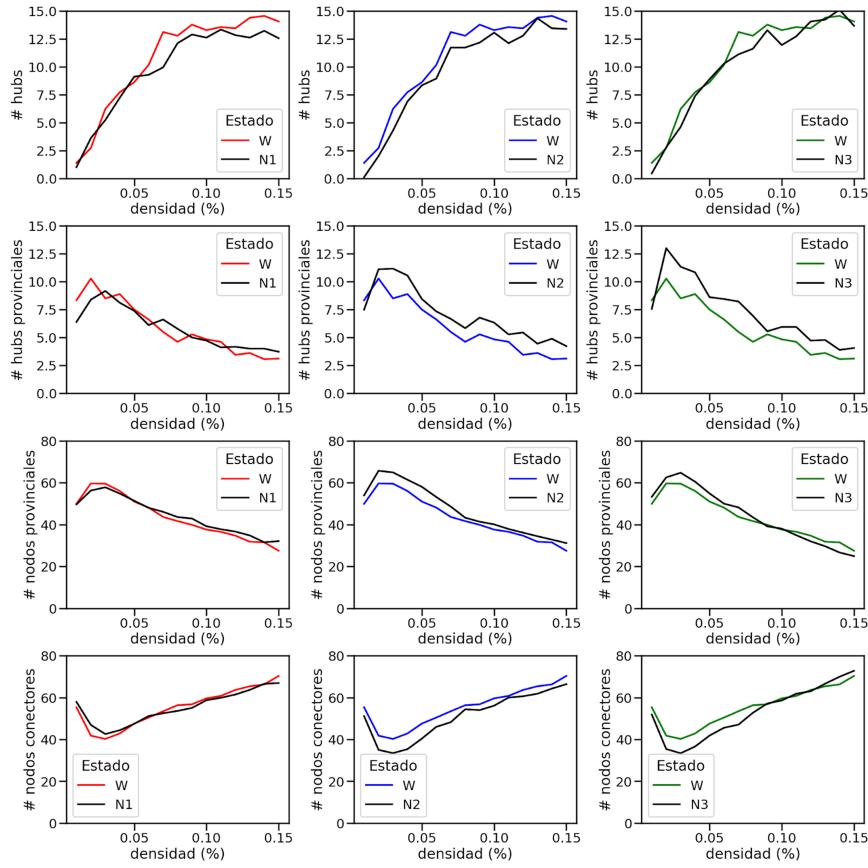


Figure 12: Hubs, hubs provinciales, nodos provinciales y conectores para vigilia (W) con cada estadío de sueño en función de la densidad

Para completar el análisis, a partir de los resultados anteriores y las matrices de adyacencia pesadas promedio para cada estadío, se seleccionó el valor de densidad 0.07 y se visualizan los Hubs, los Hubs provinciales, nodos provinciales y nodos conectores en el grafo según estadío. Como puede observarse en la figura (fig. 13 ) conforme se pasa de vigilia a estado de sueño N3 disminuye la cantidad de hubs en el cerebelo y pasan a ser hubs provinciales o nodos provinciales. Del mismo modo, los hubs que en el estadío de sueño N1 parecen estar ubicados en el región cerebral central se desplazan hacia la región frontal/parietal en los siguientes estadíos.

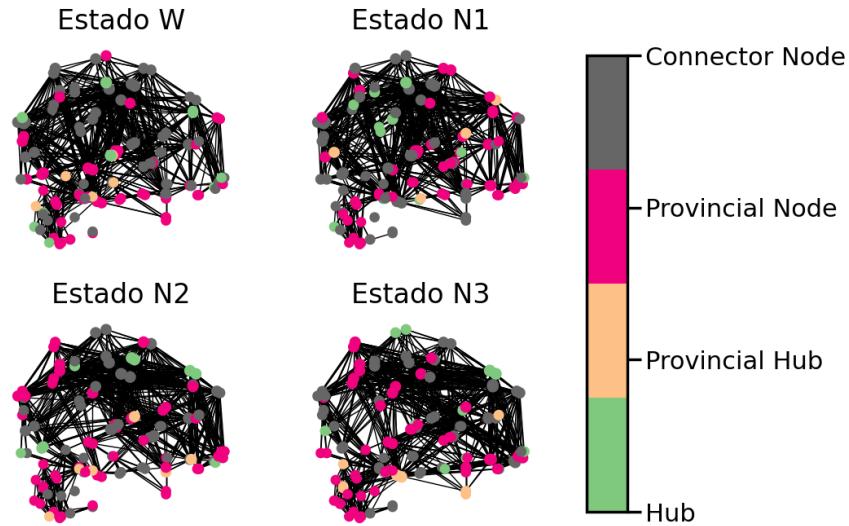


Figure 13: Hubs, hubs provinciales, nodos provinciales y conectores para una densidad 0.07 en cada estadío

## 5. Conclusión

La exploración de características de los grafos, como el tamaño de la componente gigante, el coeficiente de clustering y la eficiencia global, nos proporcionó insights sobre la dinámica de la conectividad cerebral en función de la densidad de enlaces. La comparación entre el modelo nulo y nuestros datos mostró diferencias significativas en la modularidad, indicando una organización no aleatoria de las comunidades cerebrales durante el sueño.

Al analizar la variación en el número de módulos y la distribución de modularidad utilizando dos algoritmos diferentes: Louvain y Girvan Newman, ambos métodos proporcionaron resultados coherentes y comparables con la investigación previa.

En la comparación entre vigilia y cada estadío de sueño, la cantidad de comunidades y la modularidad no mostraron diferencias significativas, sugiriendo cierta estabilidad en la partición modular entre la vigilia y el sueño, sin embargo, estas diferencias si resultan significativas en el paper.

Conforme se avanza en los estdíos del sueño, los hubs parecieran desplazarse de la región cerebral central hacia la región cerebral frontal/parietal y el cerebelo, del mismo modo ocurre con la comunidades según la partición de módulos de Louvain para una densidad prefijada de 0.07.

## 6. Disponibilidad del código

Puede acceder al Google Colab utilizado para este trabajo práctico en el siguiente [link](#)

## 7. Bibliografia

### References

- [1] O. Sporns. “Networks of the Brain.” In: *MIT press*. (2010).
- [2] A.L. Barabási. “Network science.” In: *Cambridge university press*. (2016).
- [3] M. X. Cohen. “Analyzing neural time series data: theory and practice.” In: *MIT press*. (2014).
- [4] Enzo Tagliazucchi et al. “Large-scale brain functional modularity is reflected in slow electroencephalographic rhythms across the human non-rapid eye movement sleep cycle”. In: *Neuroimage*, 70:327–339 (2013).
- [5] Berry R. B. et al. “The aasm manual for the scoring of sleep and associated events.” In: *American Academy of Sleep Medicine*, 176. (2012).
- [6] Nathalie Tzourio-Mazoyer et al. “Automated anatomical labeling of activations in spm using a macroscopic anatomical parcellation of the mni mri single-subject brain”. In: *Neuroimage*, 15(1):273–289 (2002).
- [7] V. D. et al. Blondel. “Fast unfolding of communities in large networks.” In: *Journal of statistical mechanics: theory and experiment*, 2008(10):P10008. (2008).
- [8] A. et al. Alexander-Bloch. “The discovery of population differences in network community structure: new methods and applications to brain functional networks in schizophrenia.” In: *Neuroimage*, 59(4):3889–3900 (2012).