
ESTUDO COMPARATIVO DE BIOPOTENCIAIS EXTRACELULARES EM CULTURAS EM MODELO *IN VITRO*

R.S. Ribeiro*, A.A.A. Rodrigues** e J.B.D. Filho*

*Faculdade de Engenharia Elétrica/Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

**Faculdade de Matemática/Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

e-mail: rodolfosant@gmail.com

Abstract: The classical signal processing of the bioelectrical spontaneous activity in cells culture, such as in the unicellular context of “patch-clamp”, presupposes the detection of action potentials. To avoid difficulties associated at this procedure, this paper analyzes the feasibility to use other computer measures, such as Kurtosis. Amplitudes of classical parameters are compared with kurtosis amplitude in cortical cultures context, with the development of statistical models which, after adjustment, makes possible a high linear correlation. This paper shows the equivalence of the information presents in classical analysis and that realized by Kurtosis, providing experimental subsidy for the development of new methodologies of biological signal processing.

Palavras-chave: matrizes multieletrodo, detecção de spikes, curtose.

Introdução

Uma das fronteiras na ciência biomédica consiste no desenvolvimento de próteses para o sistema nervoso central (SNC), com o objetivo de modificar terapeuticamente processos fisiológicos que foram perdidos devido a danificações ou doenças [1]. Como exemplo destas patologias, pode-se destacar a epilepsia, que envolve a atividade anômala e sincronizada de grandes grupos de neurônios no córtex humano [2]. Assim, são realizados muitos esforços para desenvolver próteses neurais que podem coexistir e comunicar bidirecionalmente com o tecido cerebral vivo [3,4].

Um dos grandes desafios para a concretização das próteses consiste em reduzir a potência consumida nos circuitos da mesma, para assegurar biocompatibilidade. Esta exigência poderia ser interpretada como reduzir o custo computacional dos algoritmos de processamento de sinais aplicados aos biopotenciais captados.

Do conhecimento dos autores, 95% dos artigos da literatura se valem da detecção de picos para efetuar a análise dos sinais. Isto pode ser explicado pelo fato do pico ser talvez uma das únicas partes do sinal mais facilmente detectável. Todavia este procedimento é fortemente influenciado pelo ruído, tanto aquele de instrumentação, quanto o ruído biológico [3]. Em consequência disso, o custo computacional de

algoritmos de processamento de sinais associados a esta abordagem clássica é bastante elevado, e portanto incompatível com os desafios atuais decorrentes da implementação de próteses.

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de dois modelos de regressão linear simples: um que relacione as variáveis “Valor médio do intervalo entre Spikes” (VMIS) e “Curtose da amplitude do sinal da atividade elétrica” (CASAE), outro que relacione CASAE e “Desvio padrão do valor médio do intervalo entre Spikes” (DP_VMIS), com um coeficiente de correlação linear de Pearson de no mínimo 0,7.

Materiais e Métodos

A - Fundamentação Teórica

Para investigação da correlação linear entre as variáveis estudadas, utilizou-se a técnica de regressão linear simples, em que considera-se um único preditor (variável independente) x e uma variável dependente ou variável de resposta Y . Suponha que a relação verdadeira entre Y e x seja uma linha reta e que a observação Y em cada nível de x seja uma variável aleatória. O valor esperado de Y para cada valor de x é dado pela equação (1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + e \quad (1)$$

Em que β_0 é a interseção e β_1 é a inclinação da reta, ambos coeficientes desconhecidos. Tem-se ainda que e é um erro aleatório com média zero e variância σ^2 . A variável dependente Y , a que deseja-se prever, é aquela de maior custo ou mais difícil de ser obtida [5].

A correlação linear entre as variáveis estudadas é medida pelo coeficiente de correlação linear de Pearson, representado pela letra R . Ele pode variar entre -1 e 1, sendo 0 o valor em que não há correlação linear nenhuma entre as variáveis e os extremos referem-se a valores em que há correlação linear máxima entre elas. Caso a correlação linear seja negativa, significa apenas que a relação entre as variáveis é inversa.

Deve-se considerar no estudo da regressão linear simples os p -valores dos coeficientes do modelo de regressão. Seja $\alpha = 0,05$ (probabilidade de cometer erro

do tipo 1). As hipóteses para testar a significância de qualquer um dos coeficientes β_i são:

$$H_0: \beta_i = 0;$$

$$H_1: \beta_i \neq 0;$$

Se o p-valor for menor ou igual a α , então rejeita-se H_0 . Logo, a respectiva variável contribui para o modelo. Caso contrário, a variável não contribui para o modelo e pode ser eliminada [6]

A diferença entre o que foi estimado pelo modelo (\hat{Y}) e o valor real da variável dependente (Y) corresponde ao resíduo ($e = \hat{Y} - Y$). Ao obter-se um modelo de regressão linear simples, supõe-se que o resíduo são aleatórios e possuem distribuição normal. Caso uma das condições citadas não seja satisfeita, o modelo é considerado inválido.

Para os casos em que o modelo seja invalidado, existe a possibilidade de ajuste do modelo [7]. Para isto, é feita a transformação das variáveis, utilizando-se por

exemplo \sqrt{Y} , $\frac{1}{Y}$, $\ln(Y)$ ou outro tipo de variável

como resposta. Após esta etapa, é refeita a regressão linear simples com todas as respectivas etapas e análises.

B – Coleta de dados

Os sinais eletrofisiológicos foram adquiridos usando o sistema MEA60 (*Multichannel Systems, Reutigen, Germany*). Culturas primárias de neurônios corticais do hipocampo de rato *Wistar* foram realizadas, extraído-se o tecido de embriões com 18 dias de desenvolvimento, após anestesia e tomados todos os cuidados necessários, estipulados pelo Comitê de Ética da Universidade de Gênova. Detalhes técnicos associados a este preparo biológico estão apresentadas e discutidas em [8]. As culturas foram crescidas sobre MEA's planares contendo 60 microeletrodos, cujas dimensões principais correspondem a 30 μm de diâmetro e 200 μm de espaçamento entre si, distribuídos em uma matriz 8 x 8, com os cantos excluídos.

O aparato experimental consistiu de uma MEA propriamente dita, que foi conectada a um banco de 60 amplificadores integrados, montados em um suporte conjunto, compreendendo os estágios de pré-amplificação e amplificação, com ganho total absoluto de 1200. Utilizou-se também um controlador de temperatura, um computador pessoal equipado com uma placa PCI de aquisição de dados para monitoramento em tempo real, um microscópio invertido, uma mesa antivibratória e uma gaiola de Faraday. Os dados foram monitorados e gravados usando o software comercial *MCRack (MultichannelSystems, Reutigen, Germany)*.

Uma cultura de atividade elétrica neuronal espontânea foi monitorada no 39º dia de incubação ou dia *in vitro* (DIV). Inicialmente, a MEA foi retirada da estufa de CO_2 e colocada sobre o respectivo banco de amplificadores. Registrou-se a atividade elétrica dos 60 microeletrodos durante um tempo total de 20 minutos, com frequência de amostragem 10 kHz.

Uma vez adquirida a atividade elétrica, foram estimadas para cada microeletrodo do dispositivo três grandezas. Uma delas corresponde ao VMIS, ou seja, o tempo médio decorrido entre a ocorrência de dois picos de atividade elétrica, conhecidos como “spikes”. A segunda grandeza corresponde ao desvio-padrão deste tempo médio, abreviado por DP_VMIS. Fisicamente, VMIS é inversamente proporcional à excitabilidade da célula, e assim quanto maior VMIS, menor a intensidade de comunicação de grupo de neurônios conectados a um certo microeletrodo com a rede da cultura. Já DP_VMIS caracteriza a variabilidade temporal da excitabilidade desse grupo. As duas grandezas foram estimadas a partir da plataforma “Spike Manager” (sistema computacional dedicado à análise de sinais eletrofisiológicos, vide [8] => mesma referencia citada há dois parágrafos atrás). A terceira grandeza é definida pelas equações abaixo:

$$\hat{M}_{4X} \cong \sum_{i=1}^Q \left(x_i - \hat{M}_{1X} \right)^4 p(x_i); Q = 30; j=3,4 \quad (2)$$

$$CASAE = (\hat{M}_{4X} / \hat{\sigma}^4) - 3 \quad (3)$$

Onde $\hat{\sigma}$ corresponde ao desvio-padrão. Fisicamente, a curtose indica a gaussianidade do sinal registrado no microeletrodo.

C - Obtenção dos modelos

Inicialmente, trabalhou-se com um banco de dados contendo 33 observações de cada variável. Após feita a análise descritiva dos dados, percebeu-se pelo gráfico *Box-Plot* a presença de 9 possíveis valores *outliers* que, após discussão com profissionais da área, foram excluídos do banco de dados, restando portanto 24 observações. Com elas, foi possível obter o Modelo 1 e o Modelo 2, pelo software *Statistica* [9].

Em (4), é apresentado o Modelo 1, atingiu R = 0,6302 (p-valor: 0,0013) e variável dependente VMIS.

$$VMIS = 1.653953 - 0,087857 * CASAE \quad (4)$$

Em (5), é apresentado o Modelo 2, que atingiu R = 0,5840 (p-valor: 0,0273) e variável dependente DP_VMIS.

$$DP - VMIS = 2,430112 - 0,10152 * CASAE \quad (5)$$

Visto que coeficientes de correlação linear de Perason não foi satisfatório, optou-se pela aplicação dos ajustes sugeridos em [7].

Assim sendo, aplicou-se a transformação de raiz quadrada na variável VMIS, obtendo-se Raiz(VMIS); Log na variável CASAE, obtendo-se Log(CASAE).

Com a transformação das variáveis, foi possível obter o Modelo Ajustado 1, que é apresentado em (6):

$$Raiz(VMIS) = 1,57 - 0,75 * Log(CASAE) \quad (6)$$

A Tabela 1 refere-se ao Modelo Ajustado 1, em que são mostrados o coeficiente de Pearson R = 0,7816, o

valor da estatística F , $F(1,22) = 34,5517$, e o respectivo p -valor, que é aproximadamente zero. Os coeficientes β_0 e β_1 apresentam p -valor = 0,00001, o que mostra que são estatisticamente diferentes de zero.

Portanto, o Modelo Ajustado 1 é significativo.

Tabela 1: Resultados para o Modelo Ajustado 1.

Coefficiente de Correlação linear de Pearson (R)	0,7816
F(1,22)	34,5517
P-valor da Regressão	0,000001

A análise de resíduos consiste em verificar se as suposições do modelo são válidas, ou seja, se os resíduos são aleatórios, sem tendências, e se possuem distribuição normal. Na Figura 1, observa-se a tendência linear dos valores e na Figura 2, observa-se a aleatoriedade dos resíduos. Pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, conclui-se que os resíduos possuem distribuição normal (p -valor: n.s.).

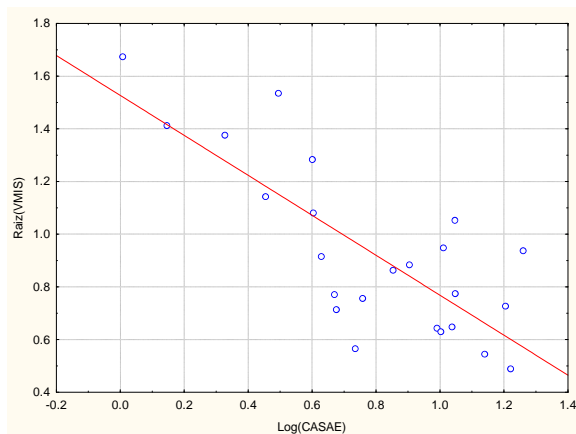


Figura 1: Gráfico de dispersão do Modelo Ajustado 1.

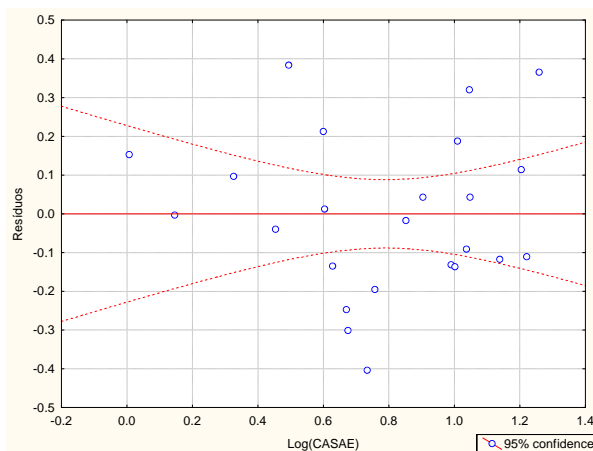


Figura 2: Gráfico de aleatoriedade da variância dos resíduos do Modelo Ajustado 1.

Este modelo foi, portanto, validado e pode ser utilizado para fazer previsões da variável Raiz(VMIS).

Para o ajuste do Modelo 2, aplicou-se Raiz4 em DP_VMIS, obtendo-se Raiz4(DP_VMIS) e Log em CASAE, obtendo-se Log(CASAE).

O Modelo Ajustado 2 pode ser visto em (7).

$$\text{Raiz4}(DP - VMIS) = 1,33 - 0,289 * \text{Log}(CASAE) \quad (7)$$

A Tabela 2 refere-se ao Modelo Ajustado 2, em que são mostrados o coeficiente de Pearson $R = 0,7258$, o valor da estatística F , $F(1,22) = 24,497$, e o respectivo p -valor, que é aproximadamente zero. Os coeficientes β_0 e β_1 apresentam p -valor = 0,00001, o que mostra que são estatisticamente diferentes de zero.

Portanto, o Modelo Ajustado 2 é significativo.

Tabela 2: Resultados para o Modelo Ajustado 2.

Coefficiente de Correlação linear de Pearson (R)	0,7258
F(1,22)	24,497
P-valor da Regressão	0,0002

Na Figura 3, observa-se a tendência linear das observações no Modelo Ajustado 2.

Foi feita a análise de resíduos para o Modelo Ajustado 2, para verificar se as suposições de aleatoriedade e normalidade dos resíduos foram atendidas. Na Figura 4, fica clara a aleatoriedade dos resíduos. A normalidade dos mesmos foi verificada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (p -valor: n.s.).

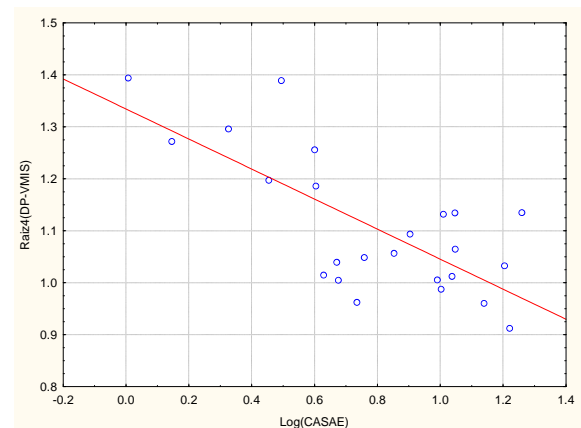


Figura 3: Gráfico de dispersão do Modelo Ajustado 2.

Após todas as suposições atendidas o modelo foi validado. É possível, portanto, realizar uma previsão da variável Raiz4(DP_VMIS) a partir da variável Log(CASAE).

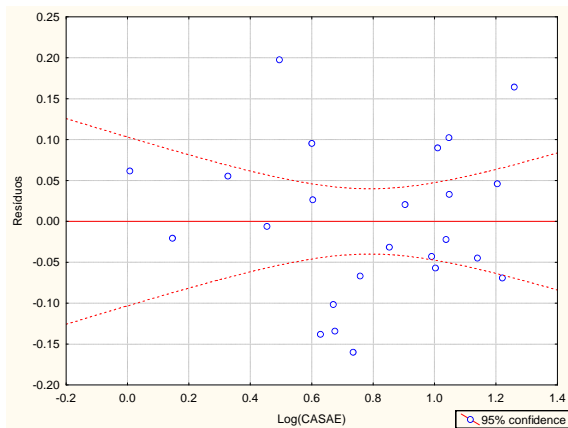


Figura 4: Gráfico de aleatoriedade da variância dos resíduos do Modelo Ajustado 2.

Resultados

Os resultados de interesse final estão colocados nas equações (6) e (7). É significativo observar que as correlações lineares para os modelos não – ajustados são baixas. Assim sendo, foi possível constatar uma relação não-linear entre grandezas clássicas do processamento de sinais neurológicos (VMIS e DP_VMIS) e uma medida alternativa tomada sobre a mesma atividade elétrica (CASAE), com correlação linear de magnitude razoável.

Discussão

Através da transformação de variáveis, conseguimos obter um modelo estatístico que relaciona tanto a intensidade média da excitabilidade neuronal quanto a variação temporal da mesma intensidade com a gaussianidade da atividade elétrica. Em síntese, demonstramos experimentalmente que a informação presente nas medidas clássicas de excitabilidade também está presente na informação propiciada pela gaussianidade. Consequentemente, a investigação de novas formas de processamento de sinais bioelétricos em cultura de células pode se valer da curtose, evitando assim as imprecisões e dificuldades ligadas à detecção de picos. Trabalhos futuros envolvem a análise de uma maior quantidade de experimentos, bem como o desenvolvimento de algoritmos de processamento baseados no conceito de curtose.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade de Gênova – Itália pela disponibilização do material, equipamento e culturas necessárias para a geração dos dados aqui analisados; bem como aos financiadores de todas as bolsas de estudo ligadas a este trabalho, a saber PIBEG-UFU, Fapesp, USP-RP.

Referências

- [1] Berger, T.W. (2001) “Brain-Implantable biomimetic electronics as the next era in neural prosthetics.” In: *Proceedings of the IEEE, Special Issue on Neural Engineering*, v.89, n.7, p.991-1012.
- [2] Durand, D.M., Bikson, M. (2001) “Suppression and control of epileptiform activity by electrical stimulation: a review”, In: *Proc. of the IEEE*, vol. 89, n. 7, pp. 1065-1082.
- [3] Akay, M. (2007) *Handbook Of Neural Engineering*. New York: IEEE Press, 2007, 662 pg.
- [4] Kandel, E.C., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2000) *Principles of neural sciences*. New York: Mc-Graw Hill Inc., 1413 p.
- [5] D.C. Montgomery, G.C. Runger. (2008) *Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. [Applied statistics and probability for engineers, 4th ed. (inglês)]*. Tradução e revisão técnica de Verônica Calado. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC.
- [6] Bussab, W.O.; Morettin, P.A. (2010) *Estatística básica*. 6 ed. São Paulo: Editora Saraiva.
- [7] Montgomery, D.C.; Peck, E. A.; Vinning, G. (2007); *Introduction to linear regression analysis*. 4th ed. Ed. Wiley Interscience.
- [8] Chiappalone, M. Bove, M. Vato, A., Tedesco, M., Martinoia, S. (2006) “Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development”, *Brain Research*, 1093, pp. 41-53.
- [9] STATISTICA. *Software Statistica, versão 9*. Copyright ©StatSoft, Inc.