

ANÁLISE DE CORRENTES IÔNICAS UNITÁRIAS POR MODELAGEM PONTO-EVENTO

por

N. G. Castro¹, Y. Aracava² e F. F. Nobre³

RESUMO -- Uma das dificuldades comuns na análise do sinal de correntes iônicas unitárias é a detecção e quantificação de fenômenos não estacionários e de dependências entre eventos. Este problema foi abordado pela aplicação de métodos estatísticos próprios da análise de processos ponto-evento ao processo estocástico definido pelos instantes de abertura dos canais iônicos. Neste trabalho, são descritos resultados preliminares da aplicação deste procedimento ao estudo da dessensibilização do receptor-canal iônico de acetilcolina. A abordagem proposta mostrou-se eficiente na detecção de tendências e de dependências entre aberturas dos canais iônicos.

INTRODUÇÃO

As correntes iônicas unitárias registradas pela técnica eletrofisiológica de "patch clamp" (Hamill et al., 1981) são uma fonte de informação fundamental no estudo da excitabilidade celular e da farmacodinâmica de receptores químicos acoplados a canais iônicos. O sinal colhido com esta técnica é caracterizado pela oscilação da corrente entre um pequeno número de níveis discretos, como em um sinal telegráfico aleatório generalizado. Estas transições entre níveis são praticamente instantâneas e ocorrem aleatoriamente no tempo, correspondendo aos instantes de abertura e de fechamento de canais iônicos individuais. Nos registros em que o número de canais em atividade é pequeno, o sinal pode ser esquematizado como na figura 1, onde o período em que o canal permanece aberto é representado por um pulso retangular de corrente.

Estes fenômenos moleculares são essencialmente estocásticos e assim têm sido tratados em termos de modelagem. O tipo de modelo mais utilizado considera as transições como ocorrendo de acordo com um processo de Markov (Colquhoun e Hawkes, 1983). Há, no entanto, situações experimentais em que a estimação de um modelo baseado no processo de

¹-Mestrando do Programa de Engenharia Biomédica, COPPE/UFRJ, Centro de Tecnologia, bloco H, sala 327 - Caixa Postal 68510 - CEP 21944 - Rio de Janeiro - RJ.

²-Profa. Adjunta, Lab. de Farmacologia Molecular II, IBCCF/UFRJ.

³-Prof. Adjunto, Programa de Engenharia Biomédica, COPPE/UFRJ.

Markov é extremamente difícil ou ainda inadequada, como nos casos em que o processo é não-estacionário ou em que os pressupostos de independência são inválidos.

Neste trabalho, é estudado o processo ponto-evento definido pelos instantes de ocorrência das aberturas dos canais, com o objetivo de caracterizar o processo de geração do sinal nas situações que se desviam do modelo de Markov em regime estacionário, como durante o aparecimento do fenômeno de dessensibilização.

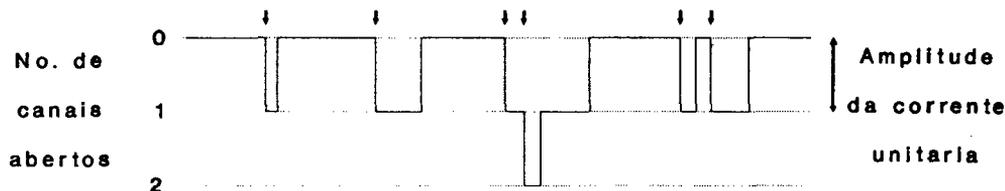


Figura 1. Esquema do registro de correntes iônicas unitárias. Os pulsos de corrente são representados para baixo da linha de base (corrente para dentro da célula); as setas indicam os instantes de abertura dos canais. Representamos a superposição de duas aberturas simultâneas.

O complexo canal iônico - receptor de ACh manifesta dessensibilização quando exposto a altas concentrações de ACh. Isto significa que a resposta (aberturas do canal) decai ao longo do tempo de maneira concentração-dependente (Ochoa et al., 1989). Este fenômeno deve se refletir, ao nível das correntes unitárias, como uma forma de tendência na taxa de ocorrência de aberturas. Além deste efeito, o aumento de concentração faz com que as aberturas tendam a se agrupar no tempo, como foi observado inicialmente por Sakmann et al. em 1980. A presença destes efeitos foi investigada usando técnicas de análise de processos ponto-evento (COx e Lewis, 1966), considerando a hipótese nula de que o processo seja Poisson, isento de tendências ou outras formas de dependências entre eventos.

MATERIAIS E MÉTODOS

As fibras isoladas foram obtidas por dissociação enzimática aguda (colagenase, 100 mg% por 2 h e protease, 16 mg% por 10 min; Sigma) do músculo interósseo do dedo maior da pata traseira da rã *Leptodactylus ocellatus*, dissecado em solução de Ringer com tetrodotoxina 0,3 M (Allen et al., 1984). O sinal foi adquirido com um sistema de "patch clamp" List EPC-7 (List Instruments, Darmstadt) na configuração "cell attached" (Hamill et al., 1981), usando microeletrodos de vidro de borossilicato preenchidos com solução de Ringer mais acetilcolina, à temperatura de 10°C. Registros em que a amplitude média da corrente unitária foi pelo menos 5 vezes maior que o valor RMS da linha de base foram filtrados a 3 kHz (-3dB, Bessel, 8 polos), digitalizados a 12.500 amostras/s e armazenados em discos rígidos de microcomputadores tipo PC. Em todos os experimentos foi registrada continuamente toda a atividade dos canais, desde imediatamente após o estabelecimento do selo entre a membrana e o microeletrodo até o

esgotamento da preparação.

As transições no sinal digitalizado foram detectadas com o programa IPROC (Sachs et al., 1982) por cruzamento de um limiar relativo à linha de base de 50% da amplitude média estimada da corrente unitária. O relatório da detecção foi pós-processado para cálculo dos intervalos entre aberturas, obtendo-se assim as séries de intervalos para análise.

RESULTADOS

Aquisição e inspeção do sinal

Foram realizados experimentos com três concentrações de ACh: $0,4 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ e $2,0 \mu\text{M}$. Para cada concentração, foi selecionado um registro em que a amplitude média da corrente unitária foi de aproximadamente $5,5 \text{ pA}$, correspondendo a um potencial transmembrana em torno de -130 mV (hiperpolarização), e em que a taxa média de ocorrência foi de aproximadamente 1 abertura por segundo.

O aspecto do sinal no primeiro minuto de registro é semelhante nos três casos, exceto por uma grande diferença na taxa de ocorrência, crescente na ordem $0,4 \mu\text{M} < 1,0 \mu\text{M} < 2,0 \mu\text{M}$. No registro com $0,4 \mu\text{M}$ de ACh, não pareceu haver qualquer modificação do padrão do sinal ao longo do tempo. Já nos outros dois, se observou claramente uma queda na frequência de eventos. Na maior concentração usada, ficou evidente uma tendência ao agrupamento, marcada pelo aparecimento de intervalos sem atividade progressivamente maiores. A figura 2 mostra dois trechos deste registro, no primeiro minuto e aos 8 minutos, em escalas diferentes de tempo, ilustrando a estrutura detalhada do sinal e o padrão de agrupamento observado. Uma vez geradas as séries de intervalos entre aberturas, uma maneira conveniente de se visualizar o processo é através de gráficos do número de eventos acumulados em função do tempo, como na figura 3, à esquerda. Nestes gráficos, a inclinação da reta que une dois pontos é igual à taxa média de ocorrência no intervalo de tempo entre eles. O decaimento da atividade se manifesta na curvatura e o agrupamento na presença de degraus no gráfico. Na figura 3c, com ACh $2,0 \mu\text{M}$, aparece um longo trecho sem atividade, seguido por um agrupamento de aberturas muito próximas, característicos do processo de dessensibilização (Sakmann et al., 1980).

Análise

Foram usadas inicialmente duas formas de teste não paramétrico baseados no número de "runs" nas séries de intervalos (Lehman e D'Abbrera, 1975). Em um teste, o "run" é considerado como uma seqüência de intervalos crescentes ou decrescentes ("runs" para cima ou para baixo), no outro, um "run" é uma seqüência de intervalos acima ou abaixo da mediana da série. Foram computadas estimativas dos coeficientes de correlação serial (CCS_k) e da função de densidade esperada (FDE) ou auto-correlação de eventos, de acordo com as expressões

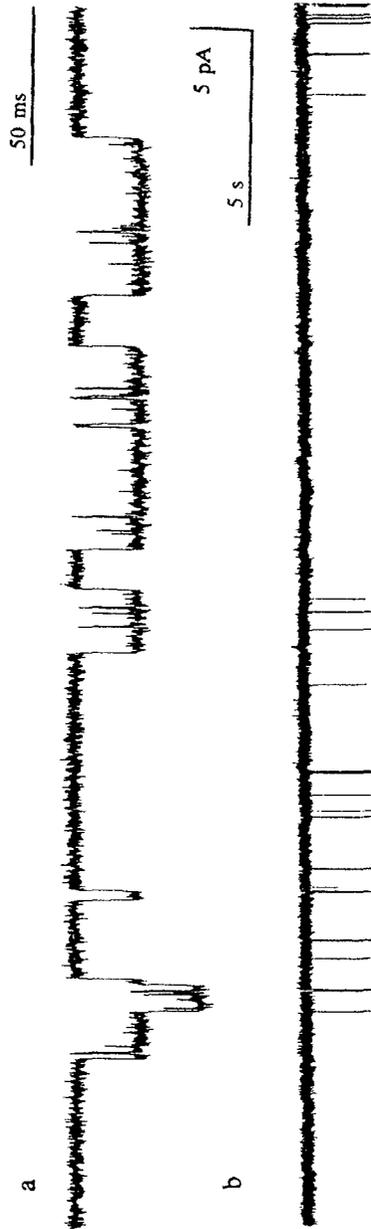


Figura 2 - Traçados de corrente unitária. **a**, canais ativados com ACh 2,0 μ M, primeiro minuto de registro **b**, mesmo experimento, aos 8 minutos de registro, em escala de tempo comprimida para evidenciar o agrupamento de aberturas.

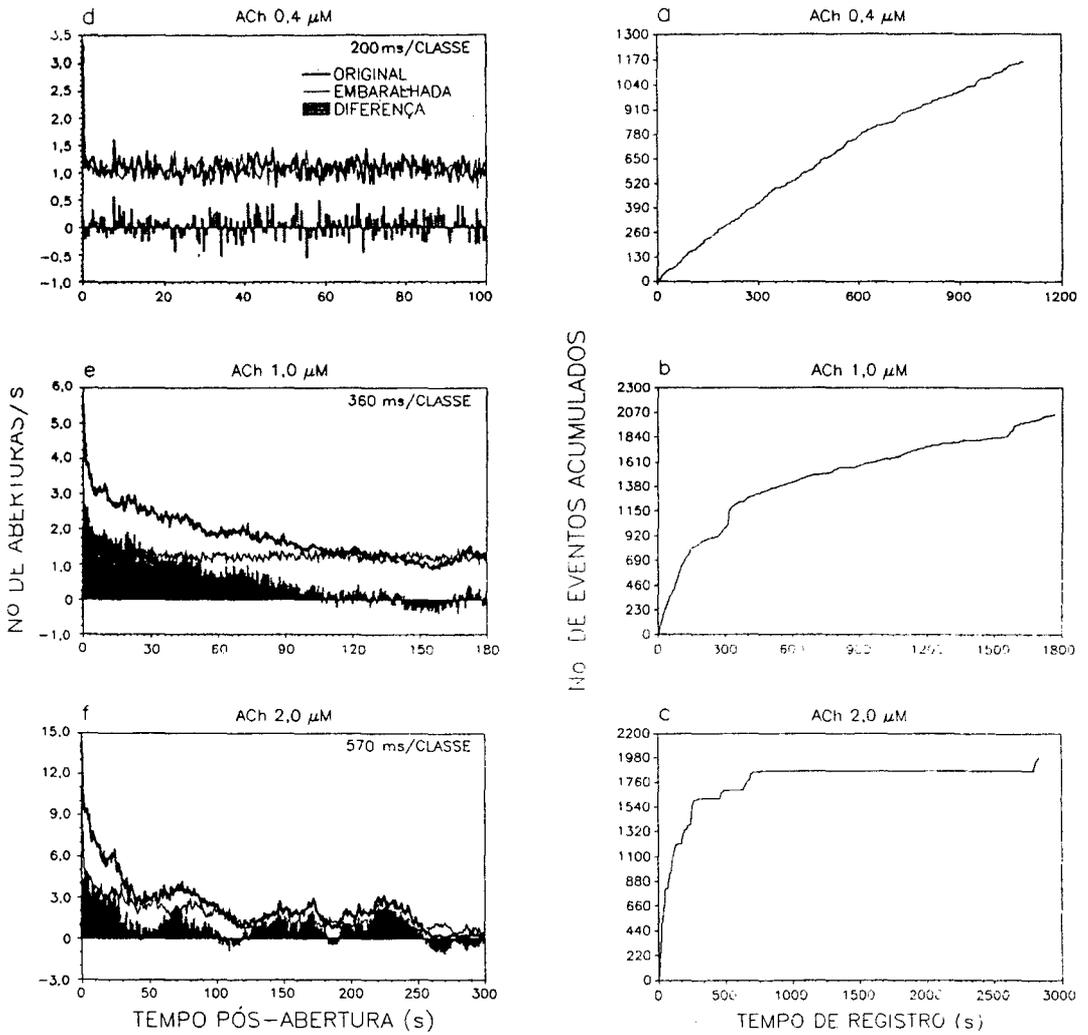


Figura 3 - **a, b e c** acúmulo de eventos em função do tempo de registro. **d, e e f** histogramas da função de densidade esperada (FDE). **a e d**, ACh 0,4 μM , **b e e**, ACh 1,0 μM **c e f**, ACh 2,0 μM .

dadas por Cox e Lewis (1966). Foi usado o procedimento de embaralhar as séries de intervalos para servir como um controle, sem dependências seriais. O método para comparação com a seqüência de intervalos originais descrito por Poggio e Viernstein (1964) é baseado no escalonamento das séries, i.e., obtenção das séries de intervalos escalonados de ordem n (X_i^n), de acordo com a expressão:

$$X_i^n = \sum_{j=0}^{n-1} X_{i+j} \quad n, i = 1, 2, \dots \quad (1)$$

onde X_i são os intervalos entre eventos. O teste consiste em se calcular os pares de média \bar{X}^n e desvio padrão s^n das séries escalonadas a partir da série original e a partir da série embaralhada aleatoriamente. O gráfico de $\log \bar{X}^n$ versus $\log s^n$ deve ser ajustado por uma reta de coeficiente angular 0,5, se não houver dependências entre eventos. As estimativas de FDE também foram computadas após embaralhamento das séries e depois subtraídas da FDE das séries originais.

Finalmente, foi usado um teste específico para tendências monotônicas na série de eventos, descrito por Cox e Lewis (1966). O teste é baseado em um modelo de Poisson não-homogêneo, com taxa de ocorrência $\lambda(t)$ variando exponencialmente com o tempo, i.e., $\lambda(t) = \exp(\alpha + \beta t)$. Neste caso, a hipótese nula é de $\beta = 0$, ou taxa de ocorrência constante. A estatística de teste u tem distribuição assintoticamente normal.

As probabilidades bicaudais dos números de "runs" encontrados, na hipótese de estacionariedade, estão relatados na tabela 1, 6ª e 7ª. colunas (Pr_M e Pr_{CB}). O teste para cima e para baixo, r_{CB} , não permitiu rejeitar a hipótese de estacionariedade, apesar de ser supostamente sensível a tendências. O teste em torno da mediana (r_M) foi positivo nas duas primeiras séries, mas não na terceira. Este teste é sensível ao agrupamento de valores semelhantes, mas não acusou a óbvia presença de agrupamento da série de ACh $2,0 \mu M$.

Tabela 1

[ACh]	T	N	λ	CV	Pr_M	Pr_{CB}	CCS_1 (prob)	u	α_{Or}	α_{Emb}
0,4	1088	1161	1,07	1,71	<0,001	0,62	0,053 (0,071)	-7,83	0,55	0,51
1,0	1769	2053	1,16	2,99	<0,001	0,98	0,175 (<0,001)	-34,12	0,70	0,49
2,0	2832	1991	0,70	26,71	0,86	0,42	-0,001 (0,96)	-58,91	0,56	0,50

[ACh] concentração de ACh em μM ; T, duração do registro em s; N, número de aberturas; λ , taxa média de ocorrência; CV, coeficiente de variação; outros ítems definidos no texto.

O primeiro coeficiente de correção serial, CCS_1 , é apresentado na 8ª coluna da tabela 1, junto com sua probabilidade bicaudal na hipótese de independência, (prob). Foi

calculado o CCS_k para retardos de até 10% do número de intervalos nas séries (não mostrado), mas o estabelecimento de significância para $K > 2$ é difícil. Na série de ACh 0,4 μ M, nem o CCS_1 nem os seguintes foram significativamente diferente de zero. Na série de ACh 1,0 μ M, o CCS_1 foi significativamente maior que zero e todos os seguintes foram positivos, o que é uma forte indicação de tendência monotônica na série. Na terceira série, o CCS_1 não foi significativo mas o CCS_2 (igual a 0,225) é significativo ao nível de 99% de confiança. Entre CCS_3 e CCS_{169} os valores foram próximos de zero (entre -0,003 e 0,024) e quase todos negativos. O CSC_{170} de 0,627 chamou atenção pelo alto valor e por estar isolado.

A estatística u de teste de tendência exponencial está na 9ª coluna da tabela 1. Todos os valores foram negativos e significativos ao nível de 99%, indicando a presença de tendência decrescente na taxa de ocorrência de aberturas.

A média e o desvio padrão foram computados para escalonamento de até 20ª ordem. A regressão linear de X^n em s^n teve coeficiente de determinação maior que 0,99 nas três séries, tanto nas originais quanto nas embaralhadas. Os coeficientes angulares para as séries originais estão na coluna 10 da tabela 1 (α_{or}), tendo sido todos maiores que 0,5. Os coeficientes para as embaralhadas estão na última coluna da tabela (α_{Emb}) e foram próximos de 0,5, como esperado. As diferenças são significativas, dada a pequena variância dos erros na regressão, e apontam para uma correlação positiva.

As FDEs foram estimadas através de histogramas normalizados de forma a representar a taxa de ocorrência ao longo do tempo, a partir de uma abertura arbitrária no tempo zero. Na figura 3, à direita, mostramos as FDEs das séries originais (curva em negrito), das embaralhadas (curvas mais claras) e as respectivas diferenças ponto a ponto (barras em cinza). Observamos nas três concentrações que o máximo de densidade esperada se dá imediatamente após o zero, tanto nas séries originais quanto nas embaralhadas. Isto deve ser provocado pelo excesso de intervalos curtos, originados nas interrupções curtas dos pulsos de corrente. Para uma distribuição de intervalos exponencial, a FDE seria constante, igual à taxa média de ocorrência. Nestas três amostras, a FDE decai do valor máximo inicial até se aproximar da taxa média (tabela 1, coluna 4). Para ACh 0,4 μ M, não parece haver diferença entre FDE da série original e a do controle. Para ACh 1,0 μ M, a FDE controle decai rapidamente para o platô, enquanto que a original só o atinge em torno de 110 s pós-abertura. As FDEs para a série de 2,0 μ M são mais complexas; mesmo a do controle apresenta oscilações. Na diferença entre as duas se observa o decaimento inicial e, em seguida, uma oscilação aparentemente periódica.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste estudo preliminar, foi possível observar que a estrutura do processo ponto-evento derivado do sinal de correntes unitárias é bastante complexa. Os resultados apresentados indicam que não nos podemos basear em um único teste para qualificar as amostras do processo, uma vez que frequentemente há discordância entre eles. Uma exceção foi o teste de

tendência, em que a estatística de teste (u) acompanhou em magnitude o aparente aumento na taxa de ocorrência em função da concentração. O teste de "runs" acima e abaixo da mediana foi negativo em alguns casos inesperados. Quanto à correlação serial, notamos que grande parte da informação de interesse está nos coeficientes de ordem maior que 1. Para série de ACh $2,0 \mu\text{M}$, uma análise baseada no primeiro coeficiente (p. ex. através de diagramas de dispersão) não evidenciaria a correlação que aparece em coeficientes seguintes. O tamanho da amostra que obtemos comumente nestes registros experimentais justifica que se valorize estes dados, apesar do desconhecimento da distribuição dos coeficientes e da conseqüente dificuldade de se testar significância (Cox e Lewis, 1966).

A grande variabilidade dos dados, avaliada pelos coeficientes de variação (CV, na 5ª coluna da tabela 1), é provavelmente responsável por muitas das discrepâncias observadas. Esta variabilidade parece ser condicionada por dois fatores: o agrupamento de aberturas e a tendência na taxa de ocorrência. Estes fatores são particularmente importantes no processo de dessensibilização, mas são conspícuos nas mais diversas situações experimentais em que se registra correntes iônicas unitárias. A hipótese nula de um processo de Poisson pareceu insuficiente para distinguir estes dois efeitos. O emprego de métodos baseados na comparação da série observada com o controle obtido da própria série embaralhada permitiu destacar o padrão devido às tendências daquele devido ao agrupamento dos intervalos.

Este estudo preliminar indica que a modelagem ponto- evento é útil na análises de correntes unitárias, ao menos na detecção de tendências e de dependências seriais entre evento. O método pode ser aplicado para qualquer outra definição de evento no sinal, particularmente quando se pode identificar mais de um tipo de evento no mesmo registro, como p. ex. pulsos de corrente de diferentes amplitudes. Esta abordagem deve se complementar pela incorporação de um modelo para os dados, para que se possa passar à estimação de parâmetros de interesse no estudo do sistema biológico subjacente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Edson X. de Albuquerque, pelo apoio a este projeto e aos financiadores CAPES, CNPq e Programa de Farmacologia Molecular FINEP/Univ. of Maryland.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, C. N.; AKAIKE, A. e ALBUQUERQUE, E. X. (1984): The frog interosseal muscle fiber as a new model for patch-clamp studies of chemosensitive and voltage-sensitive ion channels: actions of acetylcholine and batrachotoxin. *J. Physiol. (Paris)*, 79:338-343.
- COLQUHOUN, D. e HAWKES, A. G. (1983): The principles of stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. In: SAKMANN, B. e NEHER, E. (eds.) *Single Channel Recording*. Plenum Press, New York, pp. 135-175.
- COX, D. R. e LEWIS, P. A. W. (1966): *The statistical Analysis of Series of Events*. Methuen,

London.

- HAMILL, O. P.; NEHER, E.; SAKMANN, B. e SIGWORTH, F. J. (1981): Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.
- LEHMAN, E. L. e D'ABRERA, H. J. M. (1975): *Nonparametrics. Statistical Methods Based on Ranks.* Holden-Day, San Francisco, chap. 7.
- OCHOA, E. L. M.; CHATTOPADHYAY, A. e McNAMEE, M. G. (1989): Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell. Mol. Neurobiol.* 9(2):141-178.
- POGGIO, G. F. e VIERNSTEIN, L. J. (1964): Time series analysis of impulse sequences of thalamic somatic sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 27:517-545.
- SACHS, F.; NEIL, J. e BARKAKATI, N. (1982): The automated analysis of data from single ionic channels. *Pflugers,Arch.* 395:331-340.
- SAKMANN, B.; PATLAK, J. e NEHER, E. (1980): Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* 286:71-73.

THE ANALYSIS OF UNITARY IONIC CURRENTS BY POINT PROCESS MODELING

ABSTRACT – One of the common difficulties in the analysis of unitary ionic current recordings is the detection and quantification of non-stationary phenomena as well as of dependencies between events. We have approached this problem by the application of statistical methods akin to point process analysis to the stochastic process defined by the openings of ion channels. In this paper we describe the preliminary results of the use of this procedure in the study of the acetylcholine receptor-channel desensitization. The proposed statistical approach was proven efficient in the detection of both tendencies and dependencies between openings of the ion channels.