

## **AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DETECTORES DE TRANSIÇÕES DE CORRENTES IÔNICAS EM REGISTROS MULTINÍVEL DE CANAIS UNITÁRIOS**

por

CIDADE G.A.G.<sup>1</sup>, e INFANTOSI A.F.C.<sup>2</sup>,

**RESUMO** – O entendimento do comportamento cinético de canais iônicos isolados em membranas celulares e artificiais tem sido objeto de estudo da biofísica e da farmacologia molecular. A detecção dos instantes de abertura e fechamento de canais iônicos, inicialmente realizada por inspeção visual, é atualmente efetuada utilizando-se algoritmos computacionais baseados em limiar fixo ou ajustável pelo usuário. O presente trabalho objetiva investigar o desempenho de diferentes algoritmos de detecção de transições de correntes iônicas em registros multinível de canais unitários simulados. Os detectores por limiar adaptativo e fixo foram implementados em um computador IBM PC-AT. Curvas R.O.C e de Distribuição dos Tempos de Duração dos Eventos foram utilizadas na avaliação destes detectores, bem como serviram para determinar o ajuste ótimo de critérios específicos do processo de detecção. Os resultados obtidos indicam ter o detector de limiar adaptativo desempenho similar àquele de limiar fixo, sendo entretanto menos sensível à estimativa da amplitude unitária.

### **INTRODUÇÃO**

As correntes iônicas compõem o substrato microscópico de qualquer sinal elétrico biológico, seja este um sinal eletrocardiográfico ou eletroencefalográfico. Tais correntes resultam da dinâmica de abertura/fechamento de canais iônicos, formados a partir de mudanças conformacionais das proteínas presentes na membrana. O estudo destas correntes possibilita a investigação tanto dos aspectos biofísicos (tais como seletividade iônica, efeitos do potencial transmembrana) como farmacológicos da membrana.

---

<sup>1</sup>-Mestre em Engenharia Biomédica (PEB) COPPE/UFRJ.

<sup>2</sup>-Docente Programa de Engenharia Biomédica(PEB)- COPPE/UFRJ.

Caixa Postal 68.510, 21945 - Rio de Janeiro - RJ.

O registro de correntes iônicas permite estudar o comportamento de canais iônicos isolados, CANAIS UNITARIOS, em membranas de células "in vitro" - técnica de "patch-clamp" - (NEHER & SAKMANN, 1976) ou de composição conhecida - técnica de "bilayer" - (BEAN, 1969). As transições de correntes iônicas relacionadas a atividade de canais unitários denomina-se AMPLITUDE UNITARIA do registro. A atividade de diversos canais de igual condutância resulta, em determinados instantes, na soma destes níveis de mesma amplitude unitária, caracterizando o REGISTRO MULTINIVEL DE CANAIS UNITARIOS.

Tendo em vista que o processo visual de identificação e contagem de eventos válidos em sinais de correntes iônicas torna-se moroso e tedioso durante a inspeção de registros muito extensos, o nível de atenção exigido começa a decair ao longo do tempo, resultando em prováveis erros de detecção. Em substituição a este processo, a utilização de algoritmos computacionais possibilita determinar com maior velocidade e precisão a presença de eventos válidos, segundo ajustes de critérios específicos.

A maioria dos algoritmos existentes limita-se a detecção de registros de correntes iônicas com apenas 1 (um) nível de condução, como é caso do IPROC ("Integer Processor")(SACHS, 1982), o mais utilizado. Para a análise de registros com mais de um nível, VIVAUDOU (1986) sugere a utilização de IPOCH ("Interactive Processing of Channel Data"), cujo método de detecção baseia-se na compressão do sinal original, sem que seja necessário determinar sua linha de base. Tal metodologia requer que se conheça o sinal completo para o cálculo de um limiar fixo de detecção, a partir da estimativa de amplitude unitária. Por outro lado, CIDADE (1990) propõe a utilização de um método de detecção baseado em limiar adaptativo, que procura ajustar-se progressivamente às características do sinal, a partir de uma população de transições locais em registros multinível de canais unitários.

O presente trabalho objetiva avaliar o desempenho dos detectores de limiar adaptativo e fixo aplicados a registros multinível de correntes iônicas simulados. As curvas da simulação Característica Operacional do Detector (curvas R.O.C), e de Distribuição Acumulativa dos Tempos de Duração dos Eventos serão utilizadas no processo de avaliação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A simulação de registros de correntes iônicas multinível de canais unitários foi efetuada à partir da geração das distribuições dos tempos de duração de eventos (abertura/fechamento de canais) e do ruído aditivo. A distribuição dos tempos de duração é caracterizada por uma exponencial decrescente, com constante de tempo dependente da cinética de abertura/fechamento de canais (COLQUHOUN, 1983).

Para os sinais simulados foram utilizados tempos médios de duração entre 150 e 400 ms, em intervalos de 50 ms. O ruído aditivo foi assumido ter distribuição Gaussiana com variância unitária em mV (VIVAUDOU, 1986). Os registros simulados resultantes contêm 60.000 pontos (equivalente a 60 segundos), sendo compostos por 366 eventos aleatoriamente

distribuídos em três níveis, cada um deles com amplitude unitária de 1 pA, e apresentando diferentes relações Sinal/Ruído ( $S/R=3, 4$  e  $5$ ). Na Fig. 1b é exibido um registro simulado com ruído aditivo ( $S/R=5$ ) e seu correspondente traçado sem ruído (Fig. 1a).

A aplicação dos detectores em estudo consiste fundamentalmente de duas etapas: filtragem não-linear e detecção baseada em limiar. A primeira compreende o aumento da relação Sinal/Ruído através de uma variação da técnica AZTEC (COX, 1968) de compressão de dados, resultando em uma sequência de patamares de durações que não afetem o teor informativo do sinal. Na compressão do sinal é empregada uma janela (AWT) que percorre o registro, gerando médias locais dos valores contidos entre os limites (abertura) desta janela. De acordo com a escolha adequada da abertura da janela obtém-se diferentes taxas de compressão, sem alterar substancialmente o teor informativo do sinal. O registro simulado da Fig. 1b ( $S/R=5$ ), quando comprimido com  $AWT=40\%$ , resulta em uma taxa de compressão de  $96,3\%$ . Neste registro, Fig. 1c, pode ser notado que as características do sinal original foram preservadas, havendo, entretanto, uma substancial melhoria da relação  $S/R$ .

A segunda etapa do processo de detecção foi então aplicada sobre o sinal comprimido, variando-se o limiar de detecção, tomado como um percentual da amplitude unitária (detector de limiar fixo) ou da amplitude média local de 32 transições sucessivas (detector de limiar adaptativo). Este número de transições foi estabelecido heurísticamente por CIDADE (1990). Na Fig. 1d é mostrado o resultado obtido com este último detector, aplicado ao sinal comprimido (Fig. 1c), com limiar de  $50\%$ .

A avaliação de desempenho dos detectores foi realizada através do levantamento de curvas R.O.C ("Receiver Operating Characteristics"), ou curvas da Característica Operacional do Detector, cálculos de Sensibilidade, e das Distribuições Acumulativas dos Tempos de Duração dos Eventos. As curvas R.O.C indicam a probabilidade de um observador realizar uma detecção correta versus a probabilidade de incorrer em uma decisão falso-positiva, para vários níveis de limiar. A Sensibilidade do detector permite medir o grau de aproximação do número de detecções corretas em relação ao total de eventos do registro simulado sem ruído (considerando-se, assim, o número de falsos-negativos). As Distribuições Acumulativas dos Tempos de Duração dos Eventos descrevem o comportamento cinético do registro detectado, procurando mostrar possíveis desvios das durações dos eventos detectados, em relação aquelas obtidas através do registro simulado sem ruído (caso ideal).

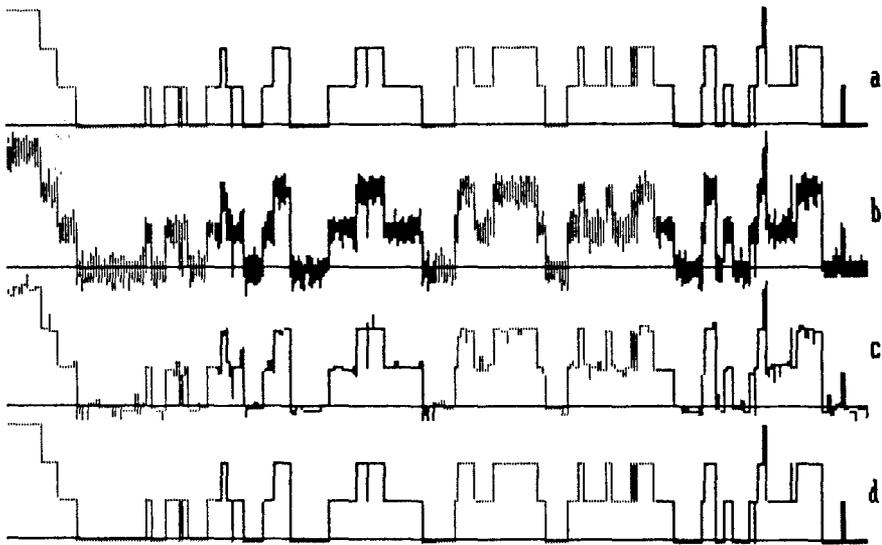


Figura 1. (a) registro simulado sem ruído; (b) com ruído aditivo ( $S/R=5$ ); (c) comprimido ( $AWT=40\%$ ) e (d) detectado utilizando método adaptativo com limiar de 50%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação de desempenho dos detectores de limiar adaptativo e fixo, aplicados a registros de correntes iônicas multinível simulados, mostra que para a relação  $S/R=5$  e amplitude unitária de 1 pA, utilizando  $AWT=40\%$ , os resultados apresentam-se idênticos até o limiar de 50% (Tabela 1), com sensibilidade constante (99,73%).

Tabela 1. Contagem do número de F.P. (Falsos-Positivos) e F.N.(Falsos Negativos), para S/R=5 e AWT=40% (Amplitude Unitária de 1 pA), segundo os métodos de limiar adaptativo e fixo. O total de eventos do registro simulado corresponde a 366.

LIMIAR		0%	20%	40%	50%	60%	80%	100%
LIMIAR ADAPTATIVO	F.P.	24	24	24	24	22	10	0
	F.N.	1	1	1	1	5	38	101
LIMIAR FIXO	F.P.	24	24	24	24	12	1	0
	F.N.	1	1	1	1	2	13	47

Conforme mostrado através das curvas R.O.C da Fig. 2, para o mesmo AWT (40%) e amplitude unitária de 1 pA, a relação Sinal/Ruído (S/R) altera significativamente o comportamento da detecção (neste caso, por limiar adaptativo), sendo observado que de S/R=3 (Fig. 2a) para S/R=4 (Fig. 2b) o índice de falsos-positivos reduz -se substancialmente. No entanto, a sensibilidade permanece constante (99,73%) até o limiar de 50%. Além da importância da relação S/R, os resultados também sugerem a necessidade da escolha adequada da janela de compressão e do limiar de detecção.

As curvas de Distribuição Acumulativa dos Tempos de Duração dos Eventos foram determinadas através da contagem do número total de eventos que mantinham-se no estado inicial em cada instante de tempo. De modo a facilitar a análise comparativa, foi tomada como referência a distribuição dos tempos de duração do registro simulado sem ruído (curva 1). Na Fig. 3, para S/R=4 observa-se um aumento no número de eventos de menor duração (falsos-positivos) em relação ao registro detectado para S/R=5, que praticamente confunde-se com a curva de referência (curva 1), indicando que registros de correntes iônicas devem ter relação S/R pelo menos maior do que 4 (quatro).

O método por limiar fixo requer conhecer-se o registro completo, para estimar sua amplitude unitária. Neste sentido, a experiência do especialista torna-se o principal fator limitante no processo de detecção, pois a estimativa errônea de tal amplitude resulta em alteração do limiar de detecção. Como mostrado na Tabela 2, erros percentuais de +/- 20% da amplitude unitária (0,8 e 1,2 pA) resultam em alterações da sensibilidade através do número de falsos-negativos) e do índice de falsos-positivos em relação aqueles obtidos à partir da Tabela 1 (amplitude unitária correta). Por outro lado, o detector por limiar adaptativo não apresenta alterações significativas para os mesmos desvios (+/- 20%).

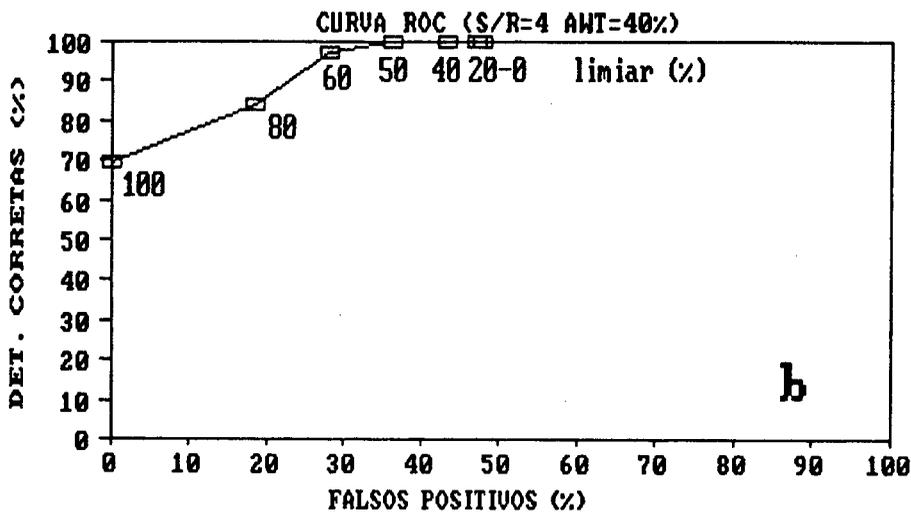
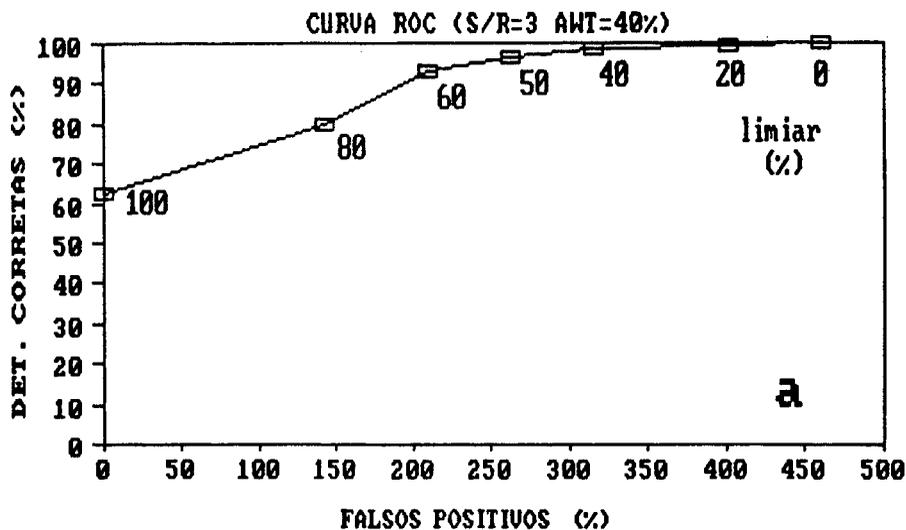


Figura 2. Curvas R.O.C (percentual de falsos-positivos vs percentual de detecções corretas) calculadas a partir da utilização do detector de limiar adaptativo em registros simulados. (a) S/R=3, (b) S/R=4, ambos com AW=40%.

Tabela 2. Contagem do número de eventos detectados, segundo estimativas da amplitude unitária, utilizando o detector de limiar fixo. Total de eventos do registro simulado corresponde a 366.

		LIMIAR	0%	20%	40%	50%	60%	80%	100%
0,8pA	F.P.		530	423	283	154	120	60	53
	F.N.		0	0	1	1	1	2	14
1,2 pA	F.P.		5	1	1	0	0	0	0
	F.N.		19	20	23	25	26	206	343

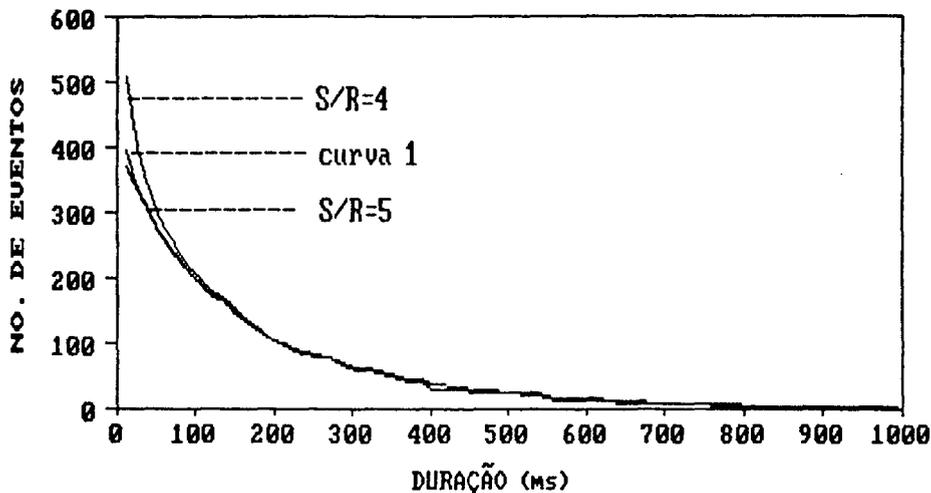


Figura 3. Curvas de Distribuição Acumulativa dos Tempos de Duração dos Eventos, calculadas utilizando o detector de limiar adaptativo para  $S/R=4$  e  $5$ , com  $AWT=40\%$  e limiar de  $50\%$ . A curva 1 é a Distribuição Acumulativa para o registro simulado sem ruído aditivo.

## CONCLUSÕES

A avaliação do desempenho do método de detecção de transições de correntes iônicas por limiar adaptativo, através das curvas R.O.C aplicadas a sinais simulados, não somente permitiu um ajuste ótimo para os critérios de decisão "ad hoc", como também forneceu bases para melhor comparar o desempenho de diferentes detectores.

Sinais simulados com relação S/R pelo menos maior do que 4 (quatro) tornam o sistema menos susceptível a detecção de falsos-positivos, e mais sensível na identificação de eventos válidos através da escolha adequada da abertura da janela de compressão (AWT) e do limiar de detecção. As Distribuições Acumulativas dos Tempos de Duração dos Eventos mostraram que o comportamento cinético do registro detectado aproximava-se daquele do sinal simulado sem ruído com o aumento da relação S/R.

A comparação entre os dois métodos aplicados a sinais simulados com S/R=5 e AWT=40%, demonstrou que tanto a sensibilidade como o índice de falsos-positivos mostraram-se idênticos até o limiar de 50%. A aplicação do método de detecção por limiar adaptativo a sinais simulados demonstrou que para +/- 20% de variação da amplitude unitária, a alteração do número de eventos válidos detectados parece estar somente relacionada ao valor da abertura da janela de compressão. Por outro lado, tal método apresentou-se menos sensível à variação da amplitude unitária em relação aquele por limiar fixo, mostrando a capacidade da média local acompanhar a variação temporal do registro multinível de correntes iônicas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq e FAPERJ.

## REFERÊNCIAS

- BEAN, R.C., SHEPHERD, H.C., EICHNER, J. (1969), Discrete Conductance Fluctuations in Lipid Bilayer Protein Membranes. *J. Gen. Physiol.*, 70:567-590.
- CIDADE, G.A.G. (1990), Sistema Experimental de Detecção Automática de Transições de Correntes Iônicas em Registros Multinível de Canais Unitários, Tese de Mestrado, Programa de Eng. Biomédica COPPE/UFRJ.
- COLQUHOUN, D., HAWKES, A.G. (1983), "The Principles of the Stochastic Interpretation on Ion Channel Mechanisms", *Single Channel Recording*, Plenum Press, New York.
- COX, J.R., NOLLE, F.M. (1968), AZTEC, a Preprocessing Program for Real-Time ECG Rhythm Analysis, Short Communication, *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, Vol. BME-15, no.2, pp. 128-129.

- NEHER, E., SAKMANN, B. (1976), "Single Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibers". *Nature (Lond.)*, 260:779-802.
- SACHS, F., NEIL, J., BARKAKATI, N. (1982), The Automated Analysis of Data from Single Ionic Channels, *Pflugers Arch.* 395:331- 340.
- VIVAUDOU, M.B., SINGER, J.J., WALSH, J.V. (1986), An Automated Technique for Analysis of Current in Multilevel Single Channel Recording. *Pfluger Arch.*, vol. 407, no.4, 407:355- 364.

## EVALUATION PERFORMANCE OF IONIC CURRENT TRANSITION DETECTORS IN MULTILEVEL SINGLE CHANNEL RECORDINGS

**ABSTRACT** – The understanding of isolated ionic channel kinetic behavior in cellular and artificial membranes has become object of studies in biophysics and molecular pharmacology. The detection of ionic channels opening and closing transitions, previously made by visual inspection, is currently performed by means of computational algorithms based on a fixed or user- adjustable threshold. The aim of this work is to investigate the performance of different algorithms for the detection of ionic current transitions in multilevel single channel simulated recordings. The adaptive and fixed threshold detectors were implemented on an IBM PC-AT microcomputer. The distribution of open time and R.O.C curves were used for the evaluation of such detectors, as well as to determine the optimal adjustments of specific criteria for the detection process. The results indicate that the adaptive threshold detector performance is similar to that of the fixed threshold one. However, it is less sensible to errors in estimating the unitary amplitude.