

Análisis y detección automática de potenciales de acción en cultivos neuronales

Víctor Lorente Sánchez¹, Jose Manuel Ferrández Vicente^{1,2}, Eduardo Fernández Jóver² y Daniel de Santos Sierra³

¹Dpto. de Electrónica, Tecnología de Computadores y Proyectos – Universidad Politécnica de Cartagena Antiguo Cuartel de Antigonos. Plaza del Hospital, Nº 1, 30202 Cartagena (Murcia)
Teléfono: 968338871

²Instituto de Bioingeniería – Universidad Miguel Hernández, Alicante

³Dpto. de Inteligencia Artificial - UNED

E-mail: victor.lorente@upct.es

Resumen. Medir la actividad de un cultivo de neuronas de forma precisa puede ser una tarea difícil debido a la cantidad de ruido de fondo y a la dificultad de distinguir los potenciales de acción de una neurona de aquellos otros situados en un área localizada. Este artículo analiza diferentes métodos para la detección y clasificación de potenciales de acción generados por cultivos de neuronas, un problema que comúnmente se le conoce como “spike sorting”. El artículo primero discute la problemática de medir actividad neuronal para posteriormente ahondar en dichos métodos presentando sus ventajas e inconvenientes.

1 Introducción

La detección de actividad neuronal supone un desafío a nivel técnico el cual es un prerequisite en el estudio de muchos tipos de funciones cerebrales. La mayoría de las neuronas en el cerebro se comunican disparando potenciales de acción, también llamados “picos” o “spikes”. Estos breves picos de voltaje pueden ser registrados con microelectrodos, los cuales a menudo recogen señales de muchas neuronas en una región localizada, además de gran cantidad de ruido de fondo.

En la detección de *spikes* se emplean inicialmente técnicas basadas en umbral [1] que, aunque sencillas, ofrecen una detección eficaz y con poca carga computacional, permitiendo incluso la detección de estos potenciales de acción en tiempo real. Sin embargo, éstas técnicas recogen a menudo falsos positivos, como pueden ser ruido de fondo, picos de ruido procedentes de equipos electrónicos, señales

solapadas, etc.

La Fig. 1 muestra la actividad electrofisiológica recogida por un array de microelectrodos (MEA) de un cultivo de hipocampo de 11 días *in vitro* (DIV). Sobre dicha figura se muestran en forma de puntos de color rojo los potenciales de acción detectados mediante un algoritmo basado en umbral de voltaje realizado utilizando el software de registro y adquisición de datos *Meabench* [2]. En la figura se pueden apreciar en primer lugar algunos electrodos ruidosos debido a un mal contacto entre el tejido neuronal y los electrodos, a que en esa zona no se encuentran células o que simplemente están dañados, sería el caso de los electrodos 17, 36, 47, 48 y 57. Es conveniente conocer tanto los electrodos ruidosos como aquellos que tienen alguna función específica (E15 tierra, A1-A4 analógicos) para no tenerlos en cuenta a la hora de aplicar los análisis. En segundo lugar, se observan ciertos electrodos con gran actividad neuronal en forma de *spikes* y ráfagas, como son los electrodos 51, 52, 62, 77 y 84. En tercer

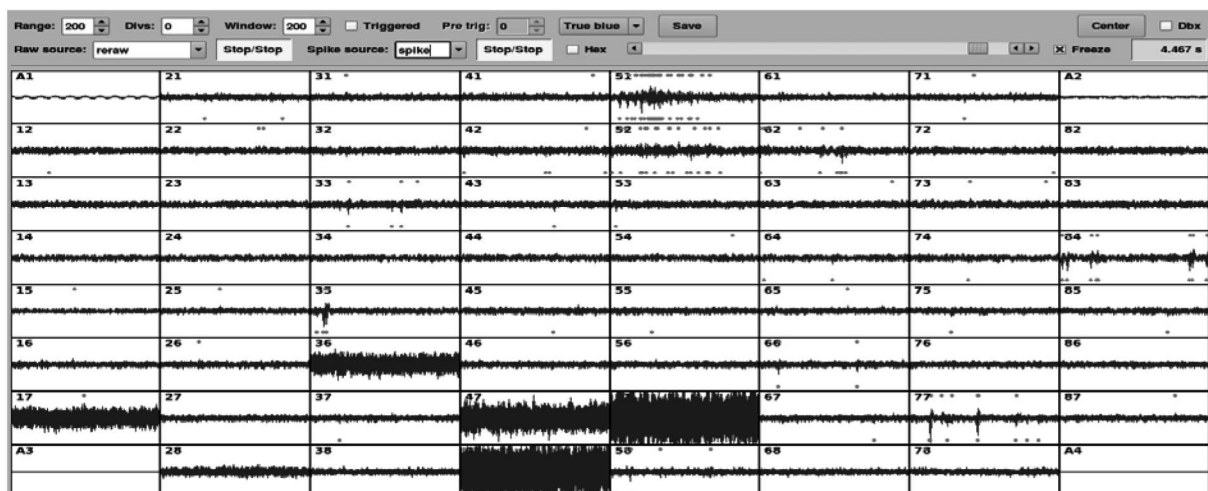


Fig. 1. Actividad electrofisiológica de un cultivo de hipocampo de 11 DIV.

lugar, tenemos electrodos con algunos potenciales de acción aislados pero destacados, e.g. 33, 35, 66. Finalmente, nos encontraríamos con casos en los que, debido a su tamaño, es muy difícil determinar a simple vista si un *spike* pertenece o no al cultivo, véanse los electrodos 12, 37, 45, entre otros. Además, también nos podemos encontrar con *spikes* que hay que rechazar, como son los *spikes* positivos, pues, por naturaleza, los *spikes* reales detectados de los cultivos son negativos.

El primer paso del *spike sorting* consistiría en determinar aquellos *spikes* que pertenecen realmente a la población neuronal, aislando aquellos procedentes del ruido u otros falsos positivos. Posteriormente, dependiendo de los objetivos del experimento, el investigador puede desear clasificar estas señales asignando *spikes* a neuronas concretas, y hacer esto con un cierto grado de fiabilidad. Esta tarea es a menudo un proceso complejo por el ya mencionado ruido de fondo y porque las neuronas en un área localizada presentan frecuentemente potenciales de acción de forma y tamaños similares.

Este artículo se centrará en los primeros pasos del *spike sorting*, es decir, en la detección de potenciales de acción que pertenecen a la población neuronal, aislando aquellos falsos positivos que pertenecen al ruido de fondo. Para ello, se analizarán diferentes métodos o algoritmos para detectar actividad neuronal exponiendo sus ventajas e inconvenientes.

2 Métodos

En esta sección se presentan diferentes métodos para la detección de *spikes* en cultivos de neuronas, exponiendo sus ventajas e inconvenientes.

2.1 Detección por umbral

Dentro de la detección por umbral podemos encontrar dos tipos principales: detección por umbral de voltaje o por umbral de pendiente.

Para la mayoría de las neuronas, la característica más importante en la forma de un *spike* es su amplitud, o altura del *spike*. Una de las maneras más simples de medir la actividad de una neurona es mediante un detector por umbral de voltaje. Este método se puede mejorar si se emplean dos umbrales, uno mínimo y otro máximo. El umbral mínimo descartaría ruido de fondo de baja amplitud, mientras que el umbral máximo descartaría grandes picos procedentes de aparatos electrónicos, conocido comúnmente como ruido de artefactos.

Este método es de lejos el más común para medir la actividad neuronal puesto que requiere un hardware y software mínimo, y el investigador obtiene a menudo la información que busca. La desventaja es que puede producir falsos positivos, sobre todo cuando las señales tienen una S/N cercana a 1, y no es posible conseguir un aislamiento aceptable si lo que se busca

es determinar las diferentes fuentes de origen de actividad.

El método de detección por umbral de pendiente detecta potenciales de acción basándose en la pendiente de un *spike* y en una amplitud mínima. La pendiente del *spike* detectado debe encontrarse por tanto entre unos valores máximo y mínimo, así como superar el umbral de voltaje.

Este sistema es más completo que la detección por umbral de voltaje y puede producir mejores resultados. Sin embargo, el usuario ha de tener un conocimiento a priori de la forma de los *spikes* para establecer unos valores de pendiente correctos. En caso de una mala elección de los mismos, se podría perder una gran cantidad de información relevante.

La eficacia de la detección por umbral ha llevado a que sea empleada como análisis inicial en la mayoría de experimentos relacionados con el análisis de actividad electrofisiológica. Los métodos que a continuación se presentan se emplean sobre los datos obtenidos tras una detección de *spikes* por umbral de voltaje utilizando el algoritmo de detección BandFit-25 [3] en el software *Meabench*.

2.2 Análisis de características

Las neuronas típicamente producen potenciales de acción con una forma característica, por lo que una aproximación es medir características de la forma de los spikes, tales como la altura, anchura o la amplitud pico a pico. En general, cuanto más características tenemos, mejor seremos capaces de distinguir diferentes formas de spikes.

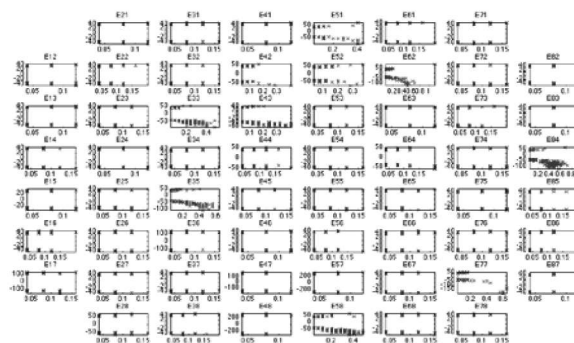


Fig. 2. Ancho vs altura de *spikes* en hipocampo

La Fig. 2 muestra el resultado de enfrentar la anchura frente a la altura de los *spikes* detectados en el cultivo de la Figura 1 para cada uno de los electrodos. Los valores de altura tienen un escalado de 4x. Se observa como los electrodos carentes de actividad, los *spikes* detectados no superan una altura de $-40 \mu\text{V}$ y una anchura de 0.15 ms. Por otro lado, los electrodos en los que creíamos ver algún *spike* o aquellos en los que veíamos *spikes* y ráfagas quedan ahora claramente identificados pues todos ellos superan los valores de altura y anchura indicados. Mediante este método también es posible determinar los electrodos

ruidosos sin haber visualizado previamente la señal ya que los *spikes* detectados de estos presentan valores de altura elevados pero una anchura que tampoco supera los 4 *samples*.

Este método es también bastante eficaz y permitiría incluso la aplicación de mecanismos de *clustering* para discriminar entre *spikes* de diferentes neuronas. Su principal inconveniente es que también es necesario un conocimiento a priori de las características del cultivo, en caso contrario podría acarrear pérdida de información importante o la detección de falsos positivos. Otro de los inconvenientes es que ciertas características de los *spikes* no son fáciles de extraer, como la altura del periodo refractario.

2.3 Análisis de componentes principales

La idea detrás del análisis de componentes principales (PCA) es encontrar un conjunto ordenado de vectores ortogonales que captura las direcciones de máxima variación en los datos. En su representación, las componentes principales son escaladas y añadidas de forma conjunta. El factor de escala para cada componente se denomina *score*, de forma que el *score* *i*-ésimo se calcula mediante:

$$s_i = \sum_j c_j(t) x_j(t)$$

donde $x(t)$ es el spike y $c_i(t)$ es la componente *i*-ésima.

Dependiendo del conjunto de datos, son muchas las componentes que se pueden obtener, pero son las 3 primeras las más importantes, ya que contienen cerca de un 76% de la variabilidad de los datos. La primera de ellas es la dirección de máxima variación en los datos y tiene una forma de spike genérico, si en ese electrodo hay actividad. La segunda también puede tener forma de spike, pero es un *offset* con respecto a la primera componente. La tercera componente no tiene una interpretación obvia pues es el principio de las componentes que representan variabilidad debido al ruido de fondo.

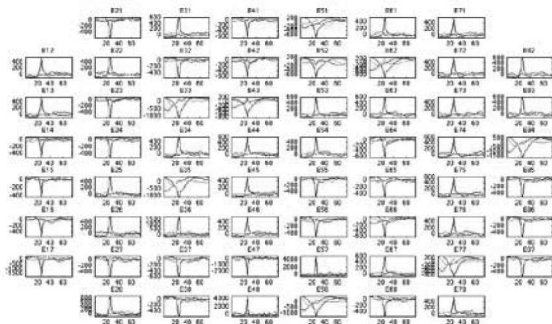


Fig. 3. Análisis de componentes principales en hipocampo

La Fig. 3 muestra el resultado de aplicar este análisis sobre el cultivo de hipocampo indicado anteriormente. En dicha figura se puede apreciar

como la primera componente (azul) de los electrodos que presentan actividad tiene una forma muy cercana a la de un potencial de acción.

El análisis PCA es extremadamente útil para detectar actividad neuronal en los diferentes electrodos. Sin embargo, éste falla en la detección de *spikes* de forma unitaria o cuando se solapan las formas de los *spikes*.

2.3 Otros métodos

Existen otros métodos que según el tipo de experimento pueden emplearse para obtener información acerca de la actividad del cultivo. Uno de ellos sería la FFT. Las neuronas generan *spikes* en un rango de frecuencias comprendido entre 300 y 3000 Hz, por lo que es interesante observar este rango de componentes frecuenciales. Otro de los métodos serían los histogramas. Dado que la naturaleza del ruido sigue una distribución gaussiana, los distintos potenciales de acción ocurridos en un determinado intervalo de tiempo hacen que dicha distribución para ese tiempo se vea alterada pudiendo así distinguir potenciales de acción ocurridos entre el ruido o fuera de él.

3 Conclusiones

En este artículo se han presentado diversas metodologías para la detección de potenciales de acción en cultivos de neuronas. La idea que se quiere transmitir es que no hay un método definitivo sino que la aplicación de varios de ellos, según los requisitos del experimento, redundará en dimensiones de información adicionales que mejorarán los resultados.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado bajo una beca predoctoral con referencia 12361/FPI/09 de la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia.

Referencias

- [1] M. Lewicki. *A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials*. *Computation in Neural Systems* 9:R53-R78 (1998).
- [2] D.A. Wagenaar, T. B. DeMarse, S. M. Potter. *MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis*. 2nd Intl. IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 518-521 (2005).
- [3] D.A. Wagenaar, *Meabench Userguide*: <http://www.its.caltech.edu/~daw/meabench/MEABench-userguide-1.2.5.pdf>