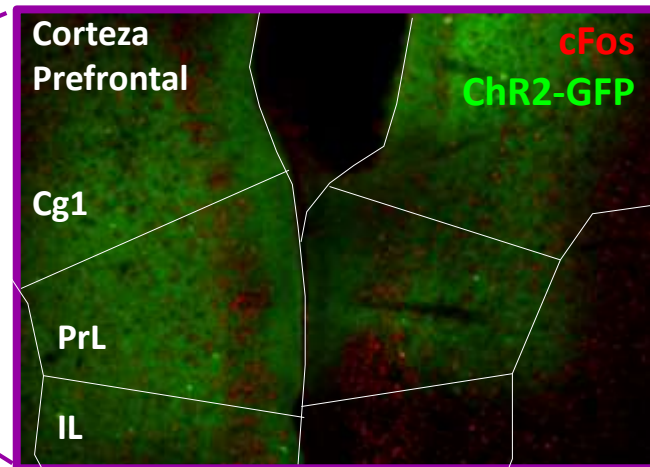


Experimento conductual y optogenética: Análisis estadístico básico en R

Sofia González Salinas
sophieglzs@gmail.com
Rutgers University
Diciembre, 2020

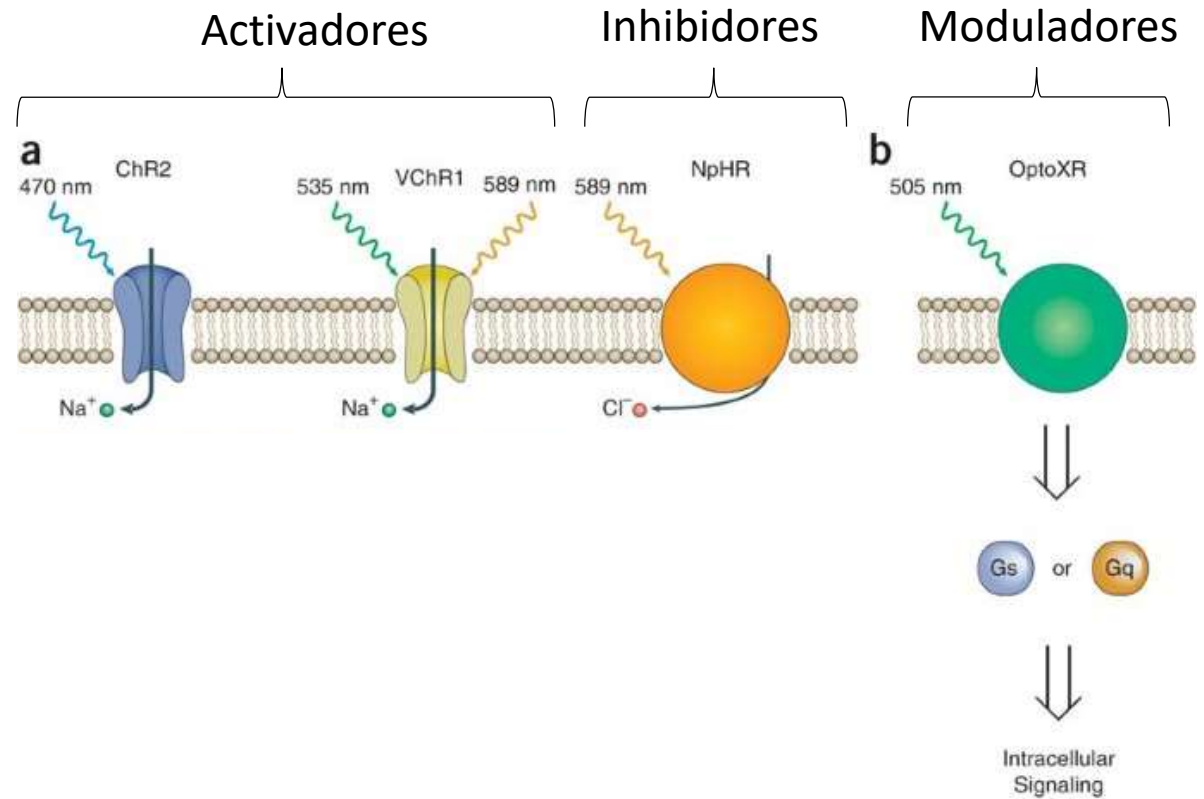


Temario

1. Descripción general de optogenética.
2. Aspectos técnicos para correr un experimento de optogenética.
3. Diseño experimental del estudio de la conducta materna con optogenética.
4. Leer archivo csv y generar gráficos.
5. ANOVA de dos factores con medidas repetidas.
6. Análisis estadístico de la conducta.
7. Cálculo del tamaño de la muestra
8. Agradecimientos.

1. Descripción general de optogenética

Canales y receptores activados por una longitud de onda específica



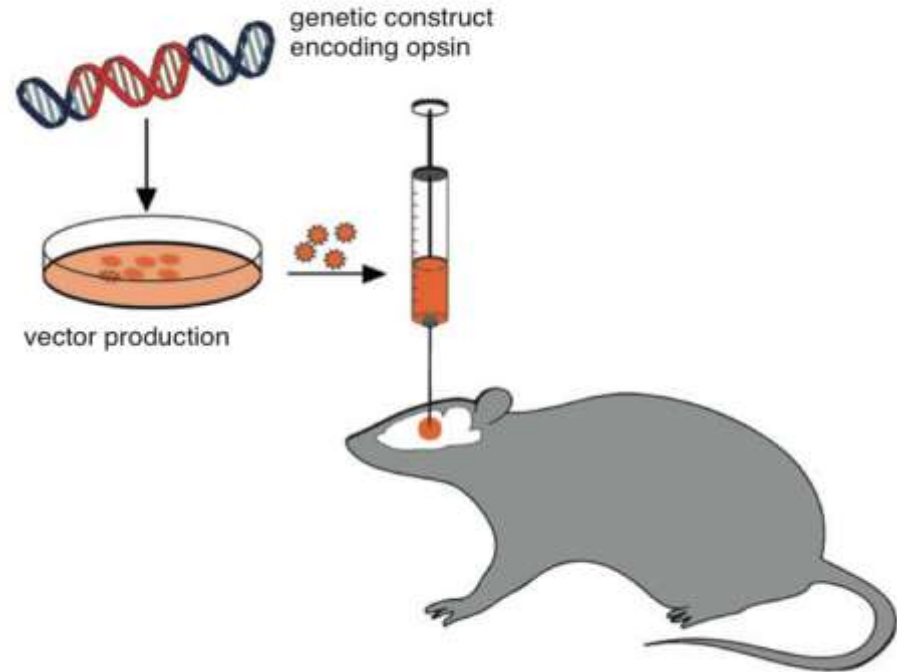
Zhang, F. et al. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat. Protoc.* **5**, 439–456 (2010).

2. Descripción general de optogenética

*Vectores virales para
expresar las opsinas*

*Deubner J, Coulon P, Diester I.
Optogenetic approaches to
study the mammalian brain.
Curr Opin Struct Biol.
2019;57:157-63.*

(a) Microinjection



Vector viral

- Lentivirus vs Adenoasociados (AAV).
- Dependientes de Cre o no.
- Promotor específico (células glutamatérgicas, GABAérgicas).

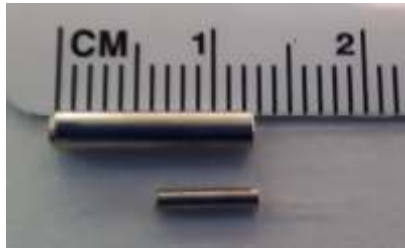
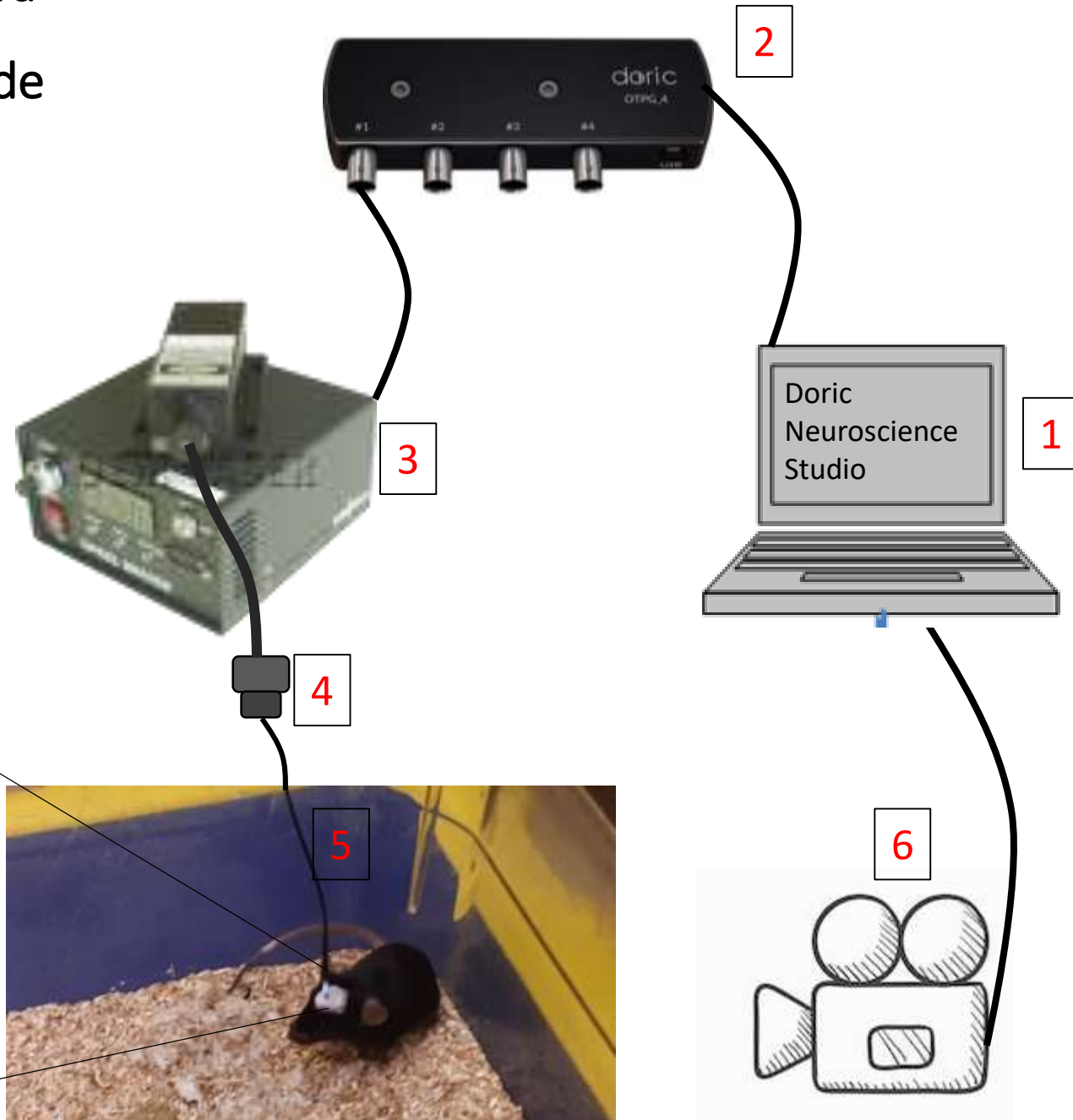
Roedores

- WT o Cre (transgénicos)

Confieren especificidad para el tipo de células a activar/inhibir

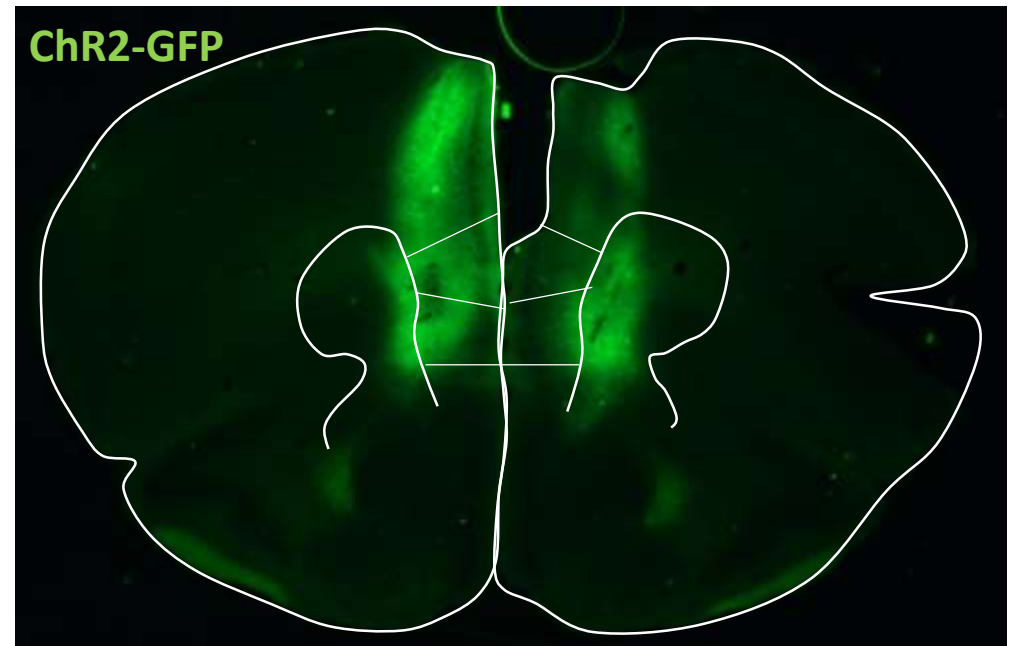
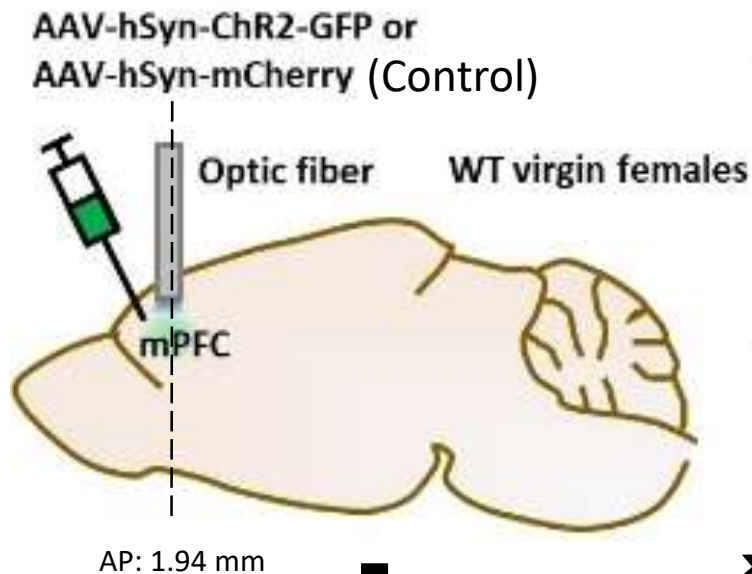
2. Aspectos técnicos para correr un experimento de optogenética

1. Computadora con el software que controla el generador de pulsos y la cámara.
2. Generador de pulsos TTL.
3. Laser (algunos usan LED).
4. Unión giratoria.
5. Fibra óptica externa.
6. Video cámara
7. Implantes de fibra óptica (metal o cerámica, 2.5 o 1.25 mm diámetro)
8. Vector viral

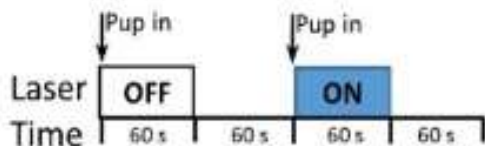


pAAV-Syn-ChR2(H134R)-GFP

3. Diseño experimental del estudio de la conducta materna con optogenética



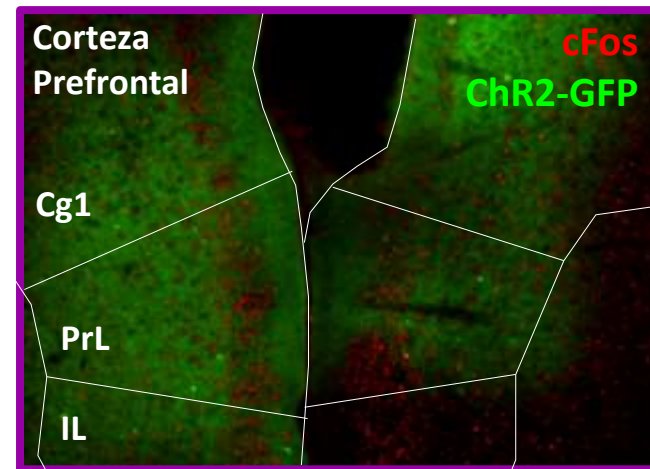
473 nm 20 Hz 10 ms



5mW

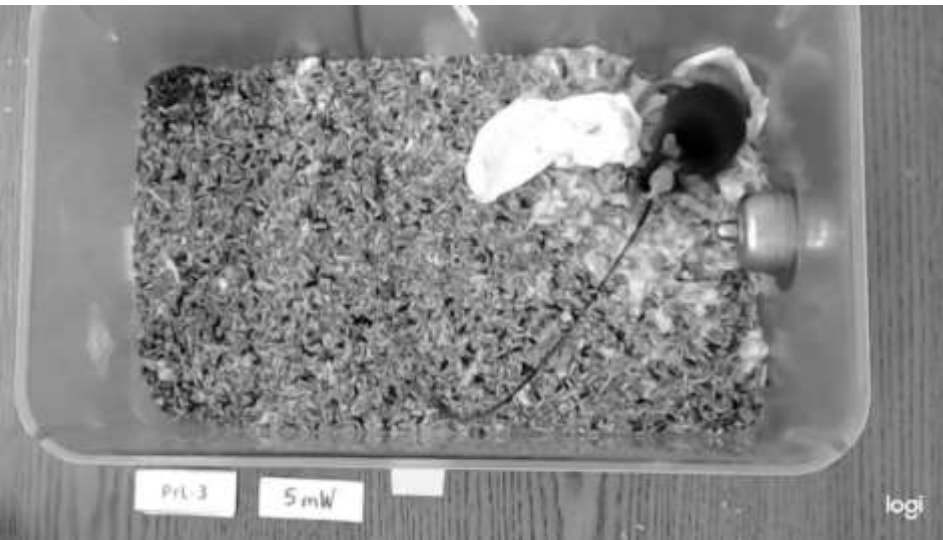
**Control de efectividad
del Sistema**

Sesión de 10 min
(20Hz, 20 ms, 5mW, 20 sec
ON, 40 sec OFF).

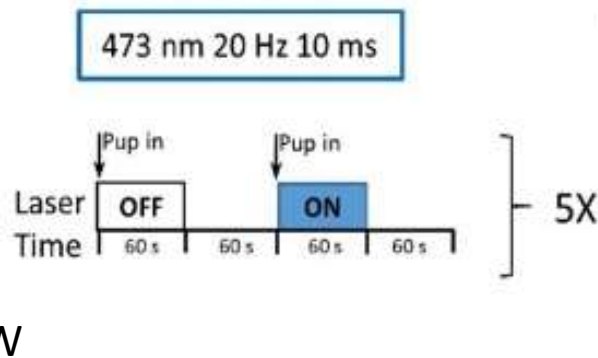
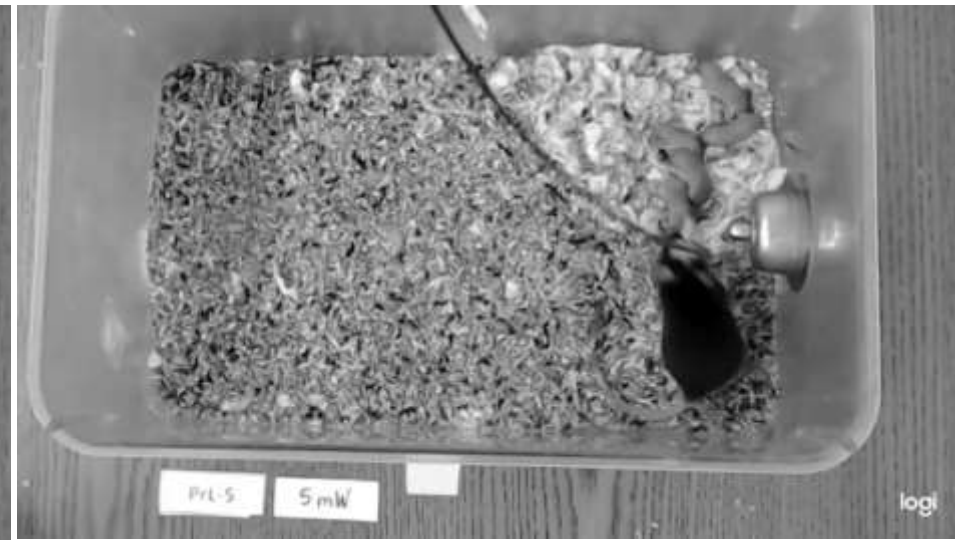


3. Diseño experimental del estudio de la conducta materna con optogenética

ChR2-Ensayo ON



Control(mCherry)-Ensayo ON



Variables a medir y condiciones a comparar:

- Latencia para acercarse a la cría (OFF vs ON).
- Latencia para llevarla hasta el nido (OFF vs ON).
- Porcentaje de crías llevadas al nido (OFF vs ON).
- Grupo experimental (ChR2) vs Control (mCherry).

4. Leer archivo .csv y generar gráficos.

Colocar en su carpeta de trabajo el archivo “MatCare_Data.csv”

Variable de
agrupamiento

Variables independientes

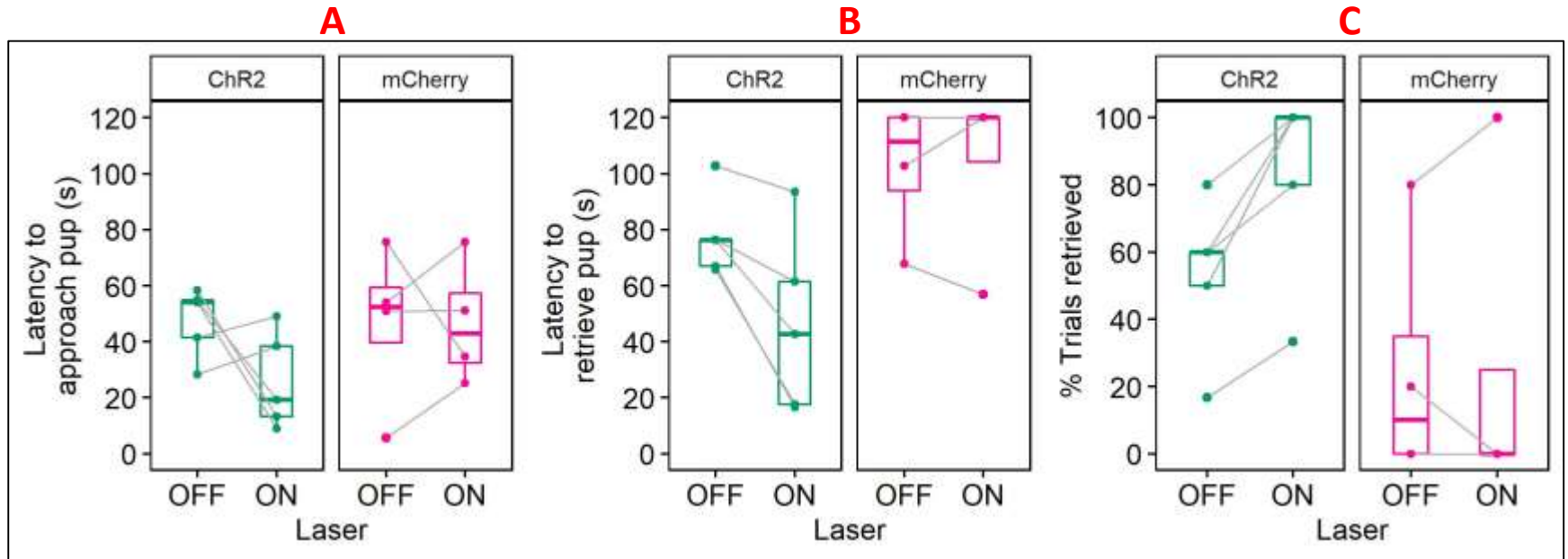
Variables dependientes

	A	B	C	D	E	F	G
1	MouseID	Virus	Trial	Laser	Latency_Contact_s	Latency_Retrieve_s	Retrieved
2	PrL-10	mCherry	1	OFF	14	120	0
3	PrL-10	mCherry	2	ON	19	120	0
4	PrL-10	mCherry	3	OFF	71	120	0
5	PrL-10	mCherry	4	ON	68	120	0
6	PrL-10	mCherry	5	OFF	120	120	0
7	PrL-10	mCherry	6	ON	11	120	0
8	PrL-10	mCherry	7	OFF	98	120	0
9	PrL-10	mCherry	8	ON	41	120	0
10	PrL-11	mCherry	1	OFF	67	120	0
11	PrL-11	mCherry	2	ON	55	120	0
12	PrL-11	mCherry	3	OFF	70	120	0
13	PrL-11	mCherry	4	ON	120	120	0
14	PrL-11	mCherry	5	ON	120	120	0
15	PrL-11	mCherry	6	OFF	29	120	0
16	PrL-11	mCherry	7	ON	32	120	0
17	PrL-11	mCherry	8	OFF	50	120	0
18	PrL-11	mCherry	9	ON	51	120	0
19	PrL-2	ChR2	1	OFF	9	120	0
20	PrL-2	ChR2	2	ON	21	120	0
21	PrL-2	ChR2	3	OFF	5	119	1
22	PrL-2	ChR2	4	ON	92	96	1

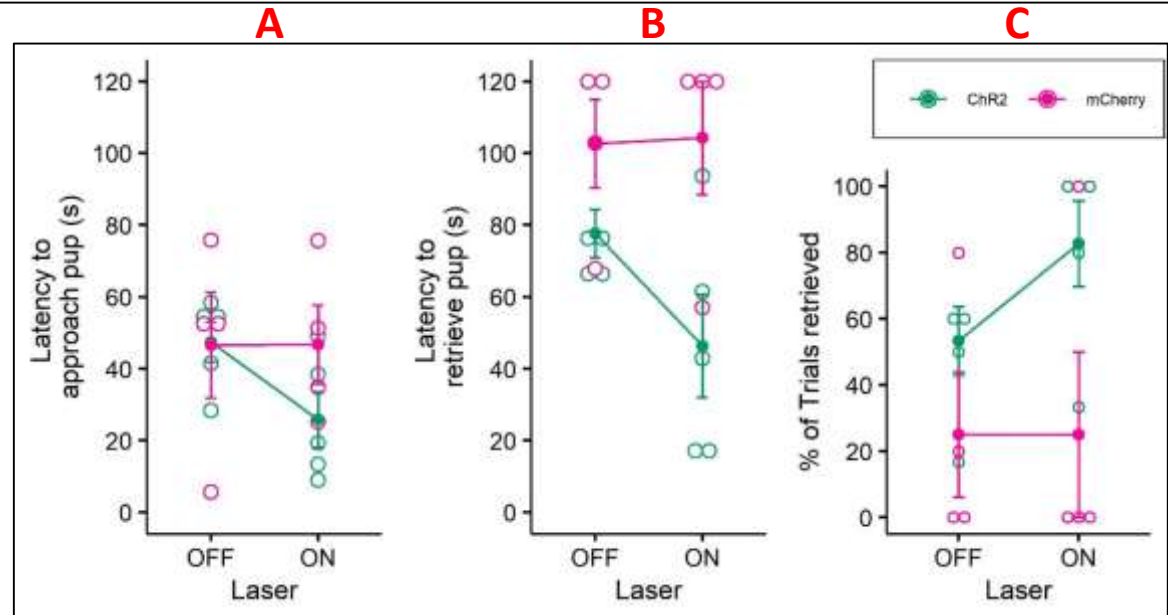
MatCare_Data

4. Leer archivo .csv y generar gráficos.

1. Medianas (Boxplot)



2. Medias y errores



5. ANOVA de dos factores con medidas repetidas

Variable dependiente Variables independientes que interactúan Variable independiente en el que están las medidas repetidas

```
aov(Mean_Contact_s ~ (Virus*Laser) + Error(MouseID/Laser), data = ave_mouse)  
summary(aov(Mean_Contact_s ~ (Virus*Laser) + Error(MouseID/Laser), data = ave_mouse))
```

La latencia para contactar a la cría está dada por la interacción del virus inyectado y del estado del laser considerando que los animals fueron medidos en ambas condiciones del laser

Modelo lineal general equivalente

Variable dependiente Variables independientes que interactúan Variable dependiente en el que están las medidas repetidas

```
lme(Mean_Contact_s~Virus*Laser, random=~1|MouseID/(Laser), data=ave_mouse)  
anova(lme(Mean_Contact_s~Virus*Laser, random=~1|MouseID/(Laser), data=ave_mouse))
```

5. ANOVA de dos factores con medidas repetidas

aov()

Tipo I

Secuencial

El orden de las variables importa.

Adecuado para diseños con mismos tamaños de muestra.

Anova()

Tipo II

Jerárquico o parcialmente secuencial.

No importa el orden de las variables.

Muy poderoso cuando no hay interacción de las variables.

Para mismos tamaños de muestra.

Tipo III

Marginal u ortogonal

No importa el tamaño de la muestra.

Válido cuando hay una interacción entre factores.

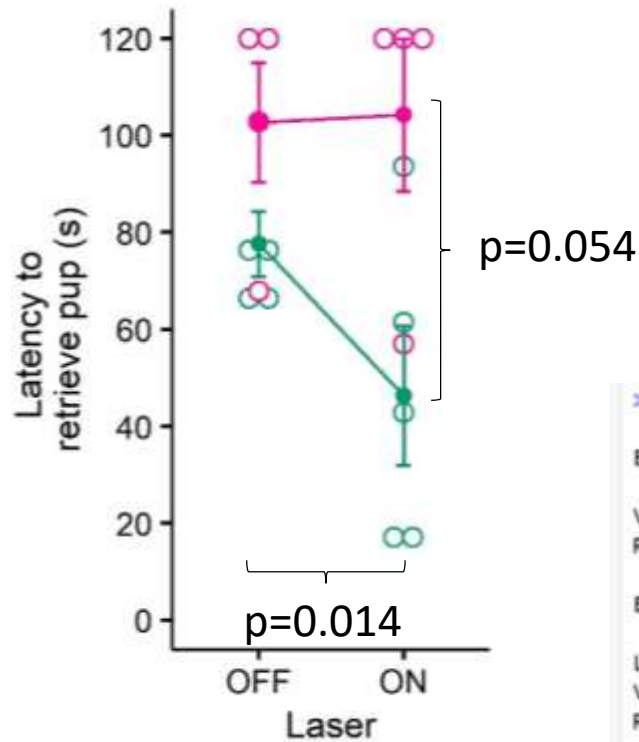
Las observaciones deben estar completas y no debe haber celdas vacías.

	ChR2		mCherry(Control)	
Obs 1	Laser OFF	Laser ON	Laser OFF	Laser ON
Obs 2	Laser OFF	Laser ON	Laser OFF	Laser ON
.....	Laser OFF	Laser ON	Laser OFF	Laser ON
Obs n	Laser OFF	Laser ON	Laser OFF	Laser ON

<http://www.utstat.utoronto.ca/reid/sta442f/2009/typeSS.pdf>

<http://core.ecu.edu/psyc/wuenschk/SAS/SS1234.pdf>

6. Análisis estadístico de la conducta.



```
$contrasts
contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
Chr2 OFF - mCherry OFF    -25.0 17.81  7  -1.404  0.5349
Chr2 OFF - Chr2 ON        31.3  7.19  7   4.352  0.0138
Chr2 OFF - mCherry ON    -26.6 17.81  7  -1.494  0.4883
mCherry OFF - Chr2 ON     56.3 17.81  7   3.161  0.0607
mCherry OFF - mCherry ON   -1.6  8.04  7  -0.199  0.9969
Chr2 ON - mCherry ON     -57.9 17.81  7  -3.251  0.0540

Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
```

```
> summary(aov(Perc_ret ~ (Virus*Laser) + Error(MouseID/Laser), data = ave_mouse))

Error: MouseID
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Virus   1  8218    8218   3.495  0.104
Residuals 7 16460    2351

Error: MouseID:Laser
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Laser   1 1195.1   1195.1   9.985 0.0159 *
Virus:Laser 1  956.0    956.0   7.988 0.0255 *
Residuals  7  837.8    119.7

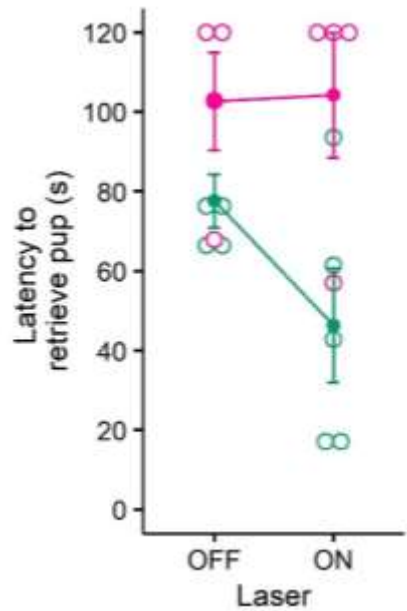
---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Virus ($F(1,7)=1.97$, $p=0.16$)
 Laser ($F(1,7)=18.94$, $p=0.000014$)
 VirusXLaser ($F(1,7)=9.29$, $p=0.002$)

Analysis of Deviance Table (Type III tests)

```
Response: Mean_Ret_s
      Chisq Df Pr(>Chisq)
(Intercept) 42.7816  1 6.120e-11 ***
Virus         1.9716  1  0.160275
Laser        18.9371  1 1.351e-05 ***
Virus:Laser   9.2993  1  0.002292 **
```

7. Cálculo del tamaño de la muestra



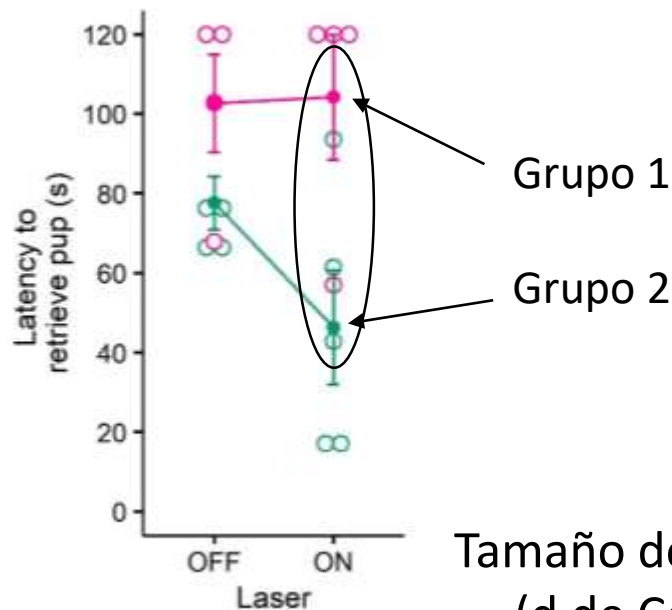
Se puede calcular con:

- Datos “históricos” previos.
- Valores hipotéticos.
- Datos de un experimento piloto

mCherry(Control) n=4

ChR2 n=5

7. Cálculo del tamaño de la muestra



Tamaño del efecto

$$d = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(s_1^2 + s_2^2)/2}}$$

Tamaño del efecto (d de Cohen) =
$$\frac{(\text{Promedio Grupo 1}) - (\text{Promedio Grupo 2})}{\sqrt{(\text{Varianza Grupo 1} + \text{Varianza Grupo 2})/2}}$$

mCherry(Control) n=4

ChR2 n=5

d=0.2 Efecto pequeño

d=0.5 Efecto mediano

d=0.8 Efecto grande

https://med.und.edu/daccota/_files/pdfs/berdc_resource_pdfs/sample_size_r_module.pdf

G*Power

<https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>

7. Cálculo del tamaño de la muestra

Poder de la prueba

H0= La latencia para llevar a los críos al nido **es la misma** en el grupo ChR2 que en el grupo mCherry(Control).

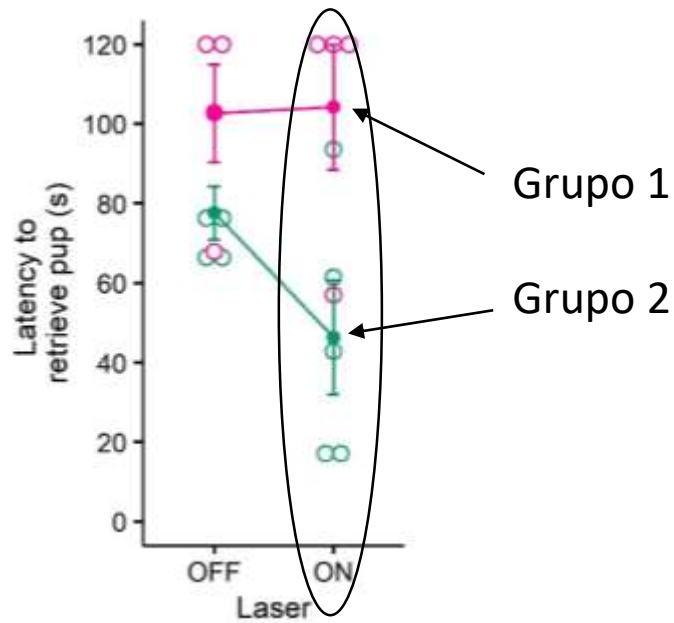
H1= La latencia para llevar a los críos al nido **es diferente** en el grupo ChR2 que en el grupo mCherry(Control).

$$\text{Poder (Power)} = P(\text{Rechazar } H_0 \mid H_1 \text{ es verdadera})$$

$$\text{Poder (Power)} = \text{Probabilidad de rechazar la hipótesis nula dado que la hipótesis alternativa es verdadera}$$

Comúnmente se usan valores de 0.8, lo que quiere decir que si corremos el experimento 100 veces, en 80 de ellos rechazaremos adecuadamente la hipótesis nula dado que la hipótesis alternativa es verdadera.

7. Cálculo del tamaño de la muestra



mCherry(Control) n=4

ChR2 n=5

Tamaño del efecto

Promedio grupo 1

Promedio grupo 2

Varianza grupo 1

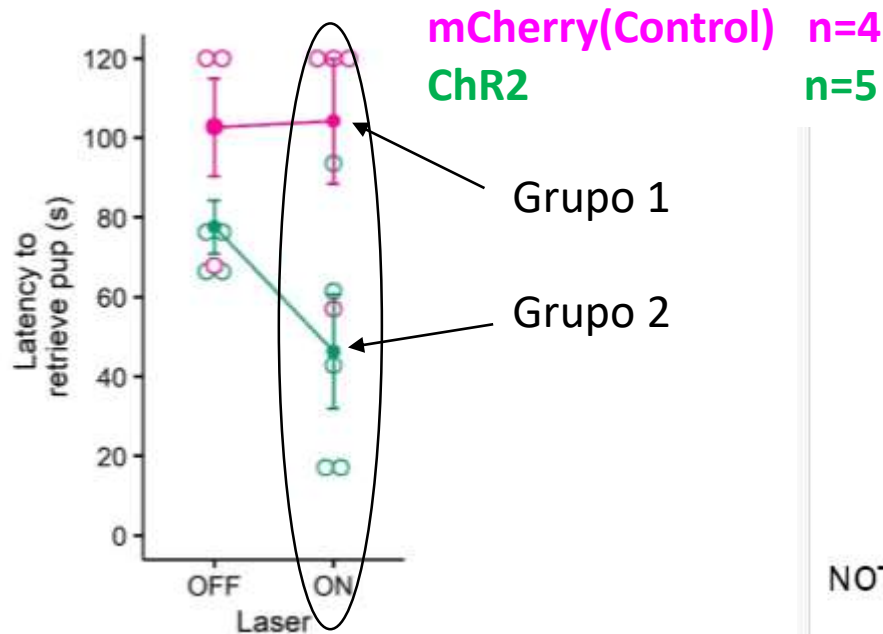
Varianza grupo 2

$$d = \frac{(\text{Promedio Grupo 1}) - (\text{Promedio Grupo 2})}{\sqrt{(\text{Varianza Grupo 1} + \text{Varianza Grupo 2})/2}}$$

Power =0.8

P-vale=0.05

7. Cálculo del tamaño de la muestra



Cómo reportarlo

Two-sample t test power calculation

```
n = 5.905275  
d = 1.81385  
sig.level = 0.05  
power = 0.8  
alternative = two.sided
```

NOTE: n is number in *each* group

```
> mean1#mCherry ON  
[1] 104.25      104.25 s    100%  
> mean2#ChR2 ON  
[1] 46.36      46.36 s    44.5%
```

Calculamos un tamaño de muestra de 6 sujetos por grupo para observar un decremento del 55.5% en la latencia para llevar a las crías al nido durante la activación del laser al comparar el grupo ChR2(experimental) y mCherry(control) con un tamaño del efecto de $d=1.8$, poder=0.8 y $p=0.05$.

8. Agradecimientos

- R-Ladies Querétaro
- Shumyatsky-lab Rutgers
Ashley Ly , estudiante de licenciatura
- Barker-lab Rutgers
Dr. David Barker

¡Colaboraciones y dudas!
sophieglzs@gmail.com

