

ESTUDO QUANTITATIVO DA EVOLUÇÃO TOPOLÓGICA DE UMA CULTURA DE NEURÔNIOS EM MATRIZES MICROELETRODOS (MEA)

A. A. Palis*, D. Vasconcelos*, M. B. P. Carneiro*, J. B. D. Filho*, C.M.C. Lotufo **

*Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, Brasil

**Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, Brasil
e-mail: debora.pvasconcelos@gmail.com

Resumo: O monitoramento morfológico da distribuição espacial de células de uma cultura plaqueada em MEA permite investigar a relação entre os neurônios e os microeletrodos, sendo fundamental para se compreender a interface neurônio-eletrodo. Este estudo teve como objetivo realizar uma caracterização quantitativa da evolução morfológica da rede neural biológica. Realizou-se uma análise quantitativa da distribuição celular das imagens, adquiridas duas vezes por dia, durante três dias consecutivos *in vitro*, para estabelecer um mapa das distâncias entre os neurônios e microeletrodos. O modelo biológico utilizado corresponde a gânglios da raiz dorsal (DRG) de ratos Wistar.

Palavras-chave: Análise Quantitativa, Interface Neurônio-Eletrodo, Matrizes Multieletrodos.

Abstract: Morphological monitoring of cell distribution tied to a culture plated on MEAs (multielectrode array) allows to investigate the relationship between neurons and microelectrodes, which may be considered of paramount relevance in order to understand the neuron-electrode interface. This study aims at providing a quantitative characterization of the morphology evolution through time of the biological neural network. We performed a quantitative analysis of the cellular distribution of the images, which were taken twice a day, during three consecutive days *in vitro*, in order to establish a map of the distances between neurons and microelectrodes. The biological model considered was dorsal-root ganglia (DRG) neurons extracted from Wistar rats.

Keywords: Multielectrode Array, Neuron-electrode Interface, Quantitative Analysis.

Introdução

Estudos em neurociência têm aproximado a comunidade de pesquisa biomédica à engenharia e às áreas da computação, levando ao aparecimento de uma variedade de ferramentas que tornam possível entender e caracterizar o sistema biológico em estudo. Além disso, a microtecnologia pode também fornecer dispositivos capazes de traduzir um impulso nervoso em informação para circuitos eletrônicos, como é o caso das Matrizes Multieletrodos (MEAs), que são capazes de estimular e fazer

a aquisição de sinais elétricos a partir de culturas neurais [1]. Mesmo com o avanço desses estudos e com a possibilidade de desenvolvimento de neuroimplantes, atualmente esta ainda é uma área relativamente desconhecida. De fato, a MEA é uma excelente plataforma para o estudo da interação entre um neuroimplante e os neurônios.

A MEA permite monitorar o desenvolvimento morfológico da rede neuronal por meio de microscopia de fluorescência confocal ou eletrônica. O monitoramento morfológico ainda permite investigar a relação célula-eletrodo, essencial para a captação de um sinal de qualidade [3]. Neste trabalho foram analisadas as respostas neuronais em MEA no contexto dos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (DRG), responsáveis pela transmissão de informação (sensações táteis, térmicas e de dor) da periferia (pele, músculo e outros órgãos) para o sistema nervoso central [6].

Esses neurônios possuem diâmetros variando entre 15 a 40 μm , em ratos *Wistar*, enquanto que o diâmetro do microeletrodo mede cerca de 30 μm . Sendo assim, tais neurônios têm maior probabilidade de cobrir os microeletrodos da MEA, já que parte substancial do corpo celular do neurônio precisa estar em contato com a superfície do microeletrodo para se obter um bom registro da atividade elétrica extracelular [3]. Assim, o objetivo deste artigo é entender a relação quantitativa existente entre neurônios-microeletrodos e neurônios-neurônios, ao longo do tempo de vida de uma cultura de células DRG, a qual em média sobrevive durante três-quatro dias [4].

Materiais e métodos

Foram realizadas duas culturas de neurônios do DRG utilizando ratos *Wistar* de 100 g, conforme protocolo descrito por [8], e os procedimentos experimentais obtiveram parecer aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) sob registro 023/10. As matrizes multieletrodos utilizadas são do modelo Standard MEA 200/30 da *Multichannel Systems*, Reutlingen, Alemanha, tendo como padrão 60 eletrodos em uma grade 8x8, como representado pela Figura 1.

O trabalho em questão realizou um estudo quantitativo da evolução topológica da rede neural crescida sobre os microeletrodos da MEA. Foram utilizadas

imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência, adquiridas de quatro culturas durante três dias *in vitro*. Em cada imagem, foram analisados os parâmetros relacionados com a distribuição espacial das células.

Estruturas da MEA– A Matriz Multieletrodo é um arranjo de vários eletrodos (tipicamente 60) onde sinais são gravados e amplificados por um filtro e enviado para o computador de aquisição de dados.

A Figura 1 ilustra como os eletrodos estão dispostos, e a numeração dos eletrodos de uma MEA na grade 8x8 segue o esquema padrão de numeração para matrizes quadradas: o primeiro dígito é o número da coluna, e o segundo é o número da linha. Por exemplo, o eletrodo 23 é posicionado na terceira linha da segunda coluna.

O eletrodo 15 está em falta, como visto na Figura 1, ele é usado como eletrodo de referência interno, conhecido como *Terra*. Esses dispositivos são produzidos pela *Multichannel Systems* e há vários tipos.

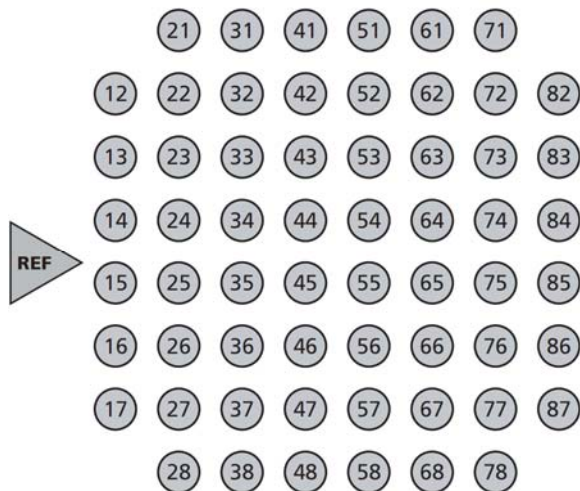


Figura 1: Esquema de uma MEA planar, com referência nos eletrodos.

Aquisição das imagens– As imagens foram obtidas, para as mesmas culturas de células neuronais, diariamente a cada 12 horas após o primeiro dia de cultura e durante três dias consecutivos, isto é, em 24h, 36h, 48h, 60h, 72h e 84h de cultura. Para capturar toda a área útil da MEA foi necessária a aquisição de duas imagens, uma do quadrante superior da MEA e outra do inferior, conforme Figura 2. No final das capturas foi obtido um total de doze imagens de cada MEA para serem processadas. Cada imagem foi tomada após a cuidadosa aplicação do fluorófilo DIBAC, e imageamento realizado em um microscópio confocal *Zeiss*, com parâmetros especialmente ajustados para maximizar a nitidez.

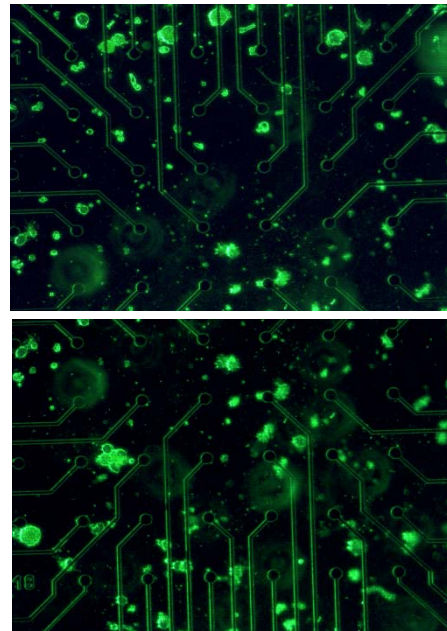


Figura 2: Imagem da área útil da MEA dividida em quadrante superior e inferior, realizada no ICBIM/UFU.

Software utilizado– Para avaliar o desenvolvimento neuronal em torno dos microeletrodos, foi realizado uma quantificação manual das imagens da cultura, utilizando funções prontas do *software* de domínio público IMAGEJ (versão 1.37c, *National Institute of Health, USA*). Neste caso, não foi realizado nenhum tratamento prévio nas imagens.

Análise das imagens– A leitura de imagens permite, dentre várias vantagens, terem um acesso mais fácil as imagens da cultura por computadores pessoais, melhores meios de compartilhamento, recuperação e armazenamento. A representação gráfica dessas imagens permite a extração e identificação de informações e a melhora da qualidade visual, facilitando a contabilização dos neurônios.

Para este trabalho foram utilizadas quatro MEAs, sendo que cada uma, soma de 12 imagens totalizando assim a análise de 48 imagens.

Classificação das imagens– A estrutura da rede neural influencia a atividade elétrica extracelular registrada na MEA. O neurônio mais próximo do eletrodo, dentro de sua área de registro, apresenta uma melhor captura do sinal e menos ruídos, enquanto que, à medida que os neurônios são encontrados mais afastados dos eletrodos, a qualidade da captura do sinal vai diminuindo [3].

Com base nisto, foi definido um padrão classificatório para estabelecer o grau de proximidade de cada neurônio em relação ao eletrodo mais próximo, para isso foi necessário compor a área de abrangência do microeletrodo. Esta última é delimitada por uma área quadrada de 200 μm de arestas, centrada no microeletrodo, conforme mostrado na Fig. 3. Então, se um neurônio estiver dentro desta área, ele pertence ao campo de leitura do microeletrodo. Para melhor compreensão, veja o exemplo apresentado na Figura 3 e pela Tabela 1.

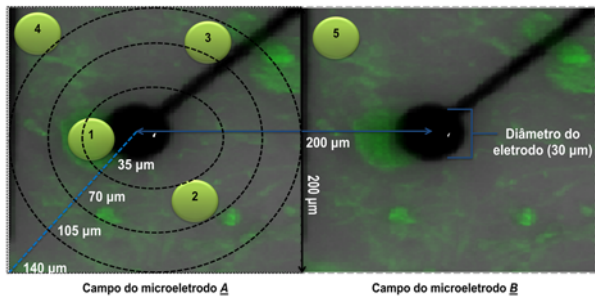


Figura 3: Diagrama descrevendo a classificação proposta, apresentando cinco exemplos de neurônios (representados por esferas verdes), que foram classificados de acordo com a sua distância (*d*) aos microeletrodos (em preto): 1-conectado, 2-próximo, 3-afastado, 4-distante, 5-fora do campo do microeletrodo A e dentro do campo do microeletrodo B.

Tabela 1: Classificação das distâncias neurônio – eletrodo.

Distância	Classe
0 – 35 μm	Conectado
35,1 – 70 μm	Próximo
70,1 – 105 μm	Afastado
105,1 – 140 μm	Distante

Essa classificação se dá a partir da equação (1).

$$d = \sqrt{(Xa - Xb)^2 + (Yb - Ya)^2} \quad (1)$$

Onde:

d- distância entre centro do eletrodo e o centro do neurônio.

Xb- coordenada x do centro do neurônio;

Xa- coordenada x do centro do eletrodo;

Yb- coordenada y do centro do neurônio;

Ya- coordenada y do centro do eletrodo.

Resultados

Foram analisados quatro experimentos de cultura *in vitro*, aqui denominados MEA 14, MEA 16, MEA 18 e MEA 19, durante um período de doze em doze horas, por três dias consecutivos.

Na MEA 14 observou-se uma alta perda de neurônios da primeira leitura, 24h, para a segunda, 36h, como mostrado no gráfico da Figura 4. É esperado que, com o passar dos dias o total de células diminua, provavelmente pela morte celular.

Nota-se que nas 72h de cultura para as últimas 84h ocorre um aumento dos neurônios conectados, afastados e distantes. E, uma redução dos neurônios próximos do eletrodo. Provavelmente essa diferença se dá pelo aumento da quantidade de células glia e/ou devido ao fato que o material nutritivo da MEA se acumula próximo ao eletrodo.

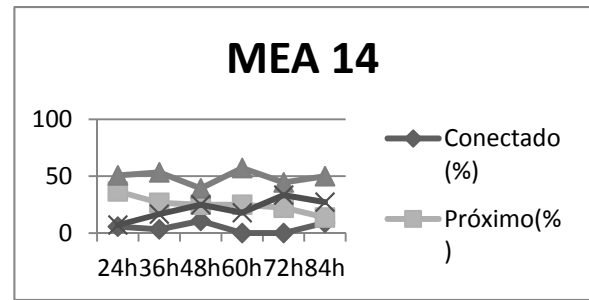


Figura 4: Distribuição dos neurônios da MEA 14. Eixo vertical exprime a quantidade de neurônios contabilizados.

Na MEA 16 ocorre um aumento significativo dos neurônios conectados ao longo do tempo, como delineado pelo gráfico da Figura 5. Além disso, observou-se também que ocorreu muita variação das distâncias dos neurônios próximos e distantes, entre 24h e 60h de cultura.

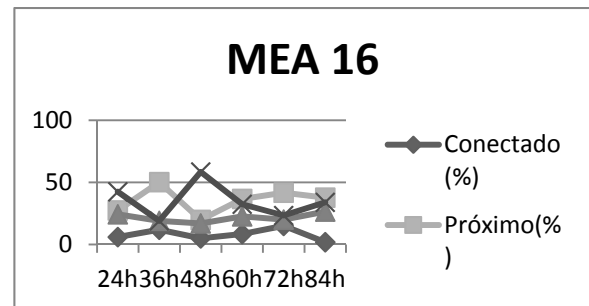


Figura 5: Distribuição dos neurônios da MEA 16. Eixo vertical exprime a quantidade de neurônios contabilizados.

Já na MEA 18 constata-se um pequeno aumento dos neurônios conectados entre 24h e 36h *in vitro*, conforme se visualiza da Fig. 6. Porém, ao longo dos dias em relação à distância, tem-se apenas a diminuição esperada dos neurônios.

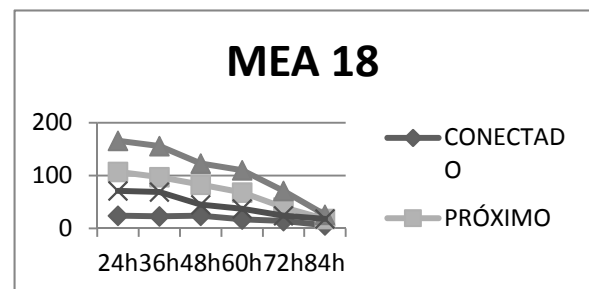


Figura 6: Distribuição dos neurônios da MEA 18. Eixo vertical exprime a quantidade de neurônios contabilizados.

Para a MEA 19, ocorre elevada perda de neurônios distantes e afastados, entre 48h e 60h, como mostrado pelo gráfico da Figura 7. Notou-se, também que entre 60h e 72h, há um aumento dos neurônios conectados e

distantes. E uma redução dos neurônios próximos e afastados do eletrodo, sendo que este fenômeno poderia ser explicado pelo mesmo discutido para a MEA 14.

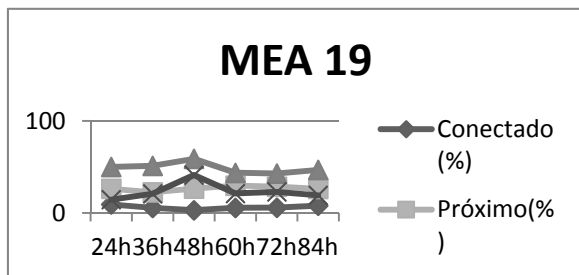


Figura 7: Distribuição dos neurônios da MEA 19. Eixo vertical exprime a quantidade de neurônios contabilizados.

Conclusão

Neste trabalho foi padronizado um procedimento para se realizar duas tarefas principais, sendo a primeira delas a contagem visual e manual de todos os neurônios contidos em uma cultura de neurônios cultivada em uma MEA, a segunda foi medir a distância entre cada neurônio da cultura e o eletrodo mais próximo, o que permite classificar os neurônios quanto a esta distância e ainda, permite fazer uma análise da expectativa de acoplamento entre neurônio e eletrodo.

É importante classificar as distâncias dos neurônios porque a proximidade com os microeletrodos afeta a qualidade da gravação do sinal, realizado pela matriz. De acordo com a literatura [3], uma parte substancial do neurônio precisa estar em contato com a superfície microeletrodo para se alcançar um bom sinal registrado.

Dessa maneira, os resultados sugerem que o sinal registrado a partir da MEA poderia permanecer durante três dias, porém, com perdas relativas na sua amplitude, porque, apesar de não ter havido redução significativa na quantidade de neurônios próximos, houve essa perda nos neurônios conectados aos microeletrodos. Sabendo também que os neurônios nociceptivos geram atividade elétrica extracelular de baixa amplitude [3], portanto qualquer redução desses pode gerar diferença significativa no sinal. Percebeu-se, com os resultados preliminares que, de maneira geral, os neurônios do DRG se adaptaram bem à matriz multieletrodo, porque em todos os experimentos foi possível visualizar células vivas. Ficou evidente também que, com o passar dos dias, o total de células e a distância entre elas diminuiu, provavelmente pelo aumento da quantidade de glias na cultura, que pode fazer com que esses neurônios se “movimentem” na MEA.

Portanto, esta nova quantificação revela que é possível caracterizar as interfaces, a partir de imagens da rede neural, afim de que se possa melhorar a qualidade do sinal da MEA. Em se tratando de análise quantitativa da distribuição celular em uma interface neurônio-microeletrodo, este trabalho pretende mostrar à comunidade científica em estudos eletrofisiológicos um instrumento metodológico que, utilizando imagens

de microscopia confocal, possibilita caracterizar uma rede neural cultivada em recipientes com matrizes de microeletrodos incorporados.

As perspectivas deste trabalho consistem em aprimorar o processamento das imagens, ao passo que outros parâmetros poderão ser utilizados para melhor caracterizar a interface entre a cultura de neurônios sensoriais do DRG e os microeletrodos das MEAs. Por isso, em longo prazo, o registro da atividade elétrica dos neurônios pelas MEAs representa, também, uma possível ferramenta para o desenvolvimento de, por exemplo, novas drogas analgésicas.

Agradecimentos

À Amanda F. Neves pela realização dos experimentos fisiológicos que conduziram aos dados usados neste artigo, bem como à Fapemig e CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

Referências

- [1] B. Alberts, et al. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre: Artmed, 866 p., 2006.
- [2] P. Bonifazi,; P. Fromherz, Silicon chip for electronic communication between nerve cells by non-invasive interface and analog-digital processing. *Advanced materials*, V. 14, N.17, P. 1190-1193, set. 2002.
- [3] A. Hai; J. Shappir; M. E. Spira. In-cell recordings by extracellular microelectrodes. *Nature Methods*, vol. 7, N.3, P. 200-202, mar 2010.
- [4] J. Van Pelt; P. S. Woltres; M. A. Corner; W. L. Rutten, G. J. Ramakers. Long-Term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultures neural networks. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. V, 51, N. 11, P. 2051 – 2062. 2004.
- [5] Multi channel systems Microelectrode array (MEA) - *User Manual*. Germany, 2005, 54P. Available from: http://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/manuals/MEA_Manual.pdf
- [6] Sítio oficial do software de domínio livre *ImageJ*. Desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH). Available from: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [7] Makoto Taketani, Michel Baudry. *Advances in network electrophysiology: using multi-electrode arrays*. New York, NY : Springer, c2006, 478 p
- [8] O. Linhart, O. Obreja, M. Kress, The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons, *Neuroscience*, vol. 118, pp. 69-74, 2003.