

ANÁLISE QUANTITATIVA E MORFOLÓGICA DA INTERFACE NEURÔNIO-MICROELETRODO

Amanda Ferreira Neves¹, Polyana Ferreira Nunes², Débora Vasconcelos², Milena Bueno Pereira Carneiro³, Celina Monteiro da Cruz Lotufo⁴ e João-Batista Destro-Filho³

¹ Mestranda da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia – MG,
E-mail: amanda.nvs@gmail.com

² Graduandas da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia – MG
E-mails: eng_bio_poly@hotmail.com, debora.pvasconcelos@gmail.com

³ Professores da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia – MG
E-mails: milenabueno@yahoo.com, jbdestrof@yahoo.com

⁴ Professora da Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas - Área de Fisiologia, Uberlândia – MG
E-mail: celotufo@icbim.ufu.br

Resumo – As matrizes microeletrodos podem estimular e registrar a atividade elétrica extracelular de uma cultura de neurônios durante longos períodos e sua tecnologia tem sido aplicada a estudos de processamento e compreensão das informações no cérebro. Estas matrizes micrométricas também permitem monitorar o desenvolvimento morfológico das redes neurais, por meio de diversos tipos de microscopia. O monitoramento morfológico ainda permite investigar a relação entre célula e microeletrodo, fundamental para a gravação de um sinal de boa qualidade. Usando imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo quantitativo da evolução morfológica da rede neural crescida sobre esses dispositivos. Foi realizada uma análise quantitativa da distribuição celular a partir de imagens adquiridas em diferentes dias *in vitro*, a qual foi aplicada a culturas de gânglios da raiz dorsal, para estabelecer um mapa das distâncias entre neurônios e microeletrodos. Os resultados indicam que um sinal registrado dessas culturas poderia permanecer sem perdas importantes na sua amplitude durante dias, uma vez que não houve redução significativa na quantidade de neurônios conectados e próximos aos microeletrodos. Essa análise quantitativa fornece uma descrição simples da cultura ligada à MEA. Assim, é possível caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, permitindo ainda estabelecer estratégias para o registro da atividade elétrica.

Palavras-Chave - Análises quantitativas, cultura neural dissociada, interface neurônio-microeletrodo, matrizes multieletrodo, microscopia confocal de fluorescência.

QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF NEURON-ELECTRODE INTERFACE

Abstract - Microelectrode arrays can stimulate and record extracellular electrical activities from neurons in culture over long periods and it has been applied to study information processing in the brain. These micrometric arrays also allow easily monitoring the morphological development of neural networks by means of several

microscopy techniques. Morphological monitoring still permits to investigate the relation between cell and microelectrode, critical to recording a good quality signal. Using images obtained by confocal fluorescence microscopy, this work performs a quantitative study of the evolution of the neural network topology on these devices. Here, analysis of cell distribution in images acquired at different days *in vitro* was carried out, which was applied to dorsal root ganglia cultures, to compute a map of the distances between neurons and microelectrodes. Results point out that a signal, recorded from these cultures, could remain throughout days without major losses on its amplitude, since there was not a significant reduction in neurons connected and neighboring to microelectrodes. This quantitative analysis provides a simple description of the culture attached to the MEA. Thus, it is possible to characterize the neuron- microelectrode interface, allowing further insights on electrical activity recordings.

1

Keywords - Confocal fluorescence microscopy, dissociated neuronal culture, microelectrode array, neuron-microelectrode interface, quantitative analysis.

I. INTRODUÇÃO

Os estudos em neurociência cada vez mais têm aproximado áreas biomédicas das áreas da engenharia e computação, o que tem gerado uma variedade de ferramentas que tornam possível compreender e caracterizar o sistema biológico em estudo. Hoje em dia já existem mecanismos nanotecnológicos capazes de traduzir um único impulso nervoso (atividade elétrica neuronal) em informação para circuitos eletrônicos, biossensores, como é o caso da matriz multieletrodo ou MEA.



X CEEL - ISSN 2178-8308
24 a 28 de setembro de 2012
Universidade Federal de Uberlândia - UFU
Uberlândia - Minas Gerais - Brasil

Em estudos de eletrofisiologia, é comum encontrar trabalhos que utilizem as técnicas de *patch-clamp*, mas sua finalidade é bastante específica e está ligada a estudos de canais iônicos da membrana celular e correntes iônicas em um único neurônio [1].

Desde o seu desenvolvimento na década de 70 [2], a MEA é utilizada para o processamento de informações em redes neurais ou grupos de neurônios, seja sob condições normais de desenvolvimento [3-5], ou sob condições patológicas induzidas, para estudos farmacológicos [6-8]. A MEA também permite monitorar o desenvolvimento morfológico da rede neuronal e até mesmo a morfologia das células em cultura, 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]. Dessa maneira, imagens periódicas tomadas sobre a cultura possibilitam caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, sendo essas investigações essenciais também para a concretização do neuroimplante [9].

Do outro lado, os grupos de pesquisa que estudam as respostas neuronais em MEA, para implementação do neuroimplante utilizam praticamente apenas a cultura de neurônios corticais [11-13]. São poucos os trabalhos que utilizam a MEA em culturas de neurônios periféricos [7] e, quando se investiga o uso de MEAs para culturas de neurônios sensoriais do DRG (gânglio da raiz dorsal), existem poucos artigos [13,14].

Os neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (DRG) são responsáveis pela transmissão de informação (sensações táteis, térmicas e de dor) da periferia (pele, músculo e outros órgãos) para o sistema nervoso central. Assim como os microeletrodos da MEA, esses neurônios possuem diâmetros variando entre 10 a 40 μm , em ratos [15], relativamente maiores que neurônios corticais. Dessa maneira, cada microeletrodo pode fazer contato com um único neurônio e os neurônios do DRG têm maior probabilidade de cobrir os microeletrodos da MEA [14], conforme ilustra a Figura 1.

Como parte substancial do corpo celular do neurônio precisa estar em contato com a superfície do microeletrodo para se obter um bom registro do sinal neural [4], a cultura de neurônios do DRG sobre a MEA representa então um sistema ideal para o monitoramento da interface neurônio-eletrodo.

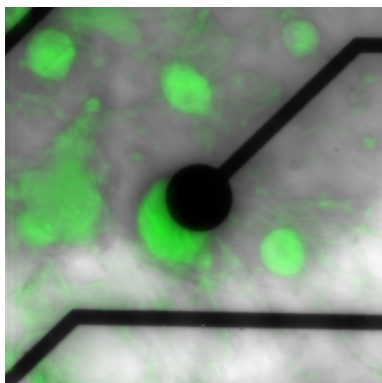


Fig. 1. Fotografia da interface entre um neurônio do DRG (verde) e um microeletrodo (preto) da MEA, capturada por microscopia confocal de fluorescência.

Dessa maneira, o trabalho em questão teve por objetivo realizar 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 uma mesma cultura em diferentes dias *in vitro* (DIVs), ou seja, com diferentes tempos de cultivo. Em cada imagem, foram analisados os parâmetros relacionados com a distribuição espacial das células, com o intuito de calcular um mapa das distâncias entre os neurônios e os microeletrodos.

Este artigo está organizado da seguinte forma. A seção II descreve a metodologia dos procedimentos biológicos e da avaliação quantitativa. A seção III apresenta os resultados e a discussão dos mesmos. Por fim, as conclusões são apresentadas na seção IV.

II. METODOLOGIA

A. Procedimentos Biológicos

1) *Preparação das culturas* - Foram realizadas duas culturas de neurônios do DRG utilizando ratos *Wistar* de 100 g, conforme protocolo descrito por [15], e os procedimentos experimentais obtiveram parecer aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU). As matrizes multieletrodos utilizadas são do modelo Standard MEA 200/30 da *Multichannel Systems*, Reutlingen, Alemanha.

2) *Aquisição de imagens das culturas* - As fotografias foram realizadas, para as mesmas culturas, diariamente durante o 1º, 2º e 3º dias de cultivo, conforme mostra a Figura 2. O marcador fluorescente utilizado para a aquisição das imagens de células vivas foi o DiBAC₄(3) a 5 μM . A aquisição das imagens foi realizada através de microscopia confocal (*Zeiss, LSM510 Meta*), utilizando a lente objetiva de 10x.

B. Avaliação quantitativa

1) *O software utilizado* - Para avaliar o desenvolvimento neuronal em torno dos microeletrodos, foi realizada 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.

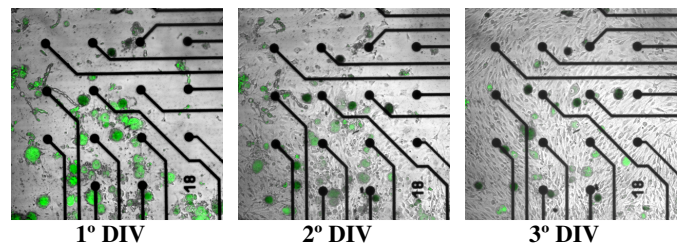


Fig. 2. Imagens diárias de uma mesma cultura ligada à MEA.

2) *Selecionando os neurônios* - Para cada cultura, foi contado o número de microeletrodos e de neurônios presentes nas imagens, possibilitando estimar a taxa de neurônios por microeletrodo.

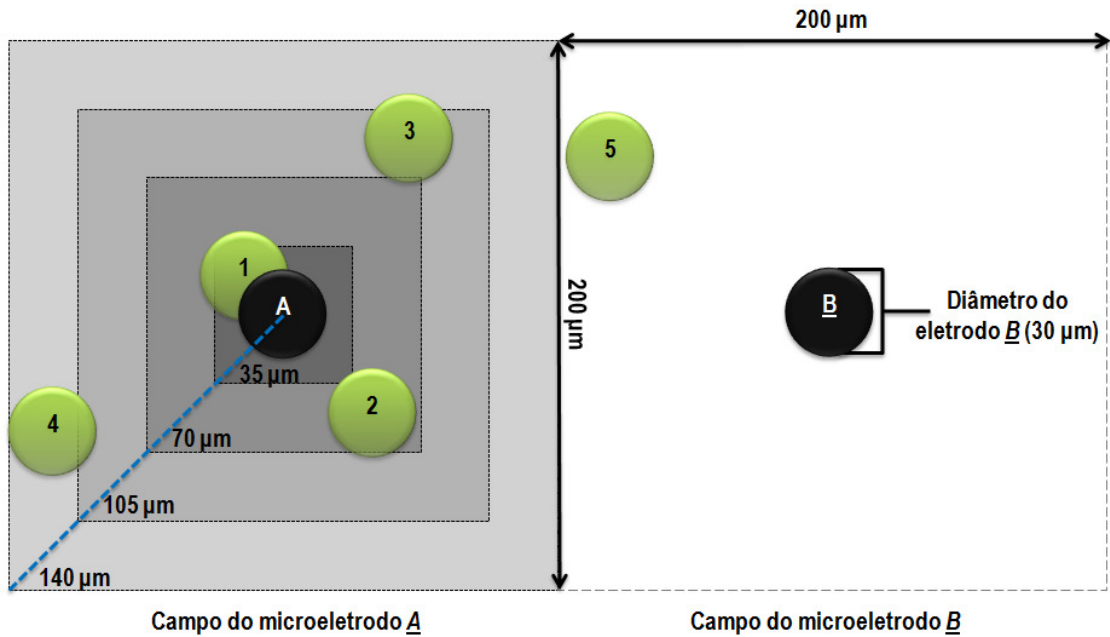


Fig. 3. Diagrama descrevendo a classificação proposta, apresentando cinco exemplos de neurônios (em verde), que foram classificados de acordo com a sua distância (D) aos microeletrodos (em preto): 1-conectado, 2-próximo, 3-afastado, 4-distante, 5-fora do campo do microeletrodo A e dentro do campo do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

A tarefa de separar visualmente os neurônios de artefatos de cultura (restos de células que permanecem em cultura após os procedimentos de dissociação) é subjetiva e requer uma visão de especialistas. Por isso, para identificar os neurônios do DRG, foram estabelecidos alguns parâmetros: estes neurônios são grandes e esféricos e possuem aproximadamente a mesma dimensão dos microeletrodos, como visto na Figura 1. Além disso, mesmo os neurônios exibindo intensidades diferentes de fluorescência, esta não foi considerada um parâmetro de diferenciação, uma vez que os artefatos também podem apresentar fluorescência.

A distância entre microeletrodos é de 200 μm e para saber se um neurônio pertencia ao campo de um microeletrodo foi delimitada uma área quadrada (200 μm de arestas) cujo centro estava um microeletrodo, assim como ilustra a Figura 3. Dessa maneira, toda a superfície da matriz, dividida em pequenos campos dos microeletrodos, pode ser considerada para a contagem.

Na seleção, foram considerados apenas neurônios localizados até aproximadamente 140 μm de distância de um microeletrodo, sendo que neurônios mais distantes que isso estaria mais próximo do microeletrodo seguinte. Para melhor compreensão, veja o exemplo apresentado na Figura 3.

3) *Classificando os neurônios* – Como o diâmetro dos microeletrodos (30 μm) é mais ou menos o mesmo diâmetro dos maiores neurônios do DRG (30-40 μm), os neurônios foram classificados de acordo com a sua distância aos microeletrodos (D): conectado ($D < 35 \mu\text{m}$), exemplificado pelo neurônio 1 na Figura 3; próximo ($36 < D < 70 \mu\text{m}$), assim como o neurônio 2 na Figura 3; afastado ($71 < D < 105 \mu\text{m}$) como mostra o neurônio 3 na Figura 3; e distante dos microeletrodos ($106 < D < 140 \mu\text{m}$), assim como o neurônio 4 da Figura 3.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de neurônios e a medida das distâncias entre neurônio e microeletrodo (D) foram realizadas a partir de imagens de duas culturas, a primeira (MEA-1) representada pela Figura 4.a. e a segunda (MEA-2) ilustrada pela Figura 4.b. Ambas as culturas foram feitas seguindo o mesmo protocolo, porém utilizando animais diferentes, a fim de comparação. As duas culturas foram, então, comparadas uma com a outra e os resultados dessas quantificações podem ser vistos na Tabela I.

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.

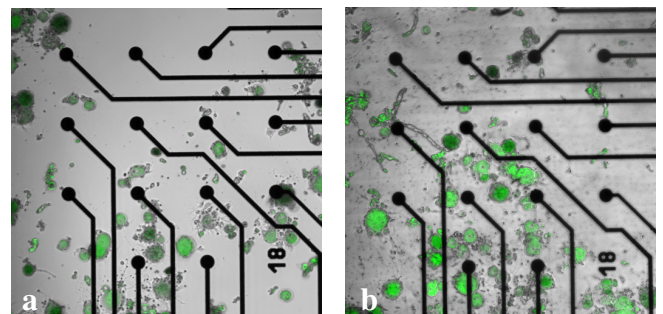


Fig. 4. Imagens de microscopia confocal de fluorescência: (a) representa a cultura da MEA-1 e (b) representa a cultura da MEA-2, ambas no 1º DIV. Em preto, destacam-se os microeletrodos (30 μm de diâmetro) e suas respectivas trilhas e, em verde, os neurônios.

TABELA I
Resultado da Classificação dos Neurônios.

	Conectados	Próximos	Afastados	Distantes	D (μm)*
CULTURA DA MEA-1					
1° DIV	12	38	71	26	$79,96 \pm 28,37$
2° DIV	3	33	30	22	$81,75 \pm 28,21$
3° DIV	5	28	24	4	$71,30 \pm 24,93$
CULTURA DA MEA-2					
1° DIV	4	35	59	14	$81,28 \pm 26,54$
2° DIV	4	33	29	14	$76,93 \pm 28,71$
3° DIV	10	22	26	8	$61,42 \pm 29,86$

* Os resultados são mostrados como média \pm desvio padrão.

Nos três dias *in vitro* (DIV) foi observado um padrão de distribuição dos neurônios amostrados, o qual pode ser ilustrado pelo gráfico da Figura 5, que faz uma média dos resultados apresentados na Tabela I. Um razoável número de neurônios foi encontrado próximo aos microeletrodos ($36 < D < 70 \mu\text{m}$), mas muito pouco foi visto em contato direto com eles ($D < 35 \mu\text{m}$). Também se observou poucos neurônios às maiores distâncias ($106 < D < 140 \mu\text{m}$) e a maioria dos neurônios estava localizada afastada dos microeletrodos ($71 < D < 105 \mu\text{m}$). Segundo os autores de [13], esse resultado era o esperado, uma vez que não foi utilizada nenhuma técnica para orientar ou direcionar o crescimento neuronal ao redor dos microeletrodos. Portanto, essa localização distante da maioria dos neurônios para a superfície dos microeletrodos pode ser explicada pela adesão difusa destas células na matriz.

Considerando-se o tempo de cultura, foi observada uma redução na quantidade de neurônios amostrados entre os três DIVs, restando no 3° DIV, em média, 50% dos neurônios inicialmente contados no 1° DIV. O decréscimo mais significativo ocorreu no 2° DIV, no qual houve uma perda neuronal de 40% na MEA-1 e 30% na MEA-2, comparado com o número de neurônios contados no 1° DIV. No 3° DIV, a perda neuronal foi menor, em relação à quantidade de neurônios observados no 2° DIV, sendo que na MEA-1 houve uma redução de 19% dos neurônios e na MEA-2 somente 12% destes desapareceram. No contexto de culturas primárias, como é o caso, é esperado que no mínimo um terço das células plaqueadas morram sob as condições de cultura [10]. Isso ocorre porque essas células sofrem estresses desde seu isolamento dos tecidos vivos e, também, por causa do ambiente adverso onde são mantidas (ao invés de um organismo, elas permanecem numa placa).

Por outro lado, a morte de neurônios ocorreu principalmente para aqueles localizados a distâncias maiores dos microeletrodos, sendo que ao final do 3° DIV somente 38% dos neurônios afastados ($71 < D < 105 \mu\text{m}$) e 30% dos neurônios distantes ($106 < D < 140 \mu\text{m}$) permaneceram. Em contrapartida, manteve-se a proporção de 94% dos neurônios conectados ($D < 35 \mu\text{m}$) e 68% daqueles observados próximos ($36 < D < 70 \mu\text{m}$) aos microeletrodos. Dessa maneira, os resultados sugerem que o sinal registrado a partir da MEA poderia permanecer, durante três dias, sem perdas

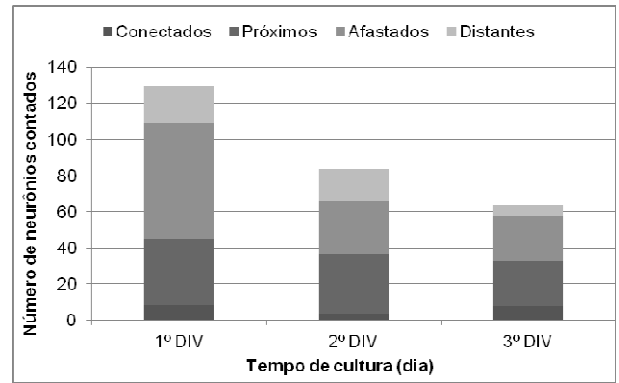


Fig. 5. Média (culturas da MEA-1 e MEA-2) da quantidade de neurônios estimados nas quatro classes de distâncias ao microeletrodo e em relação ao tempo de cultivo (dia *in vitro*).

importantes na sua amplitude, porque não houve redução significativa na quantidade de neurônios próximos e conectados aos microeletrodos.

Nos resultados, é interessante observar também que os valores médios das distâncias entre neurônio e microeletrodo, representado pela variável D na Tabela I, assim como o desvio-padrão desses, praticamente não variaram muito de uma cultura para outra. Isso indica que ambas as culturas mantiveram o mesmo padrão de adesão e perda neuronal, com uniformidade entre os dados, o que valida os resultados obtidos. Inclusive, quando se compara esses parâmetros entre os DIVs, nota-se uma redução das distâncias no 3° DIV, indicando, mais uma vez, que os neurônios mais próximos aos microeletrodos prevaleceram, apesar da perda neuronal.

Neste contexto, buscou-se aperfeiçoar a aquisição da atividade neuronal de uma cultura, considerando estudos da interface neurônio-microeletrodo de dispositivos MEA. Assim, direcionar os neurônios para mais próximos dos microeletrodos, ou aumentar a quantidade dessas células dentro da área de registro, representam técnicas alternativas para melhorar o desempenho do microeletrodo. Portanto, esta nova quantificação revela que é possível caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, a partir de imagens da rede neural, afim de que se possa melhorar a qualidade do sinal da MEA.

IV. CONCLUSÕES

Em se tratando de análise quantitativa da distribuição celular em uma interface neurônio-microeletrodo, este trabalho pretende mostrar à comunidade científica em estudos eletrofisiológicos uma instrumento metodológico que, utilizando imagens de microscopia confocal, propõe caracterizar uma rede neural cultivada em recipientes com matrizes de microeletrodos (MEA) incorporados. Assim sendo, foi investigado o número de neurônios localizados na matriz microeletrodo e a distância média de todos os neurônios individualmente amostrados nas imagens, considerando os três primeiros dias *in vitro* (DIVs).

Neste trabalho, observou-se um decréscimo na quantidade de células após os três dias em cultura, fato comum em se tratando de uma cultura primária. Porém, a perda mais significativa ocorreu nos neurônios instalados entre 71 a 140

um de distância dos microeletrodos, ou seja, aqueles mais distantes cuja atividade elétrica participa sutilmente no sinal da MEA. Dessa maneira, mantendo-se a maior parte dos neurônios próximos aos microeletrodos, ao longo dos dias, espera-se que o sinal registrado praticamente seria o mesmo.

Analisar a distância entre microeletrodo e neurônios é muito importante, uma vez que pode descrever a topologia de distribuição dessas células na superfície da cultura e ainda inferir sobre a relação da atividade elétrica das células neurais e o sinal gravado pela MEA. A adesão difusa dos neurônios na matriz pode dificultar o registro da atividade neural. Para resolver isso, é necessário diminuir a distância entre neurônios e microeletrodos, seja adicionando uma elevada concentração de neurônios nas MEAs, ou então, concentrando a adição dos neurônios apenas na região onde os microeletrodos são encontrados. Dessa maneira, aumenta-se a probabilidade de encontrar vários neurônios por microeletrodo e torna possível aperfeiçoar a aquisição dos sinais eletrofisiológicos.

As perspectivas deste trabalho, em curto prazo, envolvem testar novos procedimentos biológicos para aumentar o tempo de vida das culturas e a quantidade de neurônios em contato com os microeletrodos, gerando quantificações a serem comparadas com a Tabela I. Além disso, espera-se 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 fim, toda essa análise quantitativa fornece uma descrição simples da cultura ligada à MEA. Assim, é possível caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, de modo a permitir gravações eficientes da atividade elétrica que permitem novas investigações da excitabilidade nociceptora destas células. Por isso, em longo prazo, o registro da atividade elétrica dos neurônios sensoriais primários pelas MEAs representa, também, uma possível ferramenta para o desenvolvimento de, por exemplo, novas drogas analgésicas.

AGRADECIMENTOS

À UFU, que possibilitou a realização do projeto. À Mariane, técnica do Laboratório de Microscopia Confocal (ICBIM/UFU), que ajudou com as imagens. Ao Prof. Sérgio Martinoia (UniGe, Itália), e à empresa *Multichannel Systems Inc.* (Alemanha) pela disponibilização das MEAs usadas nos procedimentos biológicos. À FAPEMIG, CNPq e UFU, pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] J.M. Ward, "Patch-Clamping and Other Molecular Approaches for the Study of Plasma Membrane Transporters Demystified", *Plant Physiology*, vol. 114, pp. 1151-1159, 1997.

[2] G.W. Gross, E. Rieske, G.W. Kreutzberg and A. Meyer, "A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro", *Neuroscience Letters*, vol. 6, pp. 101-106, 1977.

[3] J. Van Pelt, P.S. Wolters, M.A. Corner, W.L. Rutten, and G.J. Ramakers, "Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 51, no. 11, pp. 2051-2062, November 2004.

[4] M. Chiappalone, M. Bove, A. Vato, M. Tedesco, and S. Martinoia, "Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development", *Brain Research*, vol. 1093, pp. 41-53, 2006.

[5] A.G. Blankenship and M.B. Feller, "Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits", *Nature Reviews of Neuroscience*, vol. 11, pp. 18-29, January 2010.

[6] A. Stett, U. Egert, and E. Guenther, "Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, pp. 486-495, 2003.

[7] S. Martinoia, L. Bonzano, M. Chiappalone, and M. Tedesco, "Electrophysiological activity modulation by chemical stimulation in networks of cortical neurons coupled to microelectrode arrays: A biosensor for neuropharmacological applications", *Sensors and Actuators B*, vol. 108, pp. 589-596, 2005.

[8] M.A. Corner, R.E. Baker, J. Van Pelt, "Physiological consequences of selective suppression of synaptic transmission in developing cerebral cortical networks in vitro: Differential effects on intrinsically generated bioelectric discharges in a living 'model' system for slow-wave sleep activity", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 32, pp. 1569-1600, 2008.

[9] P. Fromherz, "Neuroelectronic interfacing: semiconductor chips with ion channels, nerve, cells, and brain", in *Nanoelectronics and Information Technology*, Ed: R.Waser, Berlin: Wiley-VCH, pp. 781-810, 2003.

[10] S.M. Potter, T.B. De-Marse, "A new approach to neural cell culture for long-term studies", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 110, pp. 17-24, 2001.

[11] M. Taketani, and M. Baudry, *Advances in Network Electrophysiology - Using Multi Electrode Arrays*, New York: Springer Press, 2006.

[12] F. Greve, S. Frerker, A.G. Bittermann, "Molecular design and characterization of the neuron-microelectrode array interface", *Biomaterials*, vol. 28, pp. 5246-5258, 2007.

[13] W.L.C. Rutten, J.M., Mouveroux, and J. Buitengeweg, "Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a culture probe", in *Proceeding of the IEEE*, vol. 89, no. 7, pp. 1013-1029, 2001.

[14] A.A. Harper, S.N. Lawson, "Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons". *The Journal of Physiology*, vol. 359, pp. 31-46, 1985.

[15] 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.