

# QUANTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DE UMA CULTURA EM MATRIZES MULTIELETRODOS

Polyana Ferreira Nunes<sup>1</sup>, Débora Vasconcelos<sup>1</sup>, Milena Bueno Pereira Carneiro<sup>2</sup>, Amanda Ferreira Neves<sup>3</sup>, Celina Monteiro da Cruz Lotufo<sup>4</sup> e João-Batista Destro-Filho<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Graduanda da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia – MG  
E-mails: [eng\\_bio\\_poly@hotmail.com](mailto:eng_bio_poly@hotmail.com), [debora.pvasconcelos@gmail.com](mailto:debora.pvasconcelos@gmail.com)

<sup>2</sup>Professores da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia – MG  
E-mails: [milenabueno@yahoo.com](mailto:milenabueno@yahoo.com), [jbdestrof@yahoo.com](mailto:jbdestrof@yahoo.com)

<sup>3</sup>Mestranda da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia – MG,  
E-mail: [amanda.nvs@gmail.com](mailto:amanda.nvs@gmail.com)

<sup>4</sup>Professora da Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas - Área de Fisiologia, Uberlândia – MG  
E-mail: [celotufu@icbim.ufu.br](mailto:celotufu@icbim.ufu.br)

**Resumo** – Este trabalho apresenta um método fácil para se quantificar a conectividade neural entre neurônios e eletrodos utilizando fotos de uma cultura neural oriundas de Matrizes Multieletrodos (MEAs). Foi realizada uma padronização da contagem e classificação de neurônios, utilizando-se processamentos quantitativos simples nas imagens de culturas. A análise quantitativa não é facilmente encontrada na literatura, mesmo sendo um dos processos mais importantes em relação à interpretação de imagens.

**Palavras-Chave** - Análises quantitativas, cultura neural, interface neurônio-microeletrodo, matrizes multieletrodo.

## QUANTIFICATION AND CLASSIFICATION OF CULTURED NEURONS IN MULTI-ELECTRODE ARRAYS

**Abstract** - This paper presents an easy method to quantify the neural connectivity between neurons and electrodes using photos of a neural culture plated on multi-electrode arrays (MEAs). It was performed a standardization to count and classify neurons, using simple quantitative processing on the images from cultures. Quantitative analysis is not easily found in the literature, even though this is one of the most important tasks regarding image interpretation.

**Keywords** - Culture neural, multieletrodo matrices neuron microelectrode interface, quantitative analysis.

### I. 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 nanotecnologia pode também fornecer dispositivos capazes de traduzir um impulso nervoso em informação para circuitos eletrônicos, como é o caso das MEAs (Matrizes Multieletrodos) que são

capazes estimular e fazer a aquisição de sinais elétricos a partir de culturas neurais [1,5].

Até o momento as aquisições de potencial de células eram feitas por métodos eletrofisiológicos como *patch-clamp* ou gravações extracelulares *in vivo*. A tecnologia da MEA oferece a possibilidade única de se realizar registros extracelulares não invasivos [3].

A MEA é comumente utilizada para estudar a atividade e a plasticidade do sistema nervoso [4]. Sua tecnologia foi aplicada a estudos de tratamento da informação e compreensão do cérebro, doenças e manipulação farmacológica. Além disso, esta configuração é uma plataforma muito interessante para estudos de neuroprótese [5]. Isso é possível a partir da aquisição de potenciais elétricos extracelulares, visando a análise de aglomerados ou pequenos grupos de células neurais [6]. Esses aglomerados neurais são porções de neurônios em culturas realizadas a partir do isolamento de células de tecidos vivos, adicionadas a placas de cultivo contendo meio nutritivo, no caso as MEAs. Este processo permite o monitoramento da quantidade de células durante os dias *in vitro* e ainda permite investigar a relação entre a célula e o eletrodo da MEA, fundamental para a gravação de um sinal de boa qualidade uma vez que arranjos neuronais podem influenciar fortemente a atividade elétrica registrada por MEAs [7].

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 tarefa é 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. Para implementar estes procedimentos foram utilizadas funções do software ImageJ para manipular imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência aplicada em culturas do gânglio da raiz dorsal (DRG) que foram realizadas conforme protocolo descrito, em ratos Wistar fêmeas de 1 mês (100 g) [8].

Este artigo está organizado da seguinte forma. A seção II descreve o que é uma MEA, as estruturas e como os eletrodos estão dispostos em sua base. A seção III apresenta a análise e interpretação de imagens de culturas em MEAs e

a classificação dos neurônios de acordo com suas distâncias. Na seção o IV, é apresentado o método de obtenção das imagens dos neurônios na MEA, com a ajuda do software ImageJ para posterior cálculo das distâncias. Por fim a seção V apresenta as conclusões e a proposta deste projeto

## II. ESTRUTURAS DA MEA

A Matriz Multieletrodos (MEA) é um arranjo de vários eletrodos (tipicamente 60) que permitem gravação extracelular e a estimulação, ou seja, que traduzem ou estimulam um impulso nervoso de um neurônio em informação para circuitos eletrônicos, efetuando um registro digital destes potenciais de ação. Linhas de células ou preparações de células primárias são cultivadas diretamente sobre a MEA. Sinais gravados são amplificados por um filtro e enviado para o computador de aquisição de dados. A Figura 1 ilustra uma MEA.



Fig. 1. MEA.

A MEA, desde o seu desenvolvimento nos anos 70, é considerada como uma tecnologia potencialmente útil para estudos de processamento de informações em redes do sistema nervoso [9]. Conceitualmente, são dispositivos nanotecnológicos que registram e traduzem um impulso nervoso de uma ou várias células em informações para circuitos eletrônicos [2]. Os eletrodos da MEA são classicamente adquiridos através de eletrodos de tungstênio, também denominados de *Wolfram*. Uma matriz de microeletrodos é implementada sobre um substrato, usualmente de vidro ou silício sobre o qual uma camada metálica é construída por meio de técnicas fotolitográficas, sendo protegida por um material isolante, através da camada passivadora. A Figura 2 ilustra este processo.

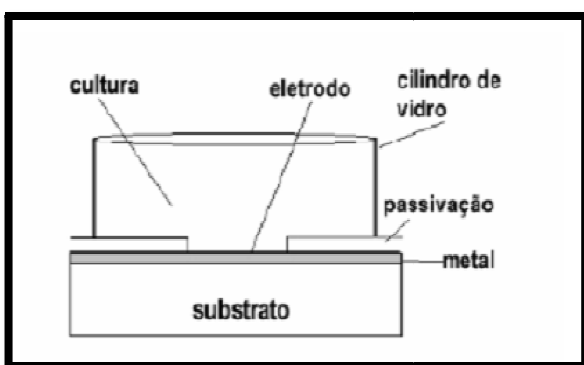


Fig. 2. Fabricação de uma MEA.

Os eletrodos devem ser biocompatíveis, duráveis e apresentar uma impedância baixa, abaixo de 500  $\Omega$  à 1 kHz, para conseguir captar pequenos sinais extracelulares, cuja amplitude atinge valores de ordem de 10 a 100 microvolts, também de novos fármacos [2].

A MEA também permite monitorar facilmente o desenvolvimento da morfologia das células, já que possui um substrato transparente, adequado para se fazer visualizações em microscópios invertidos, de fluorescência confocal ou de varredura dupla, o qual é o foco do trabalho [2].

A Figura 3 ilustra como os eletrodos estão dispostos na base da MEA. 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, eo 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 nas MEAs sendo, como visto na Figura 3, ele é usado como eletrodo de referência interno, conhecido como *Terra*. Esses dispositivos nanotecnológicos são produzidos pela Multichannel Systems e há vários tipos de MEAs, a usada nesta pesquisa é do tipo *Standard* tem como padrão 60 eletrodos em uma grade 8x8, com diâmetros dos eletrodos de 30  $\mu\text{m}$ , e as distâncias intereletrodos de 200  $\mu\text{m}$ .

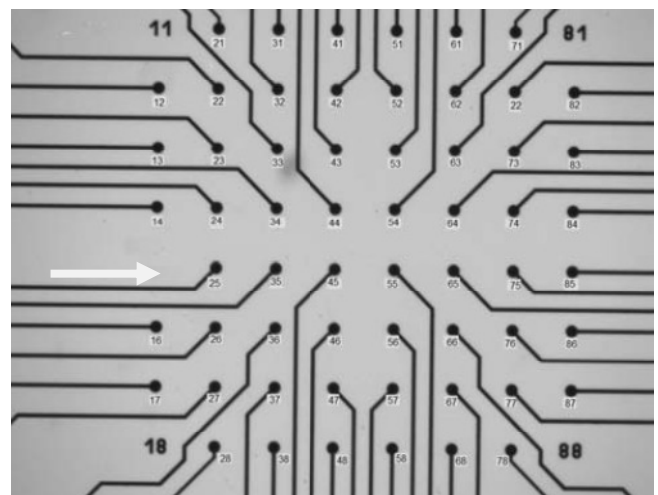


Fig. 3. Fotografia de uma MEA com referências nos eletrodos.

## III. ANÁLISE DE IMAGENS DE CULTURAS NEURAIS EM MEA

### A. Trabalhando Com Imagens de Cultura na MEA

A tarefa de análise e interpretação de imagens através de ferramentas computacionais pode ser considerada dentre as mais importantes, a qual não é facilmente encontrada na literatura, tendo poucos trabalhos sobre a contabilização de neurônios em MEAs. Essa 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. Além disso, a imagem digital pode ser manipulada para realçar a visualização dos neurônios, pode ser impressa, pode ser transportada para saídas de scanners e pode ser

processador ferramentas computacionais, como por exemplo, por um procedimento de separação de cores.

Neste trabalho, para a captura das imagens, foi usado um marcador fluorescente de células vivas com o objetivo único de facilitar a visualização e o estudo dos neurônios a partir do software *ImageJ*, que é um editor de imagens de domínio livre. A representação gráfica dessas imagens permite a extração e identificação de informações e a melhora da qualidade visual, facilitando a contabilização dos neurônios.

### B. Observando Imagens de Cultura na MEA

Sabendo que a estrutura da rede neural influencia a atividade elétrica 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.

Foi definido um padrão classificatório para estabelecer o grau de proximidade de cada neurônio ao eletrodo mais próximo permitindo a avaliação da rede neural. Classificaram-se os neurônios de acordo com as distâncias em relação aos eletrodos da MEA, dentro de uma área quadrada de  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ . A Figura 4 ilustra a chamada região de registro de um eletrodo e ainda, as regiões de classificação dos neurônios quanto à distância em relação ao eletrodo. A primeira classe inclui os neurônios que estão a uma distância máxima de  $35\ \mu\text{m}$  do eletrodo, o que está representado na Figura 4 pelo neurônio 1, a segunda classe representa os neurônios entre uma distância de  $35,1\ \mu\text{m}$  até  $70\ \mu\text{m}$  (neurônio 2), em seguida vem a terceira classe que inclui os neurônios distais de  $70,1\ \mu\text{m}$  à  $105\ \mu\text{m}$  e a quarta e última classe apresenta os neurônios a partir de uma distância de  $105,1\ \mu\text{m}$  até a distância máxima possível dentro da área de registro do eletrodo que é aproximadamente  $140\ \mu\text{m}$  (neurônio 4), essa área é definida pela distância centro a centro dos eletrodos vizinhos. Tais classificações são representadas na Tabela I.

Antes de classificar os neurônios, faz-se uma contagem desses, tomando o cuidado de não confundir neurônios com as células da Glia. Para isso foi estabelecido um padrão em relação à dimensão, geometria e o plano focal, conforme mostrado na Tabela II.

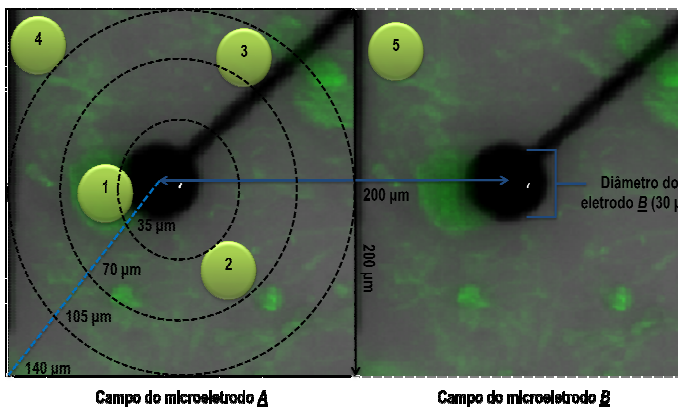


Fig. 4. Distância entre as células e o eletrodo em sua área de registro.

**TABELA I**  
**Classificação das distâncias células-eletrodo.**

Distância	Classe
0 – $35\ \mu\text{m}$	Conectados
$36 – 70\ \mu\text{m}$	Muito próximos
$71 – 105\ \mu\text{m}$	Próximos
$106 – 140\ \mu\text{m}$	Distantes

**TABELA II**  
**Parâmetros estabelecidos para comparação entre neurônios DRG e células da glia.**

Características	Neurônios DRG	Células da Glia
Dimensão	Média à grande (diâmetro $15\ \mu\text{m}$ a $50\ \mu\text{m}$ )	Pequena (diâmetro $< 10\ \mu\text{m}$ )
Geometria	Esférica	Irregular
Núcleo Celular	Se visível é esférico	Se visível é pequeno e achatado
Plano Focal	Acima dos eletrodos	Mesmo dos eletrodos

## IV. AVALIAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para obter as imagens, foi utilizado em alguns experimentos, um reagente fluoróforo atóxico ( $\text{DiBAC}_4(3)$ ) que é um marcador de células vivas para posteriormente serem fotografadas por um microscópio de fluorescência confocal.

Foram obtidas 3 imagens de cada MEA, uma no primeiro dia *in vitro* (24 horas de cultura), outra no segundo dia *in vitro* (48 horas de cultura) e a última imagem no terceiro dia *in vitro* (72 horas de cultura).

Na prática, para capturar toda a área útil de uma MEA são capturadas quatro imagens, uma de cada quadrante da MEA. A Figura 5 ilustra as imagens obtidas do registro de uma MEA.

As imagens da cultura foram analisadas quantitativamente utilizando o software *ImageJ*, que é um processador de imagem baseado em Java, que exibe, edita, analisa, processa, salva e imprime imagens de 8-bit, 16-bit e 32-bit e consegue ler diversos formatos.[10] O *ImageJ* também faz cálculos de área e do pixel selecionado pelo usuário, e é capaz de medir distâncias e ângulos, criar gráficos estatísticos e mais.

Estas análises quantitativas, em termos de estrutura celular e de distribuição, aplicada a gânglios da raiz dorsal (DRG), tem como objetivo calcular um mapa das distâncias entre neurônios sensoriais e microeletrodos da MEA em imagens adquiridas em diferentes dias *in vitro* (DIV).

Para delimitar a área, quadrante de registro de um eletrodo, usa-se a ferramenta *Rectangular Selections* do software, pressionando posteriormente o *shift* a fim de delimitar um quadrado perfeito e então se clica no centro de um eletrodo ao centro de outros três eletrodos mais próximos a ele e usamos a ferramenta *Duplicate*, que abrirá uma nova imagem apenas com a área delimitada do quadrado com arestas de  $200\ \mu\text{m}$ . A imagem duplicada serve apenas como referência, é a partir dela que teremos uma noção dos neurônios mais próximos ao eletrodo.

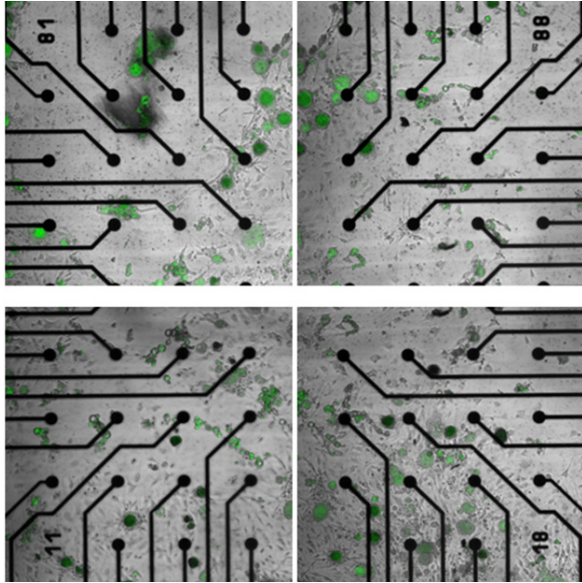


Fig. 5. Imagem de uma MEA fotografada no 3º DIV, ilustrando quatro quadrantes, que juntos formam a matriz completa dos eletrodos. A cultura foi feita utilizando fluorescência.

É feita então a contagem manual destes neurônios próximos usando o *point selections*, ferramenta do software ImageJ. Com o objetivo de medir as distâncias entre neurônios e eletrodos, primeiramente um eletrodo é selecionado e, posteriormente, os neurônios que se encontram em sua região de registro também são selecionados. Usando a *Analyze Measure*, outra ferramenta do ImageJ, as coordenadas X e Y de todos os pontos marcados (o ponto de referência do eletrodo e os pontos próximos do centro dos neurônios) são salvas no Excel. Posteriormente, são realizados os cálculos das distâncias neurônio-eletrodo, com a fórmula usual da distância entre dois pontos:

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

Onde:

- d- distância
- Xb- coordenada x da célula
- Xa- coordenada x do eletrodo
- Yb- coordenada y da célula
- Ya- coordenada y do eletrodo

A Tabela III mostra como exemplo, as coordenadas do eletrodo16 e dos neurônios pertencentes à sua região de registro com as distâncias calculadas com a equação (1).

**TABELA III**  
**Coordenadas de Um Eletrodo e Seus Respectiveos Neurônios**

	X	Y	Distância
Eletrodo16	374,39	796,03	
Neurônio1	421,64	808,75	48,932
Neurônio2	419,82	850,55	70,967
Nuerônio3	423,46	888,72	104,877
Neurônio4	358,03	895,99	101,289
Neurônio5	356,21	757,86	42,278

**TABELA IV**

**Resultados da classificação dos neurônios de umacultura.**

Dias in vitro	Neurônios conectados	Neurônios muito próximos	Neurônios próximos	Neurônios distantes	Distância Média
1º DIV	12	40	70	25	79,963
2º DIV	2	33	30	23	81,753
3º DIV	5	27	24	4	71,298

Quanto aos resultados da análise através do *ImageJ*, foram contabilizadas um total de 147 neurônios no primeiro DIV, dispostos a uma distância média de 79,96389 µm dos eletrodos. Enquanto que no segundo DIV foram encontrados 88 neurônios dispostos a uma distância média de 81,753249 µm que foram reduzidos para 60 neurônios com uma distância média 71,29824 µm no terceiro dia *in vitro*, conforme mostra a Tabela IV.

## V. CONCLUSÕES

Um profissional da área biológica realizou uma cultura de neurônios do DRG em uma placa MEA contendo um meio nutritivo. Esta cultura foi fotografada ao longo de três dias *in vitro*, sendo capturada uma imagem por dia. Essas imagens foram analisadas através do software ImageJ, onde quantificou-se o número de neurônios e calculou-se as distâncias entre eletrodo e os neurônios dentro de sua área de registro.

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 diminui, provavelmente pelo aumento da quantidade de glias na cultura, que pode fazer com que esses neurônios se “movimentem” na MEA.

O que se propôs neste projeto foi um método fácil para se quantificar a conectividade neural em relação aos eletrodos, a partir de fotos de uma cultura neural. Atualmente esse método de contabilização de neurônios na MEA é feito manualmente utilizando-se de fórmulas matemáticas e ferramentas computacionais. Porém, o processamento computacional dessas imagens ainda não é suficientemente rápido e prático, pois a análise manual demanda um tempo maior e a supervisão de um profissional da área biológica para diferenciar o que é neurônio. Pretende-se, em curto prazo, o aprimoramento dessa ferramenta, deixando a quantificação mais automatizada e independente.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é financiado pela Pró-Reitoria de Graduação da Universidade Federal de Uberlândia através do Programa de Bolsas de Graduação - DIREN/ PROGRAD/ 2012-2013.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Potter, S.M. “Distributed processing in cultured neuronal networks.” In: *NICOLELIS, M.A.L. (ed.), Progress in Brain Research*. California: Elsevier Sciences, vol.130, chapter4, 2001.

- [2] Potter, S.M., De-Marse, T.B. "A new approach to neural cell culture for long-term studies" *Journal of Neuroscience Methods*, vol.110, pp.17-24, 2001.
- [3] Lu, S.G.; Gold, M.S. "Inflammation-induced increase in evoked calcium transients in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons." *Neuroscience*, vol.153, no. 1, pp.279–288, 2008.
- [4] Rutten, W.L.C., Mouveroux, J.M., Buitenweg, J. "Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a culture probe" *Proceeding of the IEEE*, vol.89, no.7, pp.1013-1029, 2001.
- [5] Mari, J F.;Neves, A. F.; Saito, J. H.; Lotufo, C. M. C.; DestroFilho, J. B.; Chiappalone, M. "Quantifying Neuron-Electrode Interface of Micro-Electrode Arrays Based on Three-Dimensional Imaging". *Submetido à Inteligência Computacional e Neurociência, Edição Especial sobre Técnicas Avançadas de Computação e Ferramentas para Neuroscience (ACTT), Hindawi, 2012. ISSN: 1687-5265.*
- [6] Freeman, W. J. *Neurodynamics: An Exploration in Mesoscopic Brain Dynamics*, Londres: Springer, 408, 2000.
- [7] Van Pelt, J.; Wolters, P. S.; Corner, M. A.; Rutten, W. L.; Ramakers, G. J "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, 2004.
- [8] Linhart, O., Obreja, O., Kress, M. "The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons" *Neuroscience*, vol.118, pp.69-74, 2003.
- [9] Mercer, H. D., White, R. L. Photolithographic Fabrication and Physiological Performance of Microelectrode Arrays for Neural Stimulation, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 25, no. 6, pp. 494-500, November 1978.
- [10] URL1 – Sítio oficial do software de domínio livre ImageJ. Desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH). Acessado em Abril/2012 e disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.