

ESTUDO DA EVOLUÇÃO TOPOLÓGICA DAS CONEXÕES DE UMA CULTURA DE NEURÔNIOS

D. Vasconcelos, A. Palis, M. B. P. Carneiro e J. B. D. Filho

Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia-MG, Brasil

E-mail: debora.pvasconcelos@gmail.com

Resumo – É proposto neste trabalho à apresentação de um método claro e preciso para se quantificar a topologia da conectividade neural, entre os neurônios e eletrodos utilizando fotos de uma cultura neural oriundas de culturas em Matrizes Multieletrodos (MEAs). A partir da análise quantitativa dessas fotos é realizado uma padronização da contagem e classificação de neurônios, utilizando-se processamentos quantitativos simples nas imagens de culturas. Essa análise quantitativa não é facilmente encontrada na literatura, mesmo sendo um dos processos mais importantes em relação à interpretação de imagens.

Palavras-Chave - Análise quantitativa, interface neurônio – eletrodo, matrizes multieletrodos, MEA.

TOPOLOGICAL STUDY OF EVOLUTION OF CONNECTIONS OF A CULTURE OF NEURONS

Abstract - It is proposed in this paper to the presentation of a clear and precise method to quantify the topology of neural connectivity between neurons and electrodes using photos of a culture neural cultures derived from multi-electrode arrays (MEAs). From the quantitative analysis of the images is carried out to standardize the counting and classification of neurons, using simple quantitative processing the images of cultures. This quantitative analysis is not easily found in the literature, despite being one of the most important processes in relation to the interpretation of images.

Keywords – MEA, Multi-electrode arrays, neuron interface - electrode, quantitative analysis.

I. INTRODUÇÃO



XI CEEL – ISSN 2178-8308
25 a 29 de novembro de 2013
Universidade Federal de Uberlândia – UFU
Uberlândia – Minas Gerais – Brasil

Em condições adequadas, a maioria das células pode viver, se reproduzir e até mesmo expressar suas propriedades em uma placa de cultura, ou seja, *in vitro* [1]. Atualmente, existem diversos estudos de células em culturas, das quais para esse artigo se destacam os neurônios, sendo possível estudá-los morfológica e quantitativamente através de biossensores.

Os biossensores são dispositivos nanotecnológicos desenvolvidos por profissionais em Engenharia Biomédica que traduzem o impulso nervoso dos neurônios, que está na forma elétrica, para registros digitais. Um exemplo desses dispositivos é a Matriz Multieletrodo (MEA), a qual é usada para a realização desta pesquisa.

As Matrizes Multieletrodos correspondem a um refinamento do conceito de interface bioeletrônica [2]. Elas consistem de circuitos elétricos de dimensões micrométricas sobre um substrato com um conjunto de pequenos eletrodos. Sua condição ideal de uso exige que o corpo celular se localize sobre um eletrodo ou próximo até uma distância de 140 μm (micrometros), explicado melhor na seção II.c.

Os microeletrodos podem ser fabricados em configuração planas ou 3D, conforme Figura 1.

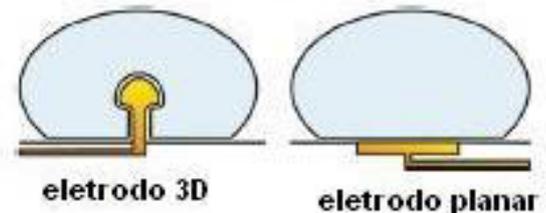


Fig. 1. Esquema de células sobre MEAs com microeletrodos em configuração 3D (à esquerda) e planar (à direita).

Na configuração planar, a célula permanece sobre o microeletrodo, e a resposta eletrofisiológica é captada de maneira extracelular. Na configuração 3D, pontas de vidro com cerca de 60 μm de altura são fixadas sobre o substrato e então cobertas com microeletrodos de platina ou de ouro. Quando a célula é depositada sobre o microeletrodo 3D, ela fagocita a ponta, de maneira a formar uma junção de alta resistência. Essa configuração permite o registro de sinais intracelulares, ainda que o eletrodo seja extracelular, com a mesma razão sinal-ruído obtida pelas técnicas tradicionais para registro intracelular [3].

As principais vantagens do uso de um dispositivo MEA em relação às técnicas tradicionais de registro eletrofisiológico são o fato de permitir o registro simultâneo da atividade de vários neurônios e de não exigir o

posicionamento fino de microeletrodos sobre o tecido, como no caso da técnica de estimulação por *patch clamp* que utiliza o controle experimental do potencial de membrana para caracterizar a dependência da voltagem dos canais iônicos, e permite a obtenção de registros eletrofisiológicos intracelulares sem a necessidade de se penetrar a célula. Além disso, a tecnologia MEA oferece a conjuntura de realizar registros não-invasivos de uma rede de neurônios simultaneamente, como ilustrado na Figura 2.



Fig. 2. Matriz de eletrodos em um tecido nervoso. Parte superior e inferior.

No desenvolvimento deste projeto, foram utilizados neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos Wistar. Esses neurônios possuem diâmetros variando entre 10 a 40 μm , o que é relativamente maior que os neurônios corticais. Essa escolha foi pelo motivo dos neurônios DRG terem maior probabilidade de cobrir os microeletrodos da MEA.

Parte substancial do corpo celular precisa estar em contato próximo até 140 μm com a superfície do microeletrodo para conseguir um bom registro do sinal neural. Assim, a cultura de neurônio do DRG sobre a MEA representa então um sistema ideal para o monitoramento da interface neurônio-eletrodo [4].

Aqui, os objetivos foram caracterizar e comparar quantitativamente a evolução topológica das redes neurais crescidas sobre a MEA para posterior armazenamento dos

dados e processamento. Foi realizada uma análise quantitativa na distribuição espacial dos neurônios com o intuito de inquirir um possível padrão, ou vários, em termos de distâncias neurônio-eletrodo. Para isso, foram utilizadas imagens obtidas a partir das mesmas culturas em diferentes dias *in vitro* duas vezes por dia, através da microscopia confocal de fluorescência.

Este artigo está organizado da seguinte forma. A seção II apresenta os principais detalhes da preparação das culturas em MEA, do processo de aquisição das imagens dessas culturas e suas respectivas análises. A seção III apresenta a interpretação e os resultados de imagens de culturas em MEAs. Por fim, a seção IV apresenta as conclusões e contribuições deste trabalho.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Preparação da cultura

Foram realizadas duas culturas de neurônios do DRG utilizando ratos Wistar de 100 g 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. A Figura 3 ilustra essa MEA.

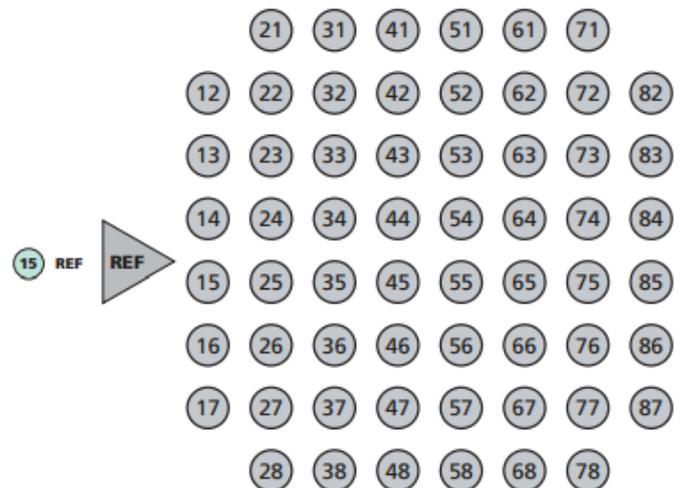


Fig. 3. Modelo da MEA utilizada. Fonte: [5].

B. Aquisição das imagens das culturas

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 (24h, 36h, 48h, 60h, 72h e 84h de cultura). Ao final foram obtidas 6 imagens de cada MEA, mas na prática, para capturar toda a área útil de uma MEA foram capturadas duas imagens, uma do quadrante superior e outro do inferior da MEA. 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 de fluorescência, utilizando a lente objetiva de 10x.

C. Análise das imagens

As imagens da cultura foram analisadas quantitativamente utilizando o software *ImageJ*, que é um processador de imagem baseado em Java, que exhibe, edita, analisa, processa, salva, imprime e consegue ler diversos formatos de imagens [6]. Além disso, 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 se traçar este mapa neuronal, as imagens já registradas são analisadas. Inicialmente, é realizada uma identificação visual dos neurônios presente na cultura e, em seguida, são marcadas as coordenadas geométricas de cada corpo celular identificado, o que possibilitará o cálculo da distância de cada um deles à cada microeletrodo da MEA.

As imagens no software *ImageJ* são abertas através da Barra de Ferramentas. Neste local basta acessar a opção “Plugins - “LOCI” - “Bio-FormatsImporter”. Após aberta a imagem, foi adotado como padrão a coloração verde nas células e, isso é alterado através do ícone “Look UpTables Tool” e para uma melhor resolução foi adotado a opção RGB Color, que é alterado na opção Image – Type – RGB Color.

A identificação dos neurônios como citado acima foi feita de forma visual. Para isso foi necessário o entendimento sobre a diferença entre neurônios e células gliais, onde as principais diferenças podem ser encontradas na Tabela I.

Tabela I - Comparação entre neurônios DRG e células da glia.

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

Os neurônios identificados são circulado através do ícone “Elliptical selections” do programa e como convenção foi adotado a cor amarela na linha da elipse. Conforme Figura 4.

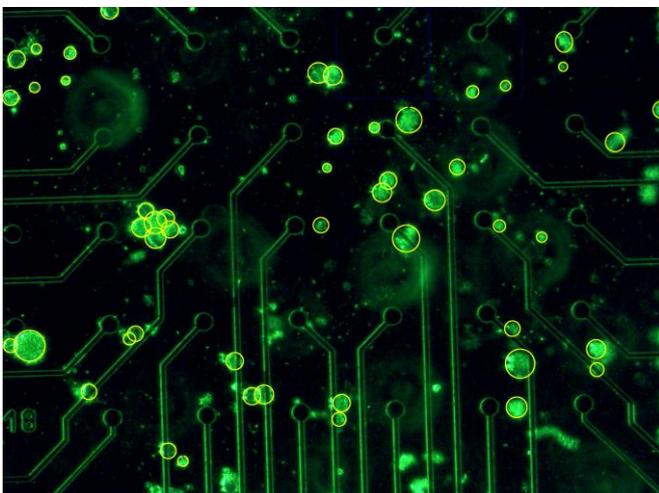


Fig. 4. Imagem de uma cultura em MEA com os neurônios identificados e circulado.

O próximo passo é realizar um procedimento para delimitar a área de proximidade de cada eletrodo. Com isso fica mais fácil definir visualmente de qual eletrodo cada neurônio detectado está mais próximo. Para delimitar a área de registro de um eletrodo, usa-se a ferramenta *Rectangular Selections* do software, pressionando posteriormente a tecla *shift* a fim de delimitar um quadrado perfeito. O centro do quadrado é posicionado no eletrodo e faz-se uso da ferramenta *Duplicate*, que abre uma nova imagem apenas com a área delimitada do quadrado com arestas de 200 μm . A imagem duplicada serve apenas como referência, é a partir dela que teremos uma noção dos neurônios mais próximos ao eletrodo.

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 *Análise 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 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.

Para a identificação do número do eletrodo é utilizada a figura 3 como exemplo. As linhas 21 a 14 representam os eletrodos presentes nas imagens da parte superior da MEA e as linhas 15 a 28 representam os eletrodos presentes nas imagens da parte inferior da MEA.

A partir de ferramentas da plataforma *Excel for Windows* é possível fazer o cálculo da média aritmética das distâncias dos neurônios.

Após os resultados desses cálculos é possível classificar os neurônios quanto ao distanciamento dos eletrodos de acordo com a Tabela II.

Tabela II – Classificação das distâncias células - eletrodo

Distância	Classe
0 – 35 μm	Conectados
36 – 70 μm	Próximo
71 – 105 μm	Afastado
106 – 140 μm	Distantes

III. RESULTADOS

Foram analisadas imagens pertencentes ao banco de dados 1 em dois dias *in vitro*, divididas em quadrante superior e inferior, como mostrado na Figura 2. No primeiro dia *in vitro* foram encontrados 38 neurônios, com distância entre seus eletrodos respectivos na média de 80,42 μm . No segundo dia houve a contabilização de 21 neurônios com a distância média de 80,79 μm .

Foi observado um padrão na distribuição dos neurônios, o qual é exemplificado pela Tabela III que mostra os dois primeiros dias *in vitro* (DIV) e ilustrado pela Figura 5. É esperado que, com o passar dos dias, o total de células e a distância entre elas diminui, provavelmente pela morte celular e pelo aumento da quantidade de glia na cultura, que pode fazer com que esses neurônios se “movimentem” na MEA.

Tabela III – Distribuição dos neurônios nos 2 primeiros dias *in vitro*.

Quadrante	Conectado	Proximo	Afastado	Distante
DIV1	1	12	18	7
DIV2	3	6	7	7

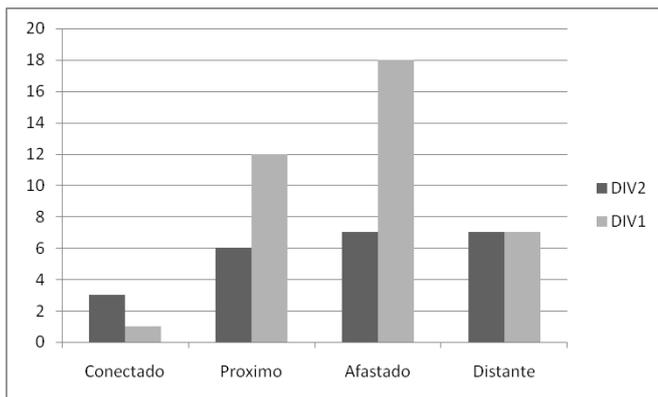


Fig. 5. Gráfico representativo da quantidade de neurônios nos 2 DIVs em relação à distância.

Segundo os autores de [7], 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 em relação 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 dois DIVs, restando no 2º DIV, em média, 55% dos neurônios inicialmente contados no 1º DIV. 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 [8]. 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 ao final do 2º DIV, somente 50% dos neurônios próximos ($76 < D < 70 \mu\text{m}$) e 38% dos neurônios

afastados ($71 < D < 105 \mu\text{m}$) permaneceram. Em contrapartida, manteve-se a proporção dos neurônios conectados ($D < 35 \mu\text{m}$) e daqueles observados distantes ($1066 < D < 140 \mu\text{m}$) aos microeletrodos. Dessa maneira, os resultados sugerem que o sinal registrado a partir da MEA não poderia permanecer durante dois dias, uma vez que houve perdas importantes na sua amplitude, o que caracteriza uma redução significativa na quantidade de neurônios próximos aos microeletrodos.

Nos resultados, é interessante observar também que os valores médios das distâncias entre neurônio e microeletrodo, praticamente não variaram de um dia para o outro. Isso indica que a cultura manteve o mesmo padrão mesmo com a influência da adesão e da perda neuronal, com uniformidade entre os dados, o que valida os resultados obtidos.

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

De maneira geral, os neurônios do DRG se adaptaram bem à matriz multieletrodo, porque em todos os experimentos foi possível visualizar células vivas. Esta pesquisa é eminentemente interdisciplinar. É ligada a dados experimentais gerados dentro da UFU por profissionais da área biológica. Foi proposto um método fácil para se quantificar a conectividade neural em relação aos eletrodos, a partir de fotos de uma cultura neural.

Em particular, deseja-se investigar a existência de padrões topológicos gerais durante o crescimento da cultura, em termos das redes de conexão funcional entre células nervosas e os microeletrodos. 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.

Posteriormente, será possível caracterizar e melhorar a compreensão da interface neurônio-eletrodo, além de possibilitar modelos neurocomputacionais, que por sua vez é uma pesquisa de fronteira pouco desenvolvida.

Cabe destacar que, do ponto de vista da literatura internacional, os modelos existentes são, em sua maioria, resultados de abstrações teóricas e não baseado em dados experimentais, como proposto nesta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À UFU, que possibilitou a realização do projeto. Ao Prof. Sérgio Martinoia (UniGe, Itália), e à empresa *Multichannel Systems Inc.* (Alemanha) pela disponibilização das MEAs

usadas nos procedimentos biológicos. E pelo financiamento da UFU através do programa de Bolsas de Graduação – DIREN/PROGRAD 2013-2014.

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. Acedido em 09 de Junho de 2013, em: 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). Acedido em 13 de Junho de 2013, em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [7] W.L.C. Rutten, J.M., Mouveroux, and J. Buitenweg, “Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a culture probe”, in *Proceeding of the IEEE*, vol. 89, no. 7, pp. 1013-1029, 2001.
- [8] 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.