

ESTUDO QUANTITATIVO DA EVOLUÇÃO TOPOLÓGICA DE UMA CULTURA DE NEURÔNIOS EM MATRIZES MULTIELETRODOS

Angélica de Andrade Palis¹, Débora Vasconcelos¹, Amanda Ferreira Neves², Milena Bueno P. Carneiro¹,
Celina Monteiro da Cruz Lotufo³ e João Batista Destro Filho¹

¹Universidade Federal de Uberlândia/UFU, Faculdade de Engenharia Elétrica, Uberlândia – MG

²Instituto de Biologia – Unicamp, Campinas – SP

³Universidade Federal de Uberlândia/UFU, Setor de Fisiologia /ICBIM, Uberlândia –MG

angelicapalis@hotmail.com, debora.pvasconcelos@gmail.com, amanda.nvs@gmail.com, milena@eletrica.ufu.br,
jbdestrof@yahoo.com e celotufu@icbim.ufu.br

Resumo - As matrizes de microeletrodos podem estimular e gravar atividades elétricas de uma cultura de neurônios. Sua tecnologia pode, também, ser amplamente aplicada a estudos de fenômenos que ocorrem no cérebro. Além disso, essas matrizes permitem micrometricamente acompanhar o desenvolvimento morfológico das redes neurais através de diferentes tipos de microscopia. O monitoramento morfológico permite investigar a relação entre as células e os microeletrodos, sendo chave para escrever um sinal de boa qualidade. Utilizando um microscópio de fluorescência confocal, foram obtidas imagens de culturas de neurônios cultivadas em MEAs. O estudo apresentado neste artigo teve como objetivo utilizar estas imagens para realizar uma análise quantitativa da evolução morfológica destas culturas. Esta análise se baseou em estabelecer um mapa das distâncias entre os neurônios e microeletrodos, o que é essencial para uma futura avaliação e caracterização da interface entre eles, permitindo estabelecer estratégias para gravar a atividade elétrica.

Palavras-Chave – Análise Quantitativa, Interface Neurônio-Eletrodo, Matrizes Microeletrodos.

QUANTITATIVE STUDY OF THE EVOLUTION OF A CULTURE OF TOPOLOGICAL NEURONS IN MULTI-ELECTRODE ARRAYS

Abstract - The microelectrode arrays can stimulate and record electrical activity of a culture of neurons. Its technology can also be widely applied to studies of phenomena occurring in the brain. Furthermore, these matrices allow micrometrically follow the morphological development of the neural networks through different types of microscopy. Morphological monitoring allows to investigate the relationship between cells and microelectrodes, being key to writing a good quality signal. Using a confocal fluorescence microscope, images were obtained from cultures of neurons cultured on MEA. The study presented in this article aimed to use these images to perform a quantitative analysis of the morphological evolution of these cultures. This analysis was based on establishing a map of distances between neurons and microelectrodes, which is essential for further evaluation

and characterization of the interface between them, establishing strategies to record the electrical activity.

Keywords - Microelectrode Array, Neuron-electrode Interface, Quantitative Analysis.

I. INTRODUÇÃO

Estudos em neurociência têm aproximado à 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 crescente demanda de neuroimplantes realizadas atualmente, ainda é uma área relativamente desconhecida. Neuroimplantes são cirurgias substancialmente novas no Brasil, devido a isso não se sabe muito da interação entre um neuroimplante e os neurônios.

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], ou sob condições patológicas induzidas, para estudos farmacológicos [4]. A MEA também 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]. Dessa maneira, imagens periódicas tomadas sobre a cultura possibilitam caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, sendo essas investigações essenciais também para a concretização do neuroimplante [5].

Neste trabalho foi analisada a evolução topológica de culturas cultivadas em MEAs utilizando neurônios corticais. Os neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (DRG) são



XII CIEEEL – ISSN 2178-8308
13 a 17 de Outubro de 2014
Universidade Federal de Uberlândia – UFU
Uberlândia – Minas Gerais – Brasil

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, enquanto que o diâmetro do microeletrodo é 30 μm . Sendo assim, cada microeletrodo pode fazer contato com um único neurônio e eles 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 do sinal neural [3]. A cultura de neurônios do DRG sobre a MEA representa, então, um sistema ideal para o monitoramento da interface neurônio-eletrodo.

Assim, o objetivo é entender a relação, e se há relação, entre neurônios-microeletrodos e neurônios-neurônios para futuramente auxiliar a interação entre neuroimplantes - neurônios e também assessorar diagnósticos e controle de doenças neurodegenerativas.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho em questão realizou um estudo quantitativo da evolução topológica da rede neural crescida sobre os microeletrodos da MEA. Para se formar as culturas, foram utilizadas células dos gânglios da raiz dorsal (DRG) de ratos Wistar fêmeas de 1 mês (100 g), conforme protocolo descrito [8].

Foram utilizadas imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência, adquiridas de duas culturas em três dias *in vitro*. 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.

A. Aquisição das imagens

Para obter as imagens, foi utilizado um reagente fluoróforo atóxico (DiBAC₄(3)) que é um marcador de células vivas para posteriormente serem fotografadas por um microscópio de fluorescência confocal.

As imagens foram obtidas, para as mesmas culturas de células neuronais, a cada 12 horas após transcorrido um dia da preparação da 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 1. No final das capturas foi obtido um total de doze imagens de cada MEA para serem processadas.

Todo procedimento adotado para a aquisição das imagens, foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia.

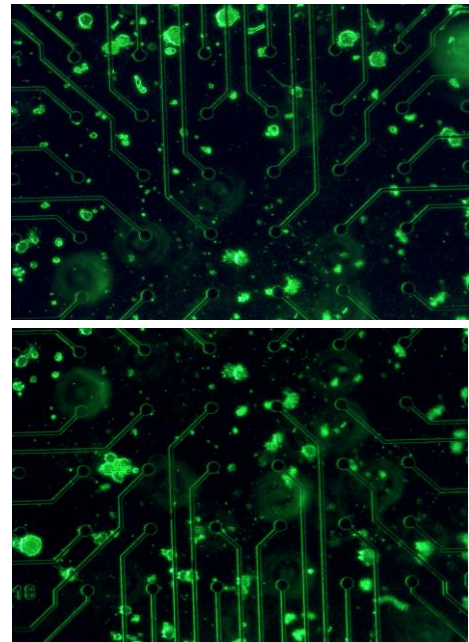


Fig. 1. Imagem da área útil da MEA dividida em quadrante superior e inferior.

B. 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.

C. Análise das Imagens

A tarefa de análise e interpretação de imagens de culturas em MEAs através de ferramentas computacionais pode ser considerada extremamente importante para a área. Porém, ela não é facilmente encontrada na literatura, tendo poucos trabalhos sobre a contabilização de neurônios em MEAs.

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 duas MEAs sendo 12 imagens de cada uma delas, totalizando, assim, a análise de 24 imagens.

D. Classificação das Imagens

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 [3].

Com base nisto, foi definido um padrão classificatório para estabelecer o grau de proximidade de cada neurônio ao eletrodo mais próximo permitindo a avaliação da rede neural. Para isso, foi necessário delimitar a área de abrangência de cada microeletrodo. Foi definida uma área quadrada de 200 μm de arestas centrada no microeletrodo, pois a distância entre os microeletrodos é de 200 μm . Se um neurônio estiver

dentro desta área, ele pertence ao campo de leitura do microeletrodo. Para melhor compreensão, veja o exemplo apresentado na Figura 2.

A primeira classe inclui os neurônios que estão a uma distância máxima de 35 μm do eletrodo, o que está representado na Figura 2 pelo neurônio 1. A segunda classe representa os neurônios entre uma distância de 35,1 μm até 70 μm (neurônio 2), em seguida vem a terceira classe que inclui os neurônios afastados de 70,1 μm à 105 μm e, finalmente, a quarta e última classe apresenta os neurônios localizados a partir de uma distância de 105,1 μm até a distância máxima possível dentro da área de registro do eletrodo que é aproximadamente 140 μm (neurônio 4), esses são os neurônios distantes. Tais classificações estão apresentadas na Tabela I.

Antes de se classificar os neurônios, faz-se uma contagem desses, tomando o cuidado de não confundir neurônios com as células da Glia. As células da Glia são células auxiliares que têm como função o suporte e a nutrição do sistema nervoso, por exemplo, produzem a Bainha de Mielina que é um isolante elétrico, participam do controle da composição iônica e molecular do ambiente extracelular e promovem a limpeza celular.

Tabela I – Classificação das distâncias neurônio - eletrodo

Distância	Classe
0 – 35 μm	Conectados
35,1 – 70 μm	Próximo
70,1 – 105 μm	Afastado
105,1 – 140 μm	Distantes

Essa classificação se dá a partir do cálculo das distâncias através da equação (1).

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

Onde:

- d- distância desejada;
- 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.

E. Relação Neurônio – Neurônio

Para analisar essa relação foi desenvolvido um programa no software Matlab que calcula a distância entre todos os neurônios da imagem e faz uma estatística sobre o menor valor de distância, o maior valor de distância encontrada, a média das distâncias e o desvio padrão das distâncias. Após obter os dados estatísticos, é possível visualizar graficamente o que ocorre com os neurônios após três (3) dias *in vitro*.

III. RESULTADOS

Foram analisadas duas culturas *in vitro*, chamadas MEA 14 e MEA 19. Conforme mencionado anteriormente, foram obtidas 12 imagens de cada uma delas, representando 6 momentos diferentes, sendo que em cada momento foram

obtidas duas imagens, uma do quadrante superior e outra do quadrante inferior.

A. Relação Eletrodo - Neurônio

Na MEA 14 em suas primeiras 24h foram encontrados 71 neurônios. Nas 36h houve a contabilização de 30 neurônios. Nas 48h de observação foram contabilizados 28 neurônios. Nas 60h a cultura se encontrava com o mesmo número de neurônios, não houve perda. Nas 72h tinha 18 neurônios. Finalmente, nas 84h de observação, foi encontrado um total de 22 neurônios.

Observou-se uma alta perda de neurônios da primeira leitura para a segunda, como mostrado na Tabela II e ilustrado pelo gráfico da Figura 3. É esperado que, com o passar dos dias o total de células diminua, provavelmente pela morte celular.

Nota-se que da penúltima leitura para a última tem-se um aumento dos neurônios conectados, afastados e distantes. E, uma redução dos neurônios próximos do eletrodo. Essa diferença se dá pelo aumento da quantidade de células glia e/ou devido ao fato que o material nutritivo da MEA acumula rente ao eletrodo.

Tabela II – Distribuição dos neurônios da MEA 14.

Tempo da Cultura	Total	Conectado (%)	Próximo (%)	Afastado (%)	Distante (%)
24h	71	5,63	36,62	50,7	7,04
36h	30	3,33	26,67	53,33	16,67
48h	28	10,71	25	39,28	25
60h	28	0	25	57,14	17,86
72h	18	0	22,22	44,44	33,33
84h	22	9,09	13,64	50	27,27

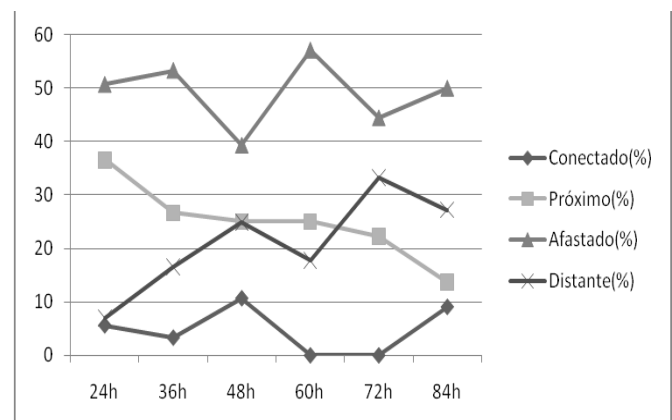


Fig. 2. Distribuição dos neurônios da MEA 14.

Para a MEA 19, em suas primeiras 24h foram encontrados 76 neurônios. Nas 36h houve a contabilização de 64 neurônios. Nas 48h de observação foram contabilizados 34 neurônios. Nas 60h a cultura se encontrava com os mesmos

54 neurônios. Nas 72h tinha 34 neurônios. E, nas 84h de observação, foi encontrado um total de 44 neurônios.

Observou-se alta perda de neurônios da segunda leitura para a terceira, como mostrado na Tabela III e delineado pelo gráfico da Figura 4. Notou-se, também que da quarta leitura para a quinta teve um aumento dos neurônios conectados, e distantes. E, uma redução dos neurônios próximos e afastados do eletrodo.

Tabela III – Distribuição dos neurônios da MEA 19.

Tempo da Cultura	Total	Conectado (%)	Próximo (%)	Afastado (%)	Distante (%)
24h	76	9,21	26,31	50	14,47
36h	64	5,51	22,45	51,17	20,87
48h	34	2,94	26,47	58,82	41,17
60h	54	5,48	29,72	43,61	21,19
72h	34	5,71	28,57	42,85	22,85
84h	44	7,84	26,13	46,83	19,17

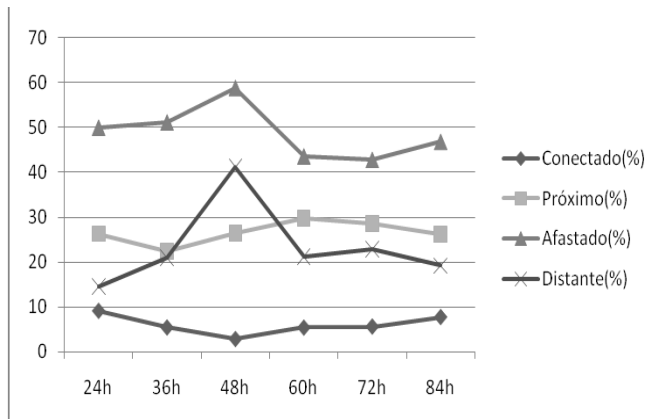


Fig. 3. Distribuição dos neurônios da MEA 19

B. Relação Neurônio – Neurônio

Todas as nossas sensações, sentimentos, pensamentos, respostas motoras e emocionais, a aprendizagem e a memória, a ação das drogas psico-ativas, as causas das doenças mentais, e qualquer outra função ou disfunção do cérebro humano não poderiam ser compreendidas sem o conhecimento do fascinante processo de comunicação entre as células nervosas (neurônios) [7]. Diante desse fato, viu-se importante a análise da interface neurônio-neurônio da rede cultural em MEA.

Desse modo, com as mesmas MEAs 14 e 19, observamos essa topologia a partir de dados estatísticos apresentados nas Tabelas IV e V, que descrevem, respectivamente, MEA 14 e MEA 19. Essa análise foi feita de modo que um neurônio se relaciona com todos os outros presentes na MEA e vice-versa. Na MEA 14 nota-se que ao passar das horas há um aumento da distância mínima entre eles, exceto na terceira leitura para a quarta que houve uma pequena diminuição, porém nas leituras sucessivas teve um aumento significativo. Em exposição à distância máxima houve aumento, com exclusão da segunda para a terceira leitura que aumentou a distância máxima entre os neurônios. E em descrição à média e o desvio padrão não houve mudanças significativas.

Esses dados indicam que a rede neuronal se manteve com o mesmo padrão em sua topologia mesmo com a influência da adesão e da perda neuronal, com uniformidade entre os dados, o que valida os resultados obtidos.

A Figura 4 possui 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. Sendo A localizado dentro do campo do microeletrodo B.

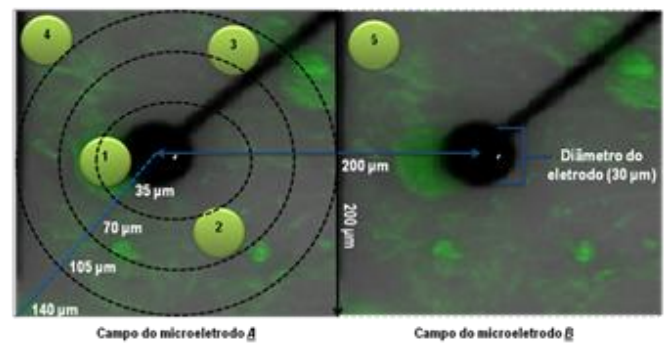


Figura 4- Classificação proposta entre os neurônios e os microeletrodos.

Tabela IV – Dados estatísticos da relação neurônio-neurônio da MEA 14.

Tempo de Cultura	Distância Mínima ($\times 10^3 \mu\text{m}$)	Distância Máxima ($\times 10^3 \mu\text{m}$)	Distância Média ($\times 10^3 \mu\text{m}$)	Desvio Padrão ($\times 10^3 \mu\text{m}$)
24h	0.0942	2.5380	1.3175	0.6347
36h	0.2246	2.4601	1.2625	0.5766
48h	0.3120	2.6666	1.2887	0.6861
60h	0.3029	2.3979	1.4095	0.6178
72h	0.6088	2.1849	1.3282	0.5818
84h	0.5087	2.0212	1.0962	0.5661

Na MEA 19 nota-se que ao passar das horas há um aumento da distância mínima entre eles. A distância máxima aumentou. E, a média e o desvio padrão também aumentaram, o que quer dizer que para essa MEA houve mudança em seu padrão topológico.

Tabela V – Dados estatísticos da relação neurônio-neurônio da MEA 19

Tempo de Cultura	Distância Mínima (um)	Distância Máxima (um)	Distância Média (um)	Desvio Padrão (um)
24h	64.9752	228.3494	155.4421	75.4311
36h	86.5054	382.5519	233.0056	133.3830
48h	108.4495	654.6415	408.5494	266.7544
60h	192.4081	627.0954	393.9889	204.6462
72h	194.8394	717.0477	345.9485	249.3369
84h	223.0570	970.2300	564.4108	297.2685

IV. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi padronizado um procedimento para se realizar três 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 e a terceira foi deparar dados estatísticos da relação entre todos os neurônios de uma MEA.

A contagem de neurônios e a medida das distâncias entre neurônio e microeletrodo foram realizadas e comparadas a partir de imagens de duas culturas. 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 relativamente importantes na sua amplitude, porque, apesar de não ter havido redução significativa na quantidade de neurônios próximos, houve essa perda nos neurônios conectados aos microeletrodos. Sabe-se também que os sinais provenientes dos neurônios nociceptivos já são de baixa amplitude [3], portanto, qualquer redução desses há diferença significativa no sinal.

Neste contexto, buscou-se aperfeiçoar a aquisição da atividade neuronal de uma cultura, considerando estudos da interface neurônio-microeletrodo e neurônio-neurônio 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 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 e neurônio-neurônio, este trabalho pretende mostrar à comunidade científica da área de estudos eletrofisiológicos um

instrumento metodológico que, utilizando imagens de microscopia confocal, propõe caracterizar uma rede neural cultivada em recipientes com matrizes de microeletrodos (MEA) incorporados.

A perspectiva futura deste trabalho é 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, é possível caracterizar a interface neurônio-microeletrodo e a neurônio-neurônio, 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.

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 Maio de 2014, 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 Maio de 2014, em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [7] Cérebro e Mente – *Comunicação entre as células nervosas*. Acedido em 30 de Maio de 2014, em http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/neurotransmitters2_p.html.
- [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.