



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE ELETRODOS
MICROFABRICADOS PARA REGISTRO E ESTIMULAÇÃO NEURAL
EXTRACELULAR *IN VITRO***

CAROLINA DE BARROS VIDOR

BACHARELA EM FÍSICA MÉDICA/LICENCIADA EM FÍSICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre
Junho, 2014**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE ELETRODOS
MICROFABRICADOS PARA REGISTRO E ESTIMULAÇÃO NEURAL
EXTRACELULAR *IN VITRO***

CAROLINA DE BARROS VIDOR

BACHARELA EM FÍSICA MÉDICA/LICENCIADA EM FÍSICA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALÉO

CO-ORIENTADOR: DR. FABRÍCIO SIMÃO

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Trabalho vinculado ao Projeto CNPq N° 590152/2011-4

**Porto Alegre
Junho, 2014**



IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE ELETRODOS MICROFABRICADOS PARA REGISTRO E ESTIMULAÇÃO NEURAL EXTRACELULAR IN VITRO

CANDIDATA: CAROLINA DE BARROS VIDOR

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

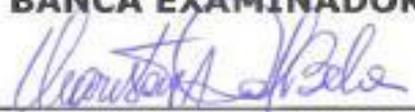


DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - ORIENTADOR

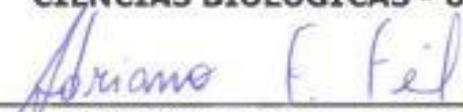


DR. FABRÍCIO SIMÃO - CO-ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA



**DR. CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO - DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UNIPAMPA**



DR. ADRIANO FRIEDRICH FEIL - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

Se ficarmos tentados a crer que poderemos alcançar a iluminação ou mesmo a felicidade simplesmente com o pensar, por mais metódico ou inteligente que seja, precisamos apenas nos lembrar de que, desde o tempo sem princípio, temos estado a pensar com tamanha intensidade que nossas ideias poderiam encher volumes e volumes. Entretanto, elas não nos deixaram mais felizes; certamente, não nos conduziram à iluminação. Se o pensar por si só produzisse iluminação, nós já seríamos Budas.

(Chagdud Tulku Rinpoche)

DEDICATÓRIA

À Mulher Selvagem que sustenta minha vida interior e exterior.

AGRADECIMENTOS

Às boas conexões cármicas que me permitiram renascer em um tempo e lugar propícios ao pleno desenvolvimento de minhas capacidades físicas, mentais e espirituais. Que minhas ações possam gerar benefícios para todos os seres.

À minha família, que provê todas as condições para que eu possa realizar meus sonhos. Em especial, ao meu pai, Joel Vidor, por sempre ter me apoiado em minhas decisões e ter me encorajado a perseguir o que quer que me fizesse feliz; e à minha mãe, Margarete de Barros, de quem sem dúvidas herdei este gênio indomável sem o qual seria impossível enfrentar todos os desafios aos quais me propus nesta vida.

Às minhas amigas e aos meus amigos, de longa data ou de tempos recentes, com os quais posso dividir risadas e lágrimas e assim tornar minha caminhada mais leve e colorida.

Ao meu orientador, Ricardo Papaléo, pela confiança no meu trabalho e pela enorme paciência com a minha “personalidade forte”. Ao meu co-orientador, Fabrício Simão, pela disposição em sanar minhas dúvidas no laboratório e pelos momentos de descontração quando o que eu mais queria era abandonar tudo em cima da bancada e voltar para casa.

À equipe do Laboratório de Neurociências, principalmente ao Ricardo Breda, por ter topado este desafio junto comigo desde o princípio; à Simone Salamoni e à Záquer Costa, por terem gentilmente me poupado da lida com os animais; à Michele Domingues e ao Denis de Assis, pelo entusiasmo na cultura de neurônios; aos alunos de iniciação científica, Wyllians Borelli, Ismael Plentz e Geraldine Basler, pelo auxílio no preparo das soluções; à Daniele Vieira, por ter se tornado amiga e confidente.

Aos meus colegas do Tecnopuc, pela companhia constante e presença indispensável: Ana Paula Graebin, Cláudia Telles, Daniela Sotelo, Danieli Guerra, Elisa Nunes, Jefferson Santana, Júlio Pires, Leandro Gutierrez, Maximiliano Rocha, Milena Pires e Raquel Thomaz. À aluna de iniciação científica, Marcela Beal, pelo bom-humor diário e pela ajuda infundável no processamento dos dados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho: muito obrigada.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| DEDICATÓRIA | 5 |
| AGRADECIMENTOS..... | 6 |
| SUMÁRIO | 7 |
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS..... | 17 |
| LISTA DE SÍMBOLOS..... | 18 |
| RESUMO..... | 20 |
| ABSTRACT..... | 21 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2. OBJETIVOS | 25 |
| 2.1. Objetivos Específicos..... | 25 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 26 |
| 3.1. Excitação e condução nervosa..... | 26 |
| 3.1.1 Propriedades da membrana neuronal | 28 |
| 3.1.1.1 Potencial de repouso | 29 |
| 3.1.1.2 Potencial de ação | 30 |
| 3.1.1.3 Modelo dinâmico de Hodgkin-Huxley (HH) | 35 |
| 3.1.2 Integração sináptica | 38 |
| 3.1.2.1 Potencial pós-sináptico excitatório (EPSP)..... | 39 |
| 3.1.2.2 Potencial pós-sináptico inibitório (IPSP) | 40 |
| 3.1.3 Plasticidade sináptica..... | 41 |
| 3.1.3.1 Potenciação de longa duração (LTP)..... | 43 |
| 3.1.3.2 Depressão de longa duração (LTD)..... | 43 |
| 3.2 O cérebro e sua utilização na experimentação em eletrofisiologia..... | 44 |
| 3.2.1 O neocórtex..... | 46 |
| 3.2.2 A formação hipocampal..... | 48 |
| 3.3 Métodos <i>in vitro</i> de medida da atividade neural | 50 |
| 3.3.1 Medidas intracelulares..... | 52 |
| 3.3.2 Medidas extracelulares..... | 54 |
| 3.4 Arranjo de microeletrodos (MEA)..... | 56 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.4.1 | Design e fabricação..... | 57 |
| 3.4.2 | Sistema MEA..... | 64 |
| 3.4.3 | Perspectiva histórica sobre desenvolvimento e aplicações de MEAs | 66 |
| 3.4.4 | Resumo do potencial de aplicações | 80 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 82 |
| 4.1 | Aparato experimental | 82 |
| 4.1.1 | Arranjos de microeletrodos (MEAs)..... | 82 |
| 4.1.2 | Sistema convencional de aquisição de dados..... | 84 |
| 4.1.3 | Sistema MEA..... | 85 |
| 4.2 | Procedimento experimental | 85 |
| 4.2.1 | Caracterização dos arranjos de microeletrodos | 86 |
| 4.2.2 | Interfaceamento entre o MEA e um sistema de aquisição de dados convencional | 87 |
| 4.2.2.1 | Protótipo 1..... | 87 |
| 4.2.2.2 | Protótipo 2..... | 87 |
| 4.2.2.3 | Testes de desempenho dos protótipos | 88 |
| 4.2.3 | Instalação de um sistema MEA | 88 |
| 4.2.4 | Adaptação de um sistema de perfusão ao MEA | 89 |
| 4.2.4.1 | Confecção de tampas de silicone biocompatível | 89 |
| 4.2.4.2 | Testes de perfusão com bomba peristáltica..... | 90 |
| 4.2.5 | Definição de procedimentos experimentais com MEAs..... | 90 |
| 4.2.6 | Experimentação com cultura celular..... | 90 |
| 4.2.6.1 | Observação a aspectos éticos | 91 |
| 4.2.6.2 | Dissociação dos neurônios hipocampais | 91 |
| 4.2.6.3 | Preparação do sensor para experimentação | 91 |
| 4.2.6.4 | Semeadura dos neurônios sobre o MEA | 92 |
| 4.2.6.5 | Obtenção de registros da atividade eletrofisiológica | 92 |
| 4.2.7 | Experimentação com fatias de cérebro de roedor..... | 93 |
| 4.2.7.1 | Observação a aspectos éticos | 93 |
| 4.2.7.2 | Obtenção de fatias de cérebro..... | 93 |
| 4.2.7.3 | Preparação dos sensores para experimentação..... | 94 |
| 4.2.7.4 | Deposição de fatia de tecido sobre o MEA | 94 |
| 4.2.7.5 | Obtenção de registros da atividade eletrofisiológica | 94 |
| 4.2.8 | Análise e validação dos registros | 95 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.8.1 | Influência dos parâmetros de processamento na análise de dados | 95 |
| 4.2.8.2 | Registros com material biológico | 96 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 98 |
| 5.1 | Caracterização dos arranjos de microeletrodos | 98 |
| 5.1.1 | Configuração espacial e composição química | 98 |
| 5.1.2 | Caracterização elétrica | 103 |
| 5.2 | Interfaceamento entre o MEA e um sistema de aquisição de dados convencional | 105 |
| 5.3 | Instalação de um sistema MEA | 108 |
| 5.4 | Adaptação de um sistema de perfusão ao MEA | 110 |
| 5.5 | Definição de procedimentos experimentais com MEAs | 112 |
| 5.6 | Análise e validação dos registros obtidos | 113 |
| 5.6.1 | Influência dos parâmetros de processamento na análise de dados | 114 |
| 5.6.2 | Registros com cultura celular | 122 |
| 5.6.3 | Registros com fatias de cérebro de roedor | 128 |
| 5.6.3.1 | Registros de atividade espontânea (Grupo 1) | 129 |
| 5.6.3.2 | Registros de atividade espontânea e evocada (Grupo 2) | 133 |
| 5.6.4 | Considerações sobre o uso do software no processamento dos dados | 140 |
| 6 | CONCLUSÕES | 142 |
| 7 | PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS | 146 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 147 |
| | ANEXO A – DESENHO ESQUEMÁTICO DE INTERFACE ELETRÔNICA | 165 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Representação esquemática da estrutura de um neurônio típico e sua interação com um neurônio vizinho na forma de sinapses. As setas indicam a direção de propagação do sinal [8].27
- Figura 3.2 Representação esquemática da membrana neuronal durante repouso [8].29
- Figura 3.3. Representação da geração e da propagação de um potencial de ação ao longo da membrana axonal de um neurônio não-mielinizado. As setas indicam o fluxo iônico. Em (a) a membrana recebe um estímulo; em (b) e (c) ocorre a propagação do potencial de ação [8].31
- Figura 3.4 Representação da condução saltatória do potencial de ação em um neurônio envolto por bainha de mielina [8]......32
- Figura 3.5. Gráficos do potencial de membrana em função do tempo, mostrando as fases de um potencial de ação: (a) potencial de ação conforme previsão teórica; (b) potencial de ação conforme medido experimentalmente (registro intracelular) [18].34
- Figura 3.6 Circuito equivalente para o modelo HH, onde I_m é a corrente de membrana; I_L é a corrente de fuga; C_m é a capacitância de membrana; V_m é o potencial de membrana; V_{Na} , V_K e V_L são respectivamente os potenciais de equilíbrio para íons de sódio, de potássio e para outros íons não determinados; e R_{Na} , R_K e R_L são as resistências associadas aos fluxos iônicos [19].36
- Figura 3.7 Representação de registro intracelular de mecanismo de integração sináptica, gerado pela combinação de potenciais pós-sinápticos excitatórios (EPSPs) e potencial pós-sináptico inibitório (IPSP). O gráfico apresenta o potencial de membrana (mV) em função do tempo (ms) [8].41
- Figura 3.8 Anatomia comparada em secção sagital de encéfalo humano (superior) e encéfalo de rato (inferior). Estruturas equivalentes estão representadas pelas mesmas cores [31].45
- Figura 3.9 Representação das seis camadas do neocórtex cerebral [32]......47
- Figura 3.10 Comparação entre hipocampo (a) de rato e (b) humano [34].48
- Figura 3.11 Esquema da circuitaria hipocampal [36]......49

| | |
|--|----|
| Figura 3.12 Esquemas de montagem do aparato experimental para obtenção de (a) registros intracelulares com micropipeta e (b) registros extracelulares com microeletrodo..... | 51 |
| Figura 3.13 (a) Imagem por microscopia óptica de uma micropipeta de vidro utilizada na técnica de <i>sharp electrode</i> (escala 5 μm) [42].(b) Imagem por microscopia eletrônica de varredura de uma micropipeta de vidro utilizada na técnica de <i>patch clamp</i> (escala 2 μm) [43]...... | 52 |
| Figura 3.14 Variabilidade de potenciais de ação registrados intracelularmente conforme diferentes tipos de neurônios: (a) neurônios cerebelares de Purkinje; (b) neurônios piramidais da região hipocampal CA1; (c) neurônios corticais dopaminérgicos. <i>Width</i> se refere à duração do potencial à largura à meia-altura [11]...... | 53 |
| Figura 3.15 Imagem por microscopia eletrônica de varredura de uma micropipeta de fibra de carbono utilizada em registros extracelulares (escala 50 μm) [45]...... | 54 |
| Figura 3.16 Representação de <i>spikes</i> extracelulares nas proximidades de um neurônio piramidal ativo. A magnitude dos <i>spikes</i> está normalizada e sua amplitude pico-a-pico é indicada pela escala de cores [48]. | 56 |
| Figura 3.17 Seção transversal esquemática do microchip de um MEA composto por substrato, microeletrodos de geometria planar e camada isolante. | 57 |
| Figura 3.18 Imagens por microscopia eletrônica de varredura de diferentes MEAs, evidenciando microestrutura e nanoestrutura de eletrodos metálicos nos quais houve deposição de (a) e (b) nitreto de titânio [57] e (c) e (d) óxido de irídio [58]...... | 59 |
| Figura 3.19 Imagens por microscopia eletrônica de varredura (a, b e c) e de transmissão (d) de microeletrodos com diferentes geometrias. Estrutura planar: (a) quadrado [60]. Estruturas tridimensionais: (b) protuberância piramidal [60]; (c) geometria cilíndrica [63]; e (d) formato de cogumelo [64]. | 60 |
| Figura 3.20 Imagens por microscopia eletrônica de varredura de dispositivos MEAs com nanoestruturas: (a) superfície de um microeletrodo recoberto por nanotubos de carbono (escala indica 200 nm) [65]; (b) nanopilares de silício (escala indica 1 μm) [67]; (c) nanopilares de silício conectados a dispositivos nano-FET [68]...... | 61 |
| Figura 3.21 Esquema da montagem final de um dispositivo MEA, evidenciando a conexão entre o microchip, a placa de circuito impresso (PCI) e a câmara de registro. | 62 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.22 Dispositivos MEAs comerciais e seus respectivos designs básicos: (a) MED64 (Alpha-MED Scientific) [69]; (b) M64-GLx (Axion Biosystems) [70]; (c) MEA60 (Multi Channel Systems) [71]; e (d) MEA biochip (Qwane Biosciences) [72]. | 63 |
| Figura 3.23 Esquema mostrando relação entre os constituintes de um sistema MEA [73]. | 64 |
| Figura 3.24 Diagrama de seção transversal do primeiro arranjo de microeletrodos registrado na literatura, em publicação feita no ano de 1972 [76]. | 67 |
| Figura 3.25 (a) Diagrama de seção transversal de um microeletrodo coberto com negro de platina (<i>platinum black</i>). (b) Imagem por microscopia eletrônica de varredura evidenciando a deposição de negro de platina [80]. | 68 |
| Figura 3.26 Esquema da estrutura de um microeletrodo combinado a um microtransistor FET [82]. | 69 |
| Figura 3.27 (a) Representação de um neurônio crescendo sobre um microeletrodo e formando uma junção do tipo “selo”. (b) Representação de uma micropipeta de vidro posta em contato com o neurônio para formar uma junção “selo” [89]. | 71 |
| Figura 3.28 (a) Registros simultâneos por microtransistor FET (extracelular) e por micropipeta (MP, intracelular); (b) Atividade espontânea registrada quando há uma boa junção neurônio – FET; (c) registro quando a junção não é adequada [92]. | 72 |
| Figura 3.29 Dispositivo ME: (a) configuração final; (b) detalhe do padrão de disposição dos seus microeletrodos [100]. | 74 |
| Figura 3.30 Estrutura de um dispositivo MED: (a) Arranjo de 64 microeletrodos planares e (b) diagrama de seção transversal evidenciando estrutura do dispositivo [111]. | 76 |
| Figura 3.31 Microscopia eletrônica de varredura evidenciando o crescimento de um neurônio hipocampal sobre um microeletrodo protuberante [62]. | 78 |
| Figura 4.1 Numeração dos microeletrodos de um MEA padrão de matriz 8x8. | 83 |
| Figura 4.2 <i>Setup</i> do sistema MEA: (1) pré-amplificador MEA1060-Inv; (2) controlador de temperatura; (3) microcomputador equipado com conversor de sinais analógico/digital (MC_Card) e softwares TCX-Control, MC_Rack e MC_DataTool. | 88 |
| Figura 5.1 Visão geral do microcircuito de um MEA (sensor customizado): (a) substrato de vidro; (b) placa de circuito impresso (PCI); (c) região de | |

| | |
|--|-----|
| conexão entre as trilhas dos microeletrodos e a PCI; (d) um dos quatro pares de eletrodos de referência; (e) região dos microeletrodos (área de trabalho). | 98 |
| Figura 5.2 Arranjo de microeletrodos de um sensor customizado mostrado por microscopia óptica..... | 99 |
| Figura 5.3 Imagem por microscopia óptica de um arranjo de microeletrodos modelo MEA60 200 Pt. | 99 |
| Figura 5.4 Imagem por microscopia óptica de um sensor modelo MEA60 200 3D GND. | 100 |
| Figura 5.5 Imagens por microscopia eletrônica de varredura nos modos (a) SE e (b) BSE de um MEA. | 101 |
| Figura 5.6 Detalhe de um microeletrodo de estimulação e registro do arranjo. Imagens obtidas por MEV nos modos (a) SE e (b) BSE. | 101 |
| Figura 5.7 Identificação por EDS da composição química de (a) microeletrodo e (b) trilha do microcircuito de um MEA customizado. | 102 |
| Figura 5.8 Identificação por EDS da composição do substrato do microchip de um MEA customizado. | 103 |
| Figura 5.9 Registro do nível de ruído (dado bruto) de um MEA preenchido com solução PBS, exibindo microeletrodos defeituosos (canais 23, 37, 38, 45 e 46). Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 20 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1000 ms)..... | 104 |
| Figura 5.10 Registros típicos do nível de ruído (dado bruto) dos microeletrodos de um MEA preenchido com solução PBS. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 20\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1000ms)..... | 104 |
| Figura 5.11 Parte da interface eletrônica para conexão com sistema de aquisição de dados convencional: (1) cabos IDE; (2) protoboard com chaves dip switch; (3) cabos com terminais BCN; (4) cabo para conexão com fixador de corrente. | 105 |
| Figura 5.12 Interface mecânica-eletrônica (protótipo 2): (a) montagem final (vista superior); (b) estrutura desmontada: (1) placa de poliacetal; (2) placa de circuito impresso (vista inferior); (3) conectores. | 106 |
| Figura 5.13 Fotografia do arranjo experimental final conectando o MEA ao sistema de aquisição de dados convencional: (1) mesa antivibracional; (2) gaiola de Faraday; (3) interface mecânica-eletrônica (protótipo 2); (4) fixador de | |

| | |
|---|-----|
| corrente; (5) conversor analógico-digital; (6) amplificador; (7) condicionador de sinais; (8) estimulador programável. | 107 |
| Figura 5.14 Análise <i>off-line</i> dos registros com software Clampfit 9.2 exibindo influência de ruído de baixa frequência quando a interface eletrônica era posicionada (a) fora da gaiola de Faraday. Quando dentro da gaiola (b) tal ruído não era detectado..... | 107 |
| Figura 5.15 Registros do nível de ruído do pré-amplificador do sistema MEA: (a) fora da gaiola de Faraday; (b) dentro da gaiola de Faraday. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 20 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms). | 108 |
| Figura 5.16 Registros do nível de ruído do pré-amplificador do sistema MEA captados pelo microeletrodo 44: (a) fora da gaiola de Faraday; (b) dentro da gaiola. Os gráficos representam o potencial (escala $\pm 20 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms). | 109 |
| Figura 5.17 Tampas confeccionadas em PDMS para encaixe sobre o MEA. | 110 |
| Figura 5.18 (a) Tampa de PDMS com agulhas acopladas a um MEA. (b) Montagem experimental do sistema de perfusão com bomba peristáltica..... | 110 |
| Figura 5.19 Montagem experimental da bomba de perfusão com o sistema MEA. | 111 |
| Figura 5.20 Registros obtidos com software MC_Rack durante perfusão por bomba peristáltica adaptada ao sistema MEA. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 200\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms). | 111 |
| Figura 5.21 Representação do sinal captado pelo microeletrodo 55 durante perfusão. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 200 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms)..... | 112 |
| Figura 5.22 Influência da aplicação de filtros digitais sobre o número de picos detectados em função do limiar (potencial negativo em microvolts) em registro obtido por MEA preenchido com PBS. | 115 |
| Figura 5.23 Registro de atividade eletrofisiológica de fatia de tecido banhada por solução excitatória (solução 2), mostrando potencial de campo local com sobreposição de <i>spikes</i> . O gráfico exhibe o potencial (escala $\pm 800 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1900 ms). | 115 |
| Figura 5.24 Registro de atividade de fatia de tecido banhada por solução excitatória (solução 2), mostrando potencial de campo local. O gráfico exhibe o potencial (escala $\pm 800\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1900ms). | 116 |

- Figura 5.25 Registro de atividade eletrofisiológica de fatia de tecido banhada por solução excitatória (solução 2), mostrando potenciais de ação. O gráfico exibe o potencial (escala $\pm 500 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1900 ms). 117
- Figura 5.26 Influência do valor de limiar sobre a detecção de picos em registros obtidos por MEA preenchido com PBS e com a deposição de fatia de tecido banhada por diferentes soluções (Ringer, solução 1 e solução 2). 118
- Figura 5.27 Registro de atividade espontânea de fatia de tecido imersa em solução de Ringer normal para dois canais de um mesmo sensor: (A) microeletrodo 13 e (B) microeletrodo 55. O sinal foi filtrado entre 300Hz-5kHz. *Spikes* de baixa amplitude aparecem em (A) e de alta amplitude em (B). Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 40 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1500 ms). 119
- Figura 5.28 Detecção de picos em registros obtidos por MEA preenchido com PBS e com a deposição de fatia de tecido banhada por diferentes soluções (Ringer, solução 1 e solução 2) a partir de limiar de amplitude de -4σ (desvio-padrão). O sinal foi filtrado na faixa de 300Hz-5kHz. 120
- Figura 5.29 Amplitude pico-a-pico dos potenciais detectados em registros obtidos por MEA preenchido apenas com PBS e com fatia de tecido banhada por diferentes soluções (Ringer, solução 1 e solução 2). O limiar de amplitude para detecção de potenciais adotado foi de -4σ (desvio-padrão). O sinal foi filtrado na faixa de 300Hz-5kHz. 121
- Figura 5.30 Registro de atividade espontânea em cultura celular banhada por meio de cultura padrão. Os gráficos representam o potencial (escala $\pm 200\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms). 122
- Figura 5.31 Registro de atividade espontânea em cultura celular banhada com solução eletrofisiológica extracelular. Os gráficos representam o potencial (escala $\pm 100\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1000ms). 123
- Figura 5.32 Registro de atividade espontânea em cultura celular com meio de cultura padrão: (A) a linha horizontal abaixo do sinal indica o limiar de amplitude para detecção de *spikes* estimado neste canal ($-11\mu\text{V}$). O gráfico representa o potencial (escala $\pm 16\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms); (B) sobreposição de *spikes* detectados no mesmo canal (microeletrodo 21). O gráfico representa o potencial (escala $\pm 20\mu\text{V}$) em função do tempo (escala $\pm 1\text{ms}$). 124
- Figura 5.33 Número total de *spikes* detectados em cada microeletrodo do sensor MEAG1373 durante monitoração eletrofisiológica de cultura celular. .. 125
- Figura 5.34 Amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados em cultura celular banhada com (A) meio de cultura padrão e (B) solução eletrofisiológica

- extracelular. Cada gráfico representa o potencial (escala $30\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 900s). 126
- Figura 5.35 Frequência de *spikes* detectados em cultura celular banhada com (A) meio de cultura padrão e (B) solução eletrofisiológica extracelular. Cada gráfico representa a frequência (escala 10Hz) em função do tempo (escala 900s). 127
- Figura 5.36 Registro de atividade espontânea em fatia de tecido, mostrando saturação do sinal devido à limitação da faixa de entrada (*input range*) antes da aquisição do registro. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 1000\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms). 129
- Figura 5.37 Registro de *spike* como resultado de atividade espontânea em fatia de tecido. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 120\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 200 ms). 130
- Figura 5.38 Dados obtidos de registro de atividade espontânea em fatia de tecido: (A) amplitude pico-a-pico dos *spikes*, onde cada gráfico representa o potencial (escala $100\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 180s); (B) frequência de atividade, onde cada gráfico representa a frequência (escala 20Hz) em função do tempo (escala 180s). 131
- Figura 5.39 Registro de atividade espontânea em fatia de tecido (fatia 1): (A) sinal bruto mostrando detecção de potenciais de campo locais. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 1000\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms); (B) sinal após filtragem na faixa de frequências de 300Hz-5kHz, onde os picos representam *spikes*. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 500\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms). 134
- Figura 5.40 Detalhe do *spike* detectado no microeletrodo 63 do sensor MEAD2400 durante registro de atividade espontânea da fatia 1. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 500\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 28ms). 135
- Figura 5.41 Frequência de atividade detectada na fatia 1 com solução de Ringer (0-180s), solução 1 (180-360s) e solução 2 (360-540s). Cada gráfico representa a frequência (escala 10Hz) em função do tempo (escala 540s). 137
- Figura 5.42 Frequência de atividade detectada na fatia 2 com solução de Ringer (0-180s), solução 1 (180-360s) e solução 2 (360-540s). Cada gráfico representa a frequência (escala 20Hz) em função do tempo (escala 540s). 138
- Figura 5.43 Amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados na fatia 2 com solução de Ringer (0-180s), solução 1 (180-360s) e solução 2 (360-540s). Cada gráfico representa o potencial (escala $40\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 540s). 139

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 5.1 Parâmetros de análise extraídos dos dados do Grupo 1..... | 132 |
| Tabela 5.2 Limiares de amplitude para detecção de <i>spikes</i> nos registros do Grupo 2 | 135 |
| Tabela 5.3 Número de <i>spikes</i> por minuto detectados nos registros do Grupo 2..... | 136 |
| Tabela 5.4 Frequências de atividade detectadas nos registros do Grupo 2..... | 137 |
| Tabela 5.5 Amplitude pico-a-pico dos <i>spikes</i> detectados nos registros do Grupo 2 | 139 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Au | ouro |
| Ag | prata |
| AgCl | cloreto de prata |
| C | carbono |
| Ca | cálcio |
| Ca ²⁺ | íon de cálcio |
| CaCl ₂ | cloreto de cálcio |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | cloreto de cálcio dihidratado |
| Cl ⁻ | íon de cloro |
| cm | centímetros |
| cm ³ | centímetros cúbicos |
| CO ₂ | dióxido de carbônio |
| g | grama |
| GABA | ácido gama-aminobutírico |
| Hz | hertz |
| Ir | irídio |
| ITO | óxido de índio-titânio |
| IrO _x | óxido de irídio |
| I _K | corrente de íons de potássio |
| I _L | corrente de fuga |
| I _m | corrente de membrana |
| I _{Na} | corrente de íons de sódio |
| K ⁺ | íon de potássio |
| KCl | cloreto de potássio |
| kHz | quilohertz |
| kV | quilovolt |
| Mg | magnésio atômico |
| Mg ²⁺ | íon de magnésio |
| MgCl ₂ | cloreto de magnésio |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | cloreto de magnésio hexahidratado |
| mL | mililitro |

| | |
|----------------------------------|---|
| mm | milímetro |
| mm ³ | milímetro cúbico |
| mM | milimolar |
| ms | milisegundo |
| m/s | metro por segundo |
| mV | milivolt |
| Na ⁺ | íon de sódio |
| NaCl | cloreto de sódio |
| NaHCO ₃ | bicarbonato de sódio |
| NaH ₂ PO ₄ | fosfato monobásico de sódio |
| ng | nanograma |
| nm | nanômetro |
| Ni | níquel |
| O | oxigênio atômico |
| O ₂ | oxigênio molecular |
| Pt | platina |
| R _K | resistência associada ao fluxo de íons de potássio |
| R _L | resistência associada ao fluxo de íons não-determinados |
| R _{Na} | resistência associada ao fluxo de íons de sódio |
| SiO ₂ | óxido de silício |
| Si ₃ N ₄ | nitreto de silício |
| SOI | silício recoberto com óxido de silício |
| TiN | nitreto de titânio |
| V _K | potencial de equilíbrio para íons de potássio |
| V _L | potencial de equilíbrio para íons não determinados |
| V _m | potencial de membrana |
| V _{Na} | potencial de equilíbrio para íons de sódio |
| μL | microlitro |
| μm | micrômetro |
| μm ² | micrômetro quadrado |
| ∅ | diâmetro |

RESUMO

VIDOR, Carolina de Barros. **Implementação de um sistema de eletrodos microfabricados para registro e estimulação neural extracelular *in vitro***. Porto Alegre. 2014. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O objetivo principal deste trabalho foi implementar um sistema de eletrodos microfabricados para registro e estimulação neural extracelular *in vitro*. A estrutura dos arranjos de microeletrodos (MEAs) foi caracterizada através de imagens por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura. A análise qualitativa da composição química foi feita por espectroscopia de raios X por energia dispersiva e a análise do nível de ruído foi realizada através da avaliação do valor RMS dos potenciais registrados com os sensores preenchidos com solução salina padrão. Uma interface eletrônica entre um MEA e um sistema de aquisição de dados convencional com oito canais foi construída e testes de desempenho foram realizados. Um sistema MEA comercial foi instalado e validado através de experimentação com cultura neuronal e fatias de cérebro de roedor. A tentativa de adaptação de um sistema convencional de perfusão por bomba peristáltica ao sistema MEA mostrou-se insatisfatória devido ao alto nível de ruído dos registros. Procedimentos experimentais relacionados ao correto manuseio dos MEAs foram definidos, e investigou-se a influência de diferentes parâmetros sobre a atividade detectada com os sensores. Finalmente, a análise dos dados com cultura celular indicou detecção de potenciais de campo locais (PCLs) de maior amplitude, maior contagem de *spikes* e maior frequência de atividade nos registros obtidos com meio de cultura padrão. Os dados com fatias de tecido indicaram a detecção de maior número de *spikes* por minuto, de maior frequência de atividade e de maior amplitude pico-a-pico dos *spikes* nos microeletrodos que captaram PCLs de maior amplitude.

Palavras-Chaves: Arranjo de microeletrodos. MEA. Registro eletrofisiológico. Registro extracelular. Epilepsia.

ABSTRACT

VIDOR, Carolina de Barros. **Implementation of a microfabricated electrode system for *in vitro* neural stimulation and recording.** Porto Alegre. 2014. Master thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The main goal of this work was to implement a microfabricated electrode system for *in vitro* neural stimulation and recording. The MEA biosensor structural characterization was obtained by optical and scanning electrical microscopy images. Qualitative analysis of the chemical composition was made through energy-dispersive X-ray spectroscopy. Analysis of the noise level was conducted by evaluating the RMS value of the potentials recorded with sensors filled with standard saline solution. An electronic interface between a MEA and a conventional data acquisition system with eight channels was constructed and performance tests of the built interface were conducted. Installation of a MEA commercial system was carried out and preliminary tests were performed by experimenting with rodent neuronal cell culture and brain slices. An attempt was made to adapt a conventional perfusion system by peristaltic pump to the MEA system; however, the results were unsatisfactory due to the high noise level of the recordings. Experimental procedures related to the proper handling of MEAs were defined, and the influence of different parameters involved in experimentation with MEAs was investigated. Finally, the data analysis of cell culture recordings indicated detection of local field potentials (LFPs) of greater amplitude, higher counts of spikes and higher spike frequency in the records obtained with standard culture medium compared to those obtained with extracellular electrophysiological solution. The data analysis of cortical slices recordings indicated the detection of a greater number of spikes per minute, higher spike frequency and greater peak-to-peak spikes amplitudes by the microelectrodes that have captured LFPs of greater magnitude.

Key-words: Microelectrode array. MEA. Electrophysiological recording. Extracellular recording. Epilepsy.

1. INTRODUÇÃO

A busca pela compreensão do funcionamento do sistema nervoso central e das funções cerebrais ainda representa um grande desafio para a ciência. Relevantes áreas de interesse no campo da neurociência tem se desenvolvido ao longo das últimas décadas com o propósito de desvendar e descrever o que e como o cérebro faz para criar, organizar e manter funções tão complexas quanto habilidades mentais, morais e intelectuais. Nesse contexto, áreas como Neuroanatomia, Neurologia, Neuroimagem, Neurociência de Sistemas, Neurologia Cognitiva, Neurologia Social, Optogenética e Filosofia da Mente tem se beneficiado enormemente dos avanços tecnológicos atuais, os quais permitem um conhecimento cada vez mais detalhado das estruturas cerebrais e dos papéis que estas desempenham no desenvolvimento de funções cognitivas e motoras.

A Neurobiologia, em particular, tem seu foco na investigação da eletrofisiologia de neurônios individuais e da relação entre estrutura e função em redes neurais. Nas duas situações, faz-se necessário a estimulação e o registro da atividade neural a nível celular, ainda que a elucidação do funcionamento de uma única célula seja insuficiente para explicar as propriedades do circuito da rede neural. Desta forma, o registro simultâneo da atividade de múltiplos neurônios é imprescindível para que a contribuição de cada célula para o funcionamento da rede seja elucidada.

A primeira técnica desenvolvida para experimentação em eletrofisiologia foi o emprego de um microeletrodo de vidro para a detecção intracelular da atividade elétrica de um neurônio, conforme descrito inicialmente por Graham e Gerard em 1946 [1]. Essa técnica, ainda utilizada atualmente, permite a obtenção de registros com uma boa relação sinal-ruído, ainda que não seja adequada para registros de longo prazo ou monitoramento simultâneo em múltiplas regiões cerebrais. Conseqüentemente, a introdução de arranjos de microeletrodos metálicos

extracelulares representou um grande avanço na investigação eletrofisiológica por oferecer a possibilidade de monitorar simultaneamente e por longos períodos um grande número de células, conectadas ou não a uma rede, constituindo assim a interface ideal entre células vivas e circuitos eletrônicos.

O entendimento da dinâmica de condução nervosa a partir de modelos animais experimentais e a caracterização eletrofisiológica de diferentes células permitem o esclarecimento da fisiopatogenia de diversos transtornos neurológicos, além da compreensão de processos eletrofisiológicos normais. Nessa perspectiva, estudos neuroeletrofisiológicos auxiliam a indicar o diagnóstico de desordens, a detectar lesões estruturais no cérebro, a monitorar a integridade funcional de determinadas estruturas neurais durante um procedimento operatório, a avaliar a acuidade visual ou auditiva de pacientes incapazes de cooperar com testes comportamentais, entre outras utilidades clínicas [2]. Além disso, também possibilitam o desenvolvimento e a avaliação de novas estratégias terapêuticas.

Dentre as disfunções cerebrais mais freqüentes, está a epilepsia, doença que afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo todo e é caracterizada clinicamente por alterações comportamentais súbitas conhecidas como “crises epiléticas” [3]. A epilepsia é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma questão de saúde pública, pois é um problema que ocorre com alta frequência na população, acarreta um risco significativo de morte ou invalidez e sobrecarrega o indivíduo afetado, sua família, comunidade e a sociedade como um todo [4].

Apesar de serem publicados anualmente inúmeros livros e artigos científicos retratando as últimas pesquisas relacionadas ao diagnóstico e ao tratamento de diversos aspectos da epilepsia, pouco tem sido feito em relação à busca e à disseminação de estratégias que possam ter um impacto importante sobre o controle de crises epiléticas e sua prevenção. A imprevisibilidade de ocorrência de crises epiléticas expõe o paciente a danos físicos e psicológicos, causando assim um impacto negativo sobre o seu desenvolvimento social, integração e qualidade de vida em geral [3].

Desta maneira, é de extrema importância que sejam desenvolvidas intervenções capazes de prever e prevenir a ocorrência de crises epiléticas. Novas abordagens terapêuticas como a infusão local de drogas antiepiléticas e a estimulação elétrica direta do cérebro, por exemplo, exigem a compreensão dos mecanismos de geração das crises (epileptogênese), a identificação do local no

cérebro onde os estímulos devem ser aplicados e a determinação de que tipo de estimulação seria mais eficaz a fim de modular ou inibir a função neuronal anormal.

Com base nas considerações apresentadas, encontra-se em andamento um projeto de pesquisa (“Desenvolvimento de biosensores para o estudo de mecanismos de epileptogênese: abordando problemas negligenciados em epilepsia”. Edital MCT/CNPq nº 01/2011 - Plano de Ação Brasil-Suíça) realizado em acordo de cooperação bilateral entre a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e a École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). O objetivo principal do projeto é desenvolver e testar sensores customizados para a investigação *in vitro* da epilepsia em fatias cerebrais humanas. Mais especificamente, os biosensores empregados correspondem a arranjos de microeletrodos (MEAs, do termo em inglês *microelectrode arrays*). A proposta da pesquisa baseia-se na aplicação desses biosensores para a detecção de alterações eletroquímicas relacionadas aos diferentes estados elétricos do tecido epilético, a fim de elucidar aspectos-chave relacionados à epileptogênese.

Este trabalho, portanto, insere-se no âmbito da referida pesquisa e corresponde à etapa de implementação e validação da tecnologia proposta no Laboratório de Neurociências da PUCRS. O uso de um sistema de eletrodos microfabricados na investigação em neuroeletrofisiologia possibilita o registro e a estimulação de células neurais em diversos pontos de maneira extracelular, simultânea e de longa duração sob condições *in vitro*, representando assim uma abordagem inovadora na pesquisa básica e aplicada em neurociências.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é implementar um sistema de eletrodos microfabricados para registro e estimulação neural extracelular *in vitro*.

2.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar arranjos de microeletrodos (MEAs) quanto a sua estrutura física, composição química e nível de ruído eletrônico.
- Desenvolver e testar uma interface eletrônica entre um dispositivo MEA e um sistema de aquisição de dados convencional com oito canais.
- Instalar e utilizar um sistema comercial para estimulação e registro de preparações biológicas com arranjos de microeletrodos.
- Adaptar um sistema de perfusão por bomba peristáltica ao sistema de eletrodos microfabricados.
- Definir procedimentos experimentais para o uso dos MEAs no Laboratório de Neurociências.
- Testar o sistema através de experimentação eletrofisiológica com cultura celular.
- Testar o sistema através de experimentação eletrofisiológica com fatia de cérebro de roedor.
- Analisar e validar os registros eletrofisiológicos adquiridos com o sistema de eletrodos microfabricados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo introduz os conceitos necessários ao entendimento dos mecanismos biológicos responsáveis pela geração e transmissão de sinais elétricos no sistema nervoso central, bem como os princípios básicos de modulação desses sinais através dos fenômenos de integração e plasticidade sinápticas. A estrutura cerebral de humanos e roedores é apresentada de maneira geral e comparada, com ênfase às regiões do córtex cerebral e da formação hipocampal. Os principais métodos utilizados para a obtenção de registros eletrofisiológicos *in vitro* são descritos, seguidos pela definição dos princípios de funcionamento dos arranjos de microeletrodos (MEAs), seu desenvolvimento tecnológico e suas possíveis aplicações.

3.1. Excitação e condução nervosa

As principais células eletrogênicas encontradas em mamíferos estão no sistema nervoso central, composto pelo encéfalo e medula espinhal; os demais tecidos nervosos são considerados componentes do sistema nervoso periférico. À semelhança de células nervosas, também células cardíacas, musculares e da retina apresentam comportamento bioeletrogênico [5].

Os diferentes tipos celulares que compõem o sistema nervoso podem ser classificados de maneira geral em dois grupos: neurônios e células gliais. Estima-se que tanto as células neuronais quanto as não-neuronais estejam presentes no encéfalo humano nas mesmas proporções, totalizando cerca de 86 e 85 bilhões de células de cada grupo, respectivamente [6]. Os neurônios são responsáveis principalmente pela recepção e transmissão de estímulos entre o exterior e o interior do corpo, enquanto as células gliais contribuem para a atividade encefálica por isolar, sustentar e nutrir os neurônios vizinhos [7]. A Figura 3.1 representa de

maneira simplificada a estrutura de um neurônio típico e sua interação com um neurônio vizinho.

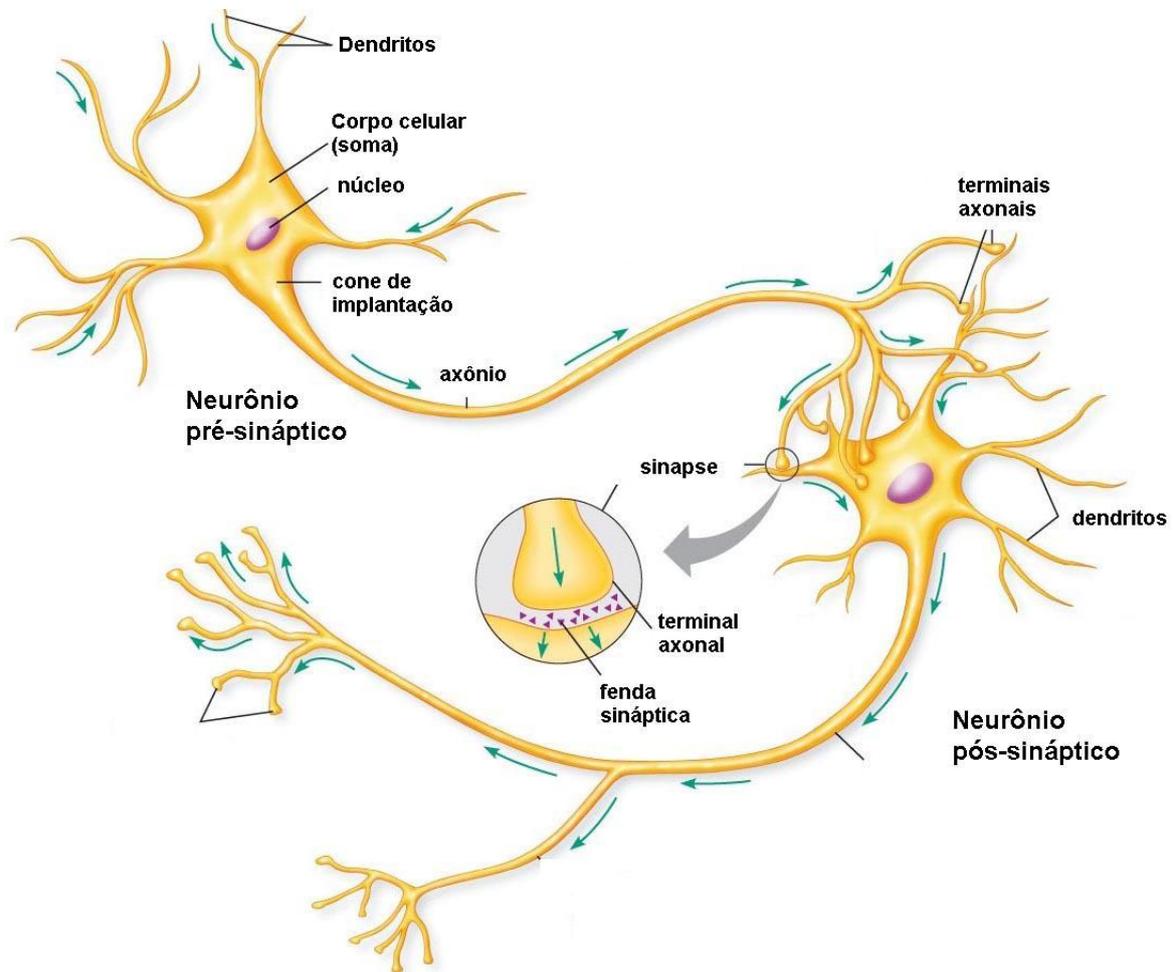


Figura 3.1. Representação esquemática da estrutura de um neurônio típico e sua interação com um neurônio vizinho na forma de sinapses. As setas indicam a direção de propagação do sinal [8].

Um neurônio típico pode ser dividido em três regiões principais: corpo celular (ou soma), dendritos e axônio. Nos neurônios mielinizados, o axônio é envolto de maneira descontínua pela bainha de mielina, formada por camadas sobrepostas de membranas de células gliais. Os espaços nos quais a bainha de mielina é interrompida, deixando pequenas regiões da membrana axonal expostas, são chamados de “nódulos de Ranvier”.

A estrutura da célula neuronal está fortemente relacionada à sua função. O corpo celular, região central da célula, detém as organelas (núcleo, mitocôndrias, ribossomos, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático liso e retículo endoplasmático rugoso), o citosol (fluido aquoso coloidal rico em potássio) e o citoesqueleto (formado por microtúbulos, microfilamentos e neurofilamentos,

responsáveis pela forma característica do neurônio). Os dendritos são prolongamentos do soma e formam um conjunto (árvore dendrítica) especializado na recepção de informação, uma vez que a membrana dendrítica é recoberta por proteínas responsáveis pela detecção de neurotransmissores na fenda sináptica (região que separa as membranas pré- e pós-sinápticas e apresenta largura variável entre 10 e 50 nm) [7].

Os axônios são estruturas altamente especializadas nos processos de transferência de informação ao longo do sistema nervoso. A parte inicial do axônio (conectada ao soma) é o chamado “cone de implantação”, seguido por uma região intermediária (o axônio propriamente dito) e finalmente pelo terminal axonal. Essa extremidade faz a junção especializada (sinapse) do axônio com outros neurônios ou tipos celulares. O lado pré-sináptico é representado pelo terminal axonal, enquanto o lado pós-sináptico pode ser um dendrito ou o soma de outro neurônio, ou qualquer outra célula que faça a ligação sináptica com o neurônio. Mecanismos de transmissão e integração sinápticos serão discutidos em maiores detalhes nos subitens 3.1.2 e 3.1.3 deste trabalho.

Além das estruturas apresentadas anteriormente, destaca-se também a membrana neuronal, que desempenha papel fundamental na geração e transmissão do impulso nervoso.

3.1.1 Propriedades da membrana neuronal

A membrana neuronal recobre todo o neurônio, delimita o citosol dos fluidos externos e é semipermeável à passagem de algumas substâncias, como íons de sódio (Na^+), de potássio (K^+), de cálcio (Ca^{+2}), de cloro (Cl^-), proteínas e glicose, entre outras. As proteínas inseridas na membrana neuronal podem formar dois tipos de estruturas funcionais, que são responsáveis pelo estabelecimento dos gradientes de concentração iônica: os canais iônicos e as bombas iônicas.

Os canais iônicos funcionam como “portões” que se abrem e fecham através da membrana a fim de permitir ou impedir o fluxo de íons a favor do gradiente de concentração, e funcionam de maneira seletiva, ou seja, cada canal é específico (ou permeável) a determinado íon. Por sua vez, as bombas iônicas são mecanismos que gastam energia para transportar íons através da membrana contra o gradiente de concentração [9].

Desta maneira, o movimento de íons através da membrana neuronal pode ocorrer por dois fenômenos distintos: difusão a favor do gradiente de concentração ou diferença de potencial elétrico através da membrana. Define-se “potencial de membrana” (V_m) como sendo a diferença de potencial elétrico entre o interior da célula e o fluido que a cerca, causado pela distribuição desigual de carga elétrica (diferentes concentrações iônicas). As diferentes concentrações de íons ao longo da membrana neuronal garantem as condições necessárias à transmissão do impulso nervoso ou potencial de ação, que representa uma breve inversão do potencial de repouso da membrana [7,10].

3.1.1.1 Potencial de repouso

O potencial de repouso (*resting potential*) representa a situação na qual a membrana celular encontra-se polarizada, ou seja, o citosol em contato com a superfície interna da membrana possui carga elétrica negativa em relação ao exterior celular, considerando-se que a maior parte dos ânions intracelulares são grandes ânions protéicos. Essa situação está esquematizada na Figura 3.2.

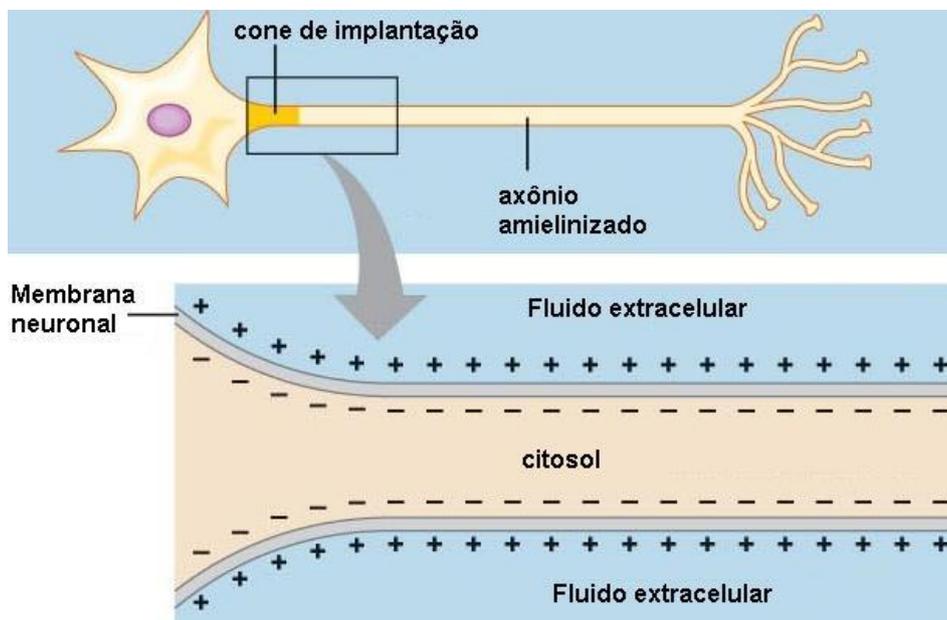


Figura 3.2 Representação esquemática da membrana neuronal durante repouso [8].

Assumindo-se por convenção que o potencial do meio extracelular seja igual a zero, tem-se que valores típicos para o potencial de repouso de neurônios do sistema nervoso central variam entre $V_m = -85 \text{ mV}$ à $V_m = -50 \text{ mV}$ aproximadamente,

dependendo do tipo celular [11]. Nessa situação, o íon K^+ apresenta maior concentração no meio intracelular, enquanto os íons Na^+ e Ca^{+2} apresentam maiores concentrações no meio extracelular. A fim de manter o potencial de repouso, a atividade da bomba de sódio e potássio produz e mantém um alto gradiente de concentração de potássio através da membrana. Uma vez que a membrana neuronal em repouso é altamente permeável ao íon K^+ devido à existência de canais de potássio, o movimento do íon através da membrana a favor do gradiente de concentração deixa o interior do neurônio carregado negativamente [7].

3.1.1.2 Potencial de ação

O potencial de ação (*action potential*) da membrana neuronal é a situação na qual ocorre uma rápida inversão do potencial de repouso, de modo que a região da membrana em contato com o interior celular torna-se carregada positivamente em relação ao exterior. Essa condição, caracterizada pela despolarização da membrana, acontece devido à abertura de canais de sódio, o que permite o influxo de íons Na^+ e, por conseguinte, torna a membrana menos negativa. A repolarização, por sua vez, é causada pelo efluxo de íons K^+ da célula.

O fluxo iônico através da membrana axonal de um neurônio não-mielinizado está representado esquematicamente na Figura 3.3. Inicialmente em repouso (conforme demonstrado anteriormente na Figura 3.2), a membrana **(a)** recebe um estímulo na região A do axônio, causando o influxo de Na^+ e tornando o interior celular localmente positivo. Assim, ocorre uma redução no potencial de membrana na região próxima ao local estimulado (região B), provocando o efluxo de íons K^+ . **(b)** Quando a diferença de potencial atingir determinado limiar, a região B da membrana se tornará permeável ao sódio e estimulará a região adjacente (região C). Após a propagação do estímulo, a região A da membrana entrará em estado refratário, ou seja, terá sua excitabilidade reduzida até alcançar novamente a repolarização. **(c)** o processo se repetirá sucessivamente, até que a onda de despolarização percorra toda a membrana [12]. Desta forma, em neurônios amielinizados, a propagação do potencial de ação ocorre por condução eletrotônica, ou seja, por difusão passiva de alterações no potencial da membrana neuronal.

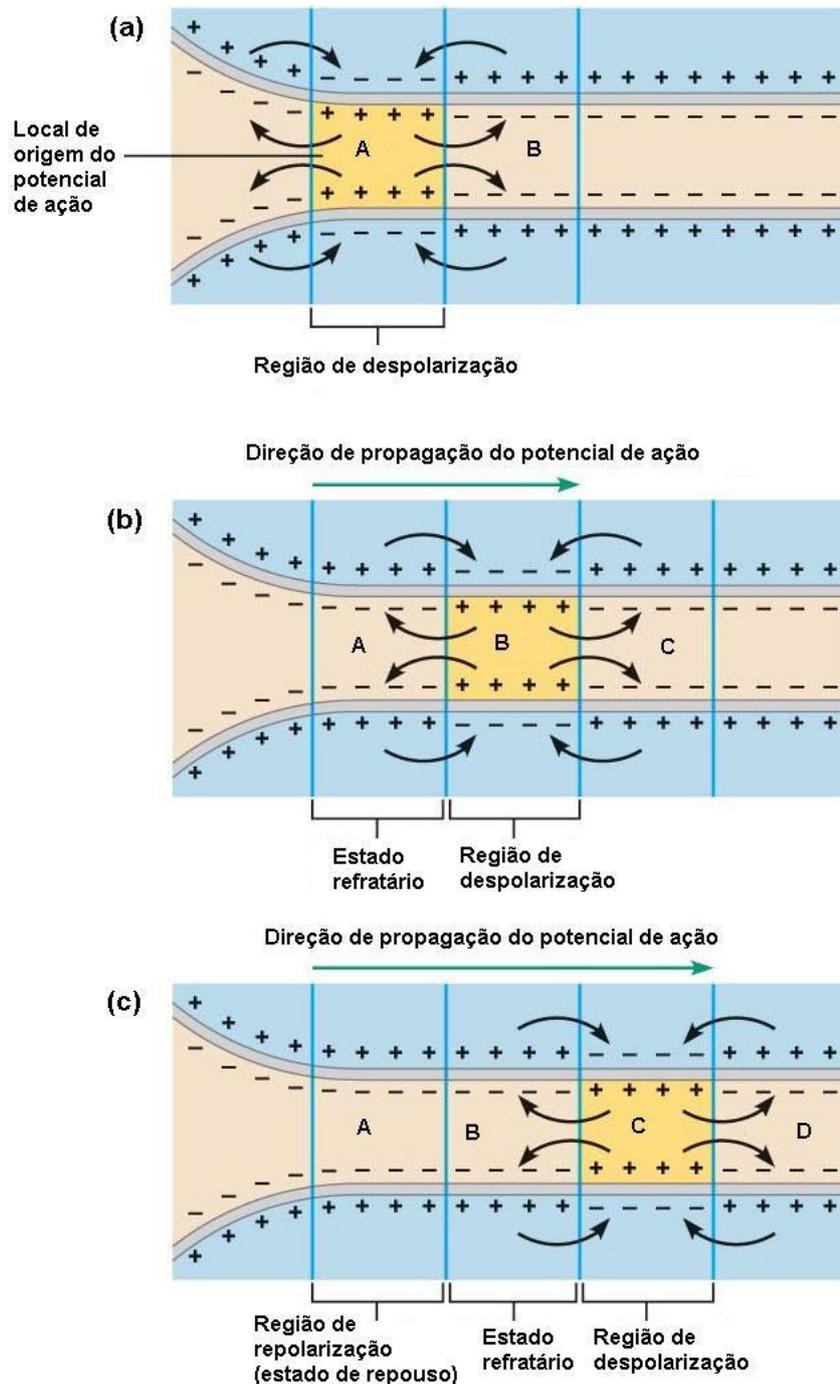


Figura 3.3. Representação da geração e da propagação de um potencial de ação ao longo da membrana axonal de um neurônio não-mielinizado. As setas indicam o fluxo iônico. Em (a) a membrana recebe um estímulo; em (b) e (c) ocorre a propagação do potencial de ação [8].

O período necessário para a membrana restaurar seu potencial de repouso é chamado de período refratário, e está relacionado às permeabilidades relativas dos íons. Durante o “período refratário absoluto”, mesmo que a membrana receba o estímulo necessário, será impossível a geração de um novo potencial de ação. Caso a célula esteja sujeita a um “período refratário relativo”, o potencial de ação ocorrerá novamente apenas mediante um estímulo muito intenso [13].

A condução eletrotônica não ocorre em neurônios mielinizados, pois o isolamento elétrico da membrana axonal causado pelo envoltório de mielina faz com que a condução nervosa ocorra de maneira saltatória através da despolarização dos nódulos de Ranvier, conforme representado na Figura 3.4.

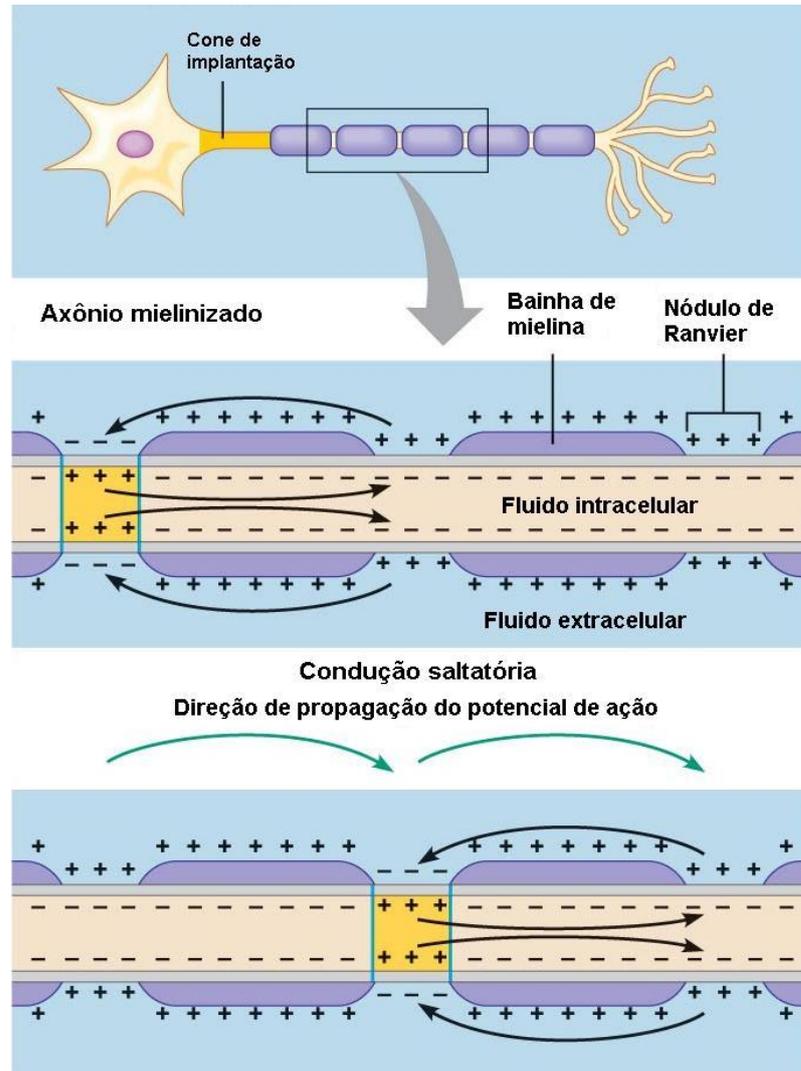


Figura 3.4 Representação da condução saltatória do potencial de ação em um neurônio envolto por bainha de mielina [8].

O fenômeno de condução saltatória ocorre porque a mielina fornece alta resistência ao fluxo iônico através da membrana, permitindo assim a passagem de íons apenas nas regiões onde não há o envoltório, ou seja, apenas nos nódulos de Ranvier. Além disso, na região dos nódulos existe uma grande concentração de canais de sódio e de potássio dependentes de voltagem, fazendo com que as correntes iônicas causadas localmente sejam fortes o suficiente para gerar o

potencial de ação. A condução saltatória representa uma vantagem, pois garante a elevação da velocidade de condução do impulso nervoso:

Nas fibras nervosas mielinizadas, a excitação salta de nóculo, razão pela qual a condução da excitação aí é denominada *saltatória*. Como o tempo de condução consumido entre os nódulos é quase nulo, a velocidade de condução no seu total é sensivelmente maior do que nas fibras amielínicas de mesma espessura. Nos vertebrados, todas as fibras que conduzem com uma velocidade superior a 3 m/s são fibras mielínicas [14].

Cabe ainda destacar que, apesar de o impulso nervoso representar a transmissão de um sinal elétrico, as propriedades elétricas dos neurônios são essencialmente distintas daquelas verificadas em um condutor metálico. Nos neurônios, a condução nervosa ocorre de maneira “muito mais lenta, regular e sem mudanças de intensidade” [15], diferindo assim fundamentalmente do fluxo de elétrons nos condutores metálicos [16]. O comportamento elétrico da membrana axonal durante a geração de um potencial de ação pode ser representado em um gráfico do potencial de membrana em função do tempo, conforme demonstrado na Figura 3.5.

O gráfico **A** representa a resposta neuronal de acordo com o modelo teórico. O potencial de repouso considerado nessa situação é de $V_m = -70$ mV. O limiar indicado nos gráficos representa o potencial no qual se inicia a rápida entrada de Na^+ na célula (potencial limiar ou limiar de excitação celular). Assim, a fase ascendente corresponde à rápida despolarização da membrana, causada pela entrada de íons Na^+ através de canais de sódio dependentes de voltagem. O termo *overshoot* indica situação na qual o potencial de membrana é positivo, e o valor máximo (pico) atinge cerca de $V_m = 40$ mV. A fase descendente é causada pela inativação dos canais de sódio e a saída de íons K^+ através de canais de potássio dependentes de voltagem, e representa uma rápida repolarização da membrana, atingindo um potencial (aproximadamente $V_m = -80$ mV) mais negativo do que o potencial de repouso. A fase de hiperpolarização representa a restauração gradual do potencial de repouso [7, 17].

O gráfico **B** mostra de que modo a membrana do axônio reage à aplicação de um estímulo elétrico, conforme medidas do potencial de membrana obtidas intracelularmente (maiores considerações sobre registros intracelulares estão detalhadas no item 3.3.1 deste trabalho). Nesse caso, o potencial de repouso da célula considerada é de $V_m = -75$ mV e o pulso de estimulação aplicado (não

representado no gráfico) teve duração constante. A aplicação de um estímulo supralimiar deflagrou na célula a resposta ativa. Uma vez que o estímulo foi capaz de elevar rapidamente o potencial de membrana acima do repouso, houve uma queda acentuada da resistência da membrana. Nesse momento, ocorreu um grande influxo de íons de sódio, o que tornou o meio intracelular positivo e causou a geração do potencial de ação.

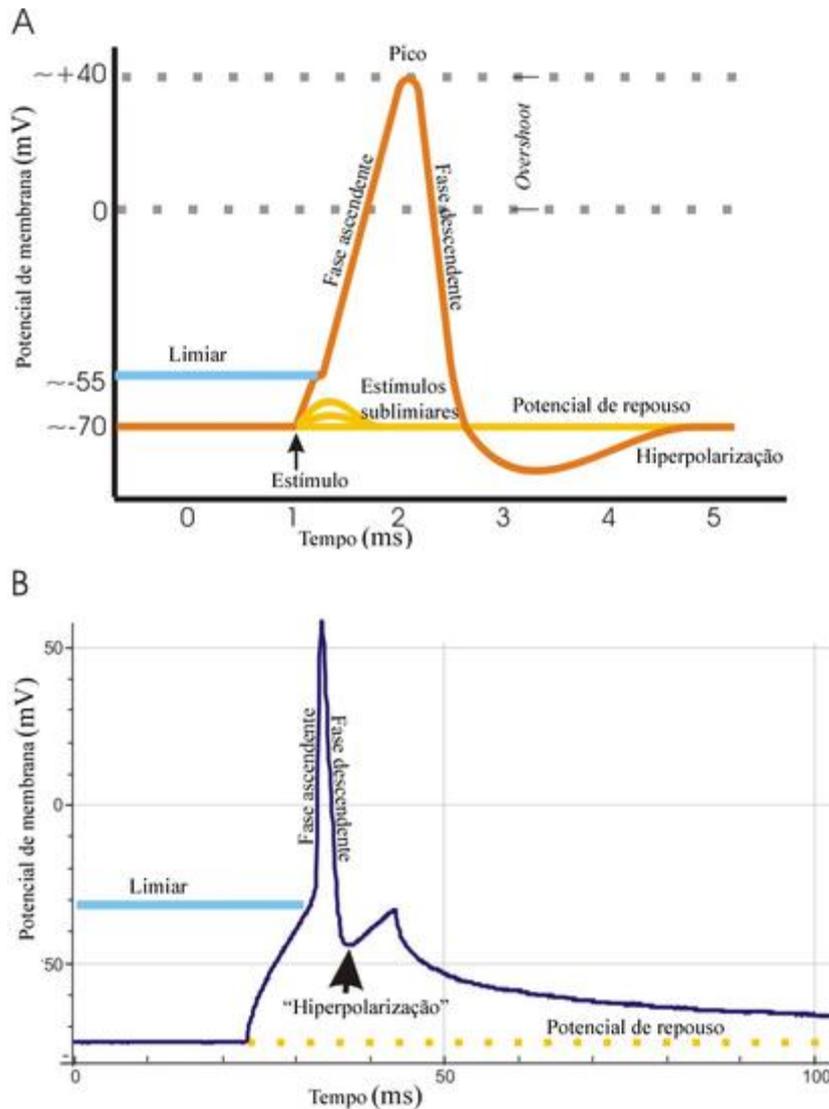


Figura 3.5. Gráficos do potencial de membrana em função do tempo, mostrando as fases de um potencial de ação: (a) potencial de ação conforme previsão teórica; (b) potencial de ação conforme medido experimentalmente (registro intracelular) [18].

Uma vez que a geração de um potencial de ação ocorrerá somente quando a despolarização alcançar ou superar determinado nível crítico, esse nível é denominado “potencial limiar excitatório” ou “limiar de despolarização” [15]. Tal processo é conhecido como “efeito tudo-ou-nada” (*all-or-none response*), pois a

aplicação de uma despolarização crescente a um neurônio não causará a transmissão de um impulso nervoso a menos que seja atingido o limiar. O termo “estimulação” se refere a essa despolarização da membrana até o limiar. É importante esclarecer que:

Para as células do organismo, o estímulo para o desencadeamento de um potencial de ação é, em regra, uma corrente elétrica, que despolariza a célula. Na maioria das vezes, essa corrente não é gerada no ponto da membrana a ser excitada, sendo “trazida de fora”. Nas células nervosas, a corrente chega das vizinhanças da membrana, de sinapses ou de receptores. Na experimentação neurofisiológica, a corrente de estímulo é geralmente aplicada através de eletrodos, pois assim será fácil controlar sua grandeza e duração [14].

Em situações nas quais o neurônio sofre despolarização contínua acima do nível do limiar de despolarização, são gerados sucessivos potenciais de ação. A intensidade do estímulo despolarizante determina a taxa de geração (“frequência de disparo”) dos potenciais de ação. Além da despolarização causada pelos diferentes mecanismos biológicos de entrada de íons na célula, um neurônio também pode ser despolarizado ao receber aplicação de corrente elétrica, observando-se que a intensidade da corrente elétrica aplicada seja o suficiente para atingir o potencial limiar excitatório [17].

Finalmente, a informação transmitida pelo impulso nervoso é codificada no sistema nervoso através da frequência de disparo e do padrão dos impulsos elétricos transmitidos, além da distribuição e do número de neurônios disparando potenciais de ação em determinada região cerebral [7].

3.1.1.3 Modelo dinâmico de Hodgkin-Huxley (HH)

O primeiro modelo físico-matemático a explicar a dinâmica de condução nervosa fundamentado nos mecanismos de base iônica foi o modelo proposto em 1952 por Alan L. Hodgkin e Andrew F. Huxley. Os pesquisadores ganharam o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina no ano de 1963 por esse trabalho [19], que serve de base até hoje para muitos outros modelos de predição da excitação e condução nervosa [16].

Os experimentos que conduziram à construção do modelo HH foram realizados conforme um método experimental desenvolvido no final da década de 1940 por Hodgkin, Huxley e colaboradores. Chamada de *voltage clamp* [14]

(“fixação”, “clampeamento” ou “bloqueio” de tensão), tal técnica foi criada com o propósito de analisar o comportamento da membrana neuronal quando o potencial de membrana fosse mantido constante. Para tanto, experimentos foram realizados inserindo-se dois eletrodos metálicos em um axônio gigante de lula (*Loligo forbesi*), um para a corrente e outro para a tensão, e um eletrodo adicional no meio extracelular como referência. A estimulação foi feita utilizando-se um amplificador com sistema de *feedback* que permitia aplicar a corrente necessária para que a tensão fosse mantida constante em um valor pré-determinado [19].

O fato de o citoplasma axonal ter sido removido da preparação e substituído por eletrólitos permitiu aos pesquisadores inferirem que todos os fenômenos críticos envolvidos no processo de condução nervosa ocorrem na membrana [20]. Assim, Hodgkin e Huxley definiram que o comportamento elétrico da membrana poderia ser descrito por um circuito equivalente conforme representado na Figura 3.6.

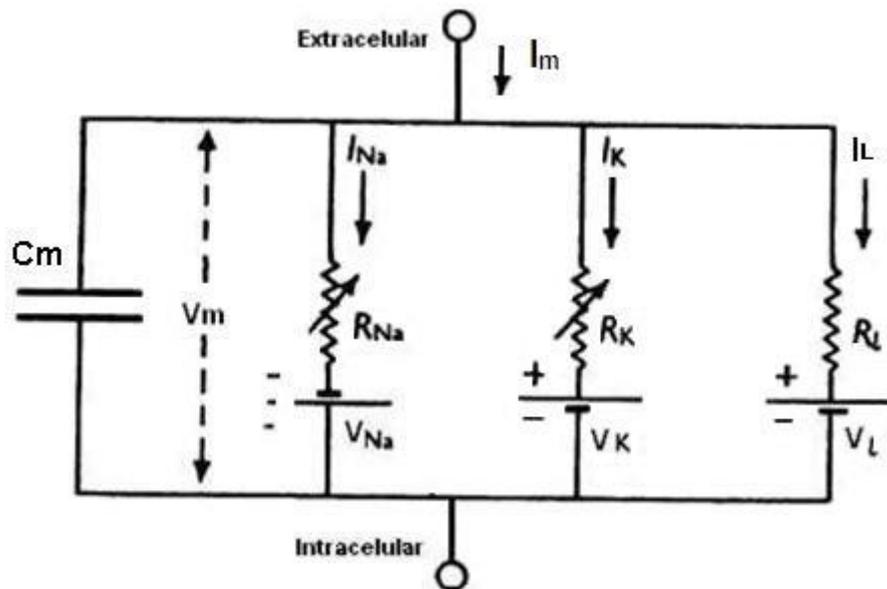


Figura 3.6 Circuito equivalente para o modelo HH, onde I_m é a corrente de membrana; I_L é a corrente de fuga; C_m é a capacitância de membrana; V_m é o potencial de membrana; V_{Na} , V_K e V_L são respectivamente os potenciais de equilíbrio para íons de sódio, de potássio e para outros íons não determinados; e R_{Na} , R_K e R_L são as resistências associadas aos fluxos iônicos [19].

Nessa descrição, os pesquisadores consideraram que a membrana axonal apresentava a propriedade de armazenar cargas como se fosse um capacitor, e também era capaz de resistir ao fluxo de cargas, como um resistor. Portanto, o fluxo de corrente na membrana seria possível quando o capacitor de membrana estivesse carregado ou quando houvesse movimento de íons através das baterias em paralelo

com o capacitor. Ou seja, as diferenças de concentrações dos íons atuavam como baterias com forças eletromotrizes cujos valores seriam correspondentes aos potenciais de equilíbrio iônico calculados teoricamente [21].

No modelo HH, a corrente iônica total I_m é a soma das correntes iônicas resultantes do movimento de íons de sódio (I_{Na}) e de potássio (I_K), e ainda por uma corrente de fuga (*leakage current* - I_L) causada por cloretos e outros íons permeáveis à membrana. A corrente de fuga se apresenta como uma complicada combinação de correntes, cujos detalhes ainda não são totalmente compreendidos [20]. O potenciais de equilíbrio para íons de sódio, de potássio e para outros íons não previamente determinados são representados respectivamente por V_{Na} , V_K e V_L . As resistências associadas aos fluxos desses íons através da membrana são R_{Na} , R_K e R_L .

Propondo que o potencial de ação do axônio seria formado por uma corrente de entrada de sódio e uma corrente de saída de potássio, Hodgkin e Huxley determinaram experimentalmente as curvas de condutância da membrana a esses íons. A condutância iônica representa uma grandeza inversa à resistência iônica e está “intimamente relacionada, embora não seja idêntica, à permeabilidade da membrana” [17].

A análise dos dados obtidos permitiu a conclusão de que, variando-se a concentração iônica no meio extracelular, era possível separar a corrente iônica fluindo através da membrana nas suas componentes causadas pelo fluxo de íons, e a partir de então determinar como a permeabilidade iônica variava de acordo com o tempo e com o potencial de membrana. Conseqüentemente, definiram que a corrente iônica causada pelo fluxo de determinado íon era igual à condutância para este íon multiplicada pela diferença entre o potencial de membrana e o potencial de equilíbrio iônico. Além disso, as condutividades da membrana para esses íons foram descritas por um conjunto de equações diferenciais não-lineares capazes de prever com grande aproximação os valores medidos nos axônios gigantes de lula.

Apesar de esta técnica não reproduzir uma condição fisiológica, pois mantém artificialmente o potencial da célula constante após o potencial de ação ter sido desencadeado [14], seu desenvolvimento possibilitou um enorme avanço no entendimento dos processos de condução nervosa por permitir o controle do parâmetro responsável pela abertura e fechamento dos canais iônicos. Além disso, a fixação da tensão aplicada permitiu eliminar brevemente a corrente capacitiva

gerada na membrana, o que possibilitou o estudo da corrente causada apenas pela movimentação de íons. Por conseguinte, Hodgkin e Huxley comprovaram que o fluxo de corrente iônica através da membrana, quando esta se encontrava despolarizada, era determinado por três diferentes processos sensíveis à tensão [17]: (1) ativação da condutância de Na^+ , (2) ativação da condutância de K^+ e (3) inativação da condutância de Na^+ . Contudo, o modelo HH não explica porque a permeabilidade da membrana se altera conforme muda a tensão aplicada, apenas relaciona o formato e a velocidade de condução do impulso nervoso às mudanças observadas na permeabilidade da membrana [20].

Cabe ainda ressaltar que o modelo dinâmico de condução nervosa proposto por Hodgkin e Huxley estabeleceu as bases para o surgimento do conceito de canal iônico, até então inexistente, por constatar que as condutâncias associadas aos íons sódio e potássio eram variáveis e altamente dependentes da tensão aplicada através da membrana neuronal. Entretanto, evidências diretas da existência de canais iônicos só foram obtidas anos mais tarde a partir da realização de experimentos baseados em uma técnica desenvolvida na década de 1970 por Erwin Neher e Bert Sakmann. Chamada de *patch clamp* (“fixação de membrana”) e baseada nos princípios do método de *voltage clamp* (embora utilizando uma configuração experimental completamente diferente) [22], essa nova técnica permitiu pela primeira vez o registro da corrente de membrana que fluía por um único canal iônico. Pelas descobertas acerca do funcionamento de canais iônicos individuais, Neher e Sakmann foram contemplados com o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1991.

3.1.2 Integração sináptica

A sinapse representa a interface anatômica e funcional entre células nervosas individuais. A transmissão sináptica consiste na transferência de informação através de uma sinapse, e pode ocorrer por processos elétricos ou químicos. As sinapses elétricas, entretanto, são fenômenos menos freqüentes que consistem na passagem direta da excitação conduzida (corrente iônica) por um neurônio através do firme contato de seu terminal axonal (junção *gap*) com a célula vizinha [14]. Tal fluxo iônico pode ser bidirecional, ou seja, passa igualmente entre duas células em ambas as direções. As junções *gap* ocorrem através de canais (*connexons*) formados por

aglomerados de proteínas (*conexins*). Na junção *gap*, as células estão separadas por uma distância de aproximadamente 3 nm, enquanto a abertura do *connexon* é de cerca de 1 a 2 nm [7]. As sinapses químicas, por sua vez, constituem quase a totalidade das sinapses realizadas e ocorrem da seguinte maneira:

(...) quando um impulso nervoso chega ao terminal axonal pré-sináptico, são liberadas moléculas de neurotransmissores das vesículas sinápticas na fenda sináptica. Os neurotransmissores então se ligam a proteínas receptoras específicas, desencadeando a geração de sinais elétricos ou químicos na célula pós-sináptica [7].

Nessa situação, as células estão afastadas cerca de 20 a 50 nm uma da outra (fenda sináptica), e o espaço entre elas é preenchido por um arranjo de proteínas extracelulares (diferenciações de membrana) responsáveis por manter as células unidas. No terminal axonal pré-sináptico se encontram as vesículas sinápticas, esferas de aproximadamente 50 nm de diâmetro repletas de neurotransmissores (compostos baseados em aminoácidos, aminas ou peptídeos). As proteínas específicas receptoras de neurotransmissores estão localizadas na membrana da célula pós-sináptica e podem assumir duas diferentes configurações: canais iônicos controlados por transmissores (*transmitter-gated ion channels*) ou receptores acoplados às proteínas-G (*G-protein-coupled receptors*). Essas estruturas são responsáveis por converter o sinal químico intercelular em um sinal intracelular (mudanças no potencial de membrana ou alterações químicas) [7].

Todos os sinais elétricos e químicos que entram em uma única célula são computados conjuntamente por ela de modo a gerar um sinal de saída (potencial pós-sináptico), capaz de resultar ou não na deflagração de um potencial de ação. Esse processo constitui a chamada “integração sináptica”. A ocorrência de dezenas ou até milhares de sinapses simultaneamente pode levar à transmissão da excitação ou contrariar o aparecimento de uma excitação propagada em um neurônio [14], conforme detalhado a seguir.

3.1.2.1 Potencial pós-sináptico excitatório (EPSP)

Quando o resultado da integração sináptica é a geração de um potencial despolarizante transiente (ou seja, capaz de causar a abertura de canais iônicos controlados por transmissores permeáveis a íons Na^+), tal potencial configura um “potencial pós-sináptico excitatório” (EPSP – *excitatory postsynaptic potential*). Deve-

se considerar, entretanto, que potenciais de ação transmitidos são desencadeados quando os EPSPs se situam acima do limiar excitatório [7]. A ativação sináptica por neurotransmissores como acetilcolina e glutamato, por exemplo, são capazes de gerar EPSPs.

A geração de diversos potenciais pós-sinápticos excitatórios simultâneos tem efeito somatório sobre o neurônio, produzindo uma intensa despolarização deste. A soma de EPSPs pode ocorrer espacialmente (quando sinais pré-sinápticos ocorrem ao mesmo tempo) ou temporalmente (ocorrência sucessiva dentro em intervalos de 1 a 15 milissegundos).

3.1.2.2 Potencial pós-sináptico inibitório (IPSP)

Quando o resultado da integração sináptica é a geração de um potencial hiperpolarizante transiente (ou seja, capaz de causar a abertura de canais iônicos controlados por transmissores permeáveis a íons Cl^-), tal potencial configura um “potencial pós-sináptico inibitório” (IPSP – *inhibitory postsynaptic potential*). O efeito causado por esse fenômeno é o afastamento do potencial de membrana do limiar necessário à excitação, ou seja, o neurônio pós-sináptico se torna menos suscetível a propagação de um potencial de ação. A ativação sináptica pelos neurotransmissores glicina e GABA (ácido gama-aminobutírico) são capazes de gerar IPSPs [7]. No caso de inibição de sinapses químicas, além da inibição pós-sináptica (em que a excitabilidade da membrana do soma e dos dendritos do neurônio é diminuída), pode ocorrer também o fenômeno de inibição pré-sináptica, no qual a liberação de neurotransmissores excitatórios na terminação pré-sináptica é reduzida ou até mesmo completamente inibida [14].

O gráfico apresentado na Figura 3.7 exhibe as variações no potencial de membrana de um neurônio em função do tempo quando há a integração de EPSPs e IPSPs. A combinação dos EPSPs mostrados ocorreu através da soma espacial destes. O potencial de repouso do neurônio considerado é de $V_m = -70 \text{ mV}$ e o limiar excitatório é de $V_m = -55 \text{ mV}$. O registro foi obtido de maneira intracelular.

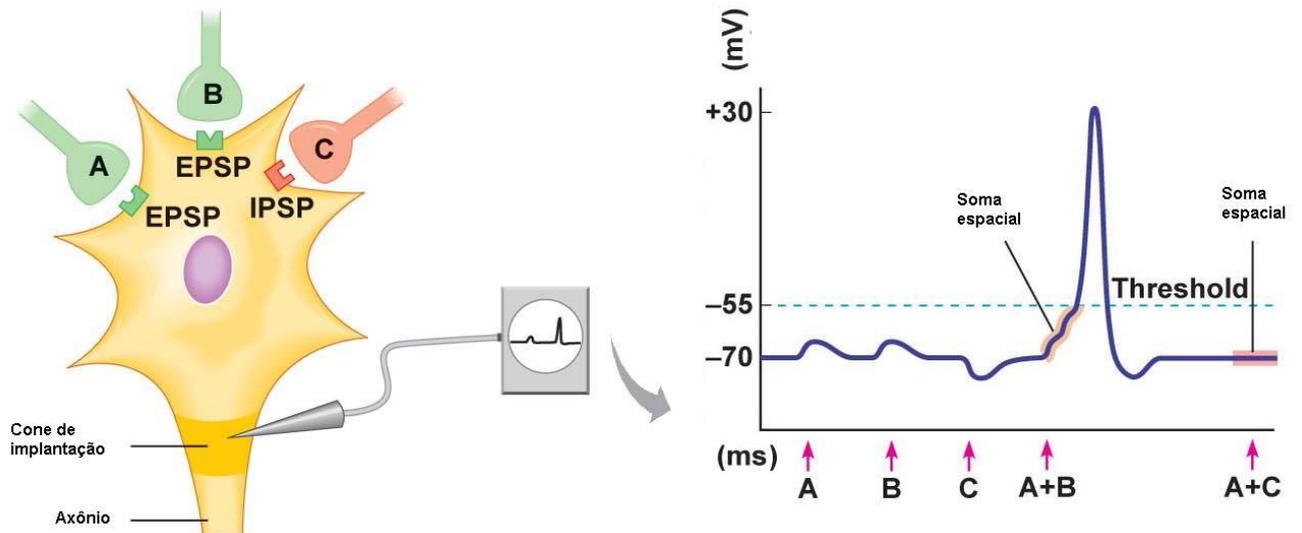


Figura 3.7 Representação de registro intracelular de mecanismo de integração sináptica, gerado pela combinação de potenciais pós-sinápticos excitatórios (EPSPs) e potencial pós-sináptico inibitório (IPSP). O gráfico apresenta o potencial de membrana (mV) em função do tempo (ms) [8].

A integração de potenciais pós-sinápticos não apenas é capaz de desencadear potenciais de ação, mas também afeta a frequência de disparo de potenciais de ação (*spike frequency*) quando o resultado da soma supera o limiar excitatório. A relação entre a intensidade de estímulos supralimiais e a frequência de potenciais de ação constitui uma área de pesquisa muito investigada em neurociências denominada “codificação neural frequencial” (*frequency coding*) [23].

3.1.3 Plasticidade sináptica

O fenômeno descrito como “plasticidade sináptica” diz respeito a alterações na eficácia da transmissão sináptica (capacidade de um neurônio de fortalecer ou enfraquecer suas sinapses ao longo do tempo) em resposta a aumentos ou diminuições em sua atividade [10]. Essas alterações têm sido intensamente investigadas na busca do entendimento do importante papel que desempenham em aprendizagem, formação da memória, mecanismos de adaptação comportamental, desenvolvimento neuronal e em estados patológicos da excitabilidade neuronal no sistema nervoso central, considerando-se a modulação da atividade de redes neurais em grande escala [24, 25].

Conforme as atividades sinápticas de um neurônio se tornam repetitivas, tal repetição pode causar alterações na sua eficiência sináptica não apenas a curto prazo (milissegundos ou segundos), mas também a longo prazo, por períodos de horas a semanas. As alterações a curto prazo, quando resultam no aumento de potenciais pós-sinápticos, são chamadas de “facilitação sináptica”; caso ocorra a diminuição dos potenciais, denominam-se “depressão sináptica” [10].

Diversos mecanismos estão envolvidos na geração da plasticidade sináptica a longo prazo, os quais envolvem modificações de um ou ambos os terminais pré- e pós-sinápticos. A plasticidade pré-sináptica está relacionada ao aumento ou a diminuição da secreção de neurotransmissores na fenda sináptica, enquanto a plasticidade pós-sináptica geralmente envolve a mudança no número ou nas propriedades de receptores pós-sinápticos [26].

Diferentes regiões corticais (como, por exemplo, o hipocampo e o córtex visual) demonstram formas diferenciadas de plasticidade sináptica. Todavia, ainda que a mesma região cortical seja considerada, é possível que diferentes tipos de células, células dentro de diferentes camadas corticais ou até mesmo sinapses na mesma célula que se liga a diferentes tipos de células apresentem formas variadas de plasticidade sináptica. Em princípio, um modelo biofísico (envolvendo a descrição de processos fisiológicos e bioquímicos) para caracterização da plasticidade sináptica de um determinado sistema deve contabilizar os resultados de protocolos de indução desse sistema único, e pode não ser capaz de explicar os resultados em um sistema diferente.

Os modelos biofísicos clássicos empregados no estudo da plasticidade sináptica são a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD), que representam, respectivamente, o aumento e a diminuição da força sináptica a longo prazo [24]. Esses modelos são normalmente aplicados em experimentos controlados que empregam técnicas convencionais de eletrofisiologia e permitem investigar diferentes estruturas cerebrais, como regiões corticais específicas e formação hipocampal, e cerebelo. Os fenômenos de LTP e LTD serão explicados resumidamente a seguir.

3.1.3.1 Potenciação de longa duração (LTP)

Experimentalmente, a potenciação de longa duração (LTP) é determinada como um aumento na resposta sináptica em consequência à aplicação de estimulação elétrica repetitiva de alta frequência (“pulsos potenciadores”), que sustentam a atividade eletrofisiológica neuronal a um nível acima da linha de base de resposta durante horas ou mais. Os mecanismos envolvidos no aparecimento da LTP estão relacionados principalmente a um aumento na concentração de cálcio na célula pós-sináptica, a qual desencadeia uma série de sistemas mensageiros secundários que necessitam tanto de receptores adicionais na membrana pós-sináptica, quanto aumentam a sensibilidade desses receptores [10]. Mecanismos pré-sinápticos, por sua vez, estão relacionados a interneurônios GABAérgicos (redes de neurônios que secretam o neurotransmissor inibitório GABA) [25].

Embora a LTP ocorra em outras regiões cerebrais, incluindo diversas regiões neocorticais, ela é melhor caracterizada no estudo da circuitaria hipocampal através de experimentos *in vitro* com fatias de hipocampo (ver item 3.2.2 deste trabalho). Os estudos que inicialmente demonstraram a ocorrência de LTP descreviam o comportamento de sinapses da via perforante (neurônios do giro denteado). Contudo, atualmente a principal região hipocampal estimulada para investigação do fenômeno de LTP é aquela das sinapses que ocorrem entre a via colateral de Schaffer e os neurônios piramidais de CA1.

3.1.3.2 Depressão de longa duração (LTD)

Como fenômeno oposto à LTP, a depressão de longa duração (LTD) representa a redução do potencial sináptico por horas ou mais, produzido por ativação sináptica prévia. Os mecanismos envolvidos no aparecimento da LTD se relacionam basicamente a discretos aumentos na concentração de cálcio pós-sináptico, acompanhados de uma redução no número e na sensibilidade de receptores pós-sinápticos [10].

Experimentalmente, a LTD pode ser induzida por estimulação de baixa frequência durante minutos, por estimulação de baixa frequência com aplicação de pulsos pareados, ou por estimulação rápida de alta frequência durante alguns segundos. A LTD foi inicialmente observada na via de colateral de Schaffer no

hipocampo (sinapses entre as células piramidais na região CA3 que enviam axônios para a região CA1); sendo em seguida descrita na região CA3 e no giro denteado, além de em várias regiões corticais e no cerebelo. Acredita-se que o fenômeno da LTD também esteja correlacionado a mecanismos de memória e aprendizagem no cerebelo.

3.2 O cérebro e sua utilização na experimentação em eletrofisiologia

O sistema nervoso central (SNC), formado pelo encéfalo e pela medula espinhal, é responsável por processar as informações coletadas pelos órgãos sensoriais, transmitidas pelos elementos do sistema nervoso periférico (SNP) e gerar respostas adequadas. O encéfalo pode ser dividido em três regiões principais, as quais são comuns a todos os mamíferos, embora apresentem diferentes graus de desenvolvimento: cérebro, cerebelo e tronco encefálico [7].

Além de similaridades anatômicas, fisiológicas e genéticas, também redes neurais semelhantes (especialmente conectividade bilateral em áreas motoras e sensoriais afins) tem sido identificadas entre diferentes espécies, como humanos, primatas e roedores [27, 28]. Em particular, roedores (ratos e camundongos) tem sido especialmente empregados como modelos animais em neurociências [29] dadas as semelhanças estruturais com o cérebro humano, apesar de seus cérebros terem tamanho reduzido e não apresentarem a região do córtex pré-frontal, responsável por funções cognitivas superiores. Contudo, o estudo do cérebro de roedores apresenta facilidades em comparação ao estudo de primatas, por serem animais de baixo custo e de fácil manuseio, possibilitando assim a utilização de dezenas de animais em um mesmo experimento, além de também serem capazes de reportar aos experimentadores determinados tipos de comportamento cognitivo complexo [30].

A Figura 3.8 mostra de forma comparada a anatomia de um encéfalo humano e de um roedor (rato). Um encéfalo humano apresenta, em média, 1300 g de massa, enquanto um encéfalo de rato (*Rattus rattus*) possui 2,6 g e de um camundongo (*Mus musculus*), apenas 0,5 g. Tanto em humanos quanto em roedores, o cérebro representa a maior porção do encéfalo.

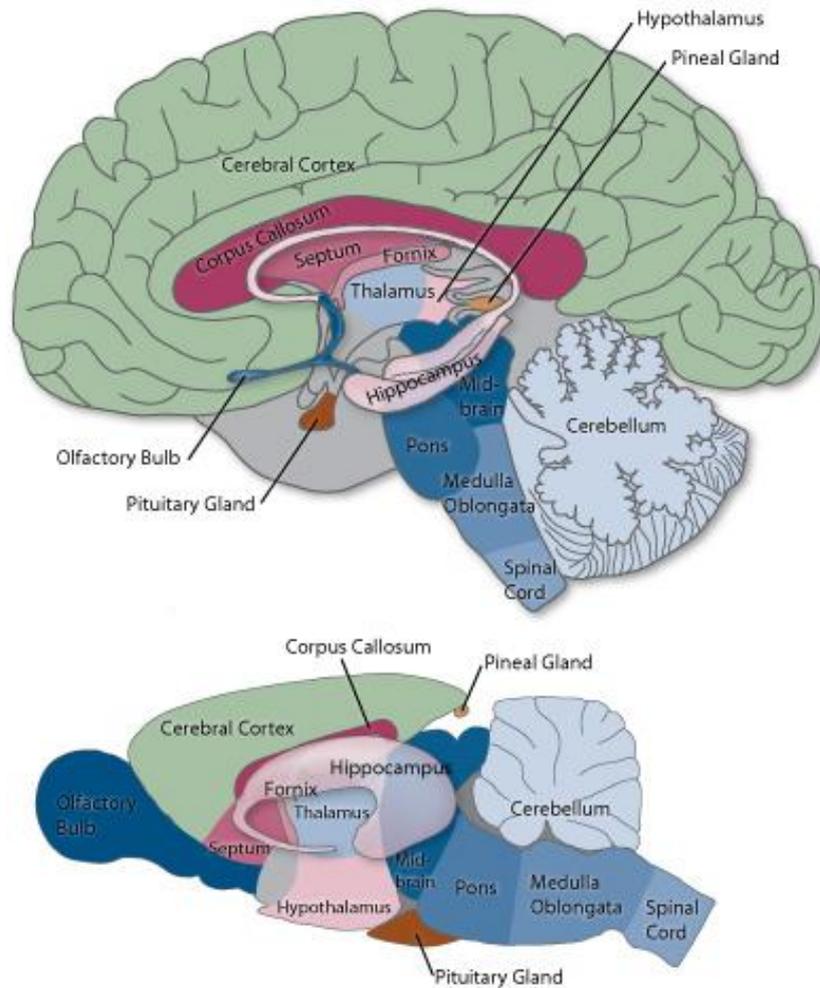


Figura 3.8 Anatomia comparada em secção sagital de encéfalo humano (superior) e encéfalo de rato (inferior). Estruturas equivalentes estão representadas pelas mesmas cores [31].

O cérebro humano pode ser genericamente descrito como constituído por dois hemisférios (direito e esquerdo), os quais são divididos por convenção em quatro regiões topográficas (lobos): frontal, parietal, temporal e occipital. A camada mais externa do cérebro constitui o córtex cerebral (região representada em verde na Figura 3.8), também chamado de “substância cinzenta” por ser constituído basicamente por corpos celulares e capilares sanguíneos. A “substância branca”, por sua vez, está localizada abaixo da substância cinzenta e é formada basicamente por axónios neuronais mielinizados e células da glia. Estruturas subcorticais são divididas em gânglios basais, sistema límbico (hipotálamo, amígdala, hipocampo, núcleos septais, giro do cíngulo), tálamo e hipotálamo.

O córtex é a região cerebral onde se processam as funções cognitivas superiores (pensamento, percepção, linguagem visual e verbal, atenção e memória),

além de ser o local de chegada de todas as vias sensitivas, que ali se tornam conscientes e são interpretadas. A principal diferença entre o córtex humano e de outros mamíferos é a presença de convoluções na sua superfície, de modo a formar sulcos e giros. Essas convoluções aumentam enormemente a área superficial cerebral humana. Com base em diferenças estruturais, o córtex cerebral pode ser classificado em duas regiões principais: neocórtex e allocórtex. O neocórtex se forma apenas em mamíferos e está arranjado em seis camadas celulares distintas, conforme será especificado a seguir. O allocórtex, por sua vez, apresenta de 2 a 5 camadas de células e assume diferentes configurações a fim de formar o hipocampo e o córtex olfatório, estruturas presentes também em outros animais.

O uso de fatias cerebrais (*brain slices*) na experimentação em eletrofisiologia tem proporcionado a investigação de diversos aspectos funcionais e de mecanismos responsáveis pela transmissão sináptica no SNC. O uso de preparações cerebrais *in vitro* apresenta diversas vantagens em relação a estudos conduzidos *in vivo* (ver item 3.3 deste trabalho). As regiões cerebrais mais comumente estudadas em experimentos eletrofisiológicos *in vitro* são o neocórtex e a formação hipocampal.

3.2.1 O neocórtex

O neocórtex apresenta citoarquitetura bem definida, dividida em seis camadas distintas, numeradas da superfície externa em direção ao centro medular [37]. Cada camada cortical apresenta uma distribuição característica de tipos de células neuronais e conexões com outras regiões corticais e subcorticais, conforme representado na Figura 3.9. Os números mostrados indicam:

- I. **Camada molecular:** pobre em células e com muitas fibras.
- II. **Camada granular externa:** possui poucas fibras e muitas células. Origem das fibras de associação curta.
- III. **Camada piramidal externa:** origem das fibras de associação longa e das fibras comissurais.
- IV. **Camada granular interna:** apresenta muitas fibras associadas a células.
- V. **Camada piramidal interna:** onde estão presentes as células piramidais gigantes de Betz. As suas fibras se projetam para estruturas subtalâmicas e para o corpo estriado.

- VI. **Camada multiforme ou plexiforme:** é a origem das fibras que se projetam para o corpo estriado e suas receptoras. Apresenta grande variedade de células.

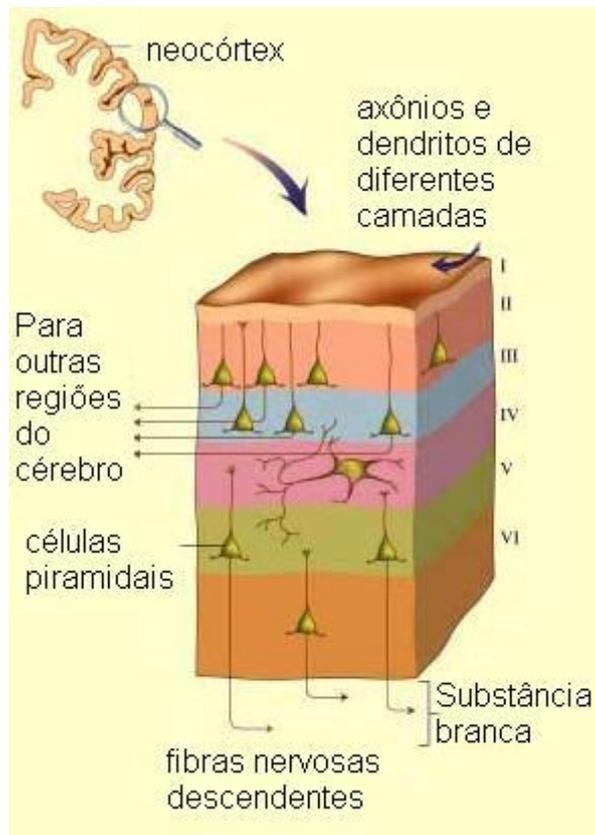


Figura 3.9 Representação das seis camadas do neocórtex cerebral [32].

Diversas pesquisas em neurociências têm sido conduzidas no sentido de mapear a composição celular de cada camada neocortical e investigar as propriedades funcionais (interconectividade das camadas, conectividade dependente de frequência e plasticidade da rede neural) da microcircuitaria dessa região cerebral, com o intuito de compreender o processo pelo qual o cérebro humano desenvolve e executa suas funções cognitivas superiores. Nesse sentido, a caracterização eletrofisiológica das camadas corticais representa uma importante ferramenta no estudo das relações entre seus neurônios, visando uma melhor compreensão de como essas interações influenciam a função neural como um todo [33].

3.2.2 A formação hipocampal

A formação hipocampal (ou simplesmente hipocampo) é uma estrutura presente bilateralmente no cérebro e localizada na porção medial dos lobos temporais. Constituído por uma única camada celular dobrada sobre si mesma, o hipocampo é formado basicamente por dois tipos de neurônios (granulares e piramidais) e seu formato lembra um cavalo-marinho, fato que originou seu nome. Nos humanos, o hipocampo desempenha importante papel em certos aspectos da aprendizagem e da memória, além de estar envolvido no processamento de sensações e expressão de emoções [7]. Em roedores, o hipocampo tem sido extensivamente estudado como parte do sistema cerebral desses animais responsável pela memória espacial e navegação no ambiente.

A Figura 3.10 indica a localização do hipocampo no cérebro de um rato (A) e de um humano (B). Em humanos adultos normais, cada formação hipocampal possui cerca de 4 cm de comprimento e de 3 a 3,5 cm³ de volume, enquanto em ratos o volume é aproximadamente 28 mm³, dependendo da idade e do sexo do animal.

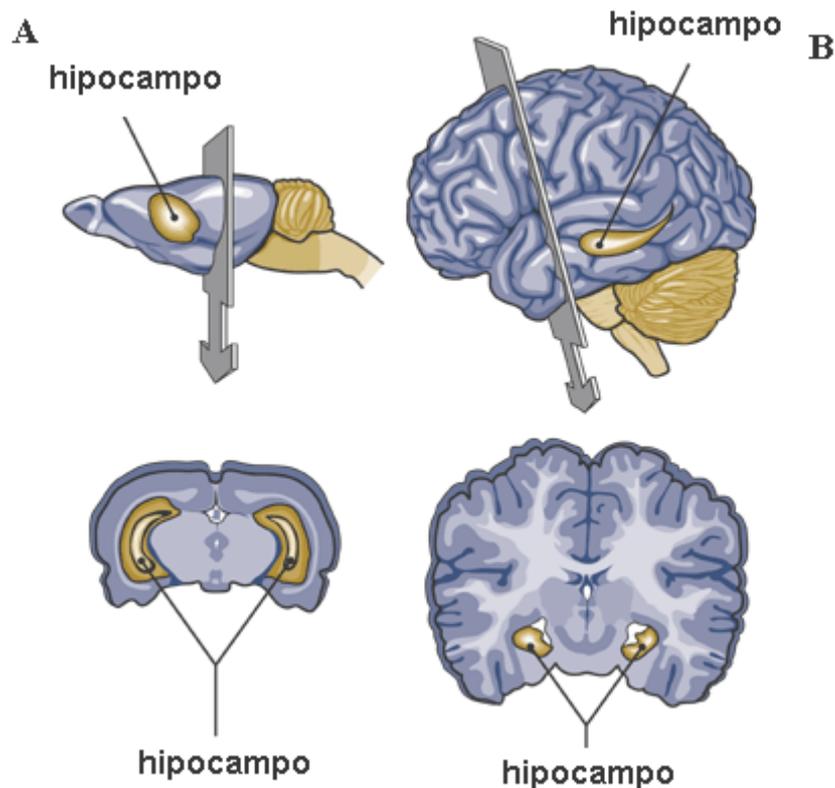


Figura 3.10 Comparação entre hipocampo (a) de rato e (b) humano [34].

Em uma descrição mais específica sobre a anatomia do hipocampo e sua circuitaria, representada na Figura 3.11 a seguir, tem-se que:

A formação hipocampal compreende quatro regiões corticais: o giro dentado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal. O giro dentado é dividido em três camadas: a camada molecular, camada de células granulares e camada polimórfica (hilo). Já o hipocampo propriamente dito é dividido em três subcampos: CA3, CA2 e CA1. Nesse sentido, os circuitos anatômicos da formação hipocampal incluem a clássica via tri-sináptica: o giro dentado recebe sua maior aferência do córtex entorrinal (via perfurante); as células granulares projetam através das fibras musgosas para a região hilar e subcampo CA3. Das células piramidais de CA1 emergem colaterais axônicas que terminam em neurônios de CA3 via conexões de associação e também proporcionam a maior aferência para os neurônios piramidais de CA1 (via colateral de Schaffer) [35].

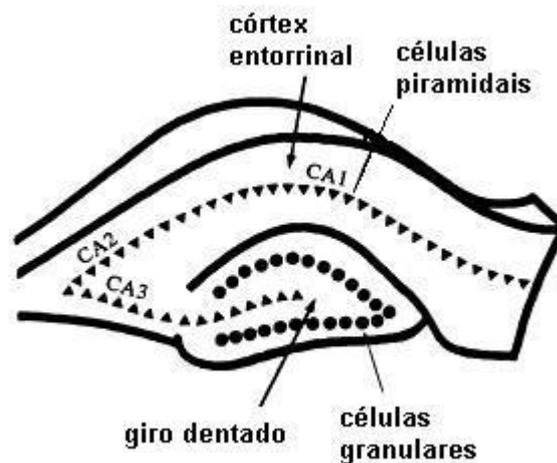


Figura 3.11 Esquema da circuitaria hipocampal [36].

O hipocampo é frequentemente utilizado como modelo no estudo de transmissão sináptica no SNC por ser uma estrutura com arquitetura e organização relativamente simples, que pode ser observada e identificada por microscopia óptica com baixas magnificações. A facilidade de observação, aliada a sua circuitaria neural já bem conhecida e com propriedades bem definidas, torna o hipocampo ideal na investigação eletrofisiológica, pois simplifica o posicionamento de eletrodos sobre a fatia. As principais investigações realizadas *in vitro* com fatias de hipocampo estão relacionadas a estudos de potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios (EPSPs e IPSPs), além de fenômenos de plasticidade sináptica relacionados à potenciação de longa duração (LTP e LDP).

3.3 Métodos *in vitro* de medida da atividade neural

Existem duas abordagens possíveis no estudo experimental da neuroeletrofisiologia: investigações *in vivo* e *in vitro*. A investigação *in vivo* é aquela na qual eletrodos são implantados no animal vivo, enquanto na investigação *in vitro* o animal é sacrificado e amostras de tecido ou células são removidas e mantidas em um ambiente de cultura, onde registros podem ser obtidos a partir de métodos intracelulares ou extracelulares.

Experimentações *in vitro* são amplamente utilizadas por possibilitarem o estudo de diferentes tecidos excitáveis (fatias cerebrais, cardíacas ou da retina) e preparações celulares (cultura primária de células neuronais ou cardíacas dissociadas; cultura organotípica de fatias cerebrais). Os parâmetros eletrofisiológicos que podem ser elucidados experimentalmente *in vitro*, dependendo da técnica empregada, são: potenciais de ação, potenciais pós-sinápticos inibitórios e excitatórios (EPSPs e IPSPs), potenciais de campo locais e oscilações do potencial de membrana abaixo do limiar excitatório [37].

As principais vantagens da utilização de preparações *in vitro* estão relacionadas à sua alta estabilidade mecânica, à possibilidade de visualização direta das estruturas investigadas e ao controle preciso do meio extracelular (temperatura, pH e concentração de solutos). Além disso, uma vez que o grau de organização e complexidade de redes neurais em cultura é menor em comparação com modelos animais *in vivo*, os estudos *in vitro* permitem uma melhor análise e compreensão das propriedades dessas redes. Por outro lado, suas principais desvantagens são os danos celulares causados pelos procedimentos de fatiamento de estruturas ou de dissociação de células, os quais conduzem invariavelmente a perdas de conectividade neural e ausência de mecanismos de regulação vascular e hormonal, além do fato de que manipulações do meio extracelular possam causar alterações metabólicas em condições não-fisiológicas [38].

Tanto na obtenção de registros intracelulares quanto extracelulares, as medidas elétricas podem ser realizadas de dois modos: (a) empregando-se dois eletrodos, sendo o primeiro utilizado para estimular e captar a resposta eletrofisiológica enquanto o segundo é imerso na solução que banha a célula ou a fatia de tecido para servir como referencial terra (eletrodo de referência); ou (b) empregando-se três eletrodos, de modo que dois são dispostos sobre a cultura

celular ou fatia de tecido, sendo um deles utilizado para a aplicação do estímulo e o outro para o registro da resposta eletrofisiológica, enquanto o terceiro é usado como eletrodo de referência. A Figura 3.12 esquematiza a montagem do aparato experimental com dois eletrodos para obtenção de registros de maneira intracelular (técnica com micropipeta de vidro) ou extracelular (conforme configuração em um arranjo de microeletrodos).

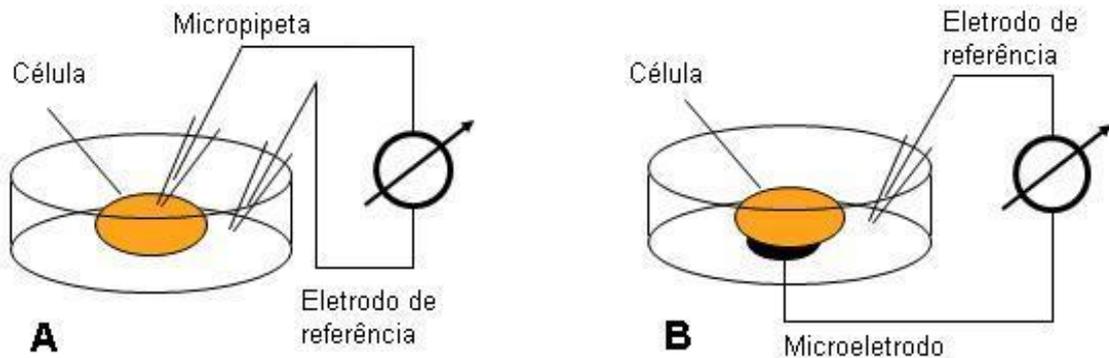


Figura 3.12 Esquemas de montagem do aparato experimental para obtenção de (a) registros intracelulares com micropipeta e (b) registros extracelulares com microeletrodo.

Os eletrodos empregados na experimentação *in vitro* podem ser: fios metálicos; micropipetas de vidro e/ou fibra de carbono; e microeletrodos metálicos ou de materiais semicondutores. Além dos detalhes inerentes a cada técnica específica, os seguintes quesitos em relação ao aparato experimental devem ser atendidos [39]:

(a) os materiais constituintes do dispositivo de medida devem ser atóxicos à amostra biológica e devem permanecer inertes durante o experimento, para se evitar distorção nos registros;

(b) a impedância elétrica de eletrodos extracelulares deve ser a menor possível a fim de se minimizar o nível de ruído e assim melhorar a relação sinal-ruído dos dados obtidos;

(c) no caso de micropipetas de vidro empregadas em registros intracelulares, a resistência formada entre a micropipeta e a célula deve apresentar valor mínimo de 500Ω para que sejam evitadas correntes de fuga;

(c) a conexão entre o eletrodo e os circuitos externos de pré-amplificação e amplificação do sinal deve ser tão curta quanto possível para se evitar ruído eletrônico suplementar no sistema.

3.3.1 Medidas intracelulares

Na realização de medidas intracelulares, o eletrodo é colocado em contato direto com o citosol, ou seja, ocorre a penetração da membrana celular. Nesse caso, o eletrodo deve ser microestruturado a fim de evitar a ruptura brusca da membrana neuronal e o conseqüente extravasamento do conteúdo intracelular. Para tanto, utiliza-se uma fina pipeta de vidro (borossilicato) cuja haste possui diâmetro de aproximadamente 1 a 2 mm [40], a qual é submetida imediatamente antes da utilização a um “estirador”, que aquece a pipeta e estica a parte fundida do vidro, até formar a microestrutura desejada. A imagem (a) da Figura 3.13 mostra uma micropipeta cuja ponta possui estrutura alongada e extremamente fina (diâmetro entre 0,1 - 1 μm), usualmente empregada no método chamado de “técnica do eletrodo pontudo” (*sharp electrode technique*). Essa técnica foi criada em 1949 por Gerard e Ling e difundida por Marmont⁴¹. A imagem (b) exhibe a ponta polida (diâmetro entre 1 - 5 μm) de uma micropipeta utilizada na “técnica de fixação da membrana” (*patch clamp technique*), desenvolvida na década de 1970 por Sakman e Neher [22].

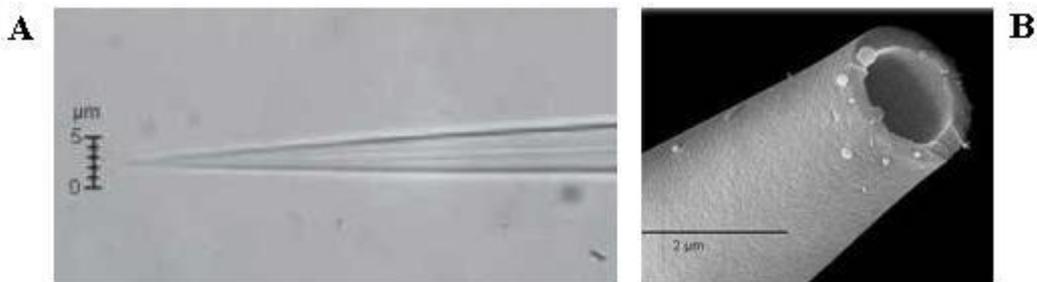


Figura 3.13 (a) Imagem por microscopia óptica de uma micropipeta de vidro utilizada na técnica de *sharp electrode* (escala 5 μm) [42].(b) Imagem por microscopia eletrônica de varredura de uma micropipeta de vidro utilizada na técnica de *patch clamp* (escala 2 μm) [43].

O uso das técnicas de *sharp electrode* ou *patch clamp* apresentam limitações inerentes por serem restritas ao registro da atividade de neurônios individuais, sendo o acesso às células-alvo possível apenas através da utilização de instrumentos especiais, como micromanipulares e mesas anti-vibracionais, necessários para se reduzir instabilidades mecânicas e biofísicas. Além disso, por serem métodos invasivos à célula, a duração dos experimentos é limitada a algumas horas. Contudo, por proporcionarem um bom acoplamento elétrico célula-eletrodo,

permitem a detecção precisa de uma ampla faixa de potenciais (da ordem de até 100 mV) sem distorcer a leitura ao longo do tempo [37]. Em suma, o registro intracelular representa de forma direta a atividade de um neurônio individual (*single-unit recording*) [44] e é capaz de detectar potenciais de ação típicos, além de eventos críticos como potenciais de membrana sub-limíares e alterações na amplitude e no tempo de disparo de potenciais sinápticos.

As características (formato de onda, duração, taxa e padrão de disparo) de potenciais de ação detectados intracelularmente dependem principalmente do tipo de neurônio investigado e dos tipos de canais iônicos presentes na membrana neuronal [11], conforme explicitado nos gráficos exibidos na Figura 3.14.

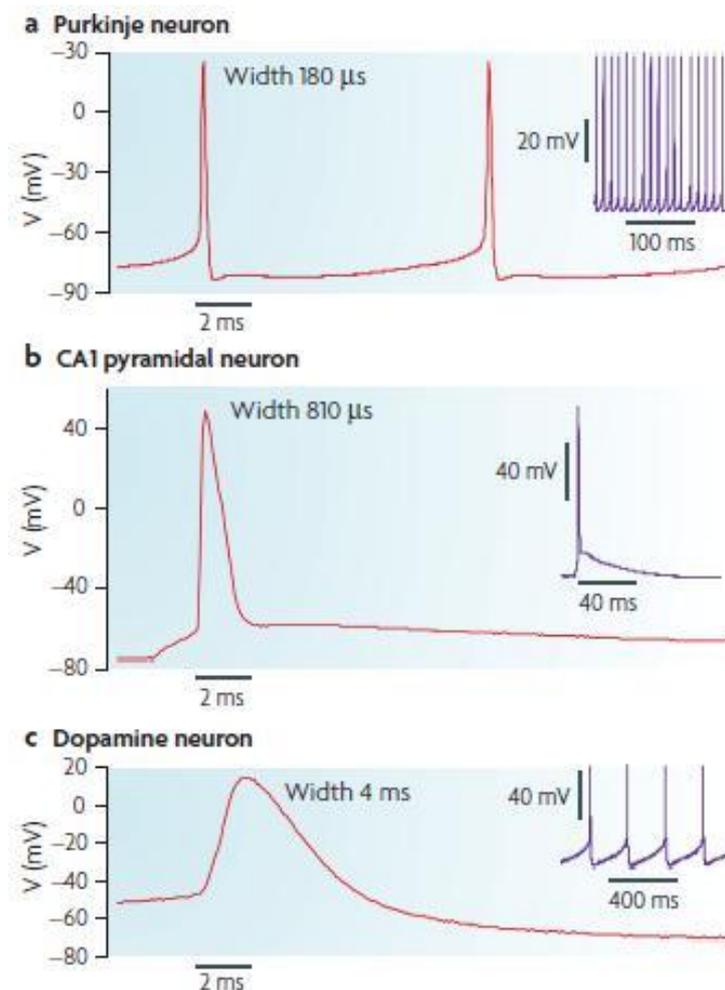


Figura 3.14 Variabilidade de potenciais de ação registrados intracelularmente conforme diferentes tipos de neurônios: (a) neurônios cerebelares de Purkinje; (b) neurônios piramidais da região hipocampal CA1; (c) neurônios corticais dopaminérgicos. *Width* se refere à duração do potencial à largura à meia-altura [11].

3.3.2 Medidas extracelulares

A obtenção de registros extracelulares não exige que o eletrodo danifique a estrutura neuronal, o que viabiliza a condução de experimentos de longa duração (várias horas, dias ou semanas) e representa uma grande vantagem em relação à experimentação intracelular. Nesse tipo de registro, os eletrodos podem ser micropipetas de vidro (com pontas relativamente maiores do que as utilizadas em registros intracelulares) preenchidas com solução concentrada de cloreto de sódio (NaCl), mimetizando assim o ambiente extracelular; pipetas de fibra de carbono; fios metálicos (usualmente tungstênio); e microeletrodos metálicos ou de materiais semicondutores integrados em arranjos de microeletrodos. A Figura 3.15 mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de uma micropipeta de fibra de carbono.

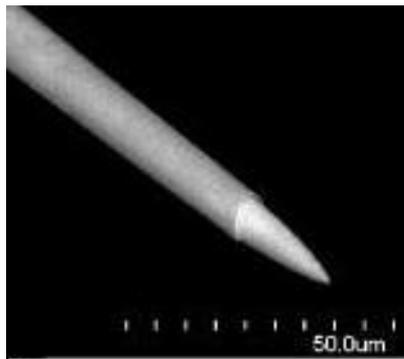


Figura 3.15 Imagem por microscopia eletrônica de varredura de uma micropipeta de fibra de carbono utilizada em registros extracelulares (escala 50 µm) [45].

Normalmente, na experimentação extracelular dá-se preferência ao uso de fios ou microeletrodos metálicos, pois a alta resistência intrínseca das pipetas de vidro pode causar um intenso ruído eletrônico. Contudo, é necessário considerar que os eletrodos metálicos, por serem condutores, trocam elétrons da sua superfície em contato com a solução eletrolítica, o que permite aos íons gerarem uma capacitância na solução. Assim, o registro extracelular exige que haja um controle rígido da temperatura, do pH e da concentração iônica da solução para se evitar um aumento desnecessário do ruído eletrônico durante a captação do sinal [46].

Uma vez que na configuração extracelular o eletrodo é posto em contato com um volume de células eletricamente ativas, ele detecta não apenas o campo elétrico causado pelo fluxo de íons através da membrana neuronal, mas também no meio

extracelular. Desta forma, o sinal captado representa o comportamento geral da população neural, detectando assim alterações nos potenciais de membrana de um número desconhecido de neurônios (*multi-unit recording*). Por conseguinte, potenciais de ação individuais (*spikes*) não são registrados diretamente. Contudo, a parte do sinal registrado que apresenta altas frequências (acima de aproximadamente 100 Hz) fornece informações sobre a atividade de neurônios localizados nas proximidades do eletrodo, o que torna possível a identificação de *spikes* através de métodos computacionais específicos (*spike sorting*).

No entanto, o potencial elétrico detectado no meio extracelular é amplamente atenuado e filtrado temporalmente. Por essa razão, a intensidade dos potenciais de ação registrados extracelularmente pode ser de 10 a 100 vezes menor (cerca de 10 μ V até alguns milivolts) quando comparado aos métodos intracelulares. É necessário ainda considerar que apenas os potenciais de ação deflagrados (ou seja, potenciais de membrana acima do limiar excitatório) são detectados pelas técnicas de registro extracelular convencionais.

O sinal com frequências de até 100 Hz é chamado de “potencial de campo local” (*local field potential*). Os mecanismos envolvidos na geração de potenciais de campo locais e sua relação com a atividade da rede neural ainda não são completamente compreendidos, contudo estima-se que possam representar a sobreposição de potenciais de ação rápidos (causados por correntes de membrana de íons de sódio), potenciais sinápticos e potenciais gliais lentos [37, 47, 48].

Finalmente, é importante notar que o sinal captado no meio extracelular difere fundamentalmente daquele realizado no meio intracelular. O formato de onda, a duração e a amplitude dos potenciais extracelulares dependerão da proximidade do eletrodo ao neurônio ativo e da sua localização em relação ao soma ou ao axônio deste [48-50], além das características elétricas do eletrodo [40]. Essa grande variabilidade no sinal detectado está representada na Figura 3.16, na qual são mostradas simulações de potenciais de ação detectados nas proximidades de um neurônio cortical piramidal.

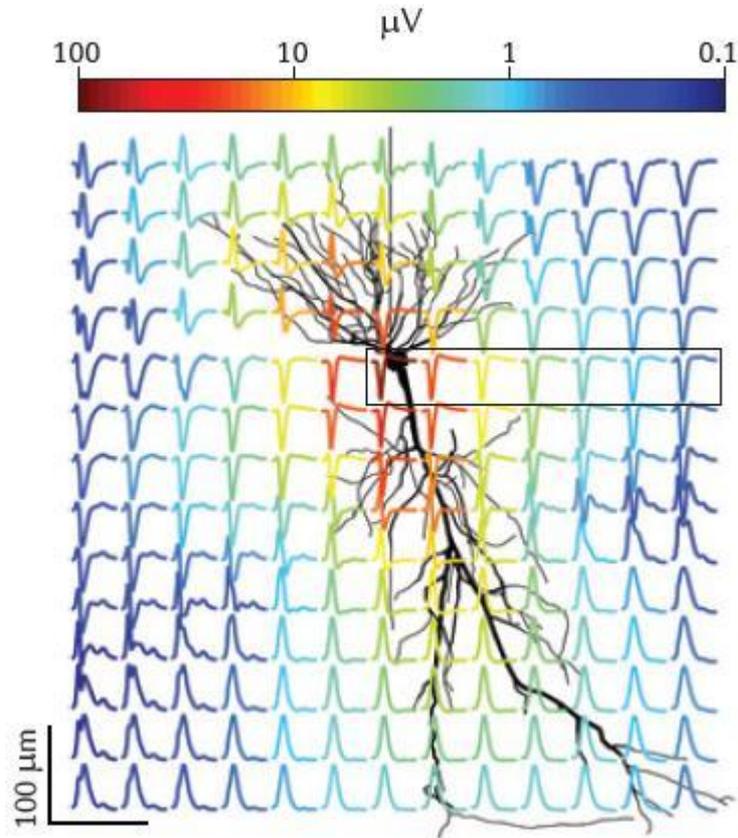


Figura 3.16 Representação de *spikes* extracelulares nas proximidades de um neurônio piramidal ativo. A magnitude dos *spikes* está normalizada e sua amplitude pico-a-pico é indicada pela escala de cores [48].

3.4 Arranjo de microeletrodos (MEA)

Os termos “arranjo de microeletrodos”, “arranjo de múltiplos eletrodos” ou “matriz multieletrodo” (MEA, dos sinônimos em inglês *multielectrode array* e *microelectrode array*) designam um dispositivo de eletrodos microfabricados desenhado para monitorar, sob condições *in vivo* ou *in vitro*, a atividade de dezenas de células simultaneamente de maneira extracelular. De fato, os MEAs podem representar dois biosensores distintos: (1) arranjos constituídos de microeletrodos penetrantes (*MEA probe*) [51], utilizados para implantação aguda (experimentação *in vitro*) ou crônica (*in vivo*); ou (2) arranjos de microeletrodos não-invasivos integrados sobre substrato (*substrate-integrated MEA*), dedicados exclusivamente à experimentação *in vitro*. O escopo deste trabalho restringe-se à descrição e à implementação de um sistema MEA com biosensores do segundo tipo.

Devido ao seu processo de fabricação relativamente simples, à facilidade de modificar seu design conforme necessidades específicas, à boa biocompatibilidade de seus componentes, à praticidade de seu uso na realização de experimentos e à possibilidade de monitorar populações neurais por longos períodos de tempo, os dispositivos MEAs representam a principal metodologia empregada atualmente no estudo de conectividade de circuitos neuronais e em testes de efeitos biológicos de nanocompostos, agentes toxicológicos e componentes farmacêuticos sobre o sistema nervoso central.

3.4.1 Design e fabricação

Basicamente, o design de um MEA apresenta uma composição “sanduíche” na qual um filme fino metálico é depositado entre duas camadas isolantes, e determinadas regiões do filme são expostas de modo a formar pequenos eletrodos metálicos, conforme representado na Figura 3.17. Os microeletrodos irão detectar o campo elétrico externo gerado pelo fluxo iônico em células próximas.

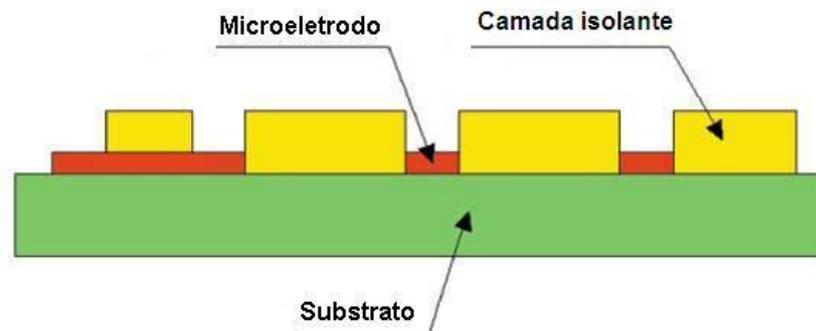


Figura 3.17 Seção transversal esquemática do microchip de um MEA composto por substrato, microeletrodos de geometria planar e camada isolante.

Em suma, a estrutura típica de um arranjo de microeletrodos consiste em um microchip no qual eletrodos metálicos são dispostos sobre um substrato isolante através de técnicas padrão de microfabricação (fotolitografia, corrosão química, deposição metálica, entre outras) e recobertos por uma camada passivadora. Os microeletrodos podem ser utilizados tanto para detectar a atividade eletrofisiológica celular quanto para aplicar estímulos elétricos (pulsos de corrente ou tensão).

Três diferentes materiais são normalmente utilizados como substrato na confecção de MEAs: silício recoberto com óxido de silício (SOI); vidro; e compostos

poliméricos, como poliimida, polidimetilsiloxano (PDMS) e parileno. O uso de substrato de silício, por ser um material semicondutor, requer o crescimento de uma camada superficial de óxido de silício (SiO_2), que além de garantir propriedades isolantes também torna a superfície quimicamente homogênea e inerte [52]. O vidro é o material mais utilizado por ser transparente (facilitando assim a observação por microscopia), altamente isolante, resistente à temperatura e de baixo custo. O uso de polímeros foi adotado como uma maneira de criar dispositivos flexíveis, sendo por essa razão mais empregados na fabricação de dispositivos para aplicações *in vivo* ou em preparações semi-intactas [53, 54].

Diversos materiais tem sido utilizados para formar os microeletrodos, dentre eles ouro (Au), platina (Pt), irídio (Ir) e óxido de índio-titânio (ITO). Cada um possui propriedades elétricas características, e suas aplicações dependem dos requisitos específicos do experimento a ser conduzido. A escolha do composto ITO é feita principalmente quando se deseja a criação de um microcircuito totalmente transparente, permitindo assim uma melhor observação por microscopia da preparação biológica mantida sobre o dispositivo [55], além de possibilitar a combinação com métodos ópticos de registro da atividade eletrofisiológica, como o uso de corantes sensíveis a voltagem (*voltage-sensitive dyes*) [56].

Outros compostos podem ser empregados para recobrir os microeletrodos e assim alterar suas propriedades, como tornar a superfície rugosa (o que facilita a adesão celular), aumentar a área superficial e reduzir a impedância. O nitreto de titânio (TiN), o óxido de irídio (IrO_x) e o “negro de platina” (*platinum black*) são bastante utilizados com esses propósitos. O resultado da deposição de TiN e IrO_x sobre diferentes microeletrodos pode ser visto nas imagens exibidas na Figura 3.18. Tais materiais se depositam na forma de nanoestruturas tubulares, o que justifica a rugosidade e o aumento da área superficial de cada microeletrodo.

Os arranjos comportam de dezenas até centenas de microeletrodos, distribuídos espacialmente em diferentes configurações (matrizes quadradas, retangulares ou em disposição hexagonal). A escolha da geometria de cada microeletrodo é uma etapa fundamental no processo de design e fabricação de MEAs, pois este é um fator que também irá definir suas propriedades elétricas.

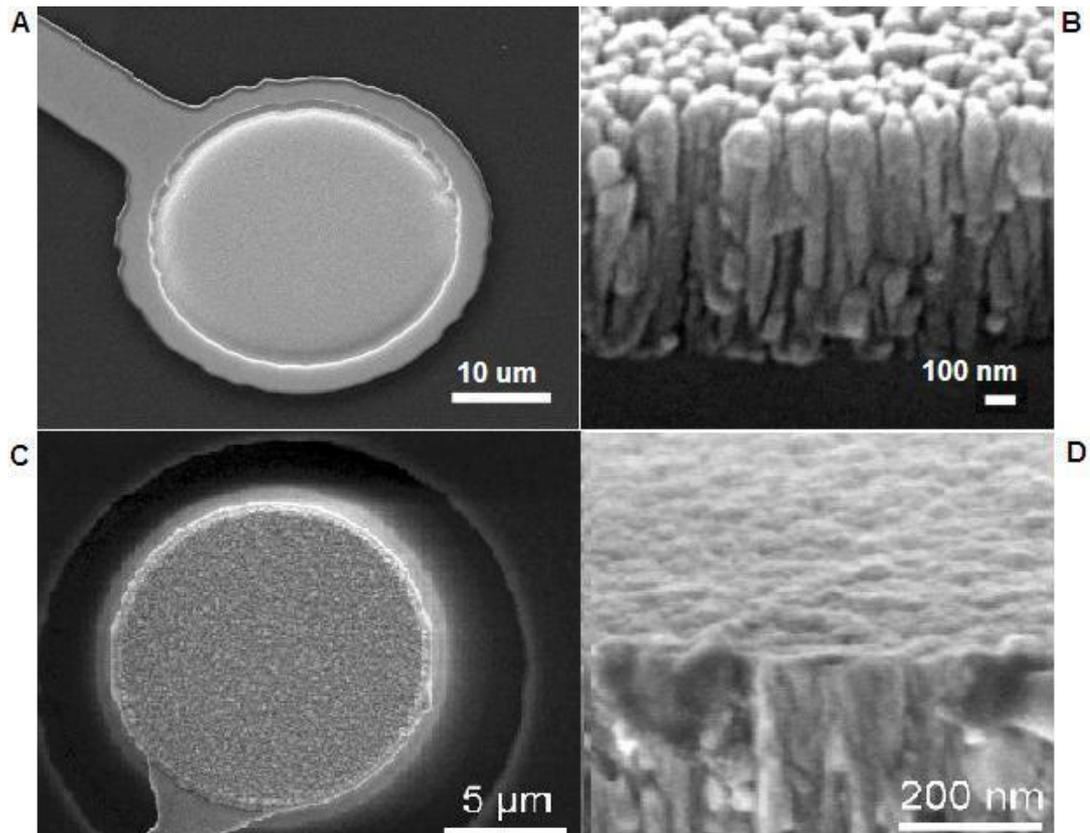


Figura 3.18 Imagens por microscopia eletrônica de varredura de diferentes MEAs, evidenciando microestrutura e nanoestrutura de eletrodos metálicos nos quais houve deposição de (a) e (b) nitreto de titânio [57] e (c) e (d) óxido de irídio [58].

A estrutura dos microeletrodos pode ser planar ou tridimensional. A forma tridimensional apresenta vantagens em relação à forma planar por possuir maior área de superfície, o que proporciona maior interface eletrodo-eletrólito e menor impedância. Essas características possibilitam a detecção de sinais de atividade eletrofisiológica com maior amplitude, menor nível de ruído e conseqüentemente melhor razão sinal-ruído, além de proporcionarem a injeção de estímulos elétricos pelos microeletrodos com maior segurança.

O uso de microeletrodos 3D tem sido preferido na realização de experimentos com fatias de tecido por alcançarem camadas de células mais internas da fatia, ultrapassando assim a camada superficial de células mortas (cerca de 50 µm de profundidade) devido ao procedimento de corte do tecido e evitando a atenuação do sinal eletrofisiológico captado [59-61]. Além disso, sua utilização em culturas celulares também tem demonstrado vantagens, pois as células apresentam maior aderência aos microeletrodos [62]. Um microeletrodo planar pode apresentar geometria quadrada ou circular, enquanto microeletrodos tridimensionais podem ser

protuberâncias em formato de pirâmide, de cilindro ou de cogumelo, conforme pode ser observado nas imagens da Figura 3.19.

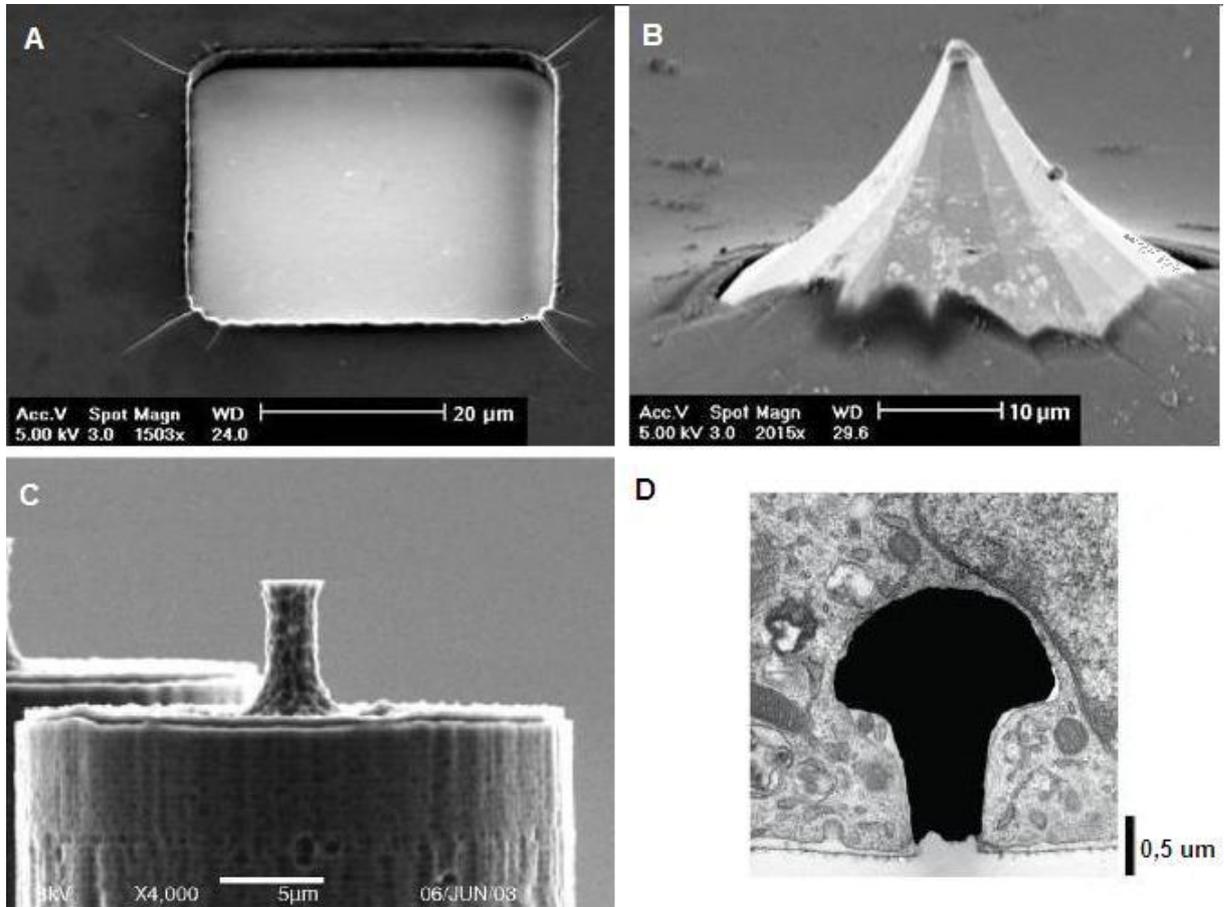


Figura 3.19 Imagens por microscopia eletrônica de varredura (a, b e c) e de transmissão (d) de microeletrodos com diferentes geometrias. Estrutura planar: (a) quadrado [60]. Estruturas tridimensionais: (b) protuberância piramidal [60]; (c) geometria cilíndrica [63]; e (d) formato de cogumelo [64].

As imagens mostram: (A) microeletrodo de platina com geometria quadrada planar, cuja área é de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$; (B) microestrutura piramidal, formada pela deposição de platina sobre protuberância de vidro com altura aproximada de $60 \mu\text{m}$; (C) microeletrodo com geometria cilíndrica, criado a partir da corrosão de um *wafers* de silício (SOI) [63]; e (D) microeletrodo de ouro com formato de cogumelo, onde se pode perceber a adesão firme de células ao microeletrodo [64].

Desenvolvimentos recentes incluem o uso de materiais nanoestruturados para recobrimento dos microeletrodos, como nanotubos de carbono (CNT-MEA, *carbon nanotube microelectrode array*) [65] e óxido de grafeno [66]. Além disso, a nanoestruturação do próprio eletrodo tem sido investigada como uma maneira de se obter com os MEAs uma configuração experimental idêntica à obtida nas técnicas de

sharp electrode e *patch clamp*, ou seja, capaz de registrar intracelularmente a atividade celular [37]. Essa situação é alcançada, por exemplo, com a criação de arranjos de nanopilares (feitos de silício dopado encapsulado com dióxido de silício e recobertos com ouro/titânio), denominados dispositivos VNEAs (*vertical nanowire electrode arrays*) [67]; ou com a confecção de nanopilares como portas de nanotransistores FET, para a criação de dispositivos denominados BIT-FET (*branched intracellular nanotube-field effect transistor*) [68]. A Figura 3.20 apresenta imagens de alguns dispositivos MEAs que empregam nanotecnologia para modificação de seus eletrodos (CNT-MEA, VNEA e BI-FET).

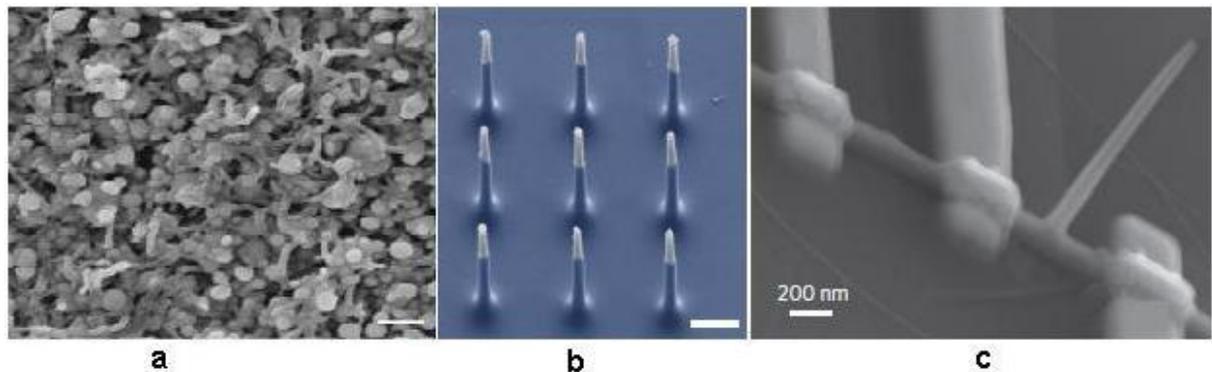


Figura 3.20 Imagens por microscopia eletrônica de varredura de dispositivos MEAs com nanoestruturas: (a) superfície de um microeletrodo recoberto por nanotubos de carbono (escala indica 200 nm) [65]; (b) nanopilares de silício (escala indica 1 μm) [67]; (c) nanopilares de silício conectados a dispositivos nano-FET [68].

A deposição de uma camada passivadora é necessária para isolar as trilhas de condução do microcircuito da solução eletrolítica presente na câmara de cultura, permitindo assim que apenas as áreas expostas do filme metálico (que formam os microeletrodos) sejam sensíveis à obtenção de registros. Além disso, é necessário que o material escolhido apresente baixo valor de constante dielétrica ou que forme um filme de grande espessura a fim de reduzir a formação de capacitâncias parasitas entre a solução de cultura e os eletrodos. Os materiais mais utilizados para formar a camada isolante são: nitreto de silício (Si_3N_4), compostos poliméricos (poliimida, PDMS) e resina (epóxi SU-8). Embora o óxido de silício (SiO_2) exiba propriedades isolantes, ele é permeável a íons, o que exige sua utilização em combinação com outro material.

Finalmente, o microchip do MEA é colado sob uma placa de circuito impresso (PCI) para viabilizar conectividade externa e um anel de vidro ou de plástico é

acoplado ao conjunto, de modo a servir como câmara de registro. Esse anel é vedado com silicone biocompatível para assegurar que os contatos elétricos da PCI estejam isolados da solução de cultura presente na câmara de registro, enquanto a cola condutora garante a conexão entre o microchip e a PCI. A Figura 3.21 apresenta de forma esquemática essa composição.

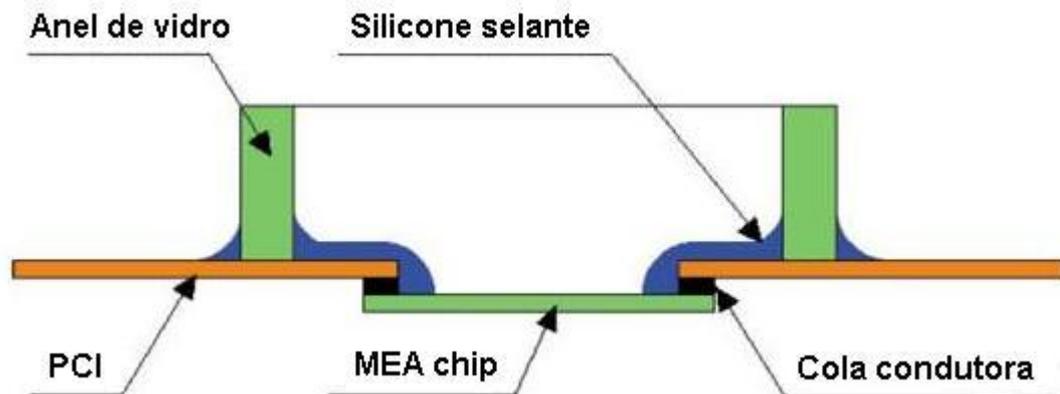


Figura 3.21 Esquema da montagem final de um dispositivo MEA, evidenciando a conexão entre o microchip, a placa de circuito impresso (PCI) e a câmara de registro.

A função da câmara de registro é viabilizar a deposição de cultura celular ou fatia de tecido sobre os microeletrodos, de maneira a prover um ambiente capaz de manter as células vivas através de soluções nutritivas. O circuito do sistema é fechado através de um eletrodo de referência conectado ao terra. O eletrodo de referência pode ser tanto um fio metálico de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) posto em contato com a solução dentro da câmara de cultura, ou um eletrodo integrado no microcircuito do MEA. Nesse caso, o eletrodo de referência deve possuir área superficial muito maior do que os microeletrodos de estimulação/registo e deve estar relativamente afastado destes dentro do microcircuito.

Atualmente, MEAs padronizados são fabricados e comercializados mundialmente por quatro empresas: Alpha-MED Scientific (Osaka, Japão), Axion Biosystems (Atlanta, EUA), Multi Channel Systems (Reutlingen, Alemanha) e Qwane Biosciences (Lausanne, Suíça). Os designs básicos dos dispositivos produzidos por essas empresas são mostrados na Figura 3.22, os quais apresentam as seguintes configurações:

(a) MED64 (Alpha-MED Scientific): arranjo de 64 eletrodos em uma matriz 8x8, substrato de vidro, trilhas condutoras de ITO, microeletrodos de Au e Ni

recobertos com negro de platina (\varnothing 50 μ m), espaçamento 150 μ m entre eletrodos, camada isolante de poliimida, anel de vidro [69].

(b) M64-GLx (Axion Biosystems): arranjo de 64 eletrodos em uma matriz 8x8, substrato de vidro, trilhas condutoras e microeletrodos de Au (\varnothing 30 μ m), espaçamento 200 μ m entre eletrodos, camada isolante de epóxi SU-8, anel de poliestireno [70].

(c) MEA60 (Multi Channel Systems): arranjo de 60 eletrodos em uma matriz 8x8 sem os eletrodos dos cantos, substrato de vidro, trilhas condutoras e microeletrodos de TiN (\varnothing 10 μ m), espaçamento 100 μ m entre eletrodos, camada isolante de SiN, anel de vidro [71].

(d) MEA biochip (Qwane Biosciences): arranjo de 60 eletrodos em uma matriz 8 x 8 sem os eletrodos dos cantos, substrato de vidro, trilhas condutoras e microeletrodos de Pt (\varnothing 30 μ m), espaçamento 100 μ m entre eletrodos, camada isolante de epóxi SU-8, anel de vidro [72].

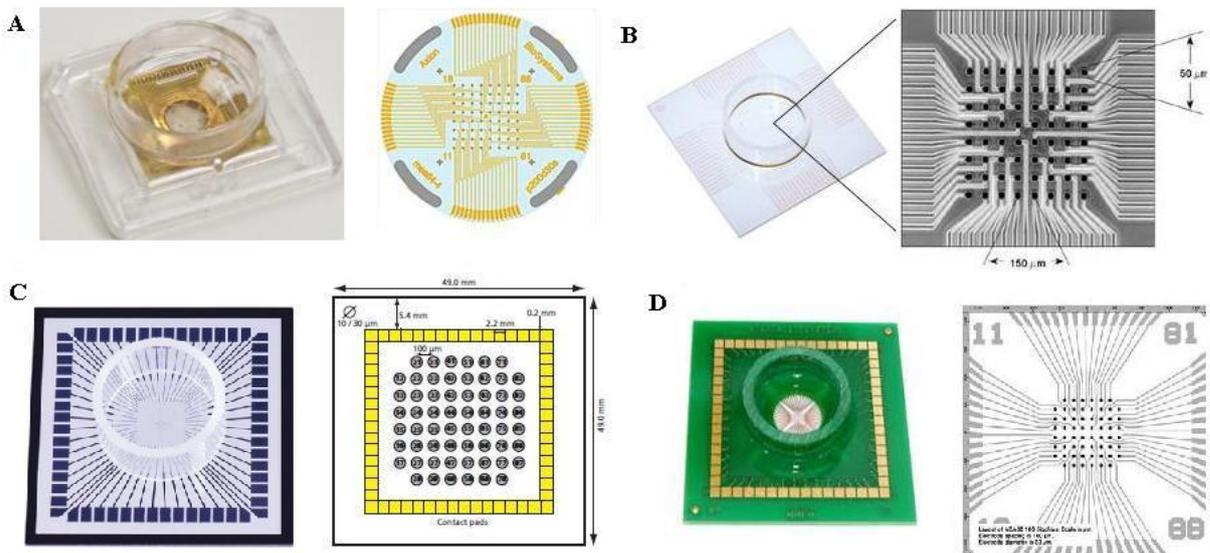


Figura 3.22 Dispositivos MEAs comerciais e seus respectivos designs básicos: (a) MED64 (Alpha-MED Scientific) [69]; (b) M64-GLx (Axion Biosystems) [70]; (c) MEA60 (Multi Channel Systems) [71]; e (d) MEA biochip (Qwane Biosciences) [72].

Finalmente, é importante considerar que o processo de design e fabricação de um arranjo de microeletrodos deve ser conduzido de maneira a garantir como produto final um dispositivo consumível, reutilizável e que permita a reprodutibilidade de experimentos, o que implica em baixos custos de fabricação e adaptabilidade do MEA a um sistema de aquisição de dados disponível comercialmente.

3.4.2 Sistema MEA

A utilização de um biosensor MEA por si só não é suficiente para a condução de um experimento. Para que a experimentação seja viável, é necessário que os sinais captados pelos microeletrodos sejam amplificados, registrados com boa resolução espacial e temporal e enviados a um computador equipado com software adequado para exibição em tempo real e posterior análise de dados. Desta forma, a combinação de um arranjo de microeletrodos com hardwares (amplificador, estimulador e conversor analógico-digital) e softwares (exibição e análise de dados) - além de equipamentos acessórios como microscópio óptico, controlador de temperatura e bomba de perfusão - constituem um sistema MEA completo. A relação entre os principais componentes de um sistema MEA está representada esquematicamente na Figura 3.23.

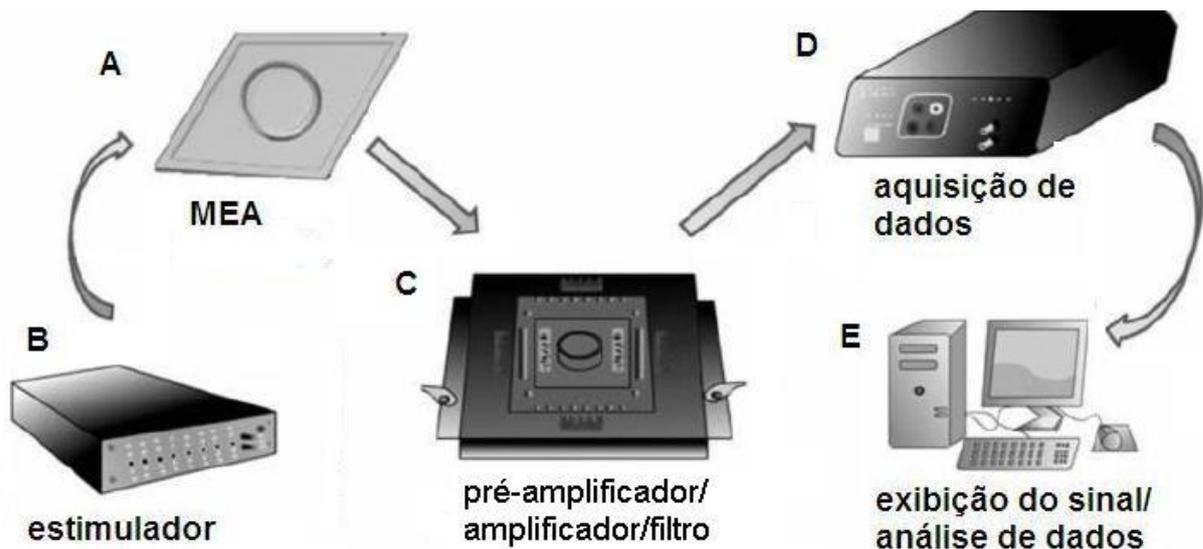


Figura 3.23 Esquema mostrando relação entre os constituintes de um sistema MEA [73].

Um sistema MEA adequado deve garantir alto ganho e baixo ruído na captação do sinal, além de apresentar baixo consumo de energia e ocupar pouco espaço. Essas características são alcançadas através da integração entre o pré-amplificador, o circuito eletrônico para filtragem do sinal e o amplificador final em um único aparato (indicado pela letra C na figura) no qual o dispositivo MEA (letra A) é encaixado para experimentação, considerando-se ainda que o aparato seja dotado de tantos canais quanto o número de microeletrodos do arranjo. Isso garante a obtenção de registros com ótima relação sinal-ruído principalmente por dois motivos:

primeiro, a curta distância entre os eletrodos e o sistema eletrônico evita a captura de ruído suplementar; segundo, é necessária a utilização de apenas um cabo para conectar o aparato ao dispositivo de aquisição de dados (letra **D**), o que também diminui a captação de ruído eletrônico externo. Além disso, tal aparato deve possibilitar a seleção de um ou mais canais (microeletrodos) para estimulação elétrica da preparação biológica sobre o MEA. Conectando-se o estimulador (letra **B**) diretamente ao dispositivo **C**, é possível aplicar pulsos de corrente ou de tensão durante a realização do experimento. Os artefatos gerados pelo estímulo enviado devem ser suprimidos dos registros durante o processamento dos dados, ou ainda antes da aquisição destes, através da utilização de um circuito eletrônico integrado ao amplificador (*blanking circuit*) capaz de alternar entre habilitar/desabilitar a amplificação e o registro do sinal durante o tempo em que o estímulo estiver sendo aplicado [53].

No caso de experimentação com MEAs, a captação e amplificação do sinal registrado é uma etapa crítica do processo, pois a amplitude de sinais extracelulares é relativamente pequena (cerca de $50 \mu V_{pp}$ para células neuronais e $5 mV_{pp}$ para células cardíacas), o que exige altos ganhos no sistema. Assim, o sinal é inicialmente aumentado cerca de 10 vezes pelo pré-amplificador; em seguida, o amplificador filtra o registro de todos os canais (microeletrodos) simultaneamente com uma taxa ou frequência de amostragem (*sampling rate* ou *sampling frequency*) previamente definida pelo experimentador e aplica um ganho em torno de 1000 vezes. Desta forma, um sistema de registro com baixo ruído garante que sinais fisiológicos na faixa de 20 a 30 μV sejam detectados [53].

A escolha da frequência de amostragem deve ser realizada com cuidado, pois este parâmetro atua como filtro e poderá determinar a detecção ou não de sinal eletrofisiológico e/ou de ruído do sistema, além de influenciar diretamente o tamanho dos arquivos de dados gravados em disco. Por exemplo, o registro de dados de 60 canais simultaneamente com uma frequência de amostragem de 25 kHz resultará em uma taxa de dados de 3 MB/s ou 10,8 GB/h [74]. Normalmente, uma taxa de amostragem de pelo menos cinco vezes a frequência mais alta do sinal de interesse é suficiente para uma representação razoável dos sinais [75].

Sistemas MEAs são fabricados e comercializados por quatro empresas: Alpha-MED Scientific (Osaka, Japão), Axion Biosystems (Atlanta, EUA), Multi Channel Systems (Reutlingen, Alemanha) e Tucker-Davis Technologies (Flórida,

EUA). Os amplificadores desenvolvidos pelas empresas Multi Channel Systems (MEA1060 Amplifier) e Tucker-Davis Technologies (MZ60 MEA Interface) são compatíveis com MEAs de até 60 canais (que apresentem interface com tamanho padrão de 49x49mm), enquanto os amplificadores das empresas Alpha-MED Scientific (MED64 Amplifier) e Axion Biosystems (Muse) foram criados especialmente para se conectar aos MEAs de 64 canais fabricados pelas respectivas empresas. Cada um dos fabricantes também disponibiliza seu próprio software para análise dos registros, contudo os dados obtidos nos quatro sistemas podem ser convertidos para formatos de arquivo padrão e processados em outros softwares gráficos, estatísticos ou específicos para análise de dados.

3.4.3 Perspectiva histórica sobre desenvolvimento e aplicações de MEAs

O surgimento dos arranjos de microeletrodos ocorreu na década de 1970 como uma tentativa de utilizar os métodos desenvolvidos pela indústria da microfabricação para introduzir algumas facilidades e novas oportunidades de investigação na área da eletrofisiologia. Uma vez que esses métodos possibilitaram a produção de dispositivos padronizados com dimensões próximas às celulares, os sistemas de eletrodos microfabricados (basicamente por técnicas de deposição de filmes finos sobre placas de vidro para cultura celular) foram concebidos como um método conveniente de estabelecer contato elétrico com células e tecidos de maneira não-destrutiva (extracelular) e de longa duração, permitindo assim o estudo da plasticidade e das interações elétricas entre os elementos cultivados.

O primeiro artigo relatando o uso de um arranjo de microeletrodos para eletrofisiologia foi publicado por Thomas *et al* em 1972 [76]. Esse trabalho descrevia o processo de fabricação de um dispositivo com 30 microeletrodos de ouro dispostos sobre um substrato de vidro em um arranjo 2 x 15 no qual o espaçamento entre os eletrodos era de 100 μm (distância centro a centro) e 50 μm entre as linhas. Cada microeletrodo possuía área de 7 x 7 μm^2 , apresentava geometria planar e era recoberto com “negro de platina” (*platinum black*) a fim de ter sua impedância reduzida. A configuração final do arranjo (adaptado da publicação no artigo original) é apresentada na Figura 3.24.

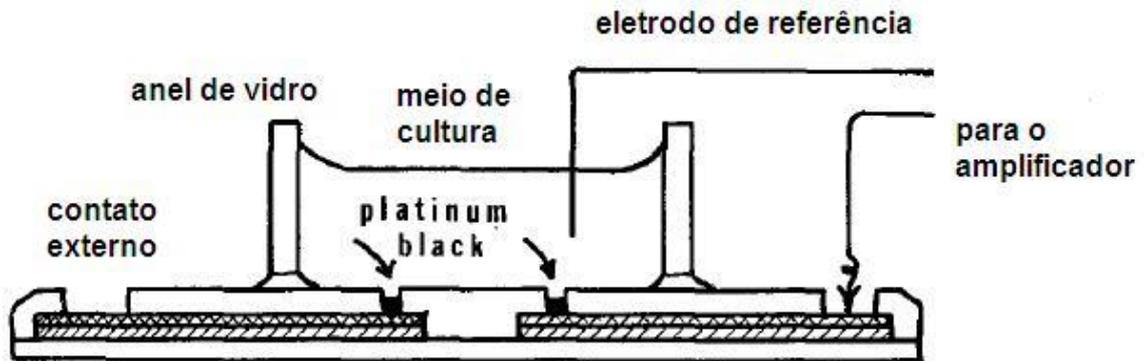


Figura 3.24 Diagrama de seção transversal do primeiro arranjo de microeletrodos registrado na literatura, em publicação feita no ano de 1972 [76].

O dispositivo foi utilizado para registrar a atividade elétrica espontânea de células cardíacas retiradas de embriões de aves e cultivadas *in vitro*. Diante dos resultados obtidos, que indicavam claramente o registro de potenciais de campo e não de potenciais de ação individuais, os pesquisadores concluíram que:

Mudanças no desenho do eletrodo ou uma maneira conveniente de aumentar a impedância extracelular durante os registros poderão, no futuro, tornar possível a monitoração da atividade de uma célula individual com tais arranjos de microeletrodos [76].

Tal conclusão indicava as perspectivas dos autores de maiores avanços no desenvolvimento do novo dispositivo. Em 1974, Shtark *et al* [77] propuseram a criação de uma câmara de perfusão sobre o arranjo de microeletrodos com a intenção de viabilizar a investigação de tecidos nervosos, contudo apresentaram apenas resultados preliminares com o uso de tais dispositivos. Em 1977, Gross e colaboradores [78] propuseram a mesma idéia de Thomas *et al* e empregaram, além de técnicas de deposição de filmes finos, microfexes de laser ultravioleta para criar um arranjo de 36 microeletrodos de ouro com 10 μm de diâmetro cada um e espaçados entre si 100 μm e 200 μm sobre um substrato de vidro. Testes foram realizados com gânglios parietais extirpados de caracol *Helix pomatia*, e resultados preliminares mostraram o registro da atividade de células individuais. Resultados mais robustos replicando o mesmo experimento foram apresentados em um artigo posterior, publicado em 1979 [79].

Em 1980, um artigo de autoria de Pine [80] conseguiu comprovar o uso dos arranjos de microeletrodos como uma ferramenta útil em eletrofisiologia por correlacionar registros intracelulares com extracelulares, mostrando então que os resultados obtidos com esses dispositivos eram compatíveis de fato com a atividade neuronal real. Pine fabricou um arranjo com 32 (2 x 16) microeletrodos de ouro, isolados com dióxido de silício e cobertos com negro de platina, cada um com área de $8 \times 10 \mu\text{m}^2$ e afastados $250 \mu\text{m}$ entre si. A Figura 3.25 mostra a imagem de um microeletrodo coberto com negro de platina, cuja superfície de contato possui área cerca de 100 vezes maior do que eletrodos de ouro puro [81].

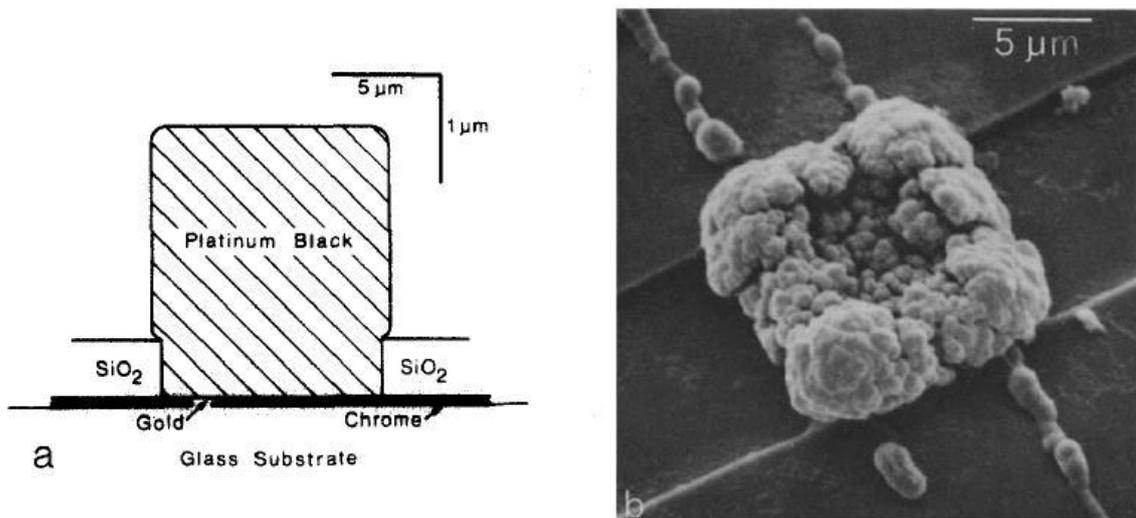


Figura 3.25 (a) Diagrama de seção transversal de um microeletrodo coberto com negro de platina (*platinum black*). (b) Imagem por microscopia eletrônica de varredura evidenciando a deposição de negro de platina [80].

O experimento foi conduzido cultivando-se neurônios dissociados de gânglios cervicais superiores de ratos neonatos sobre a câmara de cultura do arranjo. Os registros foram feitos penetrando-se uma célula localizada nas proximidades (distante até $50 \mu\text{m}$) de um microeletrodo do arranjo com uma micropipeta intracelular, aplicando-se um estímulo elétrico pela micropipeta até que fosse deflagrado um potencial de ação, e registrando-se simultaneamente a resposta pelo microeletrodo e pela micropipeta. Além disso, Pine realizou os primeiros testes utilizando os próprios microeletrodos para estimular eletricamente a cultura, tendo concluído satisfatoriamente que eles poderiam ser utilizados para aplicar pulsos de tensão de $0,5 \text{ V}$ e duração 1 ms , sem infringir danos aos microeletrodos ou causar reações eletroquímicas que pudessem prejudicar a cultura [81].

Seguindo com avanços no desenvolvimento da tecnologia dos MEAs, Jobling *et al.* publicaram em 1981 [82] um trabalho no qual descreviam a fabricação de um arranjo de nove microeletrodos no qual os eletrodos eram portas de transistores FET (*fiel effect transistor*) sobre um chip de silício, conforme demonstrado na Figura 3.26. Os experimentos foram conduzidos estimulando-se fatias agudas de hipocampo de rato com um eletrodo metálico bipolar convencional e registrando-se as respostas com os microeletrodos; os resultados obtidos indicaram uma boa relação sinal-ruído.

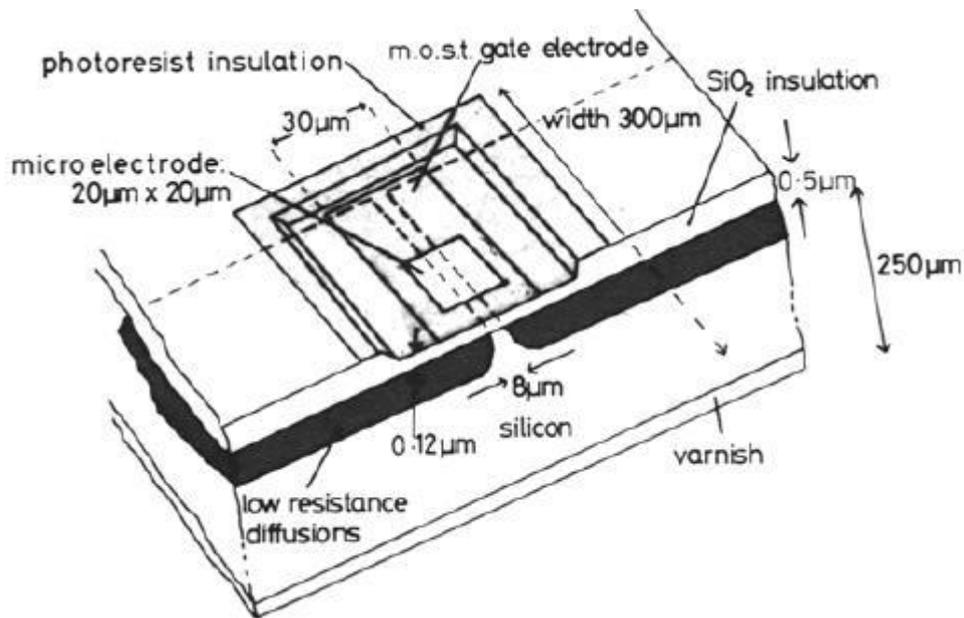


Figura 3.26 Esquema da estrutura de um microeletrodo combinado a um microtransistor FET [82].

Em continuidade às pesquisas prévias, em 1982 Gross e colaboradores [83] relataram pela primeira vez o registro de atividade espontânea em cultura de células dissociadas da medula espinhal de ratos neonatos, nomeando o arranjo feito de microeletrodos de ouro sobre substrato de vidro e isolado com resina de polisiloxane como MEP (*multimicroelectrode plate*). Em um trabalho similar, publicado no mesmo ano, Gross e Lucas [9] denominaram o dispositivo como MMEP (*photoetched multielectrode plate*). Em 1985, introduziram o uso de substrato de óxido índio-titânio (ITO) na fabricação dos MMEPs, com a perspectiva de que o material permitisse a confecção de dispositivos com alta densidade de microeletrodos (superior a 400 microeletrodos por mm^2), além de evitar a perda de dados morfológicos na preparação biológica devido à deterioração da camada de isolamento do microcircuito [84]. Investigações posteriores utilizando tais dispositivos levaram à

documentação de atividade rítmica periódica e aperiódica com o mesmo tipo de preparação celular, monitorada por períodos de 3 a 5 semanas [55, 85].

Em seguida, Wheeler e Novak se propuseram a localizar a fonte da atividade neural em preparações biológicas sobre arranjos de microeletrodos com a finalidade de investigar as características dos dispositivos. Em 1986 [86], relataram a fabricação (através da padronização de linhas condutoras de ouro sobre um substrato de vidro isolado com poliimida) de um arranjo com 32 microeletrodos de 25µm de diâmetro dispostos em uma matriz 4 x 8, afastados 200 µm entre si, e executaram experimentos utilizando gânglios abdominais de molusco marinho (*Aplysia californica*). A conclusão desse trabalho foi que os arranjos de microeletrodos se mostravam ferramentas adequadas para a investigação da atividade neural e conectividade em um gânglio desconhecido, pois permitiam correlacionar a atividade extracelular de todo o gânglio com padrões neurais de atividade individual determinados previamente. Aprofundando essa investigação em trabalhos seguintes, os pesquisadores passaram a executar o método de “análise de densidade de fonte de corrente” (*current source density analysis*) de potenciais de campo de registros obtidos em fatias agudas de hipocampo de rato, utilizando os microeletrodos simultaneamente para estimulação e registro [87, 88].

Em 1989, Regehr *et al* [89] criaram um dispositivo (61 microeletrodos de 12µm de diâmetro, separados 70 µm entre si e dispostos em um arranjo hexagonal) no qual os microeletrodos e a camada de isolamento eram transparentes (utilizando ITO introduzido por Gross e colaboradores), com o objetivo de tornar a experimentação compatível com o uso de corantes sensíveis a voltagem (*voltage-sensitive dyes*) e viabilizar a observação da preparação por microscópio óptico invertido. Além disso, conduziram os experimentos com neurônios de três espécies diferentes (sanguessuga - *Hirudo medicinalis*, lesma - *Aplysia californica* e caracol - *Helisoma trivolvis*) a fim de avaliar se a técnica era aplicável em geral e determinar a importância de diferentes fatores (como tamanho da célula) na estimulação e obtenção de registros confiáveis. Os pesquisadores observaram que os neurônios investigados, por serem células grandes em relação aos microeletrodos, aderiram firmemente a estes, formando uma junção do tipo “selo” (*seal*). Assim, constataram que se estabelecia uma relação geométrica entre o microeletrodo e o neurônio de maneira similar à formada por uma micropipeta de *patch clamp* com o mesmo diâmetro, conforme elucidado no esquema da Figura 3.27. Concluíram então que

cada geometria levava ao registro de sinais com diferentes formatos de onda, e a resistência necessária entre o microeletrodo e a célula para que fossem obtidos bons registros dependia do tipo de neurônio investigado.

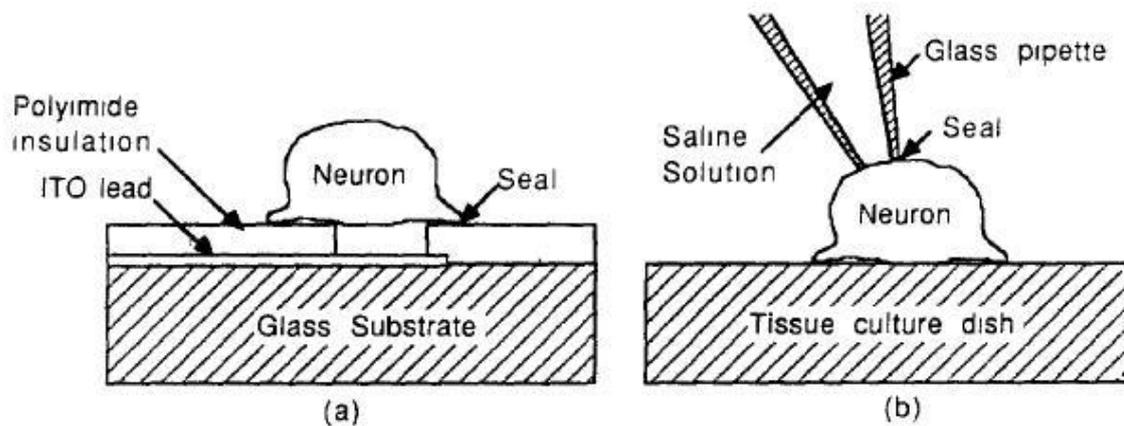


Figura 3.27 (a) Representação de um neurônio crescendo sobre um microeletrodo e formando uma junção do tipo “selo”. (b) Representação de uma micropipeta de vidro posta em contato com o neurônio para formar uma junção “selo” [89].

A questão da aderência e da atividade celular sobre os microeletrodos foi investigada mais profundamente por Lind *et al*, que publicaram um artigo dedicado ao tema em 1991 [90]. Nesse trabalho, os pesquisadores determinaram a qualidade da junção entre a célula e o microeletrodo através de medidas de impedância e mostraram que tal aderência era dependente não apenas das características celulares, mas também das propriedades do microeletrodo. Uma conclusão importante deste trabalho foi a sugestão de que a adesão celular seria melhorada conforme se aumentasse a rugosidade da superfície dos microeletrodos.

Em 1991, Chien e Pine [91] desenvolveram uma nova técnica para detecção óptica de atividade eletrofisiológica por corantes sensíveis a voltagem (*voltage sensitive dyes*, VSD), com a finalidade de registrar potenciais de ação e potenciais sinápticos sublimiáres em microculturas (densidade inferior a 10 células) de neurônios de gânglios cervicais superiores de ratos. A perspectiva maior do experimento era investigar a possibilidade de usar a técnica por VSD para estudar plasticidade sináptica a curto e longo prazo. Uma vez que, para se comprovar a confiabilidade do método seria necessário estimular os neurônios de forma não invasiva e ainda mapear seus potenciais sinápticos, eles utilizaram arranjos de microeletrodos para estimular eletricamente as microculturas e monitorar sua atividade.

Iniciando uma série de trabalhos dedicados ao entendimento da relação neurônio-microeletrodo [92-96], Fromherz e colaboradores publicaram em 1991 um artigo investigando o uso de dispositivos de microeletrodos FET no registro de potenciais de ação de células Retzius de sanguessuga. As portas dos transistores FET apresentavam aberturas entre 6 μm e 10 μm , enquanto cada célula possuía diâmetro aproximado de 50 μm ; os microeletrodos estavam completamente cobertos pelos neurônios, portanto. Os resultados permitiram comparar o desempenho de dispositivos FETs com diferentes abordagens, como portas com aberturas maiores fabricados por Bergverld *et al* [97]; portas metalizadas como as utilizadas por Jobling *et al* [82]; ou a combinação de neurônios com silício metalizado conforme descrito por Regehr *et al* [98]. A Figura 3.28 mostra os diferentes sinais obtidos por Fromherz *et al* [92] conforme a qualidade da junção estabelecida entre o neurônio e a porta do transistor FET, e também compara registros obtidos simultaneamente de maneira extracelular (FET) e intracelular (micropipeta).

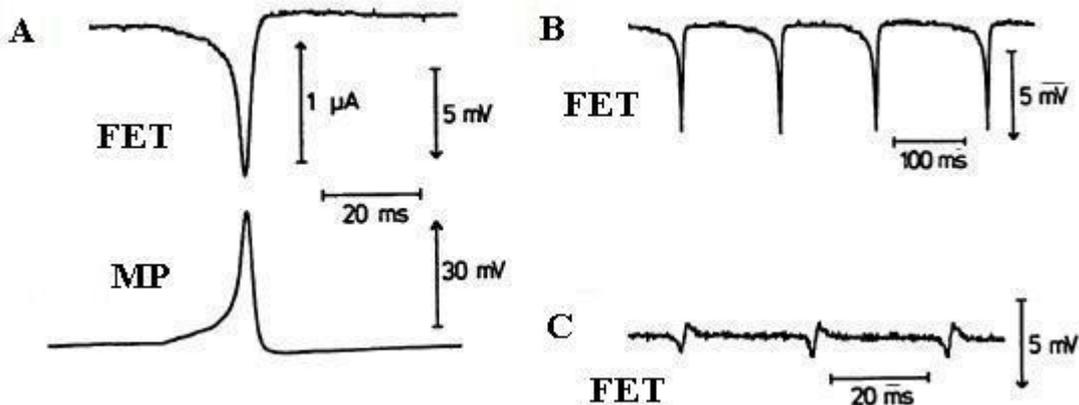


Figura 3.28 (a) Registros simultâneos por microtransistor FET (extracelular) e por micropipeta (MP, intracelular); (b) Atividade espontânea registrada quando há uma boa junção neurônio – FET; (c) registro quando a junção não é adequada [92].

O artigo publicado em 1993 se aprofundava na questão da caracterização física da junção neurônio-silício, estando o neurônio aderido à porta de um transistor livre de metal submerso em eletrólito [93]. Os trabalhos seguintes tiveram seu escopo ampliado para a investigação do circuito neurônio-microeletrônica-neurônio, sob a perspectiva de que esse caminho representava “um passo fundamental em direção à integração da dinâmica neuronal e a eletrônica digital a nível microscópico” [96].

A partir de meados da década de 1990, um grupo de pesquisadores alemães vinculado ao Instituto de Ciências Médicas e Naturais (Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut - NMI) da Universidade de Tübingen passou a se dedicar ao desenvolvimento de MEAs (adotando a partir de então tal terminologia como acrônimo de *substrate integrated microelectrode arrays*) com o objetivo claro de estabelecê-los como uma ferramenta consagrada à pesquisa em redes neurais e desenvolvimento de novas drogas. Hämmerle, Nisch, Egert e colaboradores publicaram uma série de artigos [57, 99-105] nos quais definiram os requisitos necessários, elucidaram as principais restrições encontradas e apresentaram soluções a alguns dos problemas enfrentados para a obtenção de um arranjo de microeletrodos que servisse aos propósitos pretendidos. O artigo inicial, publicado em 1994 [99], descrevia brevemente experimentos com cultura de células de gânglio de retina de aves e estabelecia as seguintes condições para o desenvolvimento adequado de um MEA:

Todos os materiais em contato com células devem ser biocompatíveis – eles não devem interferir no metabolismo, na morfologia, na diferenciação ou na atividade elétrica celular.

A complexidade da interação neuronal no modelo de cultura celular deve, entre uma única célula e um órgão, permitir uma análise compreensiva e a transferência de resultados para modelos *in vivo*.

A fim de monitorar a atividade de diversas células na rede, o sistema deve apresentar uma abordagem multieletrodo.

A aquisição e a análise de dados devem ser rápidas o suficiente para permitir uma rápida taxa de transferência de substâncias testadas. Procedimentos de análise e apresentação dos resultados devem ser viáveis sem necessidade de tempo de processamento adicional.

A facilidade no manuseio deve ser obtida em relação a dois aspectos. Eletrodos convencionais são difíceis de serem posicionados em grande número. Arranjos de microeletrodos podem resolver este problema desde que as células sejam cultivadas sobre o eletrodo. A troca do meio de cultura no dispositivo deve ser fácil e rápida.

Uma vez que arranjos de microeletrodos descartáveis ainda não são disponíveis, o arranjo deve ser reutilizável.

O sistema de medição e seus componentes devem suportar o manuseio da cultura celular e procedimentos de rotina padrão (por exemplo, ser protegido contra derrame de líquidos, ácidos fracos e bases, e permitir esterilização por técnicas convencionais) [99].

O segundo trabalho, publicado também em 1994, detalhava o design, o processo de microfabricação e a caracterização dos MEAs através de medidas do nível de impedância dos microeletrodos e imagens por microscopia eletrônica de varredura. Além disso, registros extracelulares foram simulados com a aplicação de pulsos através de uma micropipeta de vidro de cano duplo (*tethastyle*) para medir as

características de detecção em função da distância vertical e lateral entre a ponta da micropipeta e os microeletrodos [100].

Os dispositivos criados consistiam em 60 microeletrodos (10 μm de diâmetro, afastados 100 μm centro a centro) de ouro cobertos com negro de platina e dispostos em um arranjo 8 x 8 (sem os eletrodos dos cantos) sobre substrato de vidro. A camada de isolamento utilizada foi de nitreto de silício (Si_3N_4). A Figura 3.29 mostra a imagem de um desses MEAs e o detalhe do padrão dos seus microeletrodos.

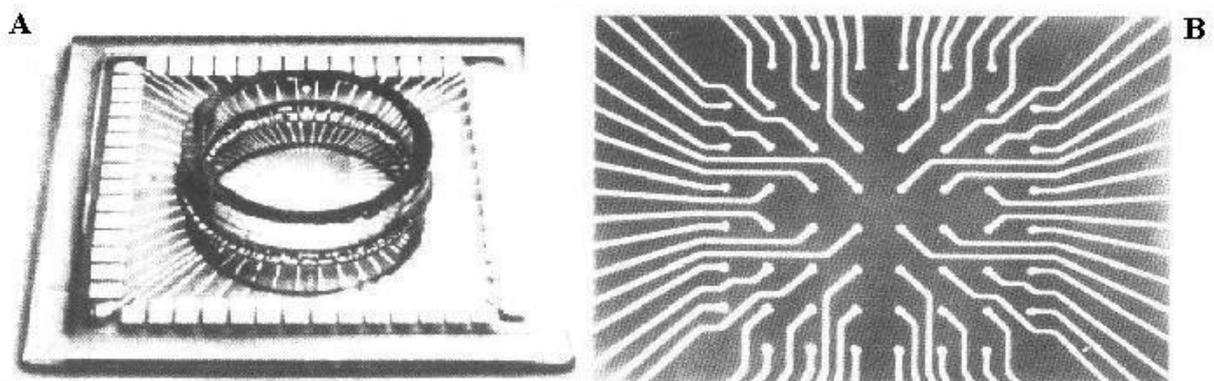


Figura 3.29 Dispositivo ME: (a) configuração final; (b) detalhe do padrão de disposição dos seus microeletrodos [100].

O artigo apresentava também as principais vantagens e restrições da técnica:

As principais vantagens desta técnica são a eliminação de interações mecânicas entre os microeletrodos de registro e a fonte de sinal; a facilidade em se obter registro simultâneo e estimulação de um grande número de neurônios; a capacidade de conduzir experimentos em câmaras estéreis fechadas e, portanto, o potencial de monitorar a atividade neuronal por um longo período.

As principais restrições no desenho do arranjo de microeletrodos de filmes finos foram: (i) a superfície do microeletrodo teve que ser pequena e as distâncias entre um microeletrodo e outro teve que ser grande o suficiente para permitir a detecção de sinais de neurônios individuais; (ii) a impedância do microeletrodo teve que ser pequena o suficiente para aumentar o nível de sinais registrados e melhorar a razão sinal-ruído; (iii) o dispositivo teve que ser biocompatível, resistente a um ambiente salino e a esterilização, e facilmente mantido em condições de cultura celular [100].

Em 1996, membros do grupo fundaram a empresa Multichannel Systems, localizada no Parque Científico e Tecnológico (vinculado à Universidade de Tübingen) na cidade de Reutlingen (Alemanha) e voltada para o desenvolvimento de biosensores e sistemas MEAs. Atualmente, a empresa também fabrica e comercializa outros equipamentos e acessórios para a experimentação com arranjos

de microeletrodos, como microscópios invertidos, micromanipuladores, sistemas de perfusão e controladores de temperatura [71].

Os trabalhos seguintes foram dedicados ao estudo de propriedades de redes neurais através do registro de potenciais de campo locais. Foram realizados testes com fatias agudas de retina de ave [101] e com cultura de células cardíacas (miócitos) de ratos [104]. No entanto, o grupo adotou abordagens diferenciadas e foi o primeiro a documentar um experimento com cultura organotípica de fatia de hipocampo sobre um MEA [57], e também o primeiro a obter registros de potenciais de ação de células individuais em fatias agudas de cerebelo de rato [103]. Além disso, um artigo publicado em 2002 apresentou um conjunto de ferramentas de código aberto (chamado “MEA-Tools”) para análise de dados obtidos com MEAs no ambiente MATLAB (The Mathworks, Natick, MA), visto que o processamento de registros obtidos com inúmeros eletrodos simultaneamente se tornou uma das principais dificuldades enfrentadas pelos usuários desses dispositivos [102]. Nessa mesma perspectiva, outros autores também desenvolveram ferramentas computacionais de livre acesso [106].

Seguindo a tendência das pesquisas européias e norte-americanas, pesquisadores japoneses vinculados aos laboratórios Matsushita e NTT, a partir da segunda metade da década de 1990, passaram a fabricar dispositivos MEAs com 64 microeletrodos para experimentação com fatias cerebrais e culturas de neurônios corticais dissociados [107]. Lideradas por Taketani e Kawana, as publicações feitas relataram importantes resultados, como a obtenção de registros em culturas organotípicas de fatias cerebrais durante várias semanas [108]; a comprovação da plasticidade de conexões em culturas corticais como resposta à estimulação tetânica [109, 110]; e a criação de um arranjo de 8 x 8 microeletrodos com as superfícies aumentadas ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$ cada um), separados $150 \mu\text{m}$ entre si e isolados com poliimida, mais adequado tanto para uma estimulação eficaz quanto para longos períodos de tempo de registros em fatias agudas de cérebro de rato [111].

O arranjo com 64 microeletrodos foi denominado inicialmente de PEA (*planar electrode array*), e em seguida de MED (*multielectrode dish*). A estrutura de um dispositivo MED é apresentada na Figura 3.30. Os desenvolvimentos alcançados na fabricação dos dispositivos MED levaram à criação da empresa Alpha-MED Scientific em 1997, inicialmente vinculada à Panasonic’s Corporate Research Division. O primeiro sistema MED64 foi lançado em 1999 [69].

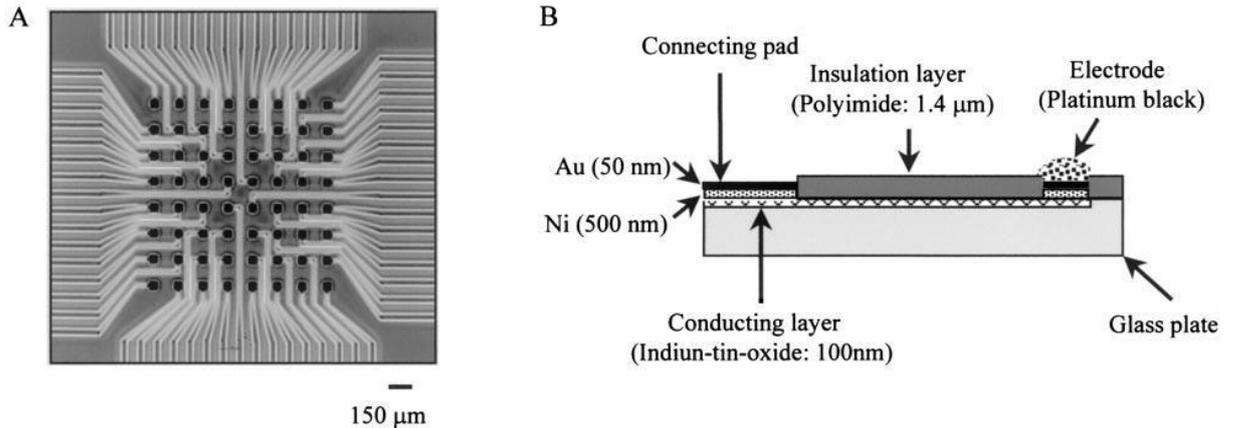


Figura 3.30 Estrutura de um dispositivo MED: (a) Arranjo de 64 microeletrodos planares e (b) diagrama de seção transversal evidenciando estrutura do dispositivo [111].

Ainda nos anos finais da década de 1990, pesquisas começaram a ser realizadas empregando-se arranjos de microeletrodos para o estudo da plasticidade de redes neurais corticais dissociadas [109, 110, 112]. Tal fenômeno se manifesta através de uma atividade sincronizada e rítmica, a qual é detectada por praticamente todos os microeletrodos do MEA simultaneamente. Esses registros são os chamados *bursts* (série rápida de potenciais de ação), e apresentam duração típica superior a cem milissegundos [113]. Diferentes padrões de atividade da rede neural em cultura sobre o MEA podem ser avaliados através da análise dos *bursts*, como frequência de disparo de potenciais de ação, amplitude da corrente sináptica tardia e velocidade de propagação, que estão diretamente relacionados à eficiência da transmissão sináptica dentro da rede [114].

Nos anos seguintes, estudos foram conduzidos com o propósito de compreender e encontrar maneiras de modular a ocorrência dos *bursts*, em uma tentativa de atingir uma plasticidade sináptica controlada [115]. A compreensão dos fatores que causam a geração espontânea de *bursts* durante o desenvolvimento da rede neural e a maneira como tal atividade irá influenciar a organização sináptica na rede madura é de extrema relevância, pois tais mecanismos desempenham importante papel em processos de aprendizagem e memória, além de estarem diretamente relacionados a distúrbios neurológicos como doença de Parkinson, esquizofrenia e epilepsia [116].

De maneira semelhante aos estudos de redes neurais corticais, a atividade rítmica gerada em culturas de células dissociadas e em culturas organotípicas de

medula espinhal de embriões de ratos também foi avaliada com arranjos de microeletrodos e correlacionada com funções motoras em vertebrados [117, 118].

Nessa mesma época, iniciou-se a investigação de processos cognitivos com base na avaliação da atividade de redes neurais em cultura sobre dispositivos MEAs. O primeiro artigo relatando processos de aprendizagem de tarefas arbitrárias em redes neurais formadas em cultura de neurônios corticais de ratos foi apresentado em 2001 por Shahaf e Marom [119]. Neste trabalho, os autores apresentaram curvas de aprendizagem geradas pela resposta dos neurônios da rede à aplicação de estímulos de baixa frequência (0,3 – 1Hz), demonstrando processos básicos de aprendizagem e memorização em termos de padrões de atividade neuronal.

Na primeira década dos anos 2000, alguns melhoramentos foram introduzidos na configuração ou nas técnicas de utilização dos arranjos de microeletrodos. Por exemplo, em 2001, Potter e DeBarse [120] introduziram o uso de uma membrana hidrofóbica transparente de teflon (*fluorinated ethylene-propylene*) sobre os MEAs para criar um microambiente estéril e estável a longo prazo, de maneira a possibilitar a cultura celular sobre os microeletrodos por períodos superiores a nove meses. Essa nova abordagem permitiu viabilizar e facilitar o estudo do desenvolvimento, da adaptação e da plasticidade celular em redes neuronais durante períodos muito longos, nos quais as culturas ainda exibiam uma robusta atividade eletrofisiológica espontânea. Em 2004, Wagenaar *et al* [115] estudaram a eficácia da aplicação de diferentes pulsos de voltagem na estimulação de células em cultura sobre MEAs e determinaram os parâmetros mais efetivos para a obtenção de resposta evocada sem causar danos aos microeletrodos por processos eletroquímicos.

A busca pela modulação da atividade de redes neurais em cultura conduziu ao desenvolvimento de dispositivos MEAs cujos substratos receberam a deposição de filmes finos em determinados padrões geométricos, os quais serviram para conduzir o crescimento celular e originar redes neurais padronizadas (*patterned networks*) [121]. Os resultados alcançados por tal padronização mostraram uma atividade elétrica da rede mais consistente, na qual as taxas de disparo de potenciais de ação se mostraram mais elevadas. Chang, Brewer e Wheeler publicaram uma série de trabalhos nos quais registraram a atividade elétrica de neurônios confinados entre linhas paralelas sobrepostas aos microeletrodos do MEA, demonstrando que seria possível manipular as taxas de disparo de potenciais

de ação da cultura através da manipulação do material usado para padronização, do design geométrico do padrão e do meio de cultura utilizado, variando-se ainda os fatores de crescimento adicionados [114, 122, 123]. Sistemas de canais microfluídicos também passaram a ser incorporados aos MEAs com o propósito de entregar fatores de crescimento celular ou testar localmente a ação de drogas [124].

Em 2002, um artigo publicado por Heuschkel *et al* [59] propôs o uso de microeletrodos tridimensionais como uma maneira de penetrar a camada de células mortas resultante do processo de fatiamento de tecidos, e assim alcançar as células intactas para diminuir a atenuação do sinal registrado pelo MEA. Os experimentos foram conduzidos estimulando-se fatias de hipocampo de rato, e os resultados mostraram que sinais de maiores amplitudes podiam ser registrados com o uso de microeletrodos 3D [60]. Em um artigo posterior, publicado em 2006 [62], os pesquisadores mostraram pela primeira vez na literatura que a utilização desses dispositivos com microeletrodos tridimensionais também melhorava as respostas obtidas de neurônios dissociados cultivados sobre o arranjo, pois as células se mostraram capazes de estabelecer excelente contato com a superfície protuberante de cada microeletrodo. A Figura 3.31 permite observar o crescimento de um neurônio sobre a superfície de um microeletrodo 3D.

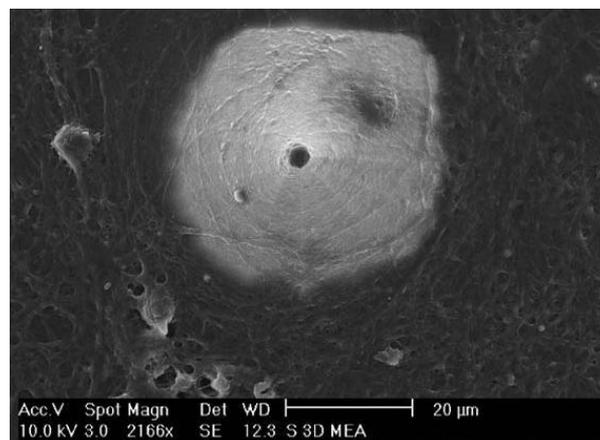


Figura 3.31 Microscopia eletrônica de varredura evidenciando o crescimento de um neurônio hipocampal sobre um microeletrodo protuberante [62].

Sob essa mesma perspectiva, em 2006 Kopanitsa *et al* [61] utilizaram MEAs 3D para investigar a plasticidade de potenciais sinápticos excitatórios de campo (fEPSPs - *field excitatory synaptic potentials*) na região CA1 de fatias de hipocampo de camundongo, empregando diferentes protocolos de estimulação a fim de induzir

potenciação de longa duração (LTP). Corroborando os resultados apresentados por Heuschkel *et al* [59], também foram registrados potenciais de maior amplitude, em comparação com os registros obtidos até então por microeletrodos planares. Um avanço na fabricação de microeletrodos 3D foi feito em 2006 por Chu *et al* [63], que desenvolveram MEAs com microeletrodos 3D de formato cilíndrico utilizando apenas silício, sem empregar metais.

Nos últimos anos, novos desenvolvimentos na fabricação de MEAs tiveram seu foco principal na modificação dos microeletrodos, com o objetivo de alcançar uma interface célula-eletrodo mais confiável ao melhorar o acoplamento elétrico dos neurônios ao dispositivo [37]. Essas novas abordagens estão relacionadas ao uso de nanomateriais para recobrimento dos microeletrodos ou à criação de microeletrodos nanoestruturados, conforme foi apresentado no subitem 3.4.1 deste trabalho: em 2009, Eick *et al* [58] fabricaram o primeiro arranjo com microeletrodos recobertos por óxido de irídio (IrO_x), cujas propriedades eletroquímicas possibilitaram a obtenção de eletrodos com alta capacidade de armazenamento de carga e baixa impedância elétrica; em 2010, Hai *et al* [64] apresentaram microeletrodos 3D de ouro com formato de cogumelo, que permitiram o registro de potenciais sinápticos sub-limíares e potenciais de ação com razão sinal-ruído equivalente à obtida em registros intracelulares; em 2012, Robinson *et al* [67] fabricaram arranjos de nanopilares (dispositivos VNEAs), capazes de estimular e registrar intracelularmente a atividade de neurônios em cultura e fornecer um mapa de conexões sinápticas individuais; de maneira semelhante, em 2012, Duan *et al* [68] empregaram nanopilares como portas de nanotransistores FET para a criação dos dispositivos BIT-FET, também capazes de penetrar a membrana neuronal e deixar os nanotransistores diretamente em contato com o citosol celular, permitindo assim o registro do potencial de membrana intracelular. Finalmente, o artigo com inovações mais recentes foi publicado em 2013, no qual Suzuki *et al* [65] descreveram o desenvolvimento de arranjos com microeletrodos planares recobertos por nanotubos de carbono (CNT-MEA), que possibilitaram o registro não apenas de sinais eletrofisiológicos, como potenciais pós-sinápticos de campo (fPSPs) e potenciais de ação, mas também mediram a liberação do neurotransmissor dopamina.

3.4.4 Resumo do potencial de aplicações

Uma vez que a disposição de um conjunto de microeletrodos possibilita o monitoramento de diversas células simultaneamente (em contraste com o emprego de apenas um ou dois eletrodos nas técnicas convencionais de eletrofisiologia), é possível se obter um mapa espacial da atividade eletrofisiológica, o que configura o MEA como um dispositivo ideal para a investigação da conectividade em redes neurais. Ademais, por integrar os microeletrodos de estimulação e registro com a câmara de cultura em um sistema compacto e de fácil manuseio, o MEA se torna uma ferramenta única no estudo das propriedades de culturas celulares ou culturas organotípicas de fatias de tecido durante curtos (horas a dias) ou longos (semanas a meses) períodos de tempo.

Essas características viabilizam, por exemplo, a investigação de efeitos agudos e crônicos de drogas e toxinas em estudos funcionais sob condições fisiológicas mimetizadas ou patofisiológicas induzidas, além de fornecer importantes indicações sobre a especificidade de uma droga em determinado tecido. Outra vantagem do dispositivo é a possibilidade de combinar seu uso com uma técnica eletrofisiológica de registro intracelular, de maneira que ambos os métodos sejam aplicados simultaneamente.

Conforme apresentado ao longo deste trabalho, diferentes preparações biológicas têm sido investigadas com os MEAs:

- Culturas de células cardíacas, da medula espinhal, neuronais corticais, neuronais hipocâmpais e neuronais do núcleo supraquiasmático¹²⁵ dissociadas;
- Culturas de células-tronco humanas pluripotentes diferenciadas (*human induced pluripotent stem cell - iPSC*) em cardiomiócitos¹²⁶ ou em neurônios;
- Culturas organotípicas de fatias de medula espinhal, de córtex, de hipocampo e de retina;
- Fatias agudas de retina, de córtex, de cerebelo e de hipocampo.

A monitoração da atividade eletrofisiológica dessas preparações pode ser realizada com os seguintes propósitos:

- Registro de atividade eletrofisiológica espontânea ou evocada (EPSPs, IPSPs, potenciais de campo, potenciais de ação individuais);
- Registro de atividade rítmica espontânea [117, 118];
- Investigação de plasticidade sináptica (LTP, LDP) [61];
- Investigação de mecanismos celulares de memória e aprendizagem [112, 127];
- Estudos de propriedades de redes neuronais em nível macroscópico [110, 123, 128];
- Testes de efeitos biológicos (agudos ou crônicos) de agentes toxicológicos e componentes farmacêuticos sobre o sistema nervoso [113, 129, 130, 131], células cardíacas [132] e retina [133];
- Pesquisas sobre nanotoxicidade no sistema nervoso [134];
- Estudos sobre o ritmo circadiano [135-137];
- Obtenção de eletroretinograma (ERG) [133, 138, 139];
- Investigações com modelos animais de epilepsia [140, 141];
- Investigações em epilepsia com tecido cerebral humano excisado [142-146].

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Multidisciplinar de Nanociências e Micro-nanotecnologia (NANOPUC), localizado no Parque Científico e Tecnológico da PUCRS (TECNO PUC), e no Grupo de Pesquisa sobre Epilepsia Experimental do Laboratório de Neurociências (NEUROLAB), localizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS. As atividades iniciaram em agosto de 2012.

No âmbito do Projeto de Pesquisa ao qual este trabalho está vinculado, foi realizado estágio de curta duração no Laboratório de Microsistemas 4 (LMIS4), localizado no Centro de MicroNanotecnologia (CMi) da École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), e no Laboratório de Microcircuitaria Neural (LNMC), localizado no Brain Mind Institute (BMI) da mesma instituição, durante o mês de julho de 2013.

4.1 Aparato experimental

Os MEAs e os equipamentos empregados para a realização deste trabalho estão especificados a seguir. Demais itens e instrumentos utilizados são especificados durante a descrição dos procedimentos experimentais.

4.1.1 Arranjos de microeletrodos (MEAs)

Os sensores utilizados neste trabalho são MEAs fabricados no Centro de MicroNanoTecnologia (CMi) da EPFL pela empresa Qwane Biosciences SA. Esta empresa é spin-off do Laboratório de Microsistemas 4 (LMIS4) vinculado à universidade.

Todos os arranjos de microeletrodos são depositados sobre substrato de vidro (15 mm x 15 mm x 0,7 mm), acoplados a uma PCI com tamanho padrão de 49 mm x

49 mm e isolados com resina epóxi SU-8 (5 μm espessura). Exceto os sensores customizados, todos os demais modelos possuem anel de vidro (6 mm altura; 2,5 mm espessura; 19mm \varnothing interno; 24 mm \varnothing externo) acoplado ao dispositivo de maneira a constituir uma câmara de registro com volume total aproximado de 1 mL. Cada microeletrodo recebe uma numeração dentro da matriz do arranjo, de acordo com o diagrama exibido na Figura 4.1. O primeiro número indica a coluna e o segundo indica a linha (por exemplo, o microeletrodo 23 está localizado na segunda coluna e na terceira linha da matriz).

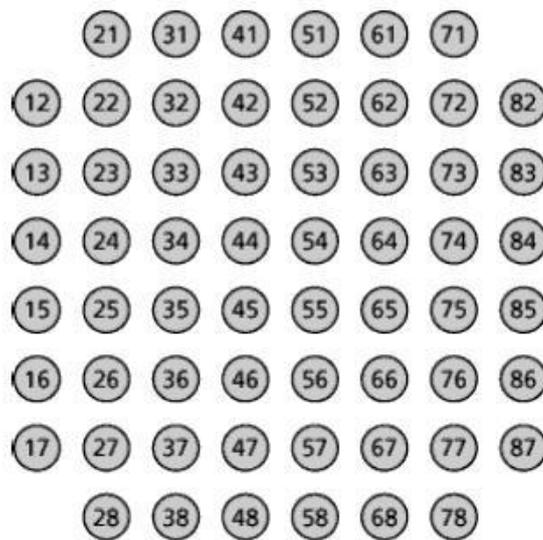


Figura 4.1 Numeração dos microeletrodos de um MEA padrão de matriz 8x8.

Os modelos dos sensores empregados neste trabalho são detalhados a seguir.

- **Sensores customizados:** arranjo de 52 microeletrodos de platina sobre ouro em uma matriz 8x8 sem os eletrodos dos cantos, geometria planar circular (\varnothing 40 μm) e espaçamento entre eletrodos de 200 μm . Eletrodos suplementares: 4 pares de eletrodos de referência.

- **MEA60 200 Pt:** arranjo de 60 microeletrodos de platina em uma matriz 8x8 sem os eletrodos dos cantos, geometria planar quadrada (40x40 μm), espaçamento entre eletrodos de 200 μm , impedância nominal 400–600 k Ω e nível de ruído 20–25 μVpp .

- **MEA60 200 3D:** arranjo de 60 microeletrodos de platina em uma matriz 8 x 8 sem os eletrodos dos cantos, geometria tridimensional quadrada (base 40 μ m x 40 μ m; altura 50-70 μ m), espaçamento entre eletrodos de 200 μ m, impedância nominal 250 - 450 k Ω e nível de ruído 15-20 μ Vpp).
- **MEA60 200 3D GND:** arranjo de 59 microeletrodos de platina em uma matriz 8 x 8 sem os eletrodos dos cantos, geometria tridimensional circular (base \varnothing 40 μ m, altura 50-70 μ m), espaçamento entre eletrodos de 200 μ m, impedância nominal 250 - 450 k Ω e nível de ruído 15-20 μ Vpp. Eletrodo suplementar: 1 eletrodo de referência (impedância nominal inferior a 2k Ω).

No total, estavam disponíveis para a realização deste trabalho 14 sensores customizados, que foram identificados pelos códigos A01 à A14 e empregados na execução das etapas 1 e 2; quatro sensores modelo MEA60 200 Pt, identificados pelos códigos G1331, G1336, G1373 e G1380 e empregados na execução das etapas 1, 2, 4 e 6; quatro sensores modelo MEA60 200 3D, identificados pelos códigos D2397, D2400, D2404, D2422 e G5002 e empregados na execução das etapas 4 e 7; e quatro sensores modelo MEA60 200 3D GND, identificados pelos códigos O1298, O1299, O1302 e O1307 e que foram empregados na execução das etapas 1 e 7.

4.1.2 Sistema convencional de aquisição de dados

O sistema de aquisição de dados convencional é composto pelos seguintes equipamentos: fixador de corrente Iso-Flex A.M.P.I.; Digidata 1200B (Molecular Devices, LLC), para aquisição de dados e conversão de sinal analógico em digital; amplificador AxoClamp 2B (Molecular Devices, LLC); condicionador de sinais programável CyberAmp 380 (Molecular Devices, LLC); estimulador programável Master 8 (A.M.P. Instruments), para aplicação de estímulos elétricos através de rotinas pré-programadas; software AxoScope 9 (Molecular Devices, LLC), para a análise em tempo real, na tela do computador, do sinal capturado; software Clampfit 9.2 (Molecular Devices, LLC), para análise *offline* dos registros; mesa antivibracional, para evitar perturbações mecânicas; e gaiola de Faraday, para evitar interferência e captação de ruído eletrônico de outros equipamentos do laboratório.

4.1.3 Sistema MEA

O sistema instalado é do tipo MEA60-System, que é comercializado pela empresa Multichannel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Alemanha) e constituído por: pré-amplificador integrado com 60 canais para utilização com microscópio invertido (MEA1060-Inv); conversor de sinais analógico/digital (MC_Card); controlador de temperatura com um canal (TC01); software para programação do controlador de temperatura (TCX-Control); software para aquisição e análise de dados (MC_Rack); e software para exportação de dados (MC_DataTool).

4.2 Procedimento experimental

O desenvolvimento deste trabalho foi dividido em oito etapas, de acordo com os objetivos específicos inicialmente propostos:

- 1) Caracterização dos arranjos de microeletrodos por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e análise do nível de ruído;
- 2) Construção e teste de uma interface eletrônica entre um dispositivo MEA e um sistema de aquisição de dados convencional com oito canais;
- 3) Instalação de um sistema MEA comercial;
- 4) Adaptação de um sistema de perfusão por bomba peristáltica ao sistema MEA;
- 5) Definição de procedimentos experimentais para o uso dos MEAs no Laboratório de Neurociências;
- 6) Teste do sistema MEA instalado através de experimentação eletrofisiológica com cultura celular;
- 7) Teste do sistema MEA instalado através de experimentação eletrofisiológica com fatia de cérebro de roedor;
- 8) Análise e validação dos registros obtidos com o sistema MEA.

Os procedimentos e os materiais necessários à execução de cada etapa são detalhados a seguir.

4.2.1 Caracterização dos arranjos de microeletrodos

Os sensores MEAs disponíveis para a realização deste trabalho foram inicialmente catalogados. Após a catalogação, a caracterização dos dispositivos foi realizada através da obtenção de imagens por meio de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura e da análise do nível de ruído dos microeletrodos através da avaliação dos potenciais registrados com os MEAs preenchidos com solução tampão padrão.

As imagens foram obtidas no Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS. As imagens por microscopia óptica foram obtidas por uma câmera de vídeo digital marca Motic modelo Moticom 2500 acoplada a um estereomicroscópio marca Olympus modelo SZ 51, com magnificações entre 30 e 40 vezes. As imagens por microscopia eletrônica de varredura foram obtidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca PHILIPS modelo XL30 com faixa de aumentos de 10 a 200.000 vezes e tensão de aceleração de 20 kV. Para a realização das imagens, um dos arranjos de microeletrodos foi previamente metalizado por deposição de uma camada de ouro. O MEV possui três detectores acoplados, sendo um para detecção de elétrons secundários (SE), um para detecção de elétrons retroespalhados (BSE) e outro para realização de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). A caracterização do sensor foi realizada através de análises qualitativas por EDS e obtenção de imagens nos modos SE e BSE.

O nível de ruído dos microeletrodos de cada MEA foi verificado preenchendo-se a câmara de registro do sensor com solução PBS (*phosphate buffered saline*) à temperatura ambiente. O sensor com PBS foi então acoplado ao pré-amplificador do sistema MEA e o eletrodo de referência foi conectado ao canal terra do pré-amplificador. O registro dos potenciais em todos os microeletrodos foi obtido com o sistema MEA de modo contínuo em uma sessão de 60 segundos em formato de 16 bits, frequência de amostragem de 25 kHz, faixa de entrada de ± 819 mV e ganho de 1200x. Como uma estimativa do nível de ruído do sinal bruto detectado, calculou-se o valor RMS de curtos períodos de tempo (500 ms) de registro de um microeletrodo de cada MEA.

4.2.2 Interfaceamento entre o MEA e um sistema de aquisição de dados convencional

A construção de uma interface entre o biosensor e um sistema de aquisição de dados convencional com oito canais teve como objetivo estabelecer as conexões eletrônicas necessárias para que o arranjo de microeletrodos pudesse ser utilizado tanto para estimular a preparação biológica sobre o MEA quanto para captar a resposta eletrofisiológica recebida, empregando-se para tanto os equipamentos de eletrofisiologia já disponíveis no Laboratório de Neurociências. Foram construídos dois diferentes protótipos de interfaces e realizados testes de desempenho de cada um deles conforme descrito a seguir.

4.2.2.1 Protótipo 1

Dois cabos IDE 40 vias marca LU CHIANG modelo 2651 E72332 UNICAB foram soldados a um arranjo de microeletrodos, de maneira que cada via do cabo IDE correspondesse a um contato do MEA. Os cabos IDE 40 vias foram então acoplados a uma protoboard e conectados através de chaves dip switch (totalizando 56 chaves) a oito cabos de áudio-frequência de alta definição com terminais BNC da marca MULT CABO®. Estes cabos foram conectados diretamente ao sistema de aquisição de dados convencional. Chaves dip switch adicionais (totalizando 16 chaves) foram integradas à protoboard e conectadas através de um cabo a um estimulador programável, de maneira a permitir a seleção de microeletrodos para a aplicação de estímulos elétricos.

4.2.2.2 Protótipo 2

O MEA foi acoplado a uma interface mecânica-eletrônica construída com uma placa de circuito impresso e barras de pinos montados sobre uma placa de poliacetal (Tecaform). O desenho e a confecção dessa interface foram realizados no Laboratório de Mecânica e no Laboratório de Eletrônica e Circuito Impresso do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IDEA) da PUCRS. A interface foi acoplada através de cabos IDEA 40 vias a uma protoboard e conectada através de chaves dip switch a oito cabos de áudio-frequência de alta definição com terminais BNC da

marca MULT CABO®. Estes cabos foram conectados diretamente ao sistema de aquisição de dados convencional. Chaves *dip switch* adicionais (totalizando 16 chaves) foram integradas à protoboard e conectadas através de um cabo a um estimulador programável, de maneira a permitir a seleção de microeletrodos para a aplicação de estímulos elétricos.

4.2.2.3 Testes de desempenho dos protótipos

Foram realizados testes preliminares das interfaces entre o biosensor e o sistema de aquisição de dados convencional preenchendo-se a câmara de cultura do MEA com solução salina padrão à temperatura ambiente e verificando-se a resposta dos microeletrodos à aplicação de estímulo elétrico nessas condições.

4.2.3 Instalação de um sistema MEA

Na terceira etapa, realizou-se a instalação do sistema MEA no Laboratório de Neurociências, conforme mostrado na Figura 4.2. O pré-amplificador foi inicialmente posicionado dentro de uma gaiola de Faraday, como pode ser visto na imagem.



Figura 4.2 *Setup* do sistema MEA: (1) pré-amplificador MEA1060-Inv; (2) controlador de temperatura; (3) microcomputador equipado com conversor de sinais analógico/digital (MC_Card) e softwares TCX-Control, MC_Rack e MC_DataTool.

A localização do equipamento dentro do Laboratório de Neurociências foi avaliada através da análise do nível de ruído do pré-amplificador do sistema MEA

quando este era posicionado dentro ou fora da gaiola de Faraday. Tais medições foram realizadas utilizando-se um modelo de teste que simula um MEA (*test model probe*). Os dados foram adquiridos de maneira contínua em sessões de 60 segundos cada e registrados em formato de 16 bits, com frequência de amostragem de 25 kHz, faixa de entrada de ± 819 mV e ganho de 1200x. Os potenciais registrados pelo software MC_Rack foram exportados no formato ASCII e analisados estatisticamente com o software KaleidaGraph 4.03. Como uma estimativa do nível de ruído, calculou-se o sinal RMS de curtos períodos de tempo (500 ms) de registro de um canal do amplificador em cada situação.

4.2.4 Adaptação de um sistema de perfusão ao MEA

A adaptação de um sistema de perfusão por bomba peristáltica ao sistema MEA comercial instalado foi realizada considerando-se que a experimentação eletrofisiológica na qual a fatia de tecido recebe oxigenação e alimentação constantes através de perfusão permite não apenas a obtenção de padrões de atividade neural fisiologicamente mais realistas, mas principalmente a realização de experimentos de longa duração. Esta etapa foi dividida em duas abordagens distintas, descritas a seguir.

4.2.4.1 Confecção de tampas de silicone biocompatível

Optou-se pela confecção de tampas de silicone biocompatível nas mesmas dimensões do anel de vidro acoplado ao MEA para permitir a fixação de duas agulhas (uma para infusão e outra para efusão de solução eletrofisiológica) junto à câmara de registro do dispositivo. Foram testados diferentes modelos de tampas, buscando-se uma configuração final capaz tanto de estabilizar as agulhas, quanto de vedar a câmara de registro e impedir o vazamento de líquido.

As tampas foram confeccionadas com PDMS (Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit - Dow Corning) sobre diferentes moldes de teflon. Os moldes foram criados a partir de peças de teflon desenhadas com torno mecânico. Os procedimentos de confecção das tampas foram realizados do seguinte modo: despejou-se 8 mL de silicone Sylgard dentro de um tubo de Falcon (capacidade 15mL). Acrescentou-se 800 μ L de agente de cura ao silicone com o auxílio de uma

pipeta micrograduada. A solução foi misturada delicadamente com o auxílio de um bastão de vidro. Após 15 minutos de espera para liberação das bolhas de ar formadas na mistura, despejou-se quantidade suficiente sobre os moldes de teflon (duas agulhas estavam encaixadas previamente sobre os moldes). Os moldes foram então levados a um forno pré-aquecido a 80°C durante 80 minutos para acelerar a cura do silicone. Após a retirada do forno, as tampas foram soltas dos moldes sendo puxadas delicadamente pelas agulhas. Ao final do procedimento, as agulhas permaneceram aderidas à tampa de silicone.

4.2.4.2 Testes de perfusão com bomba peristáltica

Foram realizados testes de perfusão de solução salina padrão na câmara de cultura do MEA com o uso de bomba peristáltica, a fim de: (i) determinar volume de perfusão adequado; (ii) verificar a estabilidade e a capacidade de vedação das tampas de silicone sobre o MEA; e (iii) verificar a influência da perfusão sobre o nível de ruído do sistema.

4.2.5 Definição de procedimentos experimentais com MEAs

A quinta etapa consistiu no estabelecimento de procedimentos experimentais relacionados ao correto manuseio dos arranjos de microeletrodos antes, durante e após a experimentação com material biológico. Tais medidas foram definidas com base em recomendações do fabricante [147].

4.2.6 Experimentação com cultura celular

A sexta etapa consistiu na realização de cultura de células neuronais hipocâmpais dissociadas de camundongos neonatos sobre um arranjo de microeletrodos e na obtenção de registros eletrofisiológicos dessa cultura através do sistema MEA.

4.2.6.1 Observação a aspectos éticos

Os protocolos experimentais utilizados foram submetidos para avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS e seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório, conforme o registro CEUA 13/00340 [148]. Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

4.2.6.2 Dissociação dos neurônios hipocampais

Foram extraídos seis hippocampi de três camundongos com dois dias de vida. Os tecidos foram colocados dentro de um tubo de Falcon de 15 mL contendo: 2 mL de HBSS sem Ca/Mg (GIBCO # 450-1250); 0,035% NaHCO_3 ; 1 mM piruvato; e 10 mM HEPES, com pH 7,4. As células foram dissociadas delicadamente sugando-se dez vezes a suspensão com pipeta de Pasteur. A suspensão resultante foi diluída com: 2 volumes de HBSS com Ca/Mg (GIBCO # 310-4060); 0,035% NaHCO_3 ; 1 mM piruvato; e 10 mM HEPES, com pH 7,4. Após três minutos, o material sobrenadante foi transferido para outro tubo de Falcon de 15 mL utilizando-se uma pipeta de Pasteur e a suspensão de células foi centrifugada por cinco minutos a 200 X g (1200 RPM). O sedimento resultante foi re-suspensão cuidadosamente em 3 mL de HBSS com Ca/Mg. Uma alíquota de suspensão de células foi separada e adicionou-se o mesmo volume de Trypan Blue 0,4%. Obteve-se finalmente uma solução com densidade celular de aproximadamente 2×10^6 células/mL.

4.2.6.3 Preparação do sensor para experimentação

O MEA foi lavado com água destilada e esterilizado com álcool etílico absoluto. Depositou-se 200 μL de solução estoque de polietilenimina (1g de PEI SIGMA diluída em 10 mL de água deionizada) diluída 1/10.000 vezes sobre a área de trabalho dos microeletrodos (essa solução foi utilizada para favorecer a adesão celular ao substrato do sensor). O MEA foi armazenado dentro de placa de Petri autoclavada e em seguida deixado em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar

dentro de sala de cultura celular) por pelos menos 2 horas antes de receber as células.

4.2.6.4 Semeadura dos neurônios sobre o MEA

O MEA foi enxaguado três vezes com água deionizada para retirada do excesso de solução aderente. Depositou-se 400 μL da suspensão contendo 2×10^5 células/mL (em meio Neurobasal suplementado com 2% de suplemento B27) sobre a câmara de cultura do MEA. Uma hora após a semeadura das células, o meio foi substituído por meio Neurobasal suplementado contendo 5 ng/mL de β -FGF (15 μL de β -FGF das alíquotas congeladas + 30 mL de meio Neurobasal suplementado). No quarto dia, retirou-se metade do meio da câmara de cultura e adicionou-se o mesmo volume de meio Neurobasal suplementado com 2% de B27 + 10 ng/mL de β -FGF. Este procedimento foi repetido a cada 4 dias durante 10 dias. O MEA foi mantido em estufa para cultura celular a temperatura constante de 37°C.

4.2.6.5 Obtenção de registros da atividade eletrofisiológica

No 12º dia de cultura, o sensor foi retirado da estufa de cultura celular e encaixado sobre o pré-amplificador do sistema MEA para captação de sinais. Um fio de prata foi imerso na solução de cultura e conectado ao canal terra do pré-amplificador para servir como eletrodo de referência. O controlador de temperatura foi ajustado para a temperatura de 36,5°C. A atividade celular espontânea foi registrada antes e após a troca do meio de cultura por solução eletrofisiológica extracelular contendo (em mM): 140 NaCl; 5 KCl; 2 CaCl₂; 2 MgCl₂; 10 HEPES; e 10 D-Glicose. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com NaOH (10 M) e HCl (1 M). A osmolalidade foi corrigida com sucrose para 312 mOsm. Essa solução foi utilizada com o propósito de alterar a excitabilidade celular através de mudanças nas concentrações iônicas extracelulares e assim favorecer a captação de sinais biológicos.

Os dados foram adquiridos de modo contínuo em sessões de 5 minutos cada e registrados em formato de 16 bits, com frequência de amostragem de 25 kHz, faixa de entrada de ± 819 mV e ganho de 1200x. Ao todo, foram obtidos 6 registros.

4.2.7 Experimentação com fatias de cérebro de roedor

A sétima etapa consistiu na obtenção de registros eletrofisiológicos em fatias de cérebro de rato empregando-se o sistema MEA.

4.2.7.1 Observação a aspectos éticos

Os protocolos experimentais utilizados foram submetidos para avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS e seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório, conforme o registro CEUA 14/00393 [149]. Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

4.2.7.2 Obtenção de fatias de cérebro

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 45 - 50 dias. Cada animal foi decapitado utilizando-se guilhotina. O escalpo foi aberto com a ajuda de uma tesoura e seu encéfalo foi removido. O cérebro foi imerso em solução salina de Ringer de dissecação com a seguinte composição (em mM): 130 NaCl; 3 KCl; 1,2 NaH₂PO₄; 26 NaHCO₃; 10 Glicose; 5 MgCl₂; e 1 CaCl₂. A solução foi mantida a temperatura de 4°C e sob constante oxigenação (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida o encéfalo foi fatiado em cortes coronais de 400 µm de espessura com auxílio de um *vibroslice*. Para descanso das fatias, o material foi imerso em solução de Ringer normal contendo (em mM): 124 NaCl; 5 KCl; 1,2 NaH₂PO₄; 26 NaHCO₃; 10 Glicose; 2 MgSO₄; e 2 CaCl₂, com pH final ajustado para 7,4. As fatias permaneceram em descanso por pelo menos 1 hora antes da obtenção de registros; a solução foi mantida à temperatura ambiente e com oxigenação constante até a finalização do experimento.

4.2.7.3 Preparação dos sensores para experimentação

Dois diferentes componentes foram testados no revestimento dos MEAs previamente à deposição de fatia de tecido: polietilenimina (PEI) e nitrocelulose. Os procedimentos adotados em cada caso foram:

(a) Polietilenimina: o MEA foi lavado com água destilada e em seguida com álcool etílico absoluto e seco com jato de ar. Depositou-se 200 μ L de solução de polietilenimina (1g de PEI SIGMA diluída em 10 mL de água deionizada) diluída 1/100 vezes sobre a área de trabalho dos microeletrodos. Aguardou-se pelos menos 2 horas antes de se enxaguar do sensor com água destilada para retirar o excesso de solução de aderência e então depositar a fatia de tecido sobre o MEA.

(b) Nitrocelulose: o MEA foi lavado com água destilada e em seguida com álcool etílico absoluto e seco com jato de ar. Depositou-se 4 μ L de solução de nitrocelulose (obtida através da diluição de 1 cm² de papel filtro de nitrato de celulose em 10 mL de metanol) sobre a área de trabalho dos microeletrodos. Aguardou-se a evaporação completa do metanol (cerca de 5 minutos) antes de se depositar a fatia de tecido sobre o MEA.

4.2.7.4 Deposição de fatia de tecido sobre o MEA

Utilizando-se uma pipeta de Pasteur, um pequeno pedaço de região cortical de uma fatia de cérebro foi cuidadosamente depositado sobre a área de trabalho dos microeletrodos. A câmara de cultura foi imediatamente preenchida com solução de Ringer normal.

4.2.7.5 Obtenção de registros da atividade eletrofisiológica

O biosensor contendo a fatia de tecido imersa em solução de Ringer normal foi acoplado ao pré-amplificador do sistema MEA. O controlador de temperatura foi ajustado para 34,5^o C. Quando empregado um sensor modelo MEA60 200 3D, um fio de prata foi imerso na solução e conectado ao canal terra do pré-amplificador para servir como eletrodo de referência. No caso dos sensores modelo MEA60 200 3D GND, conectou-se o eletrodo de referência do microcircuito ao canal terra do pré-amplificador.

No total, foram realizados experimentos com 23 fatias. De 9 fatias obteve-se apenas o registro da atividade espontânea (fatia banhada com solução de Ringer normal); do restante (14 fatias) obteve-se o registro da atividade espontânea e da atividade evocada conforme o seguinte procedimento: a atividade eletrofisiológica da amostra foi registrada antes e após a troca da solução de Ringer normal por duas soluções excitatórias, com o propósito de alterar a excitabilidade do tecido através de mudanças nas concentrações iônicas extracelulares. Ambas as composições (em mM) foram:

(a) Solução 1: 12,5 NaCl; 0,25 KCl; 0,1 MgCl₂.6H₂O; 0,125 NaH₂PO₄; 0,2 CaCl₂.2H₂O; 25 Glicose; e 25 NaHCO₃, com pH final ajustado para 7,4.

(b) Solução 2: 12,5 NaCl; 0,25 KCl; 1 MgCl₂.6H₂O; 0,125 NaH₂PO₄; 0,05 CaCl₂.2H₂O; 25 Glicose; e 25 NaHCO₃, com pH final ajustado para 7,4.

Nota-se que a solução 2 apresenta alta concentração de íons Mg⁺² e baixa concentração de íons Ca⁺² quando comparada à solução 1, apresentando assim efeito excitatório mais pronunciado [150]. Os dados foram adquiridos de maneira contínua em sessões de 60 segundos cada e registrados em formato 16 bits, com frequência de amostragem de 25 kHz, faixa de entrada de ± 819 mV e ganho de 1200x. Ao todo, foram obtidos 380 registros.

4.2.8 Análise e validação dos registros

Esta etapa foi conduzida com o propósito de elucidar os principais parâmetros envolvidos na experimentação com MEAs e validar os dados obtidos como pertinentes à experimentação extracelular em Eletrofisiologia com arranjos de microeletrodos. Os registros foram processados através do software MC_Rack.

4.2.8.1 Influência dos parâmetros de processamento na análise de dados

Verificou-se a influência da aplicação de filtro digital (Butterworth de segunda ordem) com quatro diferentes faixas de frequência (300Hz-3kHz; 300Hz-5kHz; 500Hz-3kHz; e 500Hz-5kHz) e dos limiares de detecção de potenciais de ação (*spikes*) sobre os potenciais registrados pelos sensores preenchidos com solução PBS e com deposição de material biológico. Para tanto, os sinais filtrados foram submetidos à identificação de possíveis potenciais de ação pelo “método do limiar de

amplitude” (*amplitude threshold*) empregando-se a ferramenta Spike Sorter. Diferentes valores de limiar foram investigados, variados unitariamente de $-2 \mu\text{V}$ a $-16 \mu\text{V}$. A partir dos potenciais detectados, utilizando-se a ferramenta Analyzer, se obteve como parâmetro de análise o número total de picos que atingiram cada valor de limiar estipulado. Uma vez que a ferramenta Analyzer é um instrumento para análise estatística de dados baseado em intervalos discretos de tempo (bins), assumiu-se como janela de tempo (bin) para extração do número de picos o valor de 1 segundo.

Além disso, aplicou-se filtro digital (Butterworth de segunda ordem) passa-baixa (para análise de frequências abaixo de 100 Hz) e passa-alta (para frequências acima de 100 Hz) nos registros brutos obtidos com preparação biológica, com o propósito de separar o sinal nos seus componentes de diferentes frequências e assim identificar possíveis potenciais de ação, distinguindo-os de oscilações coletivas da rede neural (potenciais de campo locais).

Os dados extraídos do software MC_Rack foram convertidos para o formato ASCII. A geração de gráficos a partir desses dados foi realizada com os softwares Microsoft Excel 2007 e KaleidaGraph 4.03. Com base nos resultados obtidos nesta etapa, foram definidos os valores de faixa de frequência para filtragem do sinal e de limiar para detecção de potenciais de ação mais adequados para análise dos registros obtidos com material biológico, conforme descrito no item a seguir.

4.2.8.2 Registros com material biológico

Os registros obtidos em cada experimento foram agrupados com o software MC_DataTool e reintroduzidos para análise no software MC_Rack. Oscilações de baixa frequência e possíveis ruídos de alta frequência foram removidos do sinal registrado através da aplicação de filtro digital (Butterworth de segunda ordem) com faixa de frequência de 300Hz-5kHz. Os sinais filtrados foram submetidos à identificação de potenciais de ação (*spikes*) pelo “método do limiar de amplitude” (*amplitude threshold*) empregando-se a ferramenta Spike Sorter. Assumiu-se como limiar de detecção de *spikes* o valor de menos quatro vezes o desvio-padrão (-4σ) em torno da média da largura de banda do ruído de fundo (*noise bandwidth*) em cada canal, tendo sido este valor estimado automaticamente pelo software MC_Rack.

Além disso, assumiram-se os seguintes intervalos de tempo limite para detecção dos *spikes* (*spike cutoff*): 1ms (*pré-trigger*), 1 ms (*pós-trigger*) e 2 ms (*dead time*). Após, utilizando-se a ferramenta Analyzer, foram extraídos os seguintes parâmetros de análise dos potenciais detectados:

- Número de *spikes* (*spike number*): número total de picos que cruzaram o limiar estipulado dentro da janela de tempo;
- Frequência de atividade (*spike rate*): número de *spikes* detectados na janela de tempo por segundo (frequência em hertz);
- Amplitude pico-a-pico (*peak-to-peak amplitude*): diferença entre o maior e o menor potencial relativos ao maior *spike* detectado dentro da janela de tempo.

Uma vez que a ferramenta Analyzer é um instrumento para análise estatística de dados baseado em intervalos discretos de tempo (bins), assumiu-se como janela de tempo para extração dos parâmetros analisados o valor de bin de 1segundo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos em cada etapa são apresentados e discutidos a seguir.

5.1 Caracterização dos arranjos de microeletrodos

5.1.1 Configuração espacial e composição química

A Figura 5.1 apresenta a estrutura de um microchip MEA, na qual é possível identificar o (a) substrato de vidro colado sob a (b) placa de circuito impresso (PCI). A imagem mostra a parte inferior do dispositivo, onde é possível observar na região delimitada por (c) a conexão entre os 60 eletrodos do microcircuito com a PCI. A imagem mostra a parte inferior do dispositivo, onde é possível observar na região delimitada por (c) a conexão entre os 60 eletrodos do microcircuito com a PCI.

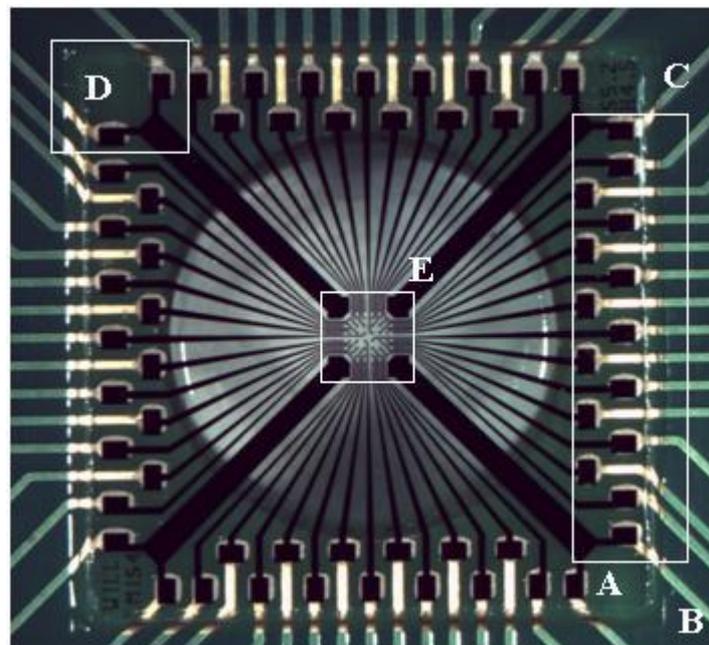


Figura 5.1 Visão geral do microcircuito de um MEA (sensor customizado): (a) substrato de vidro; (b) placa de circuito impresso (PCI); (c) região de conexão entre as trilhas dos microeletrodos e a PCI; (d) um dos quatro pares de eletrodos de referência; (e) região dos microeletrodos (área de trabalho).

O dispositivo apresentado é do tipo sensor customizado, assim nota-se (d) pares de eletrodos que se combinam na (e) região central do microcircuito (área de trabalho dos microeletrodos) para formar eletrodos de referência. Essa região central é ampliada na Figura 5.2, que mostra uma imagem obtida a partir do lado superior do MEA (lado sobre o qual a preparação biológica é depositada).

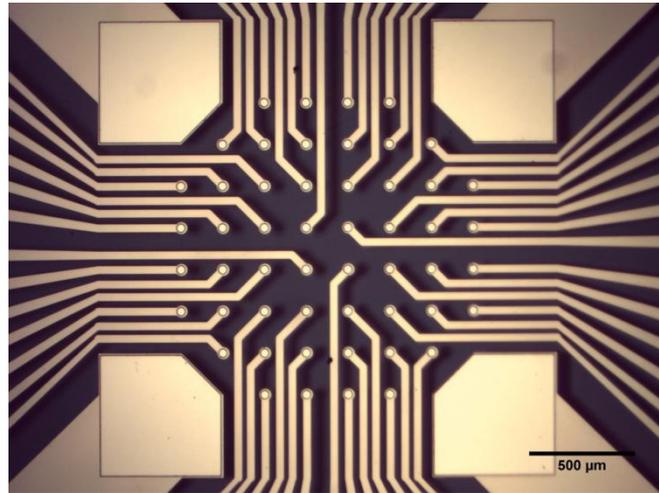


Figura 5.2 Arranjo de microeletrodos de um sensor customizado mostrado por microscopia óptica.

A imagem permite identificar o arranjo dos microeletrodos que formam a parte central do microcircuito, dispostos de maneira simétrica. Os eletrodos menores (circulares) são os de estimulação e registro, enquanto os eletrodos maiores (dos cantos) são os de referência. De maneira semelhante, a Figura 5.3 mostra a disposição dos microeletrodos de um sensor modelo MEA60 200 Pt.

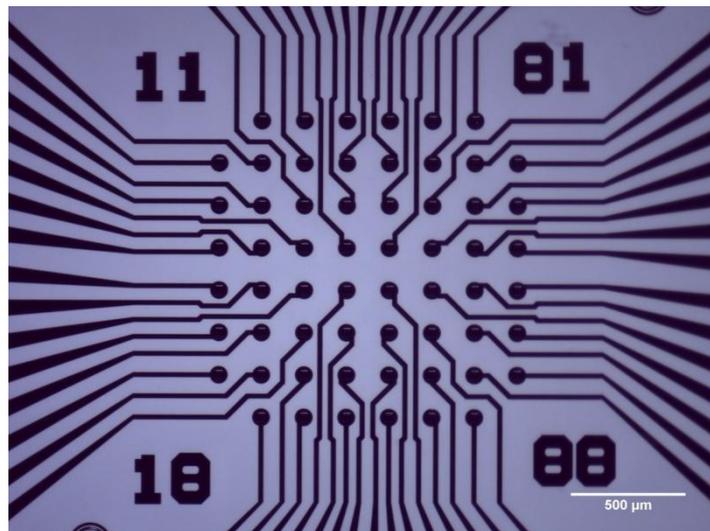


Figura 5.3 Imagem por microscopia óptica de um arranjo de microeletrodos modelo MEA60 200 Pt.

A Figura 5.4 exibe a imagem de um sensor modelo MEA60 200 3D GND, onde o eletrodo maior (retangular, canto inferior esquerdo da imagem) é o eletrodo de referência.

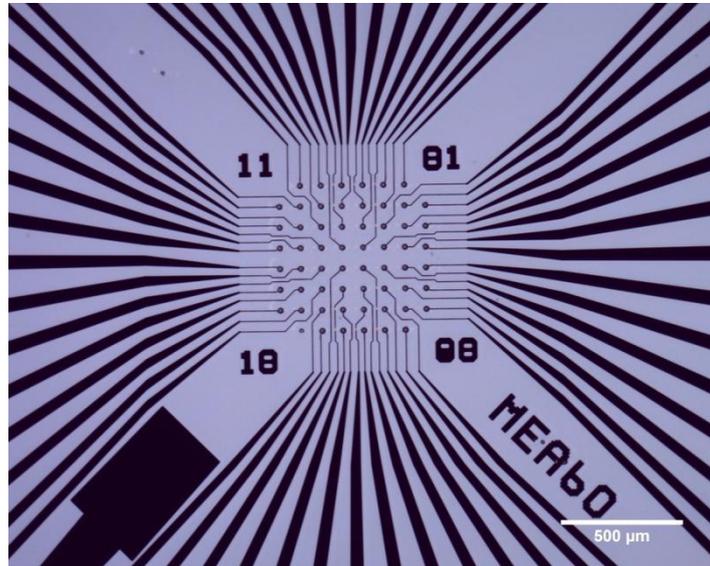


Figura 5.4 Imagem por microscopia óptica de um sensor modelo MEA60 200 3D GND.

Quanto à obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV), optou-se por realizar as imagens de apenas um dos sensores disponíveis, pois a deposição de camada metálica altera o microcircuito do MEA e impossibilita o uso do dispositivo em experimentos eletrofisiológicos. Foram então obtidas imagens por MEV de um dos sensores customizados, considerando-se também que a ausência de anel de vidro sobre esses dispositivos facilitou o procedimento.

As imagens obtidas por MEV no modo SE permitiram obter informações sobre a topografia do arranjo de microeletrodos devido ao contraste em função do relevo, enquanto as imagens obtidas no modo BSE forneceram informações sobre a composição do dispositivo devido ao contraste em função do número atômico dos elementos.

As imagens mostradas na Figura 5.5 apresentam a mesma perspectiva geral do arranjo dos microeletrodos obtida na imagem por microscopia óptica (Figura 5.2), porém a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura nos modos SE e BSE. A imagem (b) por BSE permite inferir que os microeletrodos e as trilhas do microcircuito são formados por elementos com maior peso atômico em relação ao substrato de vidro, formado por elementos com pesos atômicos mais baixos.

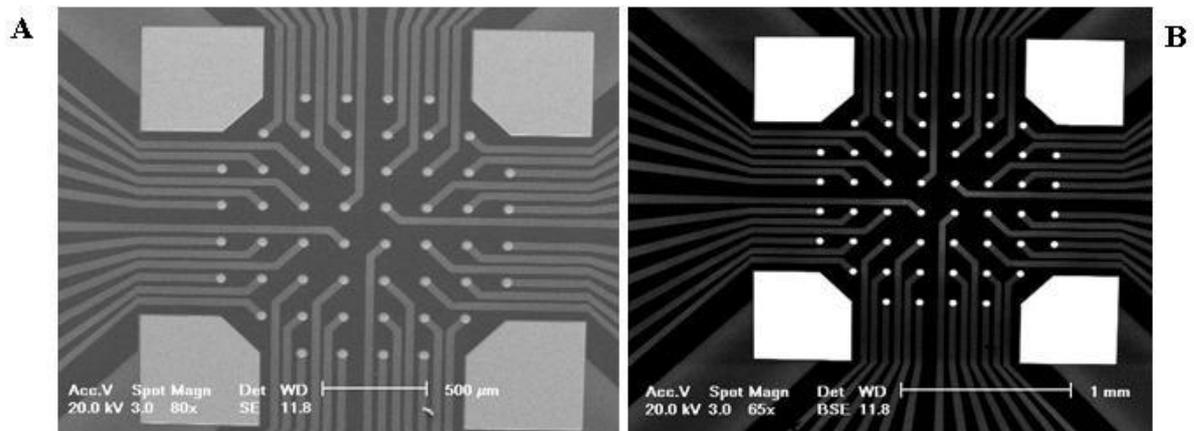


Figura 5.5 Imagens por microscopia eletrônica de varredura nos modos (a) SE e (b) BSE de um MEA.

As imagens da Figura 5.6 também foram obtidas nos modos SE e BSE, porém exibem com maior detalhe um dos microeletrodos de estimulação e registro (região circular central). A imagem (a) por SE evidencia a geometria planar e circular do microeletrodo, enquanto a imagem (b) por BSE evidencia o contraste entre o microeletrodo e a trilha do microcircuito.

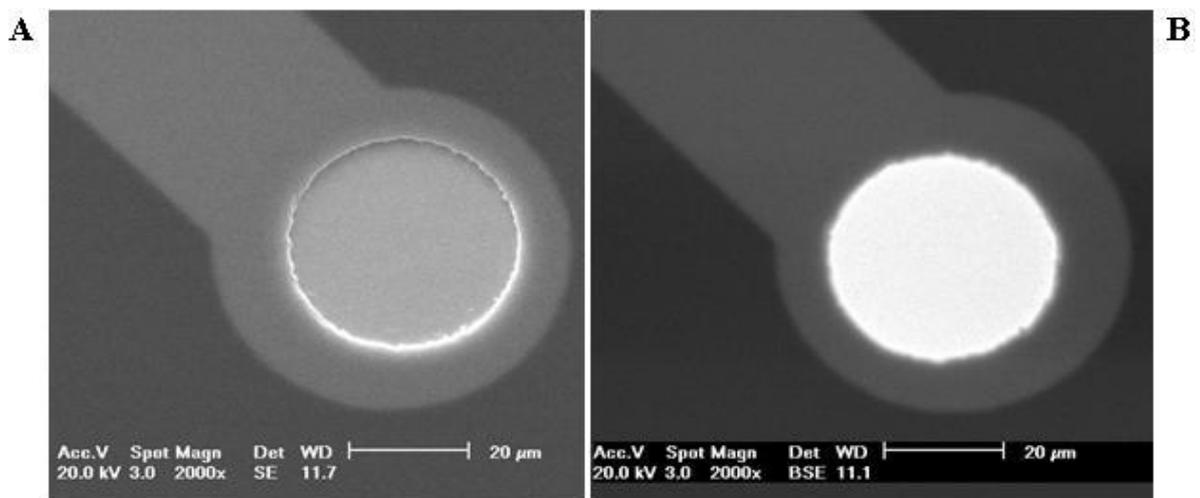


Figura 5.6 Detalhe de um microeletrodo de estimulação e registro do arranjo. Imagens obtidas por MEV nos modos (a) SE e (b) BSE.

A identificação qualitativa dos elementos químicos presentes no MEA foi feita por EDS, avaliando-se a composição de três regiões distintas do dispositivo: microeletrodo de estimulação/registro, trilha do microcircuito e substrato. Os gráficos obtidos são mostrados a seguir e representam o número de contagens (eixo y) por energia (eixo x) da ordem de kilovolts (kV).

Conforme mostrado na Figura 5.7, os resultados indicaram predominância de platina (Pt) no microeletrodo (gráfico a) e predominância de ouro (Au) na trilha do microcircuito (gráfico b), com presença, porém em quantidades menores, de carbono (C) e oxigênio (O).

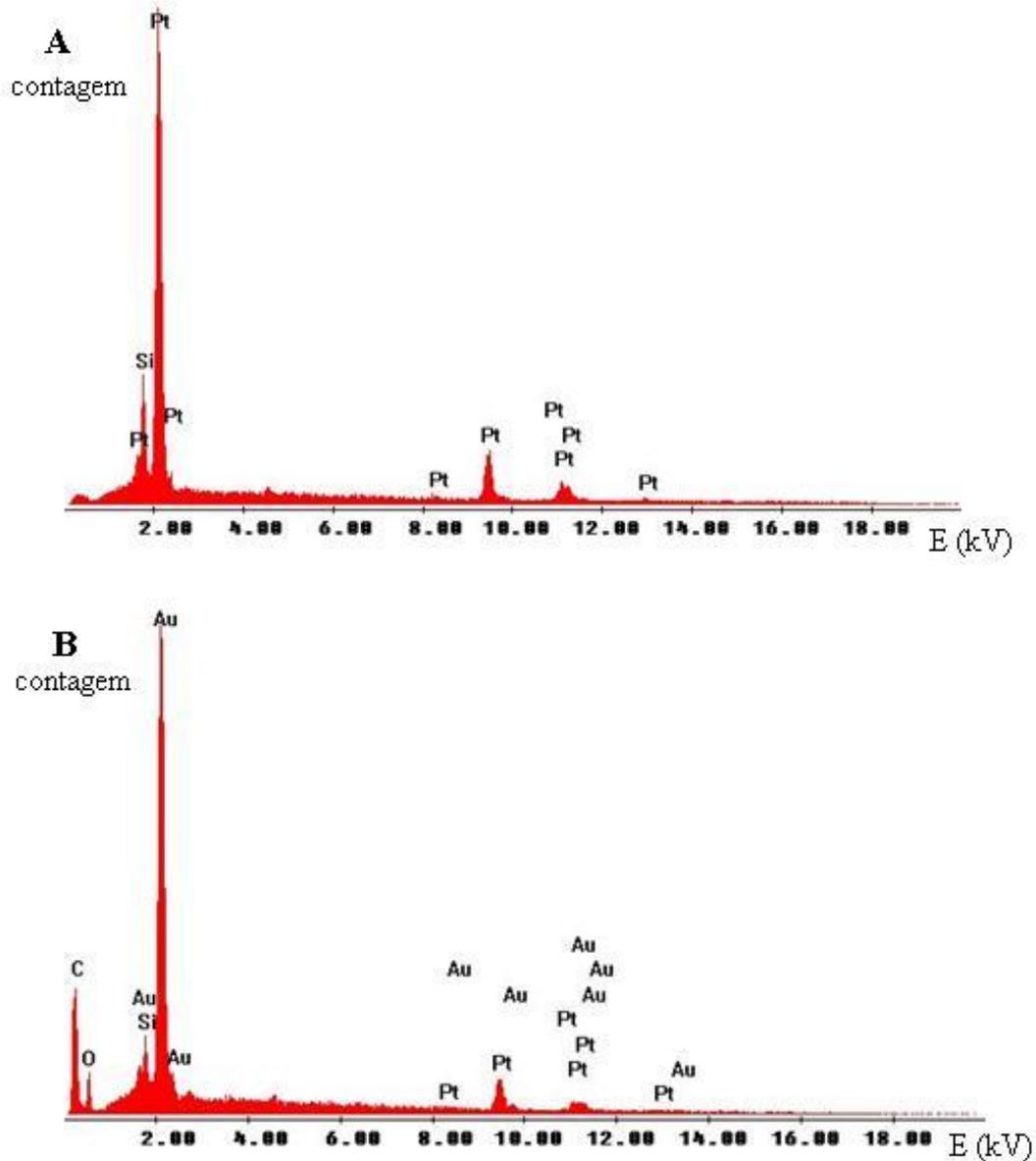


Figura 5.7 Identificação por EDS da composição química de (a) microeletrodo e (b) trilha do microcircuito de um MEA customizado.

A caracterização por EDS do substrato é mostrada na Figura 5.8 e indicou a predominância de silício (Si). A presença de ouro (Au) na composição do substrato é possivelmente referente à metalização do dispositivo.

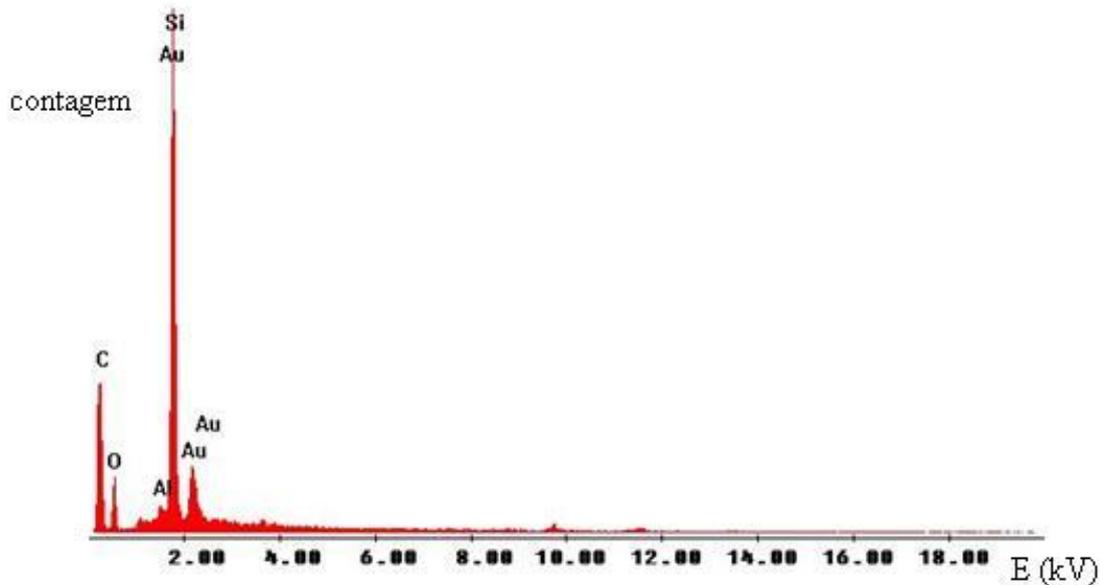


Figura 5.8 Identificação por EDS da composição do substrato do microchip de um MEA customizado.

5.1.2 Caracterização elétrica

O controle inicial do nível de ruído dos microeletrodos, realizado através da observação dos potenciais registrados com o MEA preenchido por solução PBS, possibilitou uma avaliação geral do estado dos sensores e permitiu a identificação de microeletrodos defeituosos (com alto nível de ruído). O valor RMS estimado, considerando-se o cálculo a partir do sinal registrado por um microeletrodo não-defeituoso em cada sensor, variou de 2,7 μV a 4,9 μV ($n = 12$; média = 3,6 μV ; desvio-padrão = 0,6 μV). Essa análise foi feita considerando-se o sinal bruto (*raw data*), ou seja, sem filtragem dos dados.

O sensor MEAG1331 foi descartado da experimentação com material biológico por apresentar todo o seu microcircuito comprometido, possivelmente devido a um processo de microfabricação inadequado. O valor RMS calculado neste sensor foi de 675,1 μV . Três dispositivos apresentaram microeletrodos defeituosos: MEAG5002 (microeletrodo 54); MEAO1299 (microeletrodos 23, 37, 38, 45 e 46); e MEAG1336 (microeletrodos 47, 48, 55, 56, 57, 58, 66, 67, 68, 77, 78 e 88). Contudo, esses dispositivos foram empregados em experimentação porque os demais microeletrodos mostraram níveis normais de ruído. Os sinais captados pelos canais com defeito foram excluídos da análise de dados.

Os registros captados pelo sensor MEAO1299 são exibidos na Figura 5.9, onde é possível visualizar que os microeletrodos 23, 37, 38, 45 e 46 apresentam nível de ruído aumentado em relação ao resto do microcircuito.

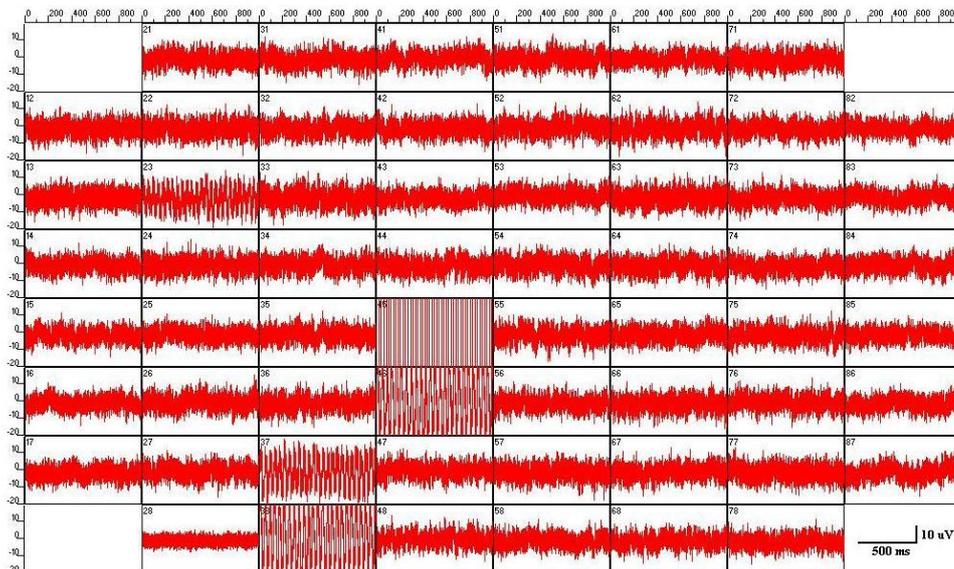


Figura 5.9 Registro do nível de ruído (dado bruto) de um MEA preenchido com solução PBS, exibindo microeletrodos defeituosos (canais 23, 37, 38, 45 e 46). Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 20 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1000 ms).

Os demais sensores demonstraram níveis típicos de ruído em todos os microeletrodos, a exemplo do sensor MEAO1302, cujos registros são exibidos na Figura 5.10.

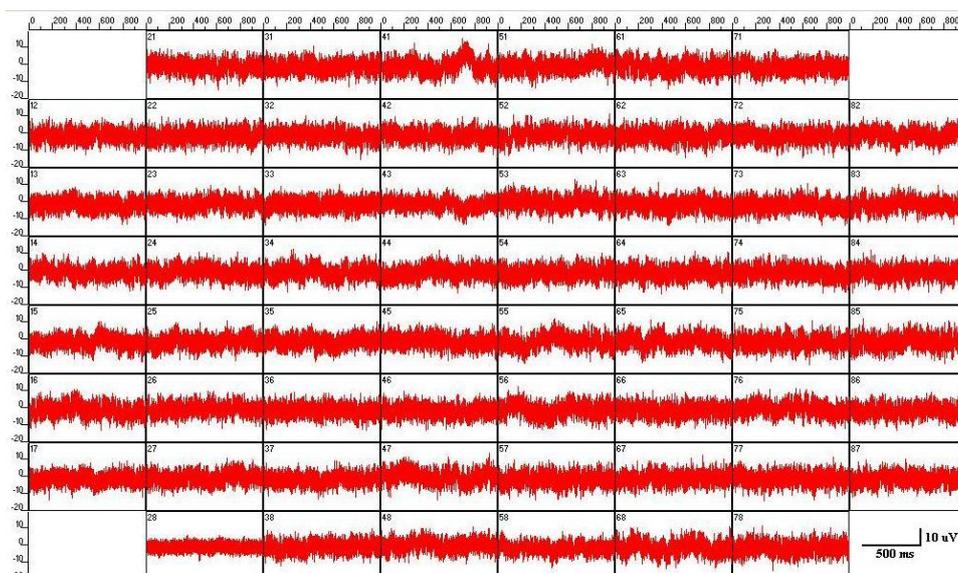


Figura 5.10 Registros típicos do nível de ruído (dado bruto) dos microeletrodos de um MEA preenchido com solução PBS. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 20 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1000ms).

Nota-se que o microeletrodo 28 apresenta potenciais ligeiramente menores por ser este o eletrodo interno de referência do microcircuito e estar conectado ao canal terra do pré-amplificador. Em todos os registros obtidos com sensores modelo MEA60 200 3D GND, excluíram-se das análises de dados o sinal captado pelo microeletrodo 28.

Salienta-se a importância da identificação dos microeletrodos defeituosos previamente à experimentação com material biológico para que o sinal captado nesses canais não seja erroneamente interpretado como atividade eletrofisiológica. Além disso, a exclusão da obtenção de registros nesses canais permite a condução de um experimento que exige menor desempenho computacional e poupa espaço em disco para a gravação dos dados, considerando-se que no sistema MEA cada microeletrodo constitui um canal independente.

5.2 Interfaceamento entre o MEA e um sistema de aquisição de dados convencional

Foram construídos dois diferentes protótipos de interfaces, conforme descrito nos procedimentos experimentais. A estrutura comum aos dois protótipos é exibida na Figura 5.11, que mostra configuração final do conjunto formado pelos cabos IDE, a *proto-board* e os cabos de áudio.

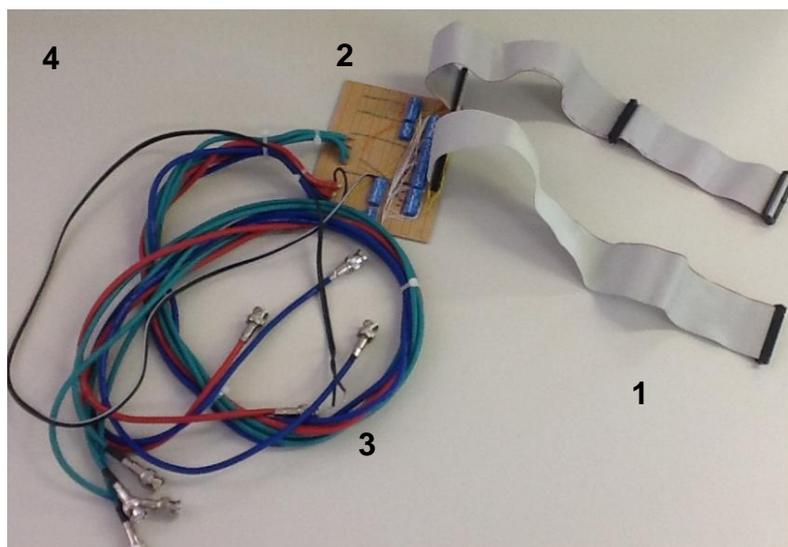


Figura 5.11 Parte da interface eletrônica para conexão com sistema de aquisição de dados convencional: (1) cabos IDE; (2) proto-board com chaves dip switch; (3) cabos com terminais BCN; (4) cabo para conexão com fixador de corrente.

No protótipo 1, os cabos IDE mostrados na Figura 5.11 foram diretamente soldados a um dispositivo MEA. No protótipo 2, os cabos IDE foram conectados à interface mecânica-eletrônica mostrada na Figura 5.12, sendo o arranjo de microeletrodos encaixado na região central da placa. O desenho esquemático desta interface se encontra no Anexo A deste trabalho.

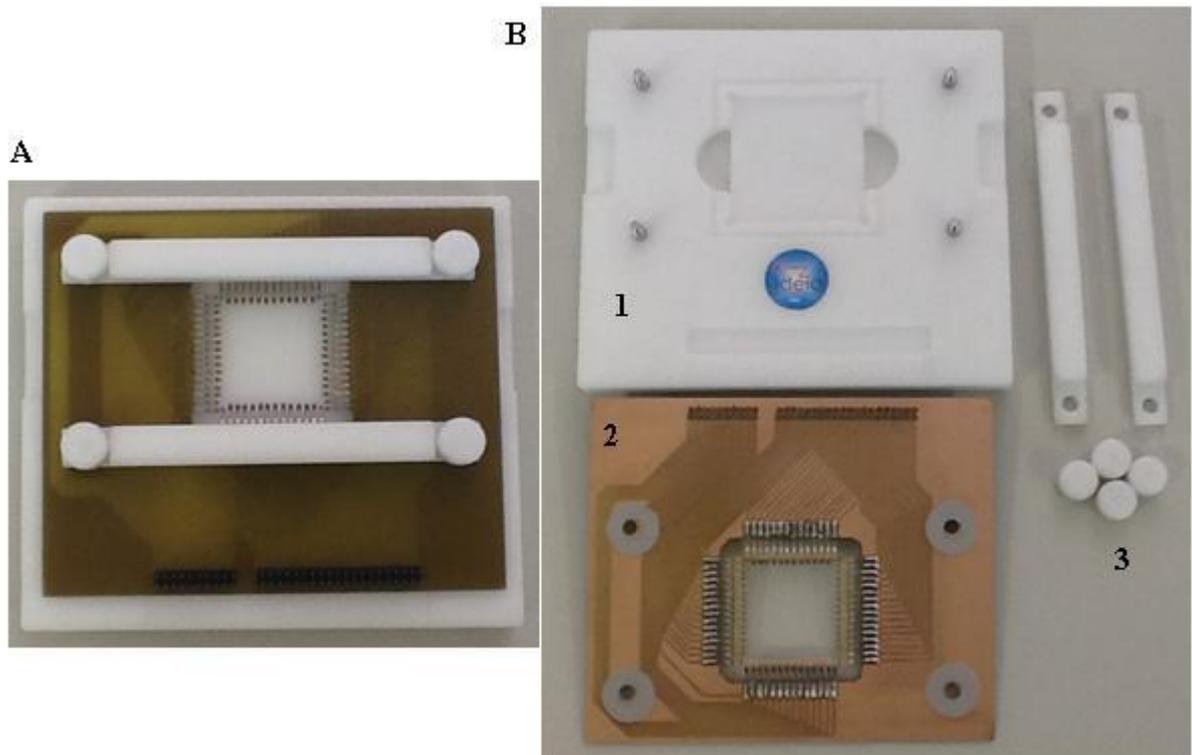


Figura 5.12 Interface mecânica-eletrônica (protótipo 2): (a) montagem final (vista superior); (b) estrutura desmontada: (1) placa de poliacetal; (2) placa de circuito impresso (vista inferior); (3) conectores.

A interface total construída para conectar o dispositivo MEA ao sistema de aquisição de dados convencional através do protótipo 2 pode ser vista a seguir na Figura 5.13. Testes de desempenho da interface eletrônica constataram o correto funcionamento de ambos os protótipos, que foram capazes de captar estímulos elétricos em todos os microeletrodos do arranjo.

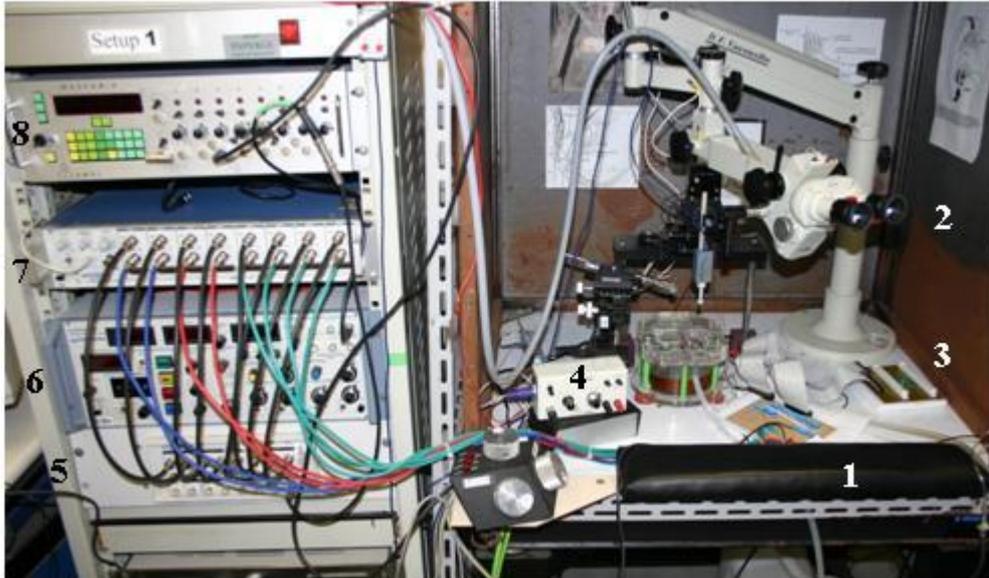


Figura 5.13 Fotografia do arranjo experimental final conectando o MEA ao sistema de aquisição de dados convencional: (1) mesa antivibracional; (2) gaiola de Faraday; (3) interface mecânica-eletrônica (protótipo 2); (4) fixador de corrente; (5) conversor analógico-digital; (6) amplificador; (7) condicionador de sinais; (8) estimulador programável.

No entanto, observou-se a influência de ruído de baixa frequência nos registros, conforme mostra a Figura 5.14-a. Tal ruído é possivelmente causado pelos demais equipamentos eletrônicos presentes no laboratório, e foi eliminado posicionando-se a interface dentro da gaiola de Faraday (Figura 5.14-b).

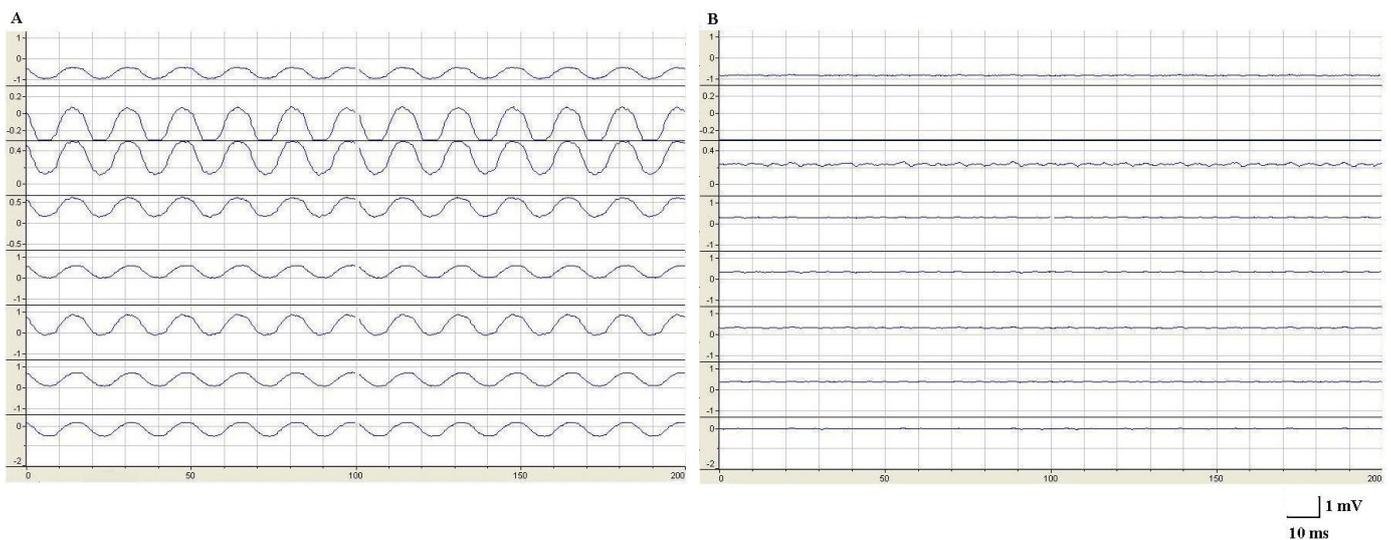


Figura 5.14 Análise *off-line* dos registros com software Clampfit 9.2 exibindo influência de ruído de baixa frequência quando a interface eletrônica era posicionada (a) fora da gaiola de Faraday. Quando dentro da gaiola (b) tal ruído não era detectado.

5.3 Instalação de um sistema MEA

O posicionamento do sistema MEA no Laboratório de Neurociências foi avaliado através da análise do nível de ruído do pré-amplificador quando este se localizava dentro ou fora de uma gaiola de Faraday. Em ambas as situações obtiveram-se registros semelhantes: os potenciais se mostraram dentro do indicado pelo fabricante como padrão ($\pm 8 \mu\text{V}$) e o valor RMS estimado foi equivalente a $2,7 \mu\text{V}$. Os registros brutos são mostrados na Figura 5.15.

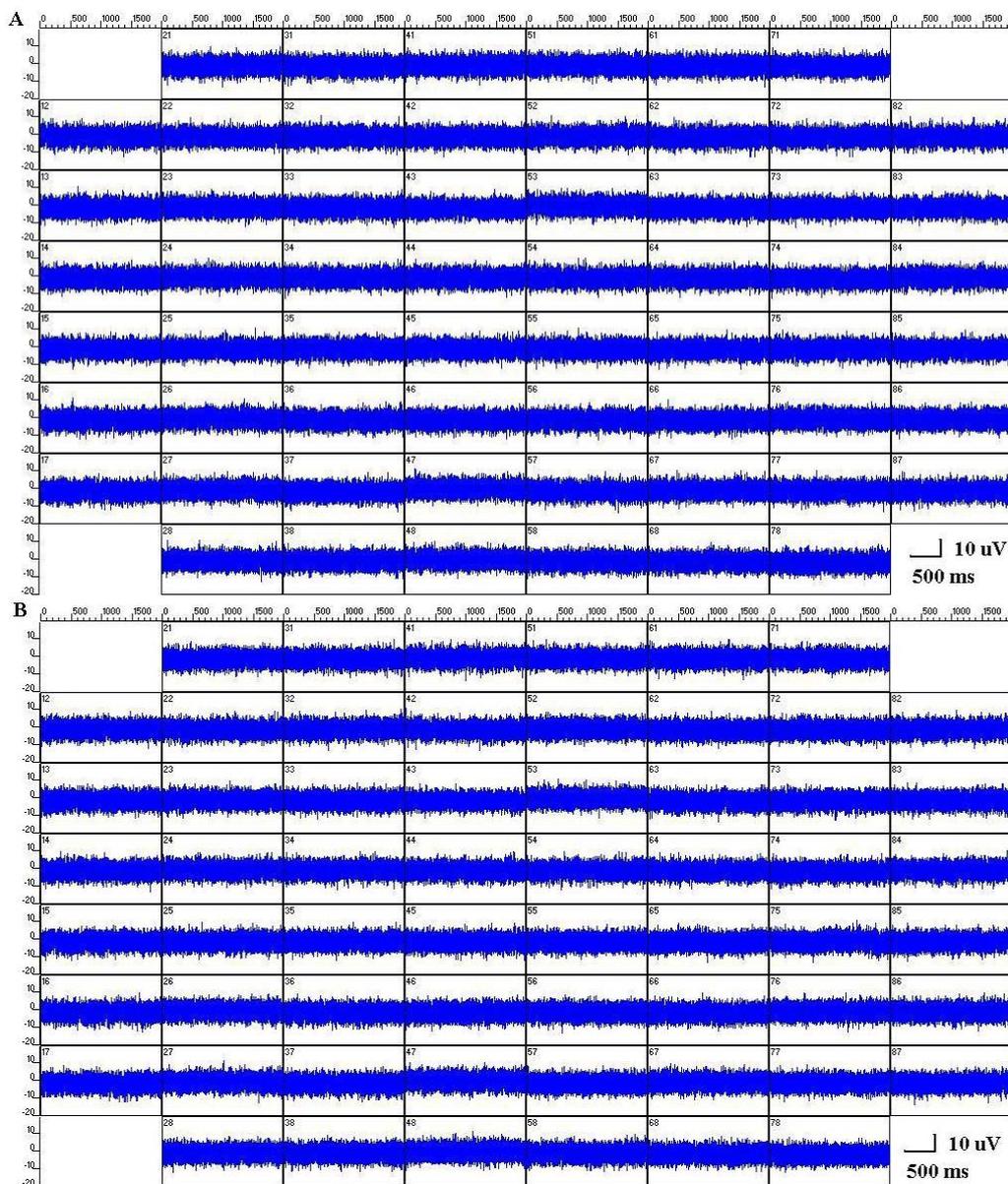


Figura 5.15 Registros do nível de ruído do pré-amplificador do sistema MEA: (a) fora da gaiola de Faraday; (b) dentro da gaiola de Faraday. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 20 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms).

Os registros podem ser vistos com maiores detalhes observando-se os gráficos da Figura 5.16, que exibem o sinal captado apenas pelo microeletrodo 44 em ambas as configurações (dentro e fora da gaiola de Faraday).

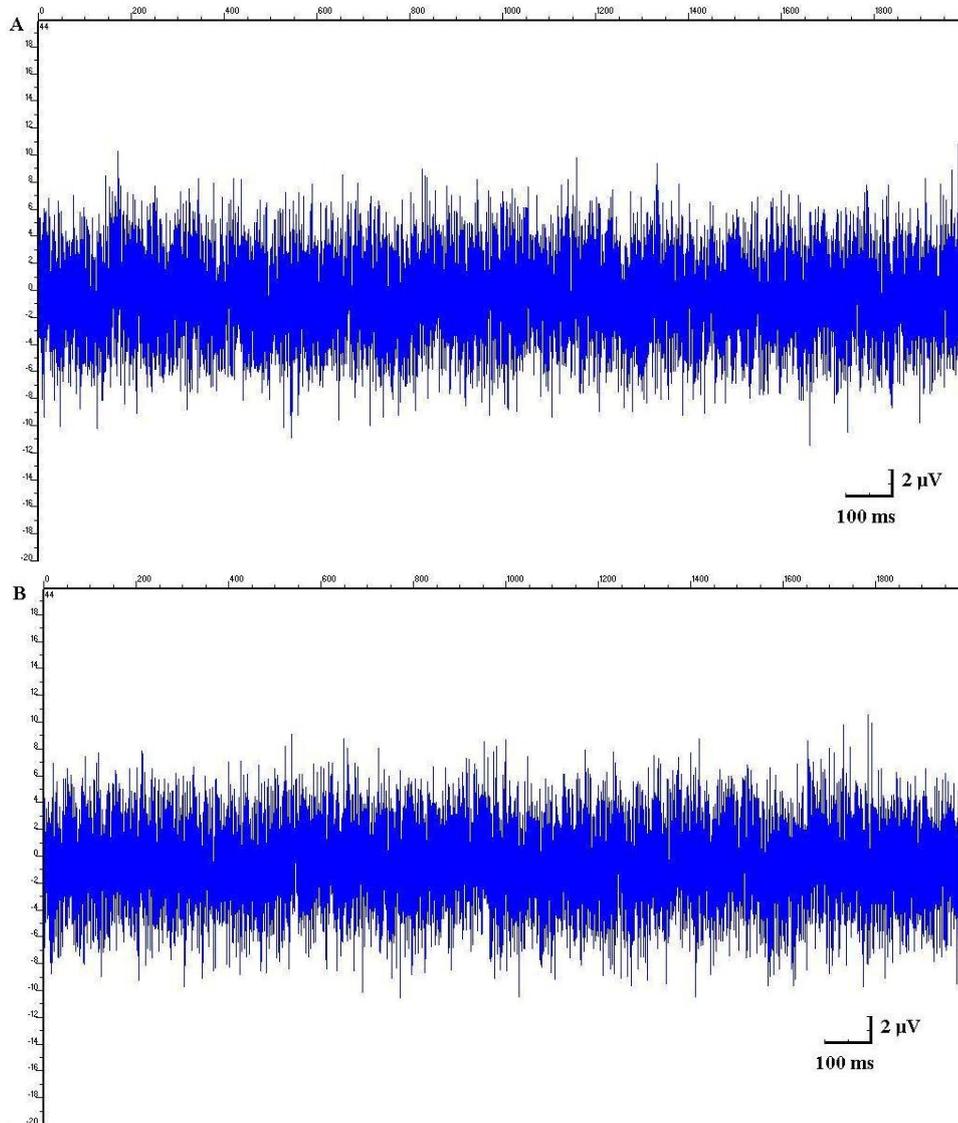


Figura 5.16 Registros do nível de ruído do pré-amplificador do sistema MEA captados pelo microeletrodo 44: (a) fora da gaiola de Faraday; (b) dentro da gaiola. Os gráficos representam o potencial (escala $\pm 20 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms).

Desta forma, sem a necessidade de o pré-amplificador estar localizado dentro da gaiola de Faraday, constatou-se a possibilidade de conduzir experimentos em diferentes espaços do laboratório, o que representou mais uma vantagem do sistema MEA em relação ao sistema de aquisição de dados convencional.

5.4 Adaptação de um sistema de perfusão ao MEA

As tampas de PDMS confeccionadas são mostradas na Figura 5.17. O modelo com menor espessura (imagem b) se mostrou mais estável sobre o MEA.



Figura 5.17 Tampas confeccionadas em PDMS para encaixe sobre o MEA.

Essas tampas foram encaixadas sobre o MEA conforme demonstrado na imagem (a) da Figura 5.18. As agulhas foram acopladas a cânulas de perfusão conectadas a uma bomba peristáltica para que os níveis de perfusão adequados pudessem ser verificados, de modo a evitar vazamento de líquido sobre o dispositivo (imagem b). Constatou-se que a perfusão pode ser adequadamente realizada até o fluxo máximo de 10 ml/min.

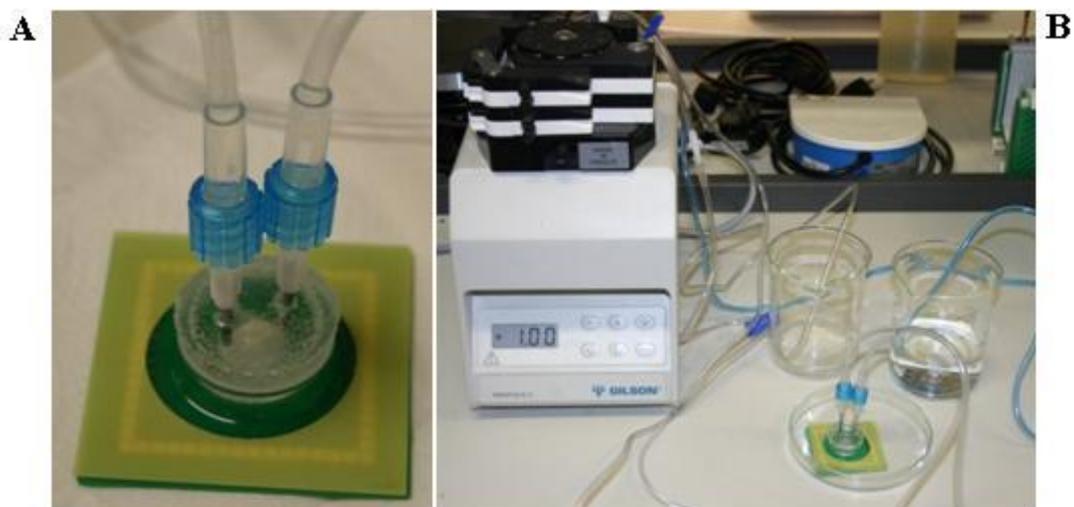


Figura 5.18 (a) Tampa de PDMS com agulhas acopladas a um MEA. (b) Montagem experimental do sistema de perfusão com bomba peristáltica.

Em seguida, foram realizados testes de perfusão combinando-se a bomba peristáltica com o sistema MEA, conforme mostra a Figura 5.19.



Figura 5.19 Montagem experimental da bomba de perfusão com o sistema MEA.

No entanto, testes empregando fatias de tecido depositadas sobre o arranjo de microeletrodos mostraram que essa configuração experimental não é adequada para realização de perfusão com o sistema MEA, pois os distúrbios mecânico (flutuação da fatia devido ao fluxo de líquido) e eletrônico introduzidos no sistema pela bomba de perfusão causaram elevado nível de ruído nos registros obtidos, conforme mostra a Figura 5.20.

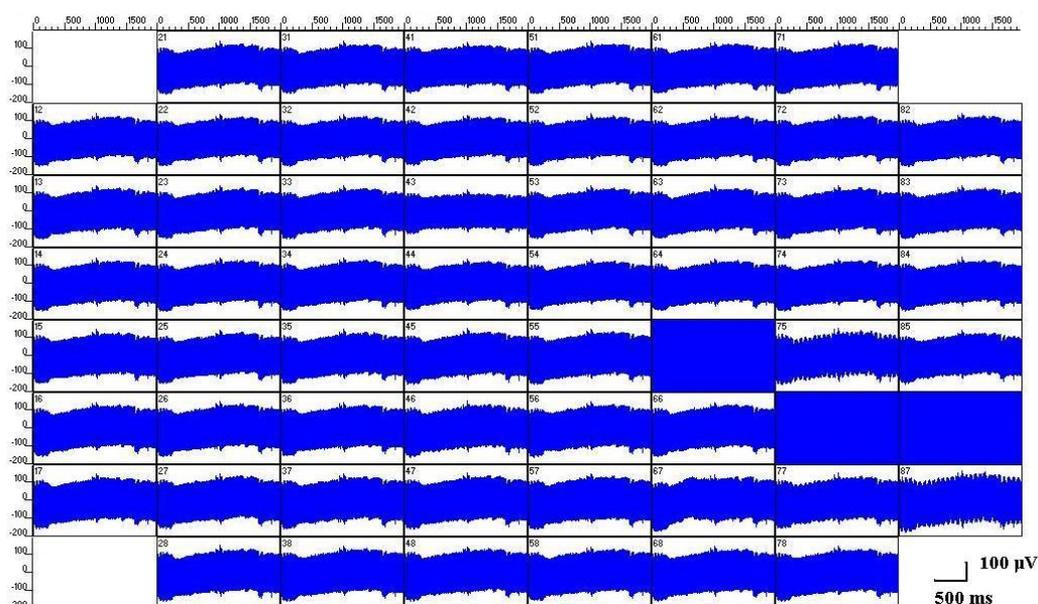


Figura 5.20 Registros obtidos com software MC_Rack durante perfusão por bomba peristáltica adaptada ao sistema MEA. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 200\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms).

O gráfico exibido na Figura 5.20 mostra o sinal registrado (*raw data*) em todos os microeletrodos do arranjo durante perfusão de solução de Ringer normal sobre uma fatia de cérebro de rato. Após alguns minutos de perfusão, a fatia flutuou dentro da câmara de registro do MEA. Nota-se que os registros obtidos pelos microeletrodos 65, 76 e 86 estão saturados em relação à escala mostrada no gráfico. Nos demais microeletrodos, os potenciais registrados foram de aproximadamente $\pm 100 \mu\text{V}$. O registro pode ser mais bem observado no gráfico da Figura 5.21, que exhibe o sinal captado apenas pelo microeletrodo 55.

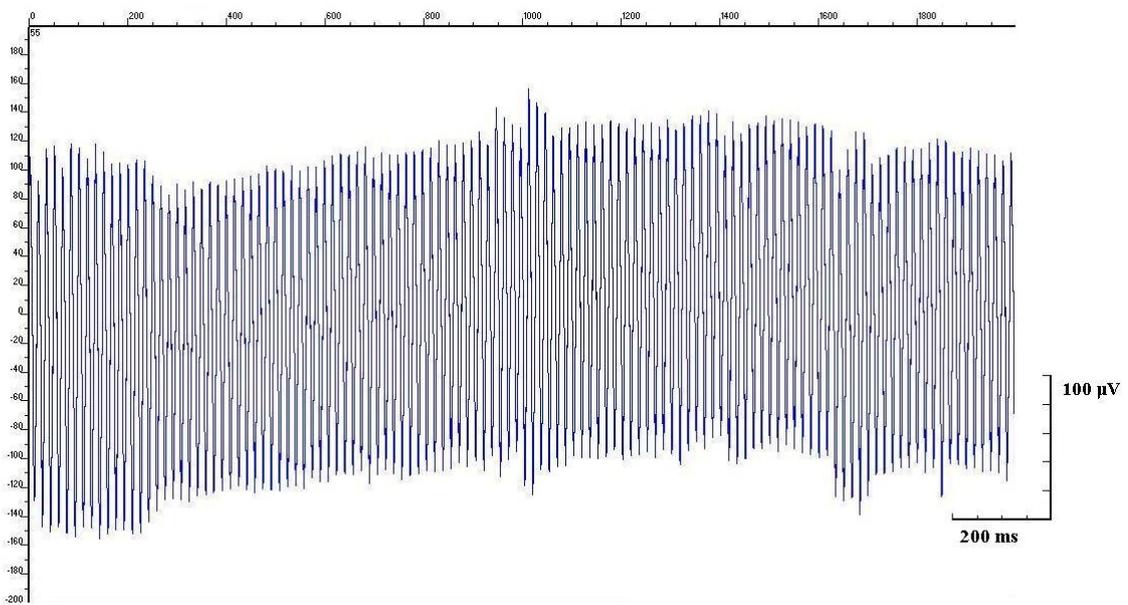


Figura 5.21 Representação do sinal captado pelo microeletrodo 55 durante perfusão. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 200 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms).

5.5 Definição de procedimentos experimentais com MEAs

Os procedimentos experimentais recomendados a fim de se prolongar a vida útil dos arranjos de microeletrodos e de se otimizar a experimentação com preparação biológica foram descritos em documento para uso interno no Laboratório de Neurociências.

5.6 Análise e validação dos registros obtidos

A experimentação extracelular em eletrofisiologia com o uso de arranjos de microeletrodos é normalmente conduzida com o propósito de detectar potenciais de ação (individuais ou em seqüências rápidas em padrões organizados, chamadas de *bursts*) e relacionar sua distribuição espacial e temporal às propriedades da rede neural investigada. Nesses experimentos, a atividade neuronal é registrada ao longo de um número finito de instantes na presença constante de ruído, de modo que os potenciais de ação (*spikes*) detectados se apresentam como pequenos sinais em meio ao registro bruto (*raw data*), que geralmente é dominado por atividade de baixa freqüência [50]. Por conseguinte, a primeira etapa básica tipicamente envolvida na análise desses registros neuronais extracelulares é a filtragem do sinal.

A aplicação de filtros é capaz de diminuir o ruído de fundo, assim melhorando a razão sinal-ruído do registro, e de separar o sinal nos seus componentes de diferentes freqüências. Conforme elucidado anteriormente, nos registros extracelulares a parte do sinal contendo altas freqüências detém informação sobre a atividade de neurônios (deflagrando potenciais de ação) localizados na proximidade dos microeletrodos, enquanto as baixas freqüências (de até 500 Hz) contêm informação sobre o potencial de campo local (relacionado a processos integrativos da rede neural) [47]. Desta forma, a escolha da faixa de freqüências na aplicação de filtros digitais durante o processamento de registros obtidos com MEAs depende primariamente do tipo de informação que se pretende extrair do sinal registrado, da freqüência esperada de atividade do material biológico em estudo e da qualidade do registro obtido.

Embora esteja bem documentado na literatura que a aplicação de filtros cause distorções no formato dos *spikes* detectados [49, 50], assume-se que a informação primária obtida a partir do registro extracelular da atividade neuronal reside no tempo de suas ocorrências individuais e não nas suas formas reais. Além disso, convém ressaltar que existe uma freqüente variabilidade de formatos de onda e de amplitudes de *spikes* em diferentes registros, a qual é decorrente do posicionamento randômico dos microeletrodos em relação aos neurônios ativos, bem como da morfologia destes. É necessário esclarecer também que a polaridade do potencial de ação no registro extracelular reflete a posição do microeletrodo em relação à fonte do sinal, ou seja, quando próximo ao corpo celular o sinal é negativo,

enquanto próximo à árvore dentrítica o sinal torna-se positivo [103]. Por conseguinte, tanto picos negativos quanto positivos podem ser detectados na experimentação com MEAs.

A segunda etapa básica na análise de registros com arranjos de microeletrodos, portanto, consiste na detecção propriamente dita de cada potencial de ação. Os dois métodos de detecção de *spikes* mais comuns baseiam-se ou no formato de onda ou na altura absoluta de cada pico. No primeiro método, o sinal deve satisfazer valores pré-definidos de amplitude e curvatura (*slope*) máxima e mínima a fim de que seja considerado um *spike*; no segundo caso, é considerado como *spike* todo pico que atingir determinado limiar de amplitude (*amplitude threshold*). Neste trabalho, optou-se pelo “método do limiar de amplitude” por ser um método computacional relativamente mais simples, embora igualmente robusto, que permite a detecção de *spikes* sem que seja necessário considerar as possíveis variabilidades de seus formatos.

Com base nessas considerações, este trabalho buscou investigar a influência de diferentes bandas de filtragem e da seleção de diferentes valores de limiar sobre a atividade registrada com os arranjos de microeletrodos, comparando-se o que seria um sinal contendo apenas ruído de fundo (registros com PBS) com aqueles onde se supôs haver a detecção de atividade eletrofisiológica (registros com preparação biológica). Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.6.1 Influência dos parâmetros de processamento na análise de dados

O resultado da aplicação de filtro digital com diferentes faixas de frequências sobre o número total de picos identificados em função do limiar pode ser visto no gráfico da Figura 5.22, que exhibe (em escala logarítmica) os valores médios da contagem de potenciais detectados pelos microeletrodos do sensor MEAD2422 preenchido com solução PBS. Conforme o esperado, a contagem de picos para cada valor de limiar é mais elevada na faixa de frequência mais ampla (300Hz-5kHz), e mais baixa na faixa de frequência mais restritiva (500Hz-3kHz). Além disso, pode-se inferir que a filtragem mais rigorosa causou atenuação no sinal registrado, pois não ocorreu a detecção de picos com altas amplitudes (limiares entre -9 μ V e -11 μ V) na faixa de frequência de 500Hz-3kHz. A mesma avaliação foi realizada com os demais sensores disponíveis, exibindo resultados semelhantes.

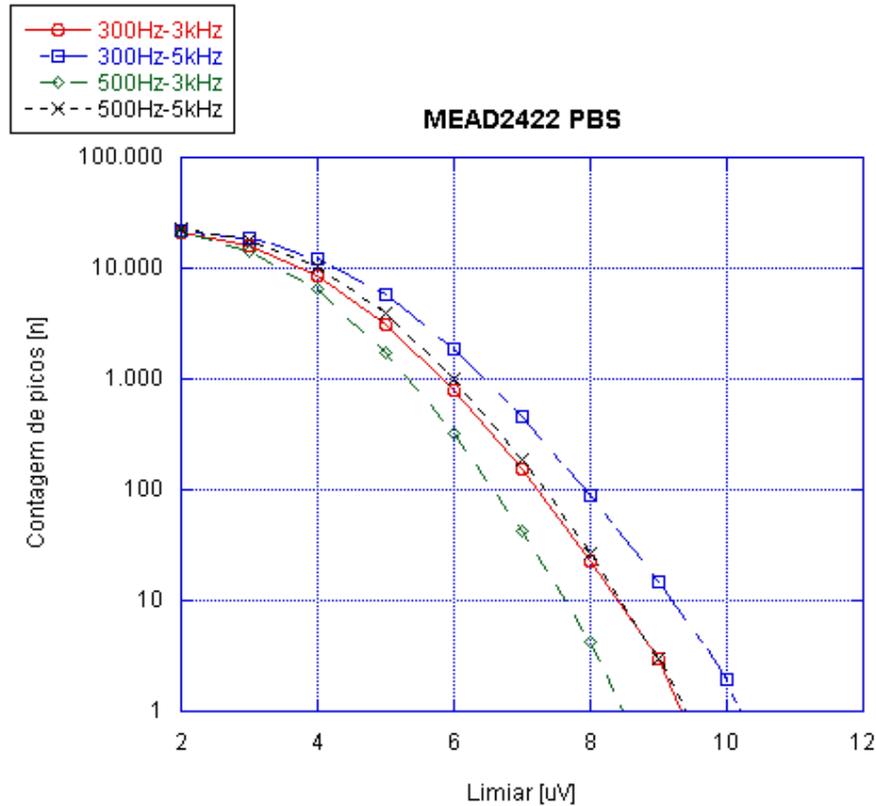


Figura 5.22 Influência da aplicação de filtros digitais sobre o número de picos detectados em função do limiar (potencial negativo em microvolts) em registro obtido por MEA preenchido com PBS.

Sabe-se que a filtragem do sinal se torna de fundamental importância para a análise de dados quando os microeletrodos captam potenciais de campo locais (PCLs), conforme mostrado na Figura 5.23.

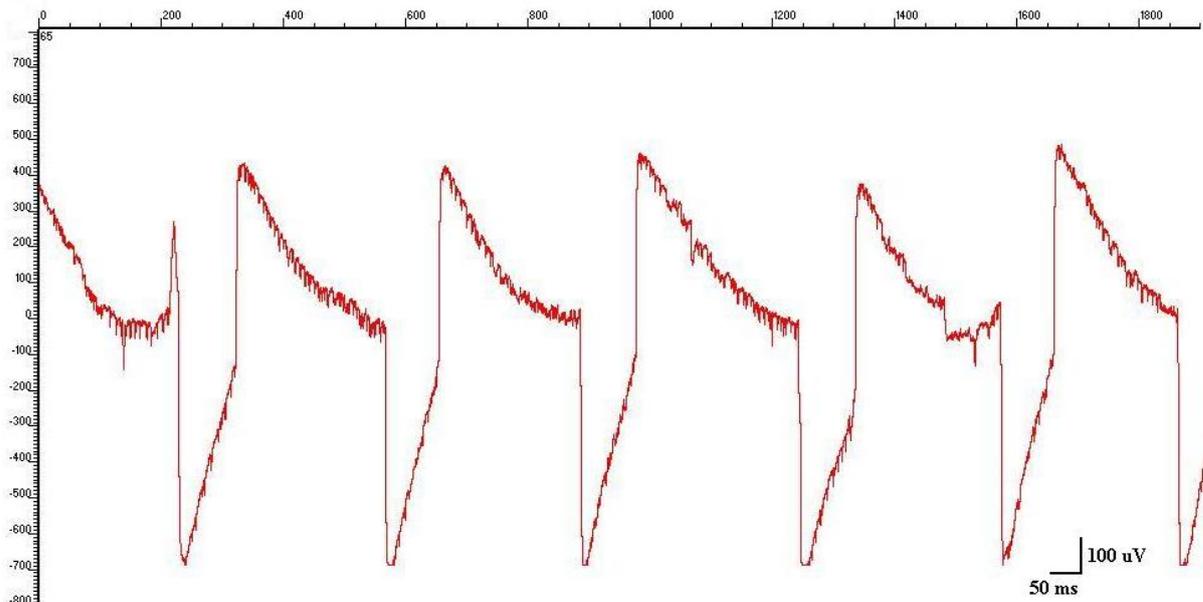


Figura 5.23 Registro de atividade eletrofisiológica de fatia de tecido banhada por solução excitatória (solução 2), mostrando potencial de campo local com sobreposição de *spikes*. O gráfico exibe o potencial (escala $\pm 800 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1900 ms).

O registro exibido na Figura 5.23 mostra a atividade detectada em um microeletrodo de um sensor MEA a partir da experimentação com fatia de tecido banhada em solução excitatória (solução 2). O registro exhibe PCLs típicos, que consistem em oscilações de baixa freqüência nas quais estão sobrepostos picos negativos [151]. Esses picos negativos refletem a atividade conjunta da população neuronal (*population spike*). A aplicação de filtro passa-baixa (Buttherworth de segunda ordem) para detecção de freqüências abaixo de 30 Hz permitiu separar as componentes de baixa freqüência do sinal, isolando assim o potencial de campo, conforme exibido na Figura 5.24.

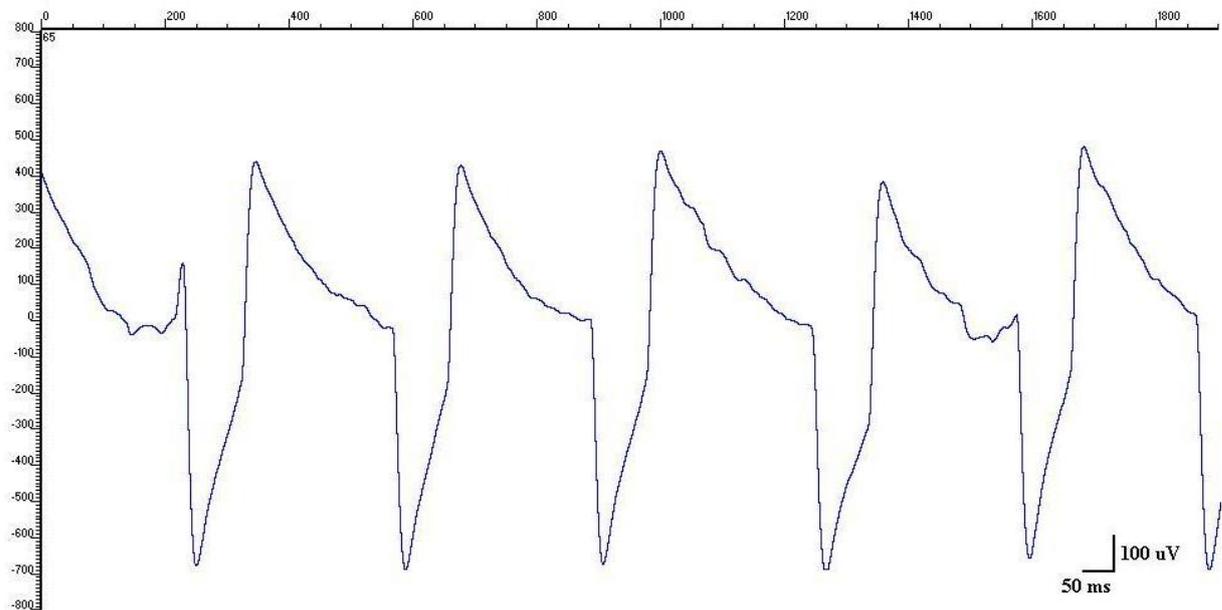


Figura 5.24 Registro de atividade de fatia de tecido banhada por solução excitatória (solução 2), mostrando potencial de campo local. O gráfico exhibe o potencial (escala $\pm 800\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1900ms).

Considerando-se que a Figura 5.24 exhibe aproximadamente seis oscilações em 2 segundos de registro, pode-se inferir que a atividade de PCL registrada apresenta freqüência da ordem de 3 Hz. De fato, essas oscilações são fortemente atenuadas quando o sinal é filtrado abaixo de 3 Hz. Nota-se também que a amplitude de cada oscilação é de aproximadamente 1,2 mV (pico-a-pico). A atividade de alta freqüência contendo *spikes*, por sua vez, pode ser identificada e separada do sinal aplicando-se filtro passa-alta (Butterworth de segunda ordem para detecção de freqüências acima de 100 Hz), como mostra a Figura 5.25. Nesse caso, os *spikes* maiores exibem amplitude pico-a-pico de cerca de 400 μV , enquanto os menores *spikes* visíveis tem amplitude pico-a-pico aproximada de 80 μV .

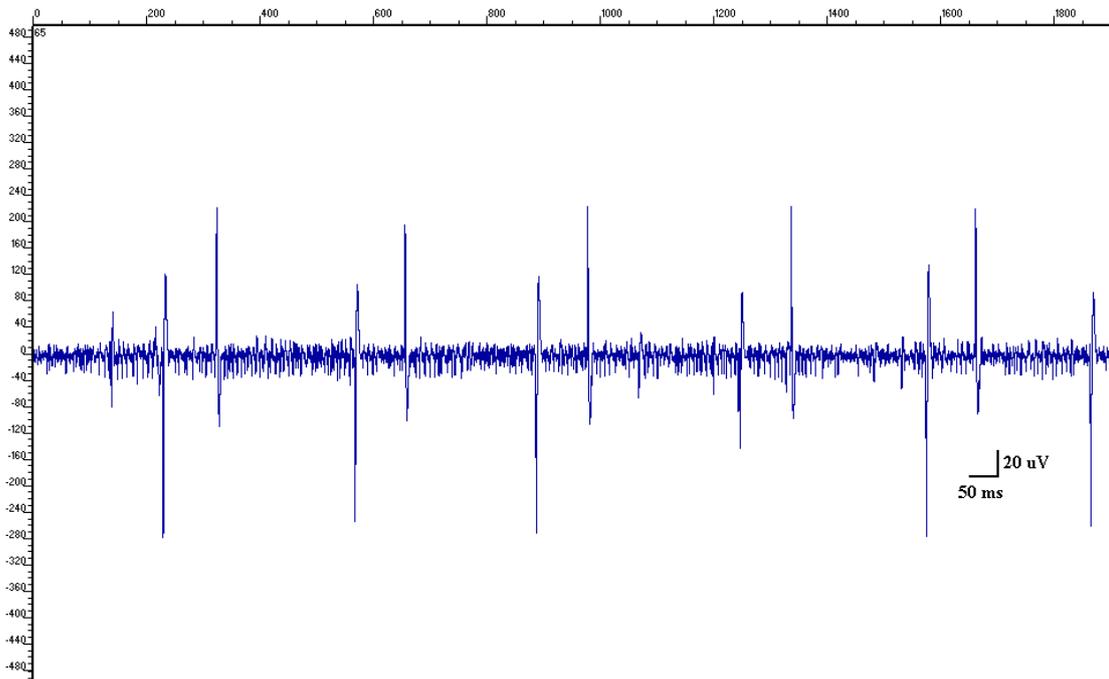


Figura 5.25 Registro de atividade eletrofisiológica de fatia de tecido banhada por solução excitatória (solução 2), mostrando potenciais de ação. O gráfico exibe o potencial (escala $\pm 500 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1900 ms).

Constatou-se que a filtragem do registro em frequências acima de 100 Hz causou atenuação do sinal, de modo que todos os *spikes* detectados mostraram amplitudes menores quanto maior fosse a frequência do filtro passa-alta aplicado. Os *spikes* menores tornaram-se completamente imperceptíveis quando aplicado filtro passa-alta de 300 Hz, enquanto os de maior amplitude foram fortemente atenuados apenas após filtragem acima de 5000 Hz.

Nos registros em que não se observou detecção de potencial de campo local, os *spikes* detectados mostraram baixa amplitude, muito próxima do nível de ruído de fundo. Contudo, a comparação do sinal captado por um sensor preenchido com solução PBS com registros feitos com fatia de tecido mostrou que é possível distinguir o registro de ruído de fundo do sinal com atividade eletrofisiológica devido a uma maior detecção de potenciais de ação, conforme exibido na Figura 5.26. Este gráfico compara a contagem de picos (em escala logarítmica) em função de diferentes valores de limiar (valor absoluto do potencial negativo) em registros com sensor preenchido apenas com solução PBS e após a deposição de fatia de tecido. Nessas medidas, utilizaram-se diferentes soluções eletrofisiológicas, conforme descrito nos procedimentos experimentais (solução de Ringer normal, solução 1 e solução 2). O sinal foi filtrado na faixa de frequência entre 300Hz-5kHz.

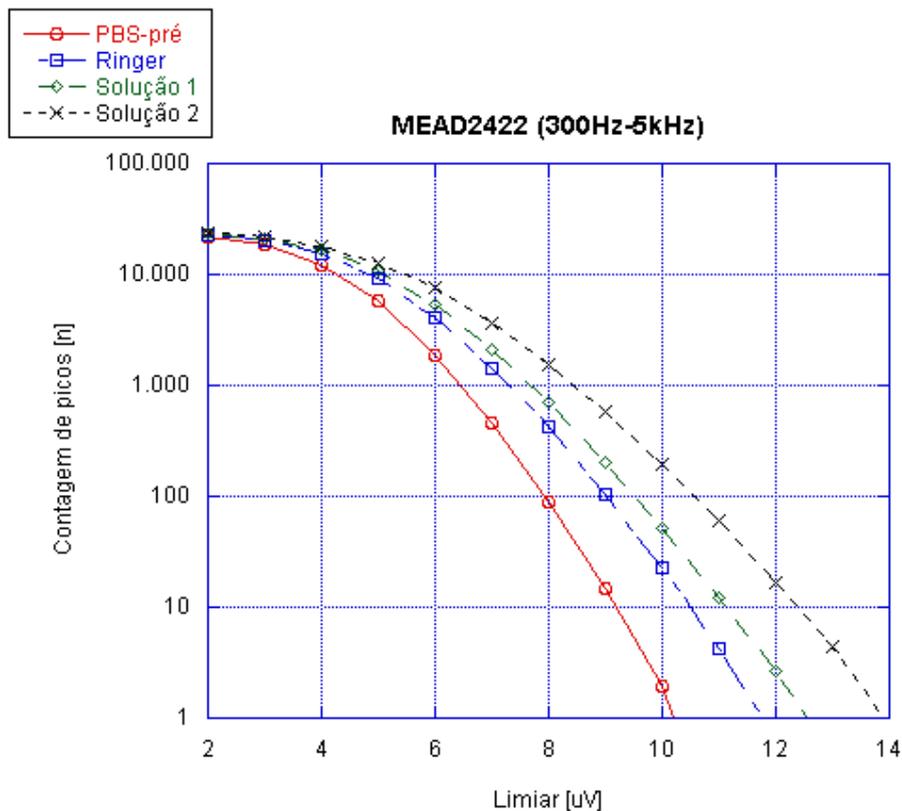


Figura 5.26 Influência do valor de limiar sobre a detecção de picos em registros obtidos por MEA preenchido com PBS e com a deposição de fatia de tecido banhada por diferentes soluções (Ringer, solução 1 e solução 2).

A Figura 5.26 indica que a contagem de picos em cada caso se diferencia mais quanto maior o valor absoluto do limiar estipulado. Contudo, ressalta-se que a determinação do limiar de detecção de *spikes* depende tanto do nível de ruído de fundo registrado, quanto da amplitude dos potenciais de ação. Quanto maior o limiar estipulado, menor a probabilidade de serem detectados falsos positivos (quando o ruído é contabilizado como *spike*). Contudo, isso também aumenta as chances de eventos reais (verdadeiros *spikes*) não serem detectados.

Essa questão exige maior atenção quando os *spikes* apresentam pequena amplitude em relação ao sinal de fundo, sendo impossível distingui-los visualmente, como seria possível com *spikes* de maior amplitude. Ambas as situações podem ser conferidas nos gráficos da Figura 5.27, que comparam o sinal filtrado (300Hz - 5kHz) registrado por dois diferentes microeletrodos de um mesmo MEA, obtido a partir da atividade espontânea de uma fatia de córtex de rato imersa em solução de Ringer normal.

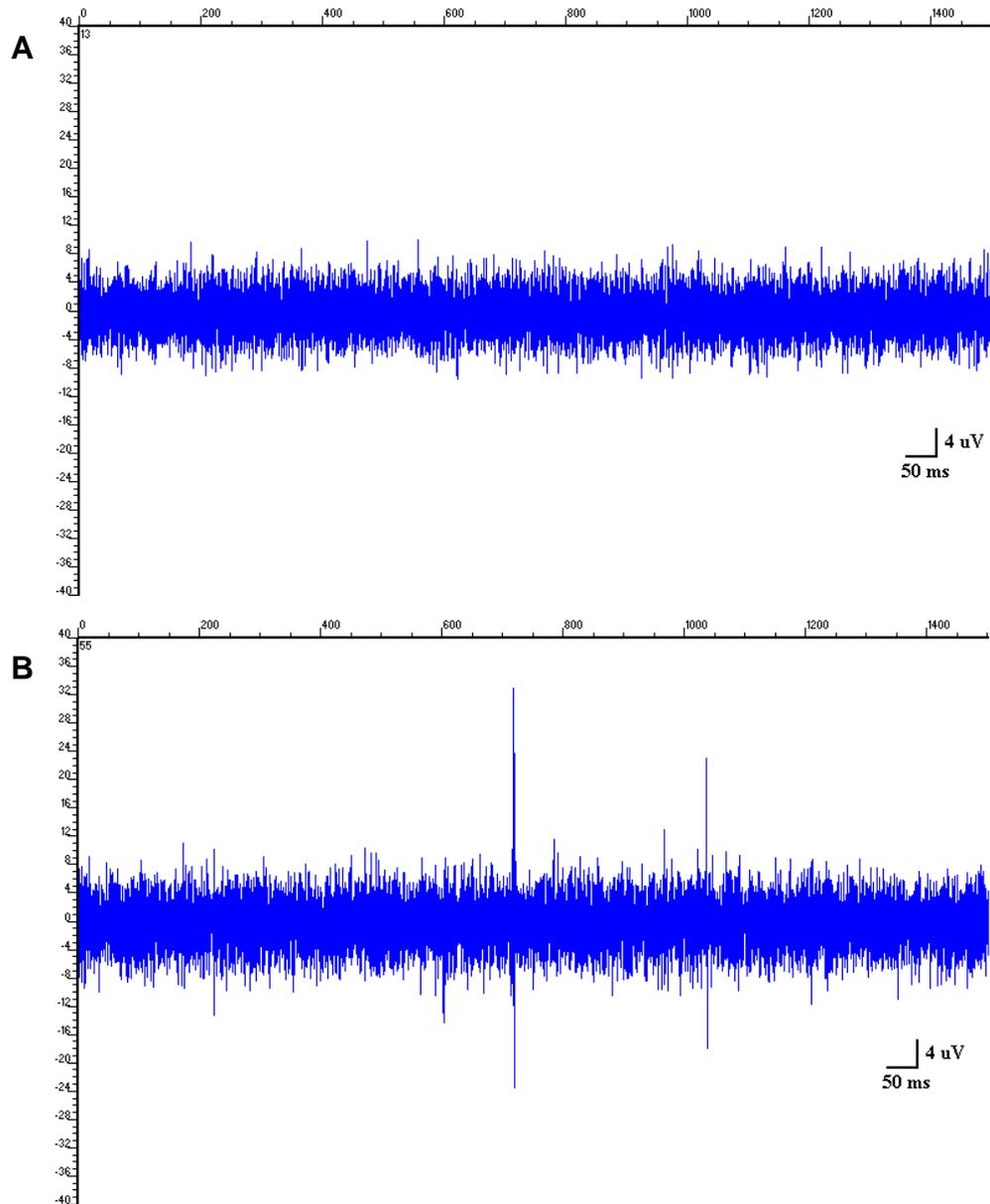


Figura 5.27 Registro de atividade espontânea de fatia de tecido imersa em solução de Ringer normal para dois canais de um mesmo sensor: (A) microeletrodo 13 e (B) microeletrodo 55. O sinal foi filtrado entre 300Hz-5kHz. *Spikes* de baixa amplitude aparecem em (A) e de alta amplitude em (B). Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 40 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1500 ms).

Nota-se que os *spikes* detectados pelo microeletrodo 13 (gráfico A) aparentam ter aproximadamente a mesma amplitude do ruído de fundo, enquanto os *spikes* detectados pelo microeletrodo 55 (gráfico B) são facilmente distinguíveis do ruído. Nesse caso, a escolha de um limiar único para os dois canais como, por exemplo, equivalente a $-12 \mu\text{V}$, possibilitaria a detecção de *spikes* no microeletrodo 55, mas não no 13. Uma medida que pode ser facilmente adotada a fim de se estipular o limiar de detecção de potenciais de ação mais adequado para cada caso é assumir um valor correspondente a múltiplos do desvio-padrão calculado para o

ruído de fundo do sinal filtrado em cada canal¹⁵². Mais uma vez, porém, a escolha de quantas vezes o desvio-padrão (duas, três ou mais vezes) recai sobre o equilíbrio entre um limiar que esteja suficientemente afastado do nível de ruído para limitar a detecção de falsos positivos, porém não tão longe a ponto de subestimar a detecção de *spikes* de baixa amplitude. Por exemplo, para o sinal exibido na Figura 5.27, assumir menos três vezes o desvio-padrão (-3σ) como limite para a detecção de *spikes* resultaria em um limiar de $-7,5 \mu\text{V}$ para o canal 13 e $-9,9 \mu\text{V}$ para o canal 55; enquanto menos quatro vezes (-4σ) seria equivalente a $-8,6 \mu\text{V}$ e $-11,6 \mu\text{V}$, respectivamente. Assim, a adoção do valor de limiar de -4σ garantiria a detecção de possíveis potenciais de ação fora da faixa de ruído de fundo. Neste trabalho, optou-se pela detecção de *spikes* a partir de um limiar de amplitude negativo, que considera a queda do sinal de entrada (*negative slope*). Picos positivos não foram detectados, logo não foram contabilizados na análise de dados.

A detecção de *spikes* em cada microeletrodo do sensor MEAD2422 (nos mesmos registros cujos dados foram exibidos anteriormente na Figura 5.26) a partir da adoção do limiar de amplitude de -4σ é mostrada na Figura 5.28.

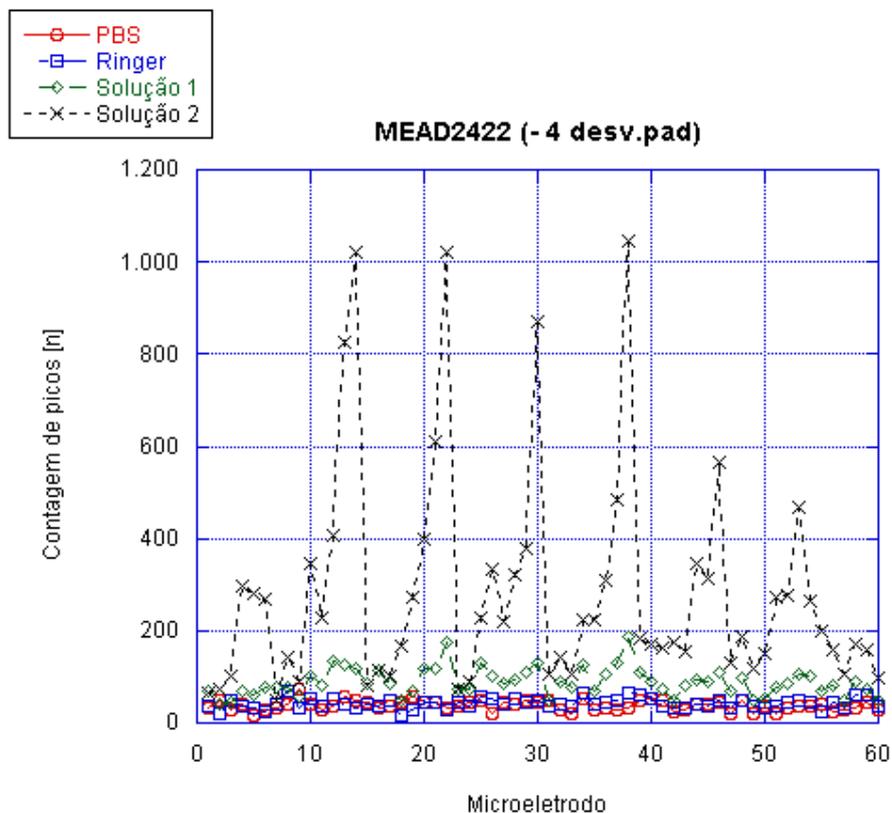


Figura 5.28 Detecção de picos em registros obtidos por MEA preenchido com PBS e com a deposição de fatia de tecido banhada por diferentes soluções (Ringer, solução 1 e solução 2) a partir de limiar de amplitude de -4σ (desvio-padrão). O sinal foi filtrado na faixa de 300Hz-5kHz.

A contagem de picos mostrada na Figura 5.28 foi realizada a partir do sinal filtrado na faixa de frequências de 300Hz-5kHz, e exibe a contagem de picos em cada microeletrodo ao longo de 1 minuto de registro. Neste gráfico é possível comparar a atividade registrada em cada um dos microeletrodos do arranjo, evidenciando o fato de que tal registro depende da localização do microeletrodo em relação à fonte do sinal. É possível perceber que, aparentemente, a atividade basal registrada (quando a fatia é banhada pela solução de Ringer normal) se aproxima do registro do nível de ruído intrínseco do sensor (quando o MEA é preenchido com solução PBS). Assim, analisando-se unicamente a contagem de *spikes* detectados, pode-se concluir que apenas quando houve a excitação do tecido (em presença das soluções 1 e 2) tornou-se claro o registro de atividade eletrofisiológica. Contudo, a diferença entre o sinal detectado durante o registro da atividade basal do tecido e o sinal do ruído de fundo do sensor é evidenciada na análise da amplitude pico-a-pico média dos *spikes*, conforme mostra a Figura 5.29.

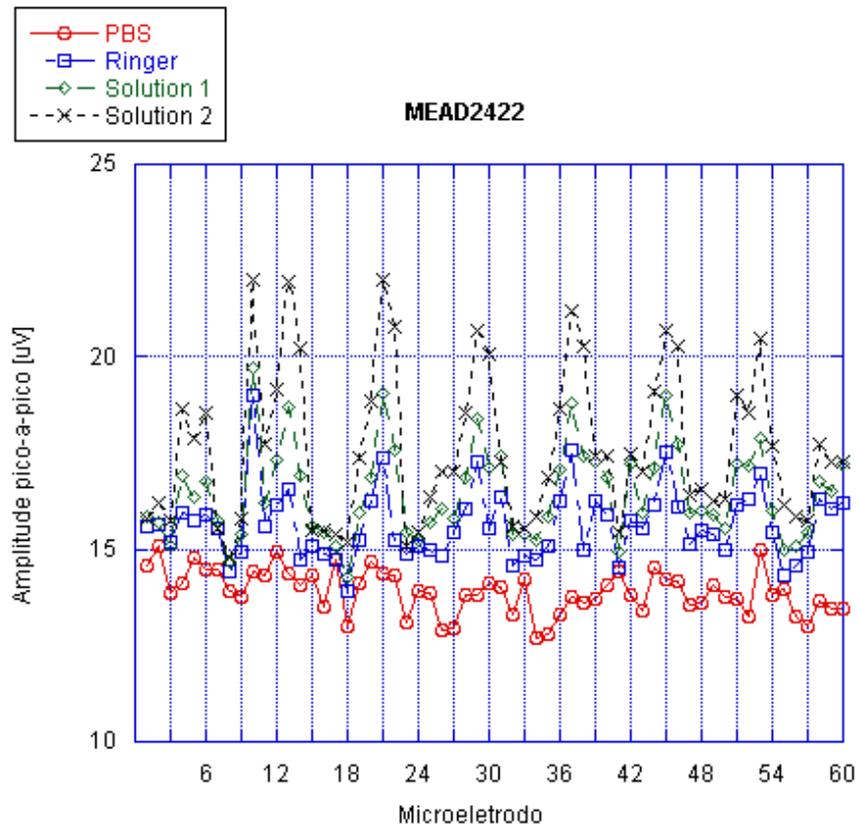


Figura 5.29 Amplitude pico-a-pico dos potenciais detectados em registros obtidos por MEA preenchido apenas com PBS e com fatia de tecido banhada por diferentes soluções (Ringer, solução 1 e solução 2). O limiar de amplitude para detecção de potenciais adotado foi de -4σ (desvio-padrão). O sinal foi filtrado na faixa de 300Hz-5kHz.

5.6.2 Registros com cultura celular

A análise morfológica (por microscopia óptica) da cultura primária de neurônios hipocampais dissociados permitiu a identificação de um grande número de células gliais (astrócitos e micróglia), além da clara presença de alguns neurônios sobre o MEA. Por conseguinte, a cultura se desenvolveu de forma mista, provavelmente devido à ausência do uso de fatores inibitórios de células gliais, tais como arabinosídeo de citosina (AraC), durante o preparo da cultura. As células se mostraram brilhantes e bem aderidas ao substrato do sensor, demonstrando assim serem viáveis.

Foram obtidos seis registros da cultura celular sobre o sensor MEAG1373, totalizando 30 minutos de captação de atividade eletrofisiológica. Durante os primeiros 15 minutos, a cultura estava banhada por meio de cultura padrão; no tempo restante, este havia sido substituído por solução eletrofisiológica extracelular, conforme descrito na seção de procedimentos experimentais. Enquanto o sensor estava preenchido pelo meio de cultura, houve a detecção de potenciais de campo locais (PCLs) de maneira simultânea em todos os microeletrodos do arranjo, conforme exibe a Figura 5.30. O sinal mostrado corresponde ao registro bruto (sem filtragem), e os gráficos exibem oscilações de amplitude pico-a-pico variável entre aproximadamente 200 μV e 330 μV

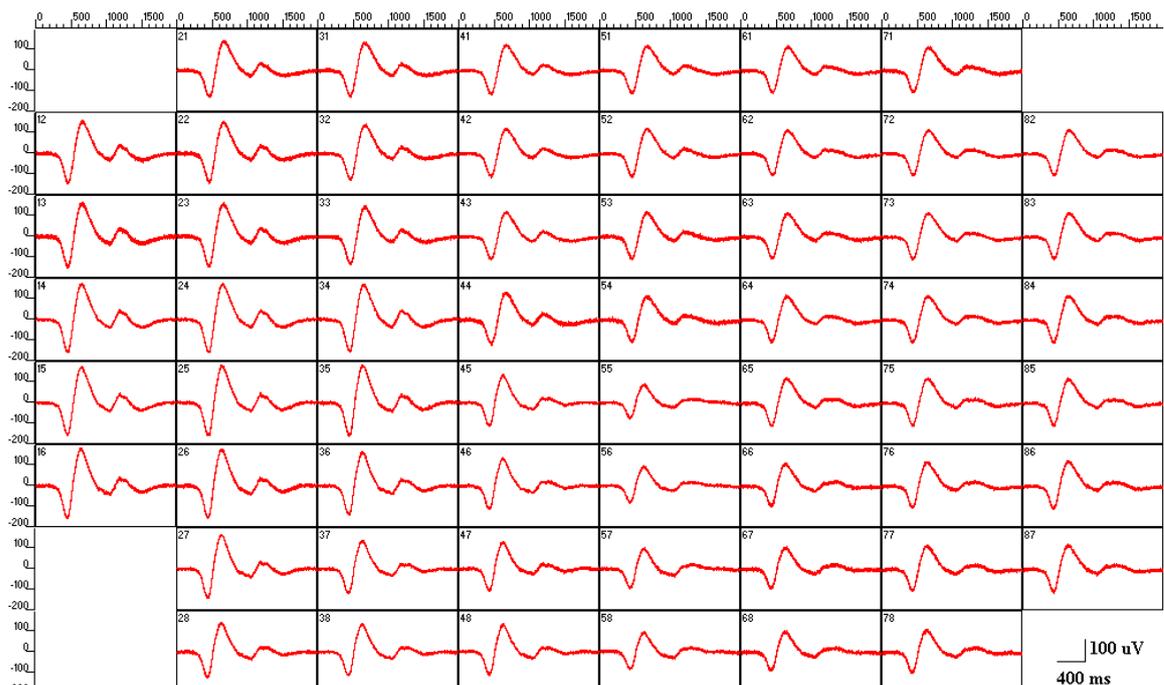


Figura 5.30 Registro de atividade espontânea em cultura celular banhada por meio de cultura padrão. Os gráficos representam o potencial (escala $\pm 200\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms).

No entanto, após a troca do meio de cultura pela solução eletrofisiológica extracelular, os PCLs foram detectados em um número reduzido de microeletrodos, além de terem apresentado sua amplitude pico-a-pico reduzida (de 70 μV a 140 μV) e formato de onda alterado, como pode ser visto na Figura 5.31.

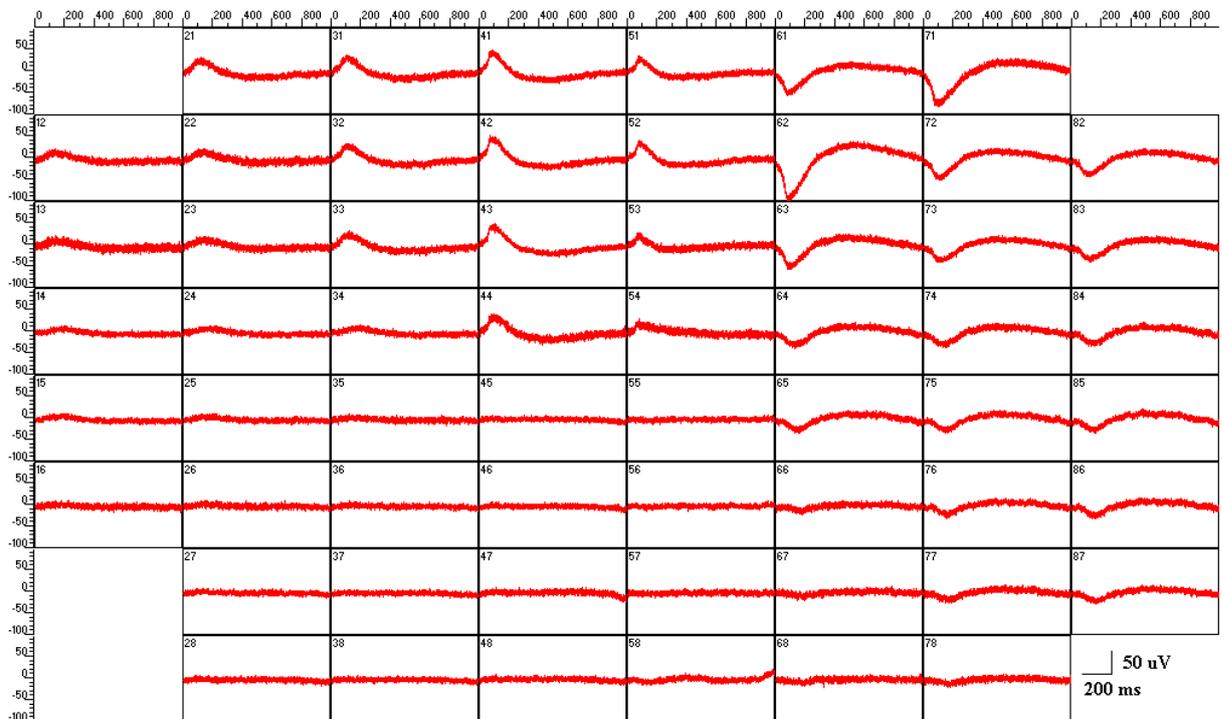


Figura 5.31 Registro de atividade espontânea em cultura celular banhada com solução eletrofisiológica extracelular. Os gráficos representam o potencial (escala $\pm 100\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 1000ms).

Após a filtragem dos registros na faixa de frequência de 300Hz-5kHz, a detecção de potenciais de ação foi realizada a partir da determinação do limiar de amplitude correspondente a múltiplos do desvio-padrão (-4σ) da média do ruído de fundo em cada canal. Os valores de limiar variaram de $-9,0\ \mu\text{V}$ à $-13,3\ \mu\text{V}$ ($-10,4 \pm 0,9\ \mu\text{V}$). Esse processo de detecção de *spikes* é exemplificado na Figura 5.32-A, que mostra o registro filtrado e o limiar de amplitude em um canal do sensor MEAG1373 (microeletrodo 21). O sinal em azul representa o registro filtrado, e a linha horizontal imediatamente abaixo do registro representa o valor do limiar estimado neste canal ($-11\mu\text{V}$). As linhas verticais em verde (sobrepostas sobre o sinal em azul e que cruzam a linha horizontal logo abaixo) indicam picos de potencial que atingiram o valor do limiar de amplitude, e que, portanto, foram identificados como *spikes*.

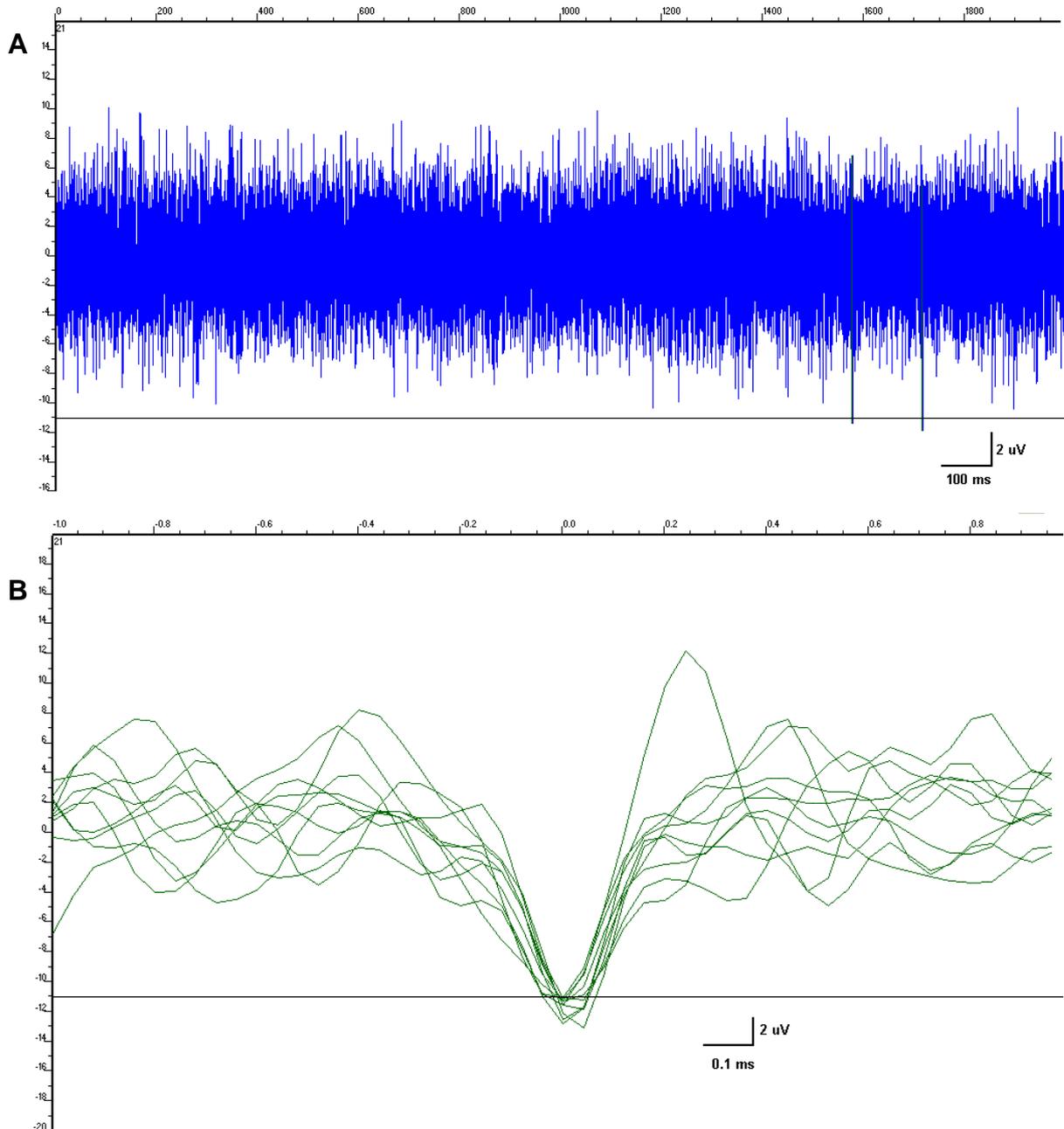


Figura 5.32 Registro de atividade espontânea em cultura celular com meio de cultura padrão: (A) a linha horizontal abaixo do sinal indica o limiar de amplitude para detecção de *spikes* estimado neste canal ($-11\mu\text{V}$). O gráfico representa o potencial (escala $\pm 16\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms); (B) sobreposição de *spikes* detectados no mesmo canal (microeletrodo 21). O gráfico representa o potencial (escala $\pm 20\mu\text{V}$) em função do tempo (escala $\pm 1\text{ms}$).

A Figura 5.32-B permite observar com maiores detalhes os formatos de onda de alguns *spikes* detectados no microeletrodo 21. Nessa representação, os potenciais de ação foram centralizados e sobrepostos no momento em que atingiram o limiar de amplitude. Pode-se inferir que a duração de um *spike* (tempo de deflexão e retorno do potencial à linha de base) variou entre 0,4 e 0,6 ms. Resultados semelhantes foram observados nos registros obtidos a partir da cultura com solução

eletrofisiológica extracelular. Essas características de formatos de onda e duração de *spike* são similares ao demonstrado no trabalho de Raghavan et al [153].

O número total de potenciais de ação identificados em cada microeletrodo do arranjo durante os 15 minutos de monitoramento da atividade das células banhadas em meio de cultura (situação A) e durante o mesmo tempo de registro com a solução eletrofisiológica extracelular (situação B) é mostrado no gráfico da Figura 5.33. Todos os microeletrodos se mostraram ativos, pois apresentaram taxa de *spikes* superior a 5 *spikes* por minuto [154]. A média e desvio-padrão dos *spikes* contabilizados durante o tempo total de registro foi de 664 ± 204 picos na situação A e de 556 ± 134 picos na situação B.

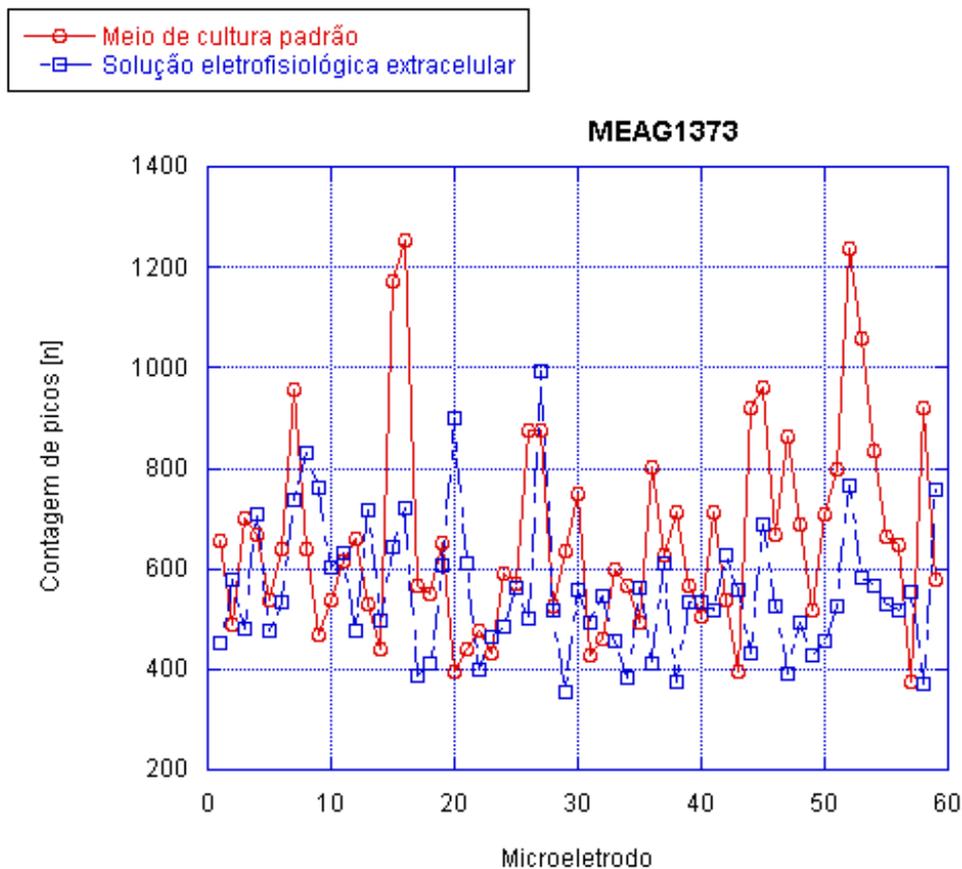


Figura 5.33 Número total de *spikes* detectados em cada microeletrodo do sensor MEAG1373 durante monitoração eletrofisiológica de cultura celular.

A amplitude pico-a-pico dos potenciais de ação detectados em cada microeletrodo do arranjo pode ser conferida nos gráficos da Figura 5.34. A média da amplitude ($17,2 \pm 2,3 \mu\text{V}$) dos *spikes* identificados no sensor com meio de cultura

padrão (gráfico A) apresentou valor semelhante à média da amplitude ($17,1 \pm 2,2 \mu\text{V}$) dos *spikes* identificados na cultura com solução eletrofisiológica (gráfico B).

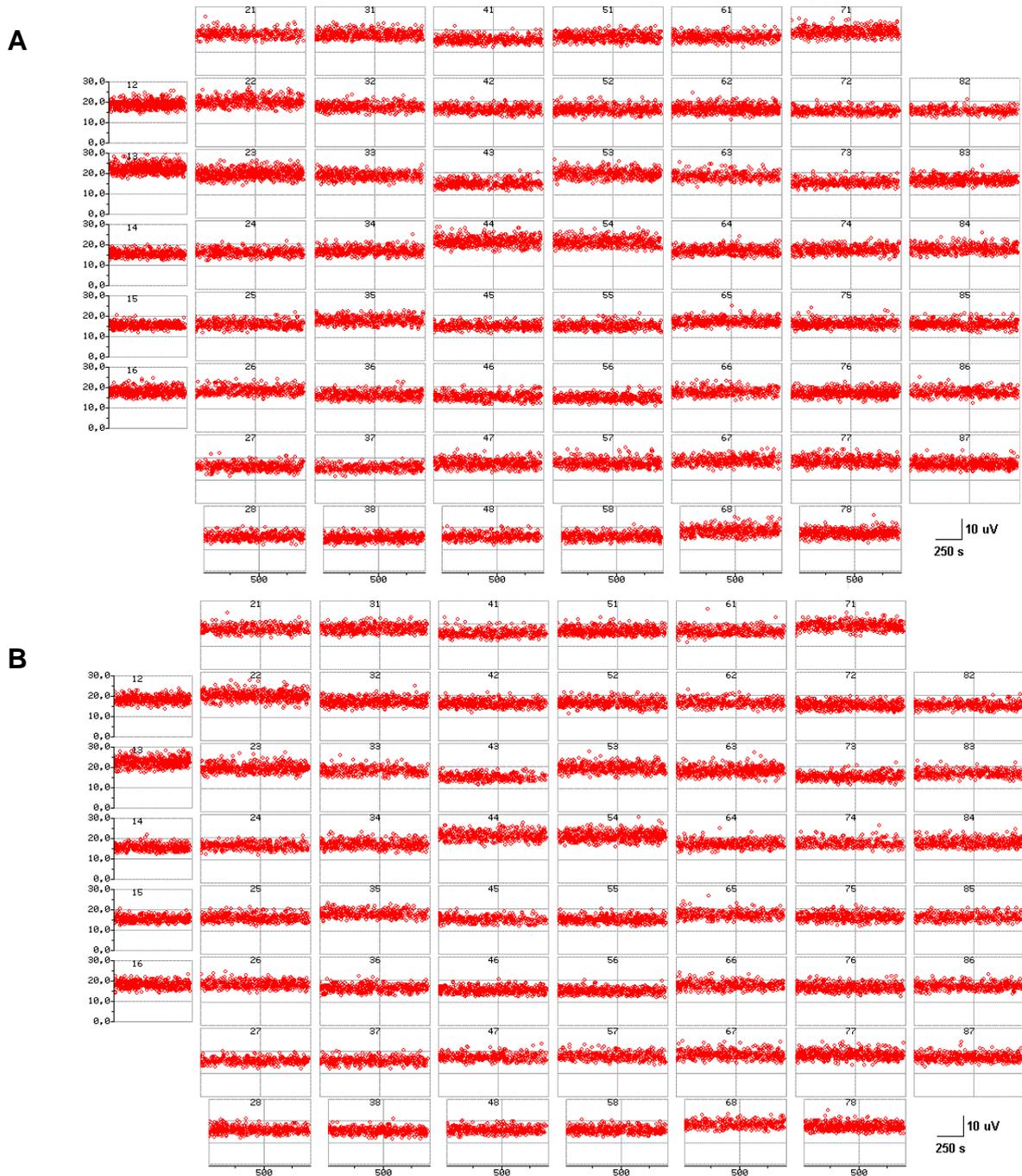


Figura 5.34 Amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados em cultura celular banhada com (A) meio de cultura padrão e (B) solução eletrofisiológica extracelular. Cada gráfico representa o potencial (escala $30 \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 900s).

A frequência de atividade detectada é exibida nos gráficos da Figura 5.35, onde A apresenta a atividade celular com o meio de cultura padrão e B com a solução eletrofisiológica extracelular. A frequência máxima registrada foi de 8 Hz em

A e de 7 Hz em B. A observação dos gráficos permite inferir que houve uma pequena diminuição da freqüência de atividade registrada na situação B em relação a situação A, sendo que a média da freqüência em todos os microeletrodos foi de $1,45 \pm 0,74 \text{ Hz}$ em A e $1,36 \pm 0,64 \text{ Hz}$ em B.

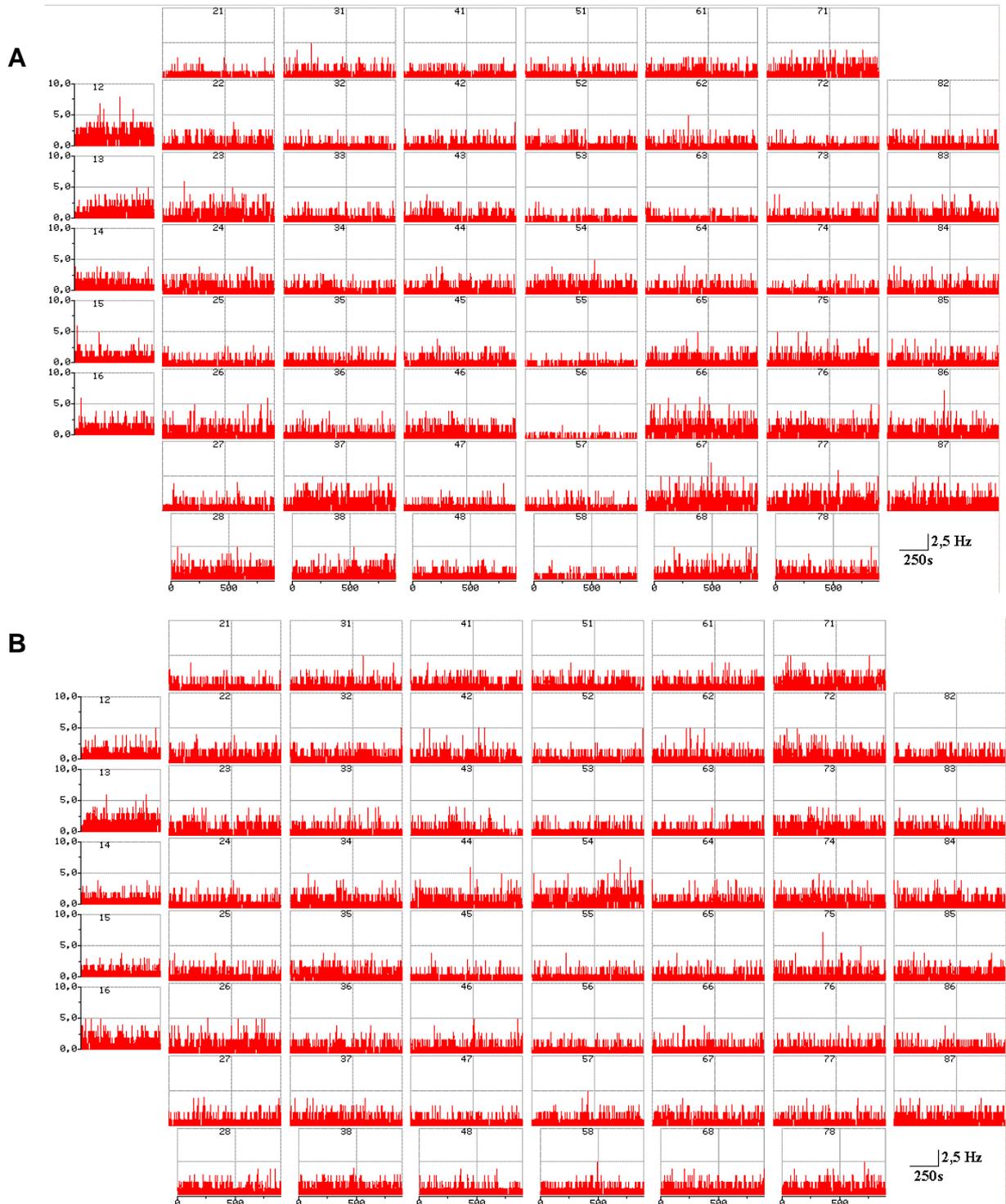


Figura 5.35 Freqüência de *spikes* detectados em cultura celular banhada com (A) meio de cultura padrão e (B) solução eletrofisiológica extracelular. Cada gráfico representa a freqüência (escala 10Hz) em função do tempo (escala 900s).

5.6.3 Registros com fatias de cérebro de roedor

De maneira geral, tanto nos experimentos em que se utilizou PEI quanto naqueles em que se empregou nitrocelulose como solução de aderência da fatia de tecido aos microeletrodos, as fatias permaneceram estáveis sobre o substrato do MEA. Não foi observada diferença na capacidade de aderência entre as duas soluções. No entanto, deve-se ressaltar que essa estabilidade foi favorecida pelo fato de os experimentos terem sido conduzidos sem a aplicação de perfusão, pois as soluções foram cuidadosamente trocadas do banho da fatia com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. A vantagem encontrada na utilização da nitrocelulose foi a rapidez no preparo do sensor, pois não foi necessário aguardar pelo menos duas horas antes de depositar a fatia como no caso da utilização de PEI; por outro lado, foi notável a presença de resíduos de nitrocelulose sobre o arranjo de microeletrodos, o que exigiu maiores cuidados de limpeza após a experimentação. Esse fato possivelmente aumenta as chances de degradação dos microeletrodos e diminui a vida útil do sensor.

Foram obtidos 380 registros a partir de 23 fatias de córtex de rato dispostas sobre diferentes sensores MEAs, totalizando 380 minutos de captação de atividade eletrofisiológica. No entanto, foram excluídas da análise aquelas fatias que tiveram sua atividade registrada durante apenas 1 minuto ou registros que apresentaram alto nível de ruído. Por conseguinte, a identificação de potenciais de campo locais e a avaliação da contagem de picos (número de *spikes*), da amplitude pico-a-pico dos *spikes* e da frequência de atividade foi realizada a partir dos dados obtidos com 18 fatias, monitoradas de 3 a 30 minutos cada, totalizando 285 registros. A fim de facilitar a apresentação dos resultados e possibilitar a comparação dos dados, optou-se pela sua divisão em dois grupos:

- **Grupo 1:** dados obtidos a partir de 4 fatias que tiveram apenas sua atividade espontânea monitorada, totalizando 32 registros.
- **Grupo 2:** dados obtidos a partir de 14 fatias que tiveram tanto sua atividade espontânea quanto evocada monitoradas, totalizando 253 registros.

5.6.3.1 Registros de atividade espontânea (Grupo 1)

Os resultados apresentados nesta seção são decorrentes da monitoração da atividade espontânea de quatro fatias de tecido enquanto estas estavam imersas em solução de Ringer normal, empregando-se três sensores MEAs diferentes.

A identificação de potenciais de campo locais (PCLs) foi realizada através da observação dos registros brutos (sinal não-filtrado). Assim, PCLs foram identificados em 6 registros como oscilações de amplitude variável entre $100\mu\text{V}$ e $1,4\text{mV}$ presentes em um ou vários microeletrodos dos arranjos. Nos microeletrodos em que houve a detecção de PCLs de maior amplitude, contudo, ocorreu a saturação do registro, possivelmente causada pela limitação da faixa de entrada (*input range*) do sinal conforme definido no momento da aquisição dos dados. Uma vez que PCLs representam a soma de potenciais, seu sinal pode atingir a faixa de milivolts; entretanto, como a faixa de entrada foi previamente definida como $\pm 819\text{ mV}$, e sendo o ganho do amplificador de 1200, a faixa de registro do sinal restringiu-se aos limites de $\pm 682\ \mu\text{V}$. Um exemplo dessa situação pode ser visto na Figura 5.36, que mostra o registro bruto (sem filtragem do sinal) de atividade espontânea obtido pelo microeletrodo 46 do sensor MEAG5002.

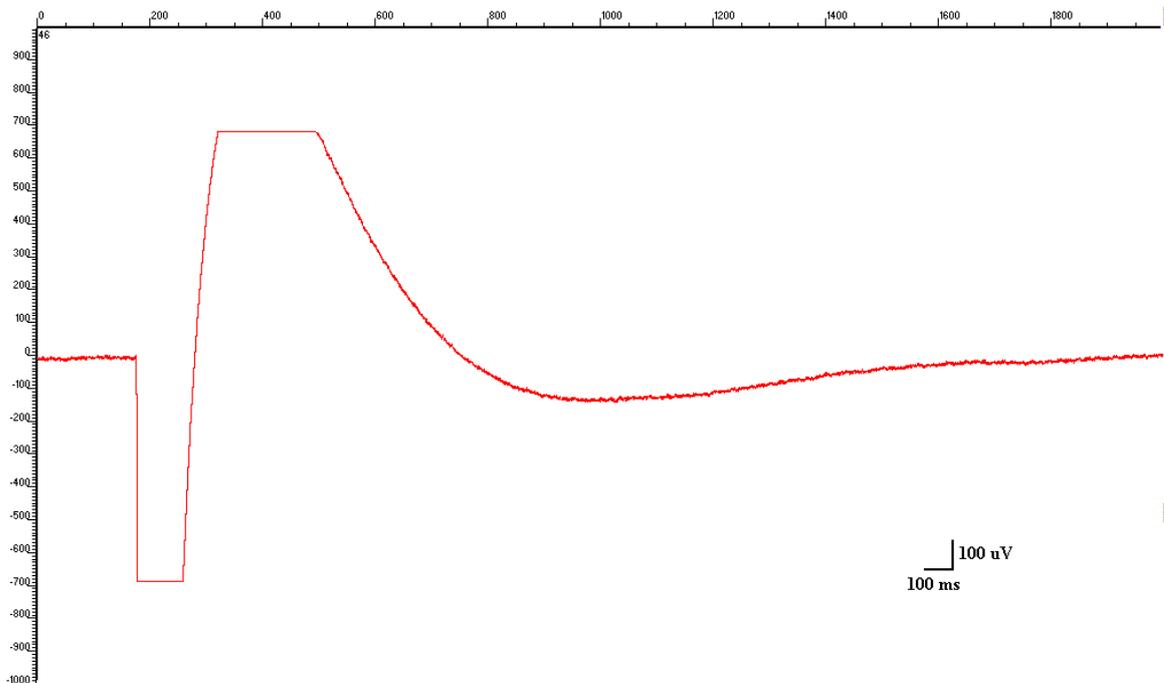


Figura 5.36 Registro de atividade espontânea em fatia de tecido, mostrando saturação do sinal devido à limitação da faixa de entrada (*input range*) antes da aquisição do registro. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 1000\ \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000 ms).

A impossibilidade de visualização do formato de onda decorrente da saturação do registro impede que sejam feitas inferências sobre o tipo de sinal detectado. No entanto, é possível presumir que este registro não tenha sido decorrente de ruído eletrônico, pois os demais microeletrodos do arranjo não detectaram PCLs de mesma amplitude. É interessante observar que, após a filtragem do registro na faixa de frequências de 300Hz-5kHz, a atividade detectada nesse microeletrodo com sinal saturado foi identificada como um *spike* de amplitude pico-a-pico de cerca de $190\mu\text{V}$, conforme mostra a Figura 5.37.

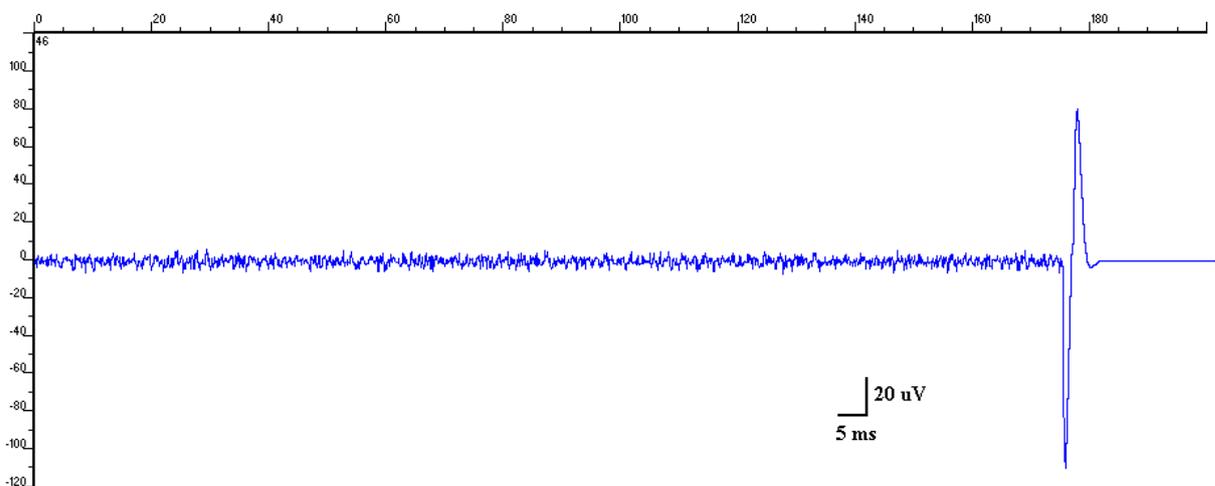


Figura 5.37 Registro de *spike* como resultado de atividade espontânea em fatia de tecido. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 120\ \mu\text{V}$) em função do tempo (escala 200 ms).

Os dados obtidos individualmente em cada microeletrodo do sensor MEAG5002 são mostrados na Figura 5.38, onde a imagem A apresenta a amplitude pico-a-pico dos *spikes* e a imagem B apresenta a frequência de atividade. Os dados do canal 54 foram desconsiderados por apresentar alto nível de ruído. Curiosamente, no entanto, percebe-se que a amplitude pico-a-pico que seria correspondente ao *spike* mostrado na Figura 5.37 não está representada no gráfico do microeletrodo 46 mostrado na Figura 5.38-A. Uma possível explicação para este fato é que a limitação da janela de tempo para a identificação de *spikes* (*spike cutoff*) - conforme estabelecido na ferramenta Spike Sorter no momento do processamento dos dados com o software MC_Rack – tenha sido inferior ao tempo total de duração do *spike*, de modo que os picos mínimo e máximo identificados não tenham correspondido aos valores de fato mínimo e máximos desse *spike*. A comparação entre os gráficos A e B da Figura 5.38 permite inferir que nos canais em que foram detectados *spikes* de maior amplitude pico-a-pico também foram

registradas as maiores freqüências de atividade, como pode ser visto, por exemplo, no gráfico correspondente ao microeletrodo 35.

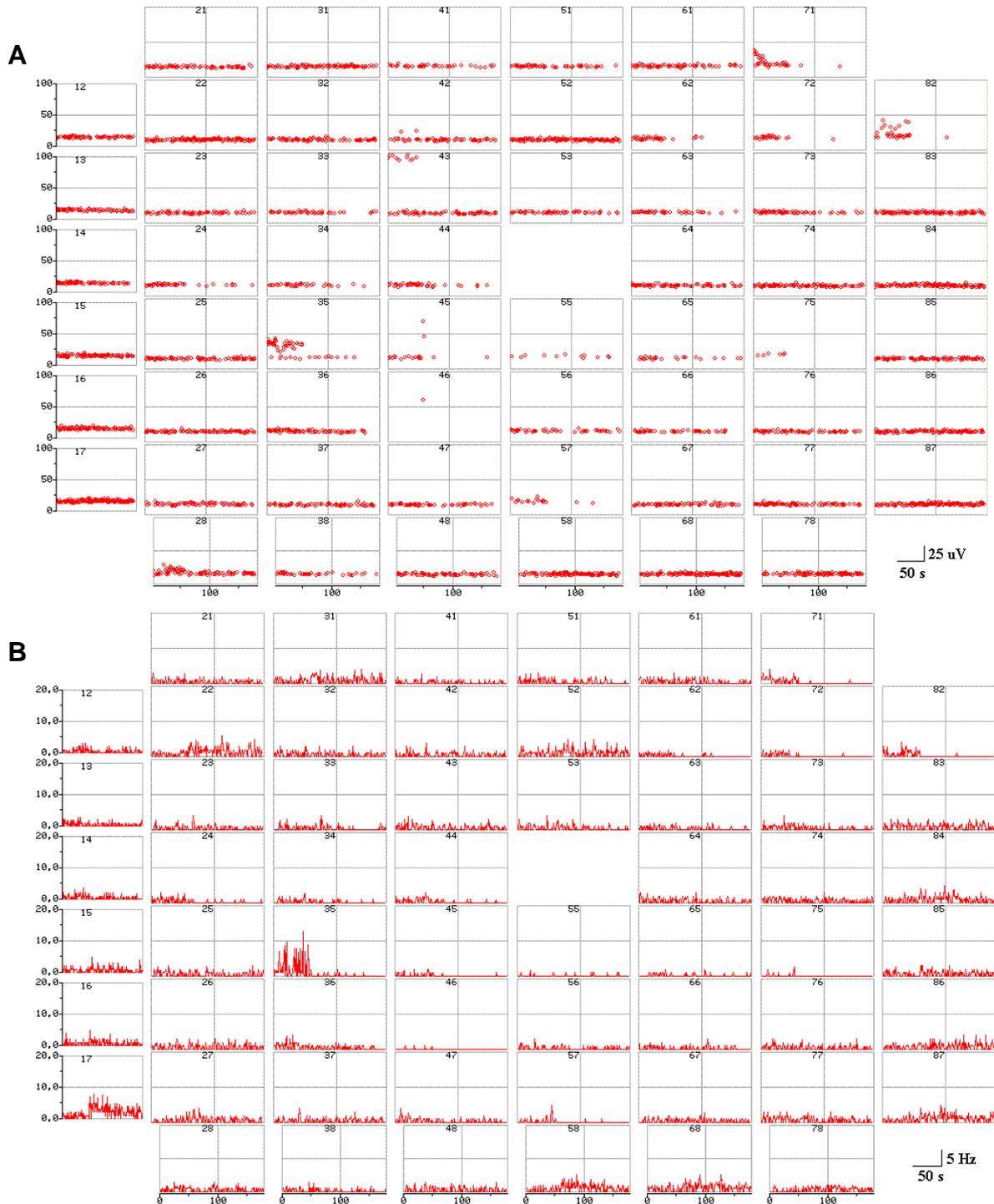


Figura 5.38 Dados obtidos de registro de atividade espontânea em fatia de tecido: (A) amplitude pico-a-pico dos *spikes*, onde cada gráfico representa o potencial (escala $100\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 180s); (B) freqüência de atividade, onde cada gráfico representa a freqüência (escala 20Hz) em função do tempo (escala 180s).

Os dados mostrados na Tabela 5.1 resumem os valores médios de cada parâmetro calculados sobre todos os microeletrodos dos arranjos e os valores mínimos e máximos detectados individualmente. Os parâmetros avaliados foram o limiar de potencial para detecção de *spikes* (-4σ), a contagem de picos por minuto (o número total de *spikes* identificados foi dividido pelo tempo total de registro), a amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados e a frequência de atividade registrada em cada fatia. Os dados coletados com o sensor MEAG5002 exibidos anteriormente correspondem aos dados da Fatia 1 mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Parâmetros de análise extraídos dos dados do Grupo 1

| Parâmetros | | Fatia 1 | Fatia 2 | Fatia 3 | Fatia 4 |
|--|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| limiar de amplitude [μV] | mín | -7,7 | -7,3 | -8,1 | -8,0 |
| | máx | -13,0 | -10,4 | -10,4 | -10,4 |
| | méd \pm desv.pad | -8,6 \pm 1,0 | -9,5 \pm 0,4 | -9,7 \pm 0,4 | -9,3 \pm 0,4 |
| contagem de picos por minuto [n/min] | mín | 11 | 20 | 13 | 24 |
| | máx | 114 | 66 | 69 | 107 |
| | méd \pm desv.pad | 34 \pm 18 | 39 \pm 9 | 39 \pm 10 | 55 \pm 13 |
| amplitude pico-a-pico [μV] | mín | 9,8 | 9,6 | 10,3 | 9,7 |
| | máx | 113,5 | 23,4 | 24,0 | 23,7 |
| | méd \pm desv.pad | 13,9 \pm 4,6 | 15,8 \pm 1,7 | 16,0 \pm 1,6 | 15,7 \pm 1,6 |
| frequência de atividade [Hz] | mín | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| | máx | 16,00 | 6,00 | 6,00 | 9,00 |
| | méd \pm desv.pad | 1,46 \pm 0,91 | 1,38 \pm 0,65 | 1,38 \pm 0,65 | 1,56 \pm 0,84 |

As fatias 2 e 3 foram monitoradas por 10 minutos cada e apresentaram resultados semelhantes, mostrando valores aproximados entre os parâmetros analisados. Além disso, em nenhum dos dois registros foram detectados potenciais de campo locais (PCLs). De fato, ambas as fatias foram provenientes do mesmo roedor, o que pode justificar a similaridade entre os registros obtidos. A fatia 4 foi monitorada por 9 minutos e apresentou maior taxa de contagem média de *spikes*, além de maior da frequência de atividade média. Tanto a fatia 4 quanto a fatia 1 apresentaram detecção de PCLs, sendo que os registros de PCLs de maior amplitude (exibido anteriormente na Figura 5.36) foram detectados na primeira fatia; esse fato possivelmente explica a maior amplitude pico-a-pico máxima dos *spikes* e

também a maior frequência de atividade máxima registrada na fatia 1, que foi monitorada por apenas 3 minutos.

5.6.3.2 Registros de atividade espontânea e evocada (Grupo 2)

Os resultados apresentados nesta seção são decorrentes da monitoração da atividade espontânea (utilizando solução de Ringer normal) e da atividade evocada (utilizando soluções excitatórias de concentrações iônicas distintas, chamadas de soluções 1 e 2, conforme descrito nos procedimentos experimentais) de 14 fatias de região cortical de cérebros de ratos. Os registros foram obtidos empregando-se cinco sensores MEAs diferentes.

A identificação de potenciais de campo locais (PCLs) foi realizada pela observação dos registros brutos (sem filtragem do sinal). Os PCLs identificados em 37 registros (dos quais 14 eram decorrentes de atividade espontânea e 23 de atividade evocada) se mostraram como oscilações de baixa frequência de amplitude variável entre 100 μV e 1,4 mV. Também nesta situação, houve a saturação do sinal registrado em alguns microeletrodos devido à limitação da faixa de entrada (*input range*) no momento de aquisição dos dados, conforme elucidado anteriormente na apresentação dos resultados das fatias do Grupo 1.

A Figura 5.39-A exibe o sinal bruto (sem filtragem) e exemplifica o registro de PCLs como resultado de atividade espontânea em uma fatia de tecido obtido com o sensor MEAD2400 (os dados correspondentes a esse registro serão posteriormente identificados como os dados da fatia 1). Percebe-se pelos gráficos que a amplitude dos PCLs não é constante ao longo da fatia, o que está de acordo com o fato de este tipo de sinal ser dependente da localização do microeletrodo em relação à região ativa da fatia cerebral. A Figura 5.39-B exibe esse mesmo registro após a filtragem do sinal na faixa de frequências entre 300Hz-5kHz, onde as linhas verticais no sinal representam *spikes* de amplitude pico-a-pico variável entre aproximadamente 400-600 μV . A ampliação do *spike* detectado pelo microeletrodo 63 é mostrado na Figura 5.40, onde é possível ver com maiores detalhes o formato de onda registrado.

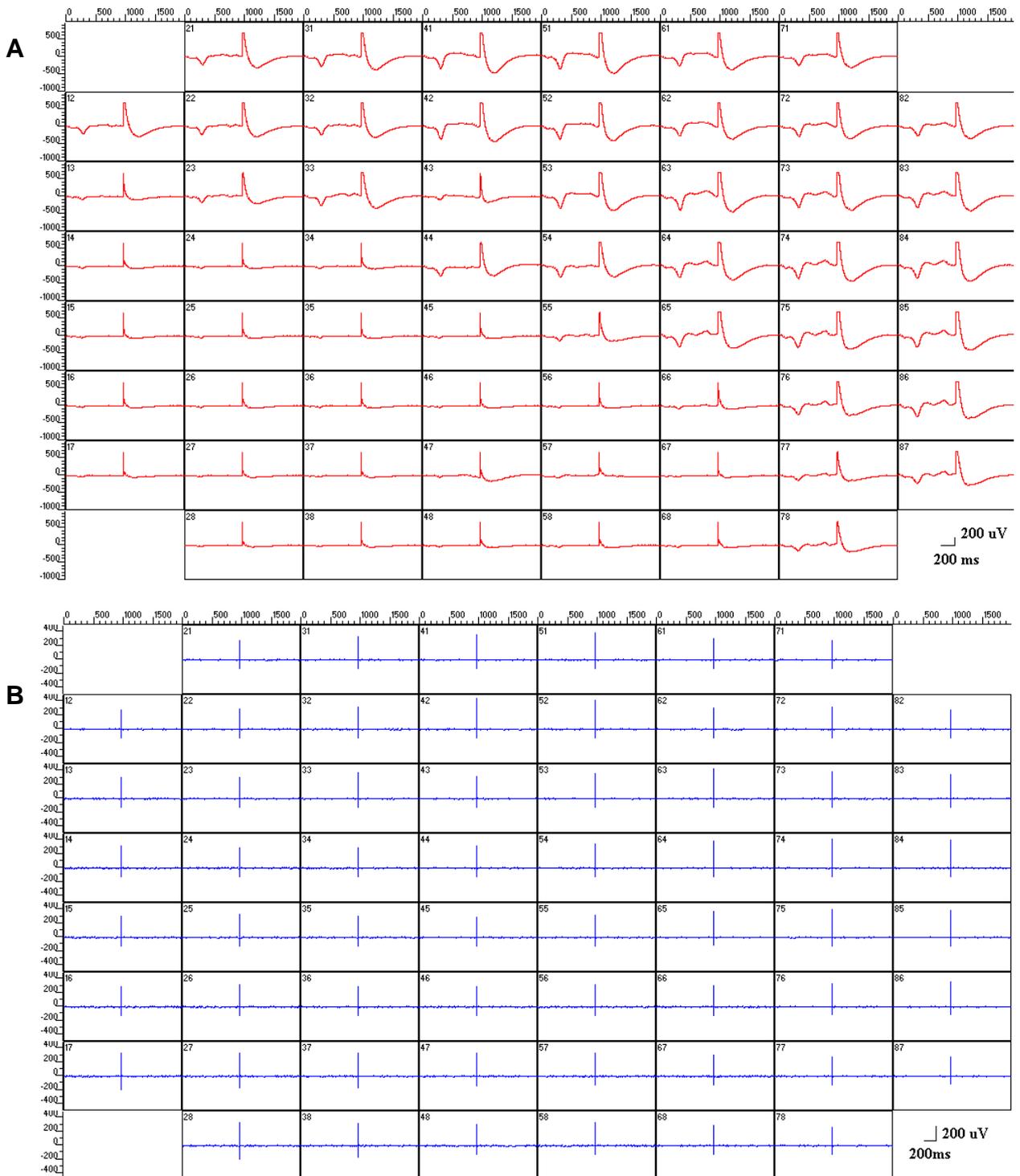


Figura 5.39 Registro de atividade espontânea em fatia de tecido (fatia 1): (A) sinal bruto mostrando detecção de potenciais de campo locais. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 1000\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms); (B) sinal após filtragem na faixa de frequências de 300Hz-5kHz, onde os picos representam *spikes*. Cada gráfico representa o potencial (escala $\pm 500\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 2000ms).

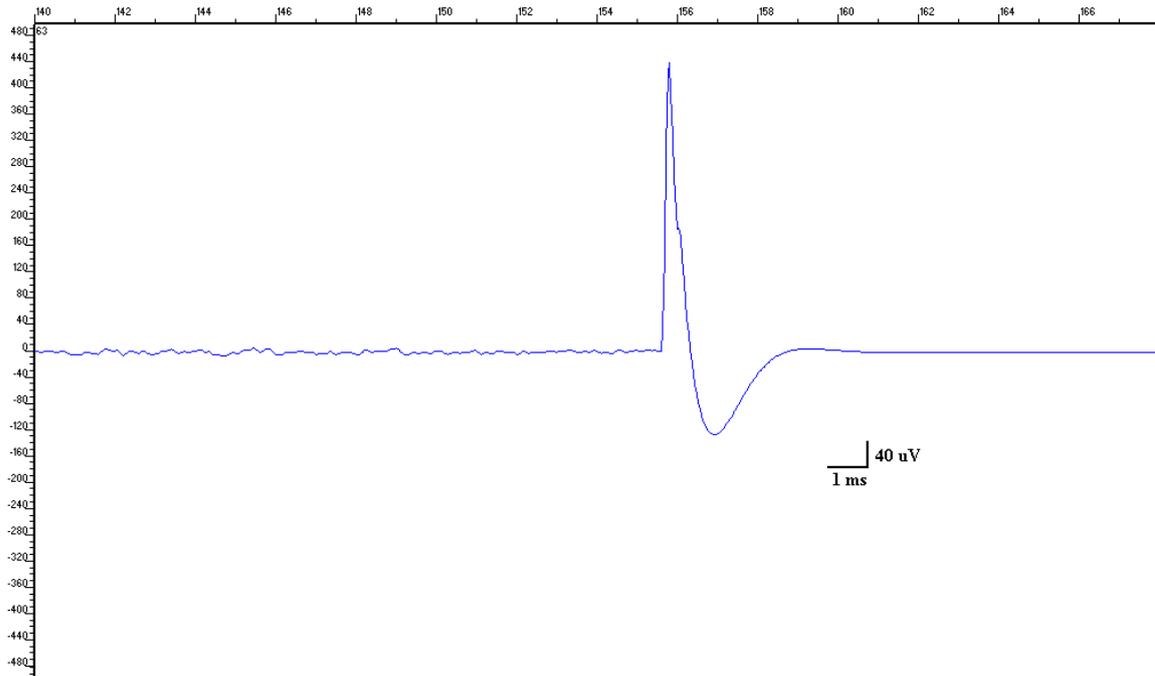


Figura 5.40 Detalhe do *spike* detectado no microeletrodo 63 do sensor MEAD2400 durante registro de atividade espontânea da fatia 1. O gráfico representa o potencial (escala $\pm 500\mu\text{V}$) em função do tempo (escala 28ms).

Os registros obtidos com todas as fatias foram filtrados na faixa de 300Hz-5kHz (com filtro Butterworth de segunda ordem) e os potenciais de ação foram detectados considerando-se o limite de -4σ em cada canal individualmente. Os limiares de amplitude estabelecidos em cada fatia analisada são mostrados na Tabela 5.2. Em suma, esses valores variam entre $-7,8\mu\text{V}$ e $-11,2\mu\text{V}$.

Tabela 5.2 Limiares de amplitude para detecção de *spikes* nos registros do Grupo 2

| Parâmetro | Limiar de amplitude [μV] | | |
|-----------------|---------------------------------------|-------|--------------------|
| | mín | máx | méd \pm desv.pad |
| Fatia 1 | -7,9 | -9,4 | -8,6 \pm 0,4 |
| Fatia 2 | -8,4 | -11,2 | -9,4 \pm 0,6 |
| Fatia 3 | -7,8 | -10,0 | -9,3 \pm 0,4 |
| Fatia 4 | -7,9 | -9,2 | -8,5 \pm 0,3 |
| Fatia 5 | -7,9 | -9,2 | -8,5 \pm 0,3 |
| Fatia 6 | -8,0 | -9,8 | -8,9 \pm 0,3 |
| Fatia 7 | -9,1 | -10,8 | -9,7 \pm 0,3 |
| Fatia 8 | -8,8 | -10,5 | -9,8 \pm 0,3 |
| Fatia 9 | -9,1 | -10,5 | -9,8 \pm 0,3 |
| Fatia 10 | -8,6 | -9,8 | -9,4 \pm 0,2 |
| Fatia 11 | -9,0 | -10,5 | -10,0 \pm 0,3 |
| Fatia 12 | -9,1 | -9,9 | -9,5 \pm 0,2 |
| Fatia 13 | -9,2 | -10,3 | -9,8 \pm 0,2 |
| Fatia 14 | -9,0 | -9,3 | -8,5 \pm 2,3 |

A contagem de picos por minuto (considerando-se que o número total de *spikes* identificados foi dividido pelo tempo total de registro) é mostrada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Número de *spikes* por minuto detectados nos registros do Grupo 2

| Parâmetro | Contagem de picos por minuto [n/min] | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------------|-----|--------------|-----------|-----|--------------|-----------|-------|--------------|
| | Ringer | | | Solução 1 | | | Solução 2 | | |
| Solução | mín | máx | méd±desv.pad | mín | máx | méd±desv.pad | mín | máx | méd±desv.pad |
| Fatia 1 | 13 | 89 | 33±14 | 3 | 71 | 30±21 | 4 | 190 | 71±57 |
| Fatia 2 | 16 | 68 | 42±10 | 40 | 295 | 109±48 | 48 | 1073 | 275±242 |
| Fatia 3 | 60 | 228 | 132±39 | 72 | 276 | 182±44 | 46 | 226 | 154±37 |
| Fatia 4 | 24 | 78 | 51±12 | 12 | 87 | 41±15 | 11 | 92 | 42±17 |
| Fatia 5 | 35 | 121 | 70±19 | 46 | 162 | 90±25 | 43 | 180 | 87±29 |
| Fatia 6 | 29 | 108 | 64±18 | 6 | 84 | 29±15 | 5 | 69 | 26±13 |
| Fatia 7 | 23 | 57 | 37±8 | 22 | 68 | 39±8 | 20 | 54 | 34±8 |
| Fatia 8 | 21 | 66 | 35±8 | 18 | 66 | 35±9 | 15 | 61 | 33±8 |
| Fatia 9 | 16 | 60 | 35±8 | 17 | 70 | 35±10 | 1 | 12039 | 397±1964 |
| Fatia 10 | 25 | 95 | 43±13 | 29 | 75 | 48±12 | 32 | 100 | 53±14 |
| Fatia 11 | 16 | 58 | 34±9 | 18 | 65 | 35±9 | 12 | 47 | 25±7 |
| Fatia 12 | 16 | 56 | 33±9 | 21 | 70 | 40±12 | 19 | 75 | 40±12 |
| Fatia 13 | 16 | 42 | 29±6 | 17 | 51 | 33±8 | 12 | 59 | 35±9 |
| Fatia 14 | 5 | 53 | 19±9 | 2 | 14 | 6±3 | 1 | 12 | 5±2 |

Os dados da Tabela 5.3 mostram que a fatia 14 apresentou a menor média de contagem de *spikes* por minuto dentre todos os registros, sendo que as contagens foram diminuindo ao longo do experimento. Essa fatia já apresentava uma atividade basal (medida com solução de Ringer) inferior quando comparada aos demais resultados apresentados e, considerando-se que essa fatia foi monitorada por 30 minutos, presume-se que a falta de perfusão adequada para fornecer nutrientes e oxigênio causou a “morte” do tecido. Por outro lado, as fatias 2, 3, 4 e 5 apresentaram altas taxas médias de *spikes*, que se mantiveram elevadas ou ainda aumentaram ao longo dos registros, realizados por 9, 24, 18 e 18 minutos, respectivamente. As demais fatias apresentaram valores intermediários de detecção de potenciais de ação por minuto, exceto a fatia 9, que apresentou um elevação brusca da taxa de *spikes* após a adição da solução 2 na câmara de registro do MEA.

A Figura 5.41 mostra a frequência de atividade da fatia 1, obtida com o sensor MEAD2400. A fatia foi monitorada por 9 minutos; a solução 1 foi adicionada à câmara de registro do sensor no instante $t=180s$ e a solução 2 no instante $t=360s$. Comparando-se a Figura 5.39 com a Figura 5.41, é possível inferir que nos canais em que houve a detecção de PCLs de maior amplitude, foram registradas as maiores frequências de atividade.

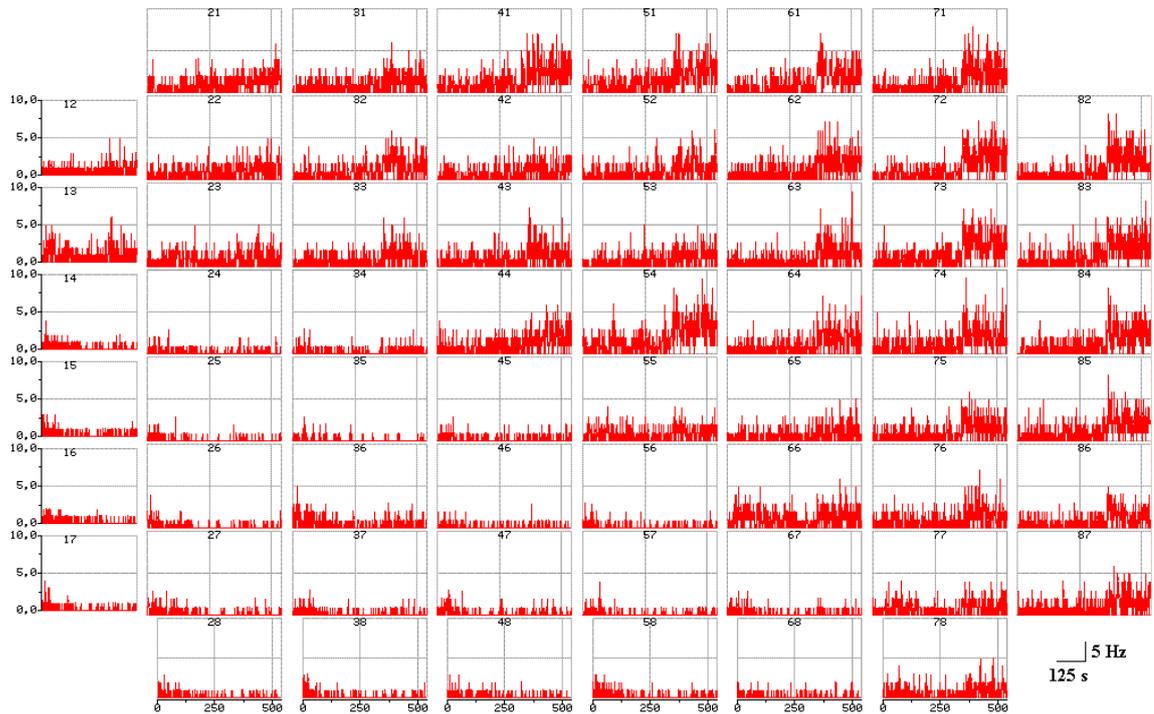


Figura 5.41 Freqüência de atividade detectada na fatia 1 com solução de Ringer (0-180s), solução 1 (180-360s) e solução 2 (360-540s). Cada gráfico representa a freqüência (escala 10Hz) em função do tempo (escala 540s).

As freqüências de atividade obtidas com as demais fatias são apresentadas na Tabela 5.4. A relação entre amplitude de potencial de campo e freqüencia de atividade descrita no caso da fatia 1 também foi observada nos registros obtidos com as fatias 2 e 9, que mostraram uma elevação da freqüencia de atividade após serem banhadas com a solução excitatória 2.

Tabela 5.4 Freqüências de atividade detectadas nos registros do Grupo 2

| Parâmetro | Frequencia de atividade [Hz] | | | | | | | | |
|-----------|------------------------------|------|--------------|-----------|------|--------------|-----------|-------|--------------|
| | Ringer | | | Solução 1 | | | Solução 2 | | |
| Solução | mín | máx | méd±desv.pad | mín | máx | méd±desv.pad | mín | máx | méd±desv.pad |
| Fatia 1 | 1,0 | 6,0 | 1,36±0,65 | 1,0 | 6,0 | 1,40±0,68 | 1,0 | 9,0 | 2,15±1,32 |
| Fatia 2 | 1,0 | 6,0 | 1,40±0,69 | 1,0 | 28,0 | 2,31±1,56 | 1,0 | 29,0 | 5,03±4,51 |
| Fatia 3 | 1,0 | 7,0 | 1,51±0,78 | 1,0 | 8,0 | 1,70±0,92 | 1,0 | 8,0 | 1,59±0,84 |
| Fatia 4 | 1,0 | 6,0 | 1,26±0,53 | 1,0 | 5,0 | 1,21±0,48 | 1,0 | 5,0 | 1,22±0,49 |
| Fatia 5 | 1,0 | 6,0 | 1,33±0,61 | 1,0 | 7,0 | 1,45±0,73 | 1,0 | 8,0 | 1,45±0,74 |
| Fatia 6 | 1,0 | 6,0 | 1,38±0,66 | 1,0 | 5,0 | 1,15±0,40 | 1,0 | 5,0 | 1,14±0,38 |
| Fatia 7 | 1,0 | 7,0 | 1,36±0,63 | 1,0 | 6,0 | 1,37±0,65 | 1,0 | 5,0 | 1,32±0,59 |
| Fatia 8 | 1,0 | 5,0 | 1,33±0,60 | 1,0 | 6,0 | 1,33±0,61 | 1,0 | 6,0 | 1,32±0,61 |
| Fatia 9 | 1,0 | 16,0 | 1,33±0,61 | 1,0 | 5,0 | 1,34±0,62 | 1,0 | 360,0 | 16,11±62,61 |
| Fatia 10 | 1,0 | 8,0 | 1,43±0,72 | 1,0 | 6,0 | 1,49±0,74 | 1,0 | 9,0 | 1,53±0,80 |
| Fatia 11 | 1,0 | 5,0 | 1,33±0,59 | 1,0 | 6,0 | 1,33±0,61 | 1,0 | 6,0 | 1,28±0,55 |
| Fatia 12 | 1,0 | 5,0 | 1,32±0,60 | 1,0 | 6,0 | 1,40±0,68 | 1,0 | 6,0 | 1,41±0,69 |
| Fatia 13 | 1,0 | 5,0 | 1,26±0,52 | 1,0 | 8,0 | 1,32±0,60 | 1,0 | 6,0 | 1,36±0,64 |
| Fatia 14 | 1,0 | 3,0 | 1,06±0,25 | 1,0 | 3,0 | 1,06±0,24 | 1,0 | 3,0 | 1,04±0,20 |

Sabe-se que, em registros com fatias de córtex cerebral de ratos, freqüências de atividade de até 10Hz estão associadas a um estado de despolarização de neurônios disparando potenciais de ação de maneira regular [155]. Os dados da Tabela 5.4 mostram que, exceto os resultados das fatias 2 e 9, todas as freqüências detectadas se mantiveram abaixo de 10Hz. Dentro deste limite, apenas a fatia 1 apresentou aumento da freqüência de atividade após a troca da solução de Ringer pela solução 1, que se tornou mais pronunciado após o uso da solução 2. As demais fatias mantiveram sua freqüência de atividade relativamente constante, independentemente da solução utilizada.

De maneira geral, os dados sugerem que o aumento da freqüência de atividade também é acompanhado de um aumento na amplitude dos potenciais de ação. Esse fato é evidenciado na comparação entre a Figura 5.42, que mostra a frequência de atividade detectada na fatia 2 com o sensor MEAD2422, e a Figura 5.43, que mostra a amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados nos mesmos registros. A fatia 2 foi monitorada por nove minutos; a solução 1 foi adicionada no instante $t=180s$ e a solução 2 no instante $t=360s$.

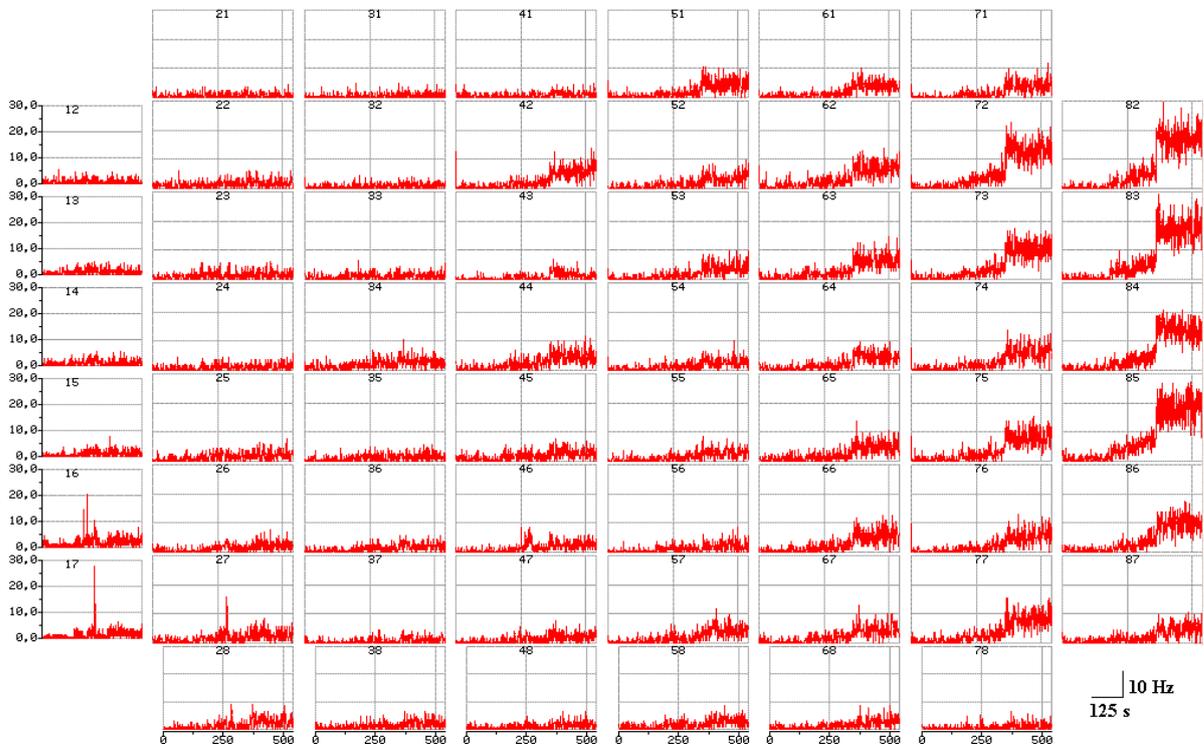


Figura 5.42 Freqüência de atividade detectada na fatia 2 com solução de Ringer (0-180s), solução 1 (180-360s) e solução 2 (360-540s). Cada gráfico representa a freqüência (escala 20Hz) em função do tempo (escala 540s).

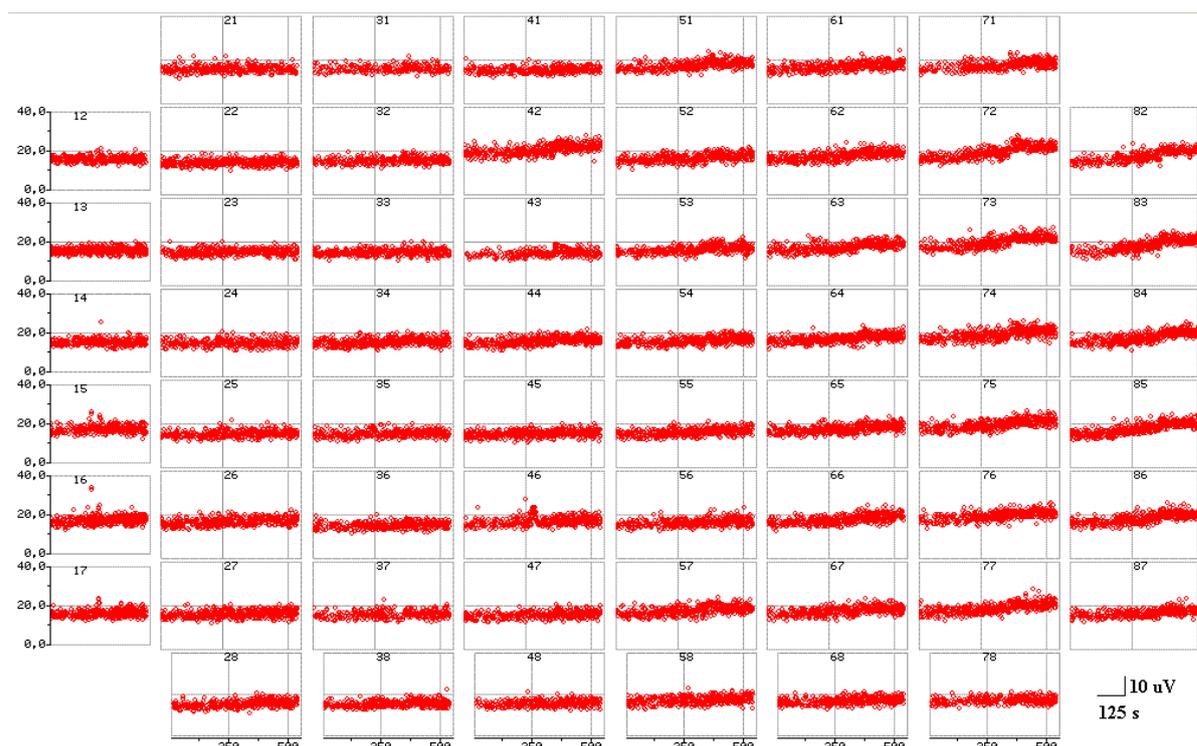


Figura 5.43 Amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados na fatia 2 com solução de Ringer (0-180s), solução 1 (180-360s) e solução 2 (360-540s). Cada gráfico representa o potencial (escala 40 μ V) em função do tempo (escala 540s).

Os valores das amplitudes pico-a-pico dos *spikes* detectados em todas as fatias são apresentadas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados nos registros do Grupo 2

| Parâmetro | Amplitude pico-a-pico [μ V] | | | | | | | | |
|-----------|----------------------------------|-------|--------------------|-----------|-------|--------------------|-----------|-------|--------------------|
| | Ringer | | | Solução 1 | | | Solução 2 | | |
| Solução | mín | máx | méd \pm desv.pad | mín | máx | méd \pm desv.pad | mín | máx | méd \pm desv.pad |
| Fatia 1 | 8,6 | 579,8 | 20,3 \pm 53,7 | 10,3 | 103,9 | 13,9 \pm 1,9 | 10,52 | 20,70 | 14,54 \pm 1,42 |
| Fatia 2 | 11,2 | 24,6 | 15,6 \pm 1,7 | 11,0 | 34,0 | 16,6 \pm 2,0 | 11,25 | 27,45 | 17,79 \pm 2,51 |
| Fatia 3 | 10,5 | 23,6 | 15,6 \pm 1,6 | 10,0 | 23,6 | 15,9 \pm 1,6 | 9,71 | 24,26 | 15,72 \pm 1,63 |
| Fatia 4 | 10,0 | 21,1 | 15,3 \pm 4,2 | 11,5 | 21,1 | 15,5 \pm 1,4 | 11,12 | 21,16 | 15,52 \pm 1,58 |
| Fatia 5 | 10,0 | 19,5 | 13,9 \pm 1,3 | 10,0 | 20,1 | 14,1 \pm 1,4 | 10,06 | 20,91 | 14,09 \pm 1,37 |
| Fatia 6 | 9,2 | 95,4 | 14,6 \pm 6,0 | 10,6 | 20,6 | 14,2 \pm 1,3 | 10,14 | 20,56 | 14,17 \pm 1,32 |
| Fatia 7 | 11,3 | 23,9 | 16,0 \pm 1,6 | 11,2 | 22,9 | 16,0 \pm 1,6 | 11,31 | 23,72 | 15,94 \pm 1,59 |
| Fatia 8 | 11,4 | 23,0 | 16,1 \pm 1,6 | 11,3 | 23,8 | 16,1 \pm 1,6 | 11,31 | 24,81 | 16,07 \pm 1,59 |
| Fatia 9 | 11,3 | 23,6 | 16,1 \pm 1,6 | 12,0 | 22,4 | 16,2 \pm 1,6 | 6,52 | 806,7 | 21,14 \pm 25,3 |
| Fatia 10 | 11,0 | 27,3 | 15,6 \pm 1,5 | 11,1 | 22,9 | 15,7 \pm 1,5 | 10,60 | 22,49 | 15,78 \pm 1,53 |
| Fatia 11 | 11,3 | 23,8 | 16,5 \pm 1,6 | 11,2 | 23,3 | 16,5 \pm 1,6 | 11,62 | 24,39 | 16,38 \pm 1,57 |
| Fatia 12 | 11,7 | 22,1 | 15,8 \pm 1,5 | 11,0 | 22,7 | 15,8 \pm 1,5 | 11,43 | 23,12 | 15,87 \pm 1,50 |
| Fatia 13 | 11,9 | 22,1 | 16,1 \pm 1,5 | 11,7 | 22,5 | 16,2 \pm 1,5 | 11,85 | 22,89 | 16,28 \pm 1,55 |
| Fatia 14 | 8,3 | 21,8 | 15,0 \pm 2,0 | 8,1 | 21,1 | 14,9 \pm 2,1 | 8,02 | 20,91 | 14,80 \pm 2,12 |

Os dados da Tabela 5.5 mostram que os *spikes* detectados apresentaram amplitude pico-a-pico média variável entre 14 μV e 21 μV . As fatias 1, 6 e 9 apresentaram *spikes* cujas amplitudes máximas se destacaram das demais. A análise dos registros dessas fatias mostrou que esses *spikes* correspondem aos potenciais de campo locais com oscilações de grande amplitude, conforme discutido anteriormente. Uma vez que os PCLs apresentaram duração típica de apenas alguns milisegundos, no restante tempo foram detectados *spikes* de amplitude similar aos demais registros apresentados. Embora a fatia 14 tenha apresentado atividade inferior às demais fatias (de acordo com a avaliação da contagem de *spikes* por minuto), os *spikes* identificados mostraram amplitude similar.

Finalmente, é importante ressaltar que uma avaliação mais precisa dos resultados obtidos tanto nos registros de atividade espontânea quanto evocada depende da identificação da região da fatia de cérebro depositada sobre o arranjo de microeletrodos, pois cada tipo de neurônio expressa atividade eletrofisiológica característica. No entanto, neste trabalho não foi realizada a correlação entre a atividade detectada em cada microeletrodo e a região cortical correspondente. Além disso, a variabilidade de resultados quanto à utilização das soluções excitatórias provavelmente pode ser atribuído ao fato de as fatias não serem provenientes da mesma região cortical. Convém ainda destacar que a apresentação dos resultados foi feita de maneira a resumir a enorme quantidade de dados obtidos, embora a avaliação de apenas valores máximo, mínimo e média dos parâmetros investigados certamente conduza à redução da informação registrada nos 60 microeletrodos dos sensores MEAs.

5.6.4 Considerações sobre o uso do software no processamento dos dados

O processamento e a análise dos registros obtidos experimentalmente se mostraram altamente dependentes do desempenho do software MC_Rack, não apenas em relação aos parâmetros de análise que podem ser efetivamente determinados pelo experimentador, mas também em relação a erros de funcionamento (*bugs*) do software. Dentre os parâmetros selecionados experimentalmente, constatou-se que mudanças nos seguintes valores alteraram significativamente os resultados obtidos:

- Na ferramenta **Spike Sorter**: variações na janela de tempo para identificação de potencial de ação (*spike cutoff*) em torno do evento (*pré-trigger*, *post-trigger* e *dead time*) que é o potencial atingir o limiar de amplitude previamente estipulado geraram diferentes valores de amplitude pico-a-pico para um mesmo *spike*.
- Na ferramenta **Analyzer**: diferentes intervalos discretos de tempo (bins) geraram diferentes valores de frequência de atividade e de número total de *spikes* identificados.

Os seguintes erros de funcionamento do software foram identificados:

- Alguns gráficos não mostraram todos os valores dos parâmetros de análise obtidos após os dados gerados terem sido exportados em formato ASCII.
- Não foi possível processar os parâmetros de análise investigados quando utilizado valor de bin superior a 60 segundos, embora o software disponibilize a seleção de intervalos de tempo nas escalas de minutos e horas. Esse fato impossibilitou, por exemplo, uma análise direta da atividade eletrofisiológica geral das amostras durante todo o tempo de monitoração de cada uma delas. Assim, foi necessário gerar os dados empregando-se intervalos de tempo de 1s, exportar esses dados em formato ASCII e importá-los com outro software estatístico para então somar os valores obtidos, o que aumentou consideravelmente o tempo de processamento dos dados.
- O software teve que ser reinicializado várias vezes durante o processamento dos registros mais longos (com 30 minutos de duração), possivelmente devido ao alto desempenho computacional exigido para isso (considerando-se que o tamanho de um registro de 30min é de cerca de 5 GB).

Salienta-se que o processamento de dados obtidos com arranjos de microeletrodos é considerado, independentemente do software utilizado, uma etapa difícil e trabalhosa de ser conduzida devido ao enorme volume de dados decorrentes do registro em dezenas (ou até centenas) de canais simultaneamente. Por essa razão, diversos esforços têm sido conduzidos no sentido tanto de criar ferramentas computacionais de análise mais robustas [102, 106], quanto de interpretar esses dados [47, 48].

6 CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu na implementação e no teste de um sistema de eletrodos microfabricados, empregando arranjos de microeletrodos (MEAs) para estimular e registrar a resposta eletrofisiológica de células e tecidos neurais em diversos pontos de maneira extracelular e simultânea sob condições *in vitro*.

A fim de contextualizar este trabalho sob uma perspectiva interdisciplinar, apresentou-se inicialmente o embasamento teórico necessário ao entendimento dos mecanismos biológicos responsáveis pela geração, transmissão e modulação de sinais elétricos no sistema nervoso central de mamíferos. As estruturas cerebrais de humanos e de roedores foram apresentadas de maneira geral e comparadas, sendo dada ênfase às regiões do córtex cerebral e do hipocampo, visto que essas estruturas figuram entre as mais investigadas na área da neuroeletrofisiologia. Os principais métodos empregados em experimentação eletrofisiológica *in vitro* foram brevemente descritos, e também foram esclarecidas quais são as principais diferenças entre a obtenção de registros de maneira intracelular e extracelular.

Em seguida, os princípios de funcionamento e o design básico de arranjos de microeletrodos foram definidos, e discorreu-se acerca de seu desenvolvimento tecnológico desde a concepção inicial do biosensor até as mais recentes inovações tecnológicas. Além disso, foi apresentado um resumo do potencial de aplicações do dispositivo, tanto em relação aos diversos tipos de preparações biológicas que podem ser estudadas com os MEAs, quanto aos parâmetros eletrofisiológicos que podem ser investigados com esses biosensores.

A caracterização dos MEAs empregados neste trabalho foi realizada a partir de três abordagens: (1) obtenção de imagens por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura, que permitiram conhecer a microestrutura do sensor e visualizar a distribuição dos 60 microeletrodos dentro do arranjo; (2) análise

qualitativa de composição química através de espectroscopia de raios X por energia dispersiva, que possibilitou a identificação dos elementos químicos constituintes do dispositivo; e (3) análise do nível de ruído dos microeletrodos através da avaliação do valor RMS dos potenciais registrados com os MEAs preenchidos com solução tampão padrão, cujos resultados possibilitaram uma avaliação geral do estado dos sensores e permitiram a identificação de microeletrodos defeituosos nos arranjos.

A utilização de equipamentos de eletrofisiologia previamente disponíveis no Laboratório de Neurociências foi viabilizada através da construção de um interfaceamento eletrônico entre um dispositivo MEA e um sistema de aquisição de dados convencional com oito canais. Para tanto, foram construídos dois diferentes protótipos de interfaces e realizados testes de desempenho de cada um. Constatou-se o correto funcionamento de ambos os protótipos, embora a presença de ruído de baixa frequência nos registros obtidos tenha exigido o posicionamento da interface dentro de uma gaiola de Faraday.

Posteriormente, um sistema comercial específico para aquisição de dados com arranjos de microeletrodos foi instalado. A análise do nível de ruído do pré-amplificador do sistema MEA comercial foi realizada através da avaliação dos potenciais registrados com um dispositivo modelo de teste. Os resultados mostraram que o sistema MEA não sofria interferência externa de ruído eletrônico proveniente de outros equipamentos, não exigindo, portanto, sua localização em uma gaiola de Faraday e assim possibilitando a condução de experimentos em diferentes espaços do Laboratório. Uma tentativa de adaptação de um sistema convencional de perfusão por bomba peristáltica ao sistema MEA foi realizada com o propósito de viabilizar a condução de experimentos com fatias de tecido durante longos períodos, porém os resultados obtidos foram insatisfatórios devido ao alto nível de ruído dos registros.

Um procedimento operacional padrão (POP) foi criado, no qual foram definidos os procedimentos experimentais relacionados ao correto manuseio dos MEAs antes, durante e após a experimentação. Essas recomendações foram estabelecidas com o propósito de se prolongar a vida útil dos arranjos de microeletrodos e de se otimizar a experimentação com preparação biológica.

Testes do sistema MEA instalado foram realizados através de experimentação com cultura de células neuronais hipocampais dissociadas de camundongos neonatos e fatias de cérebro (região cortical) de ratos. Em ambos os

casos, durante a experimentação com material biológico a amplitude pico-a-pico do ruído de fundo dos microeletrodos se manteve em torno de 10 μV , valor considerado dentro das especificações do fabricante dos sensores.

Optou-se pela detecção de atividade eletrofisiológica através da identificação de potenciais de ação pelo “método de limiar de amplitude”, o que exigiu a filtragem do sinal para eliminação de possíveis ruídos de altas e baixas frequências. Desta forma, a influência de diferentes bandas de filtragem e da seleção de diferentes valores de limiar sobre a atividade registrada foi investigada através da comparação entre o sinal contendo apenas ruído de fundo (registros obtidos com MEAs preenchidos apenas por solução tampão padrão - PBS) e aquele onde se supôs haver a detecção de atividade eletrofisiológica (registros com preparação biológica).

Os resultados indicaram que a aplicação de uma faixa de frequência de filtragem do sinal mais ampla (300Hz-5kHz) possibilitou uma maior detecção de picos em função do limiar de potencial e também causou menor atenuação do sinal. A aplicação de filtros se mostrou fundamental no processamento dos dados, pois possibilitou separar o sinal nos seus componentes de baixa frequência (para identificação de potenciais de campo locais) e de alta frequência (para identificação de potenciais de ação ou *spikes*). A comparação do sinal registrado com PBS e com material biológico indicou que contagem de picos em cada caso se diferencia mais quanto maior o valor absoluto do limiar estipulado, e que a amplitude pico-a-pico dos potenciais identificados foi maior nos registros com material biológico.

A cultura celular utilizada nos experimentos se desenvolveu de forma mista (a presença de células gliais e neuronais sobre o MEA foi identificada por microscopia óptica). A monitoração da atividade celular espontânea foi feita no 12º dia da cultura, e registros foram obtidos antes e após a troca do meio de cultura padrão por solução eletrofisiológica extracelular, utilizada com o propósito de favorecer a captação de sinais biológicos. Os resultados indicaram a detecção de potenciais de campo locais (PCLs) de amplitude pico-a-pico variável entre 200-300 μV na cultura com meio de cultura padrão (situação A) e com amplitude de 70-140 μV após troca por solução eletrofisiológica (situação B). Além disso, um número reduzido de microeletrodos detectou PCLs na situação B, que mostrou também uma leve diminuição do número de contagem de *spikes* e menor frequência de atividade, embora a amplitude pico-a-pico dos *spikes* detectados não tenha mostrado diferença significativa nas duas situações.

A experimentação com tecido foi realizada de modo a ser registrada a atividade das fatias de córtex de maneira espontânea (fatias imersas em solução de Ringer normal) e evocada (fatias imersas em duas diferentes soluções excitatórias com concentrações iônicas alteradas, uma delas apresentando muito baixa concentração de cálcio e alta concentração de magnésio.). O efeito do uso das soluções excitatórias não foi unívoco, pois em algumas fatias detectou-se um aumento da atividade registrada, porém em outras não foi observado nenhum efeito significativo. Contudo, esta observação provavelmente pode ser atribuída ao fato de não terem sido registradas atividades das mesmas regiões corticais. Os resultados indicaram a detecção de PCLs de amplitude variável entre 100 μ V e 1,4mV decorrentes tanto de atividade espontânea quanto evocada. De maneira geral, constatou-se a detecção de maior número de *spikes* por minuto, de maior frequência de atividade e de maior amplitude pico-a-pico dos *spikes* nos microeletrodos que captaram PCLs de maior amplitude.

7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Pretende-se continuar as ações desenvolvidas neste trabalho, ainda no âmbito do projeto de pesquisa já citado. Dentre os objetivos futuros, pode-se citar:

- Complementação do sistema MEA através de instalação de bomba de perfusão, estimulador elétrico e plataforma de visualização específicos para experimentação com arranjos de microeletrodos. O uso da bomba de perfusão permitirá a condução de experimentação com fatias de tecido por tempo prolongado; o uso do estimulador elétrico possibilitará a obtenção de registros da atividade evocada por paradigmas específicos de experimentação; e a plataforma de visualização possibilitará a monitoração visual da preparação biológica sobre a área de trabalho do MEA, tornando possível então correlacionar diretamente a atividade detectada em cada microeletrodo do arranjo com a região da fatia de tecido ou células próximas.
- Otimização da experimentação com fatias de tecido através da obtenção de fatias de menor espessura (300 μ m) e da utilização de “grades” (*harp grids*) sobre a fatia durante a experimentação. Espera-se que essas medidas facilitem a aderência da fatia aos microeletrodos, melhorando assim a relação sinal-ruído dos registros e possibilitando a detecção de potenciais de ação de maior amplitude. Além disso, o uso de “grade” evitará que a fatia flutue durante a perfusão de solução.
- Realização de testes experimentais com tecido cerebral humano de acordo com a proposta de pesquisa avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS (CAAE 22487313.5.0000.5336 – Parecer nº 475.150). As amostras de tecido humano serão obtidas no âmbito do Programa de Cirurgia de Epilepsia do Hospital São Lucas da PUCRS em procedimentos cirúrgicos que buscam tratar epilepsias focais refratárias aos fármacos antiepilépticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] GRAHAM, J.; Gerard, R. W. Membrane potentials and excitation of impaled single muscle fibers. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 28, n. 1, p. 99-117, 1946.

[2] GREENBERG, D. A.; Aminoff, M. S.; Simon, R. P. **Neurologia clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 378 p.

[3] ENGEL, J. et al. **Epilepsy**: global issues for the practicing neurologist. World Federation of Neurology. Series of Seminars in Clinical Neurology. New York: Demos Medical Publishing, 2005. 140 p.

[4] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epilepsy. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/epilepsy/en/>>. Acesso em: 31 ago. 2013.

[5] GARCIA, E. A. C. **Biofísica**. São Paulo: Sarvier, 1998. 387 p.

[6] AZEVEDO, F. A. C. et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 513, n. 5, p. 532-541, 2009.

[7] BEAR, M. F.; Connors, B. W.; Paradiso, M. A. **Neuroscience**: exploring the brain. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 857 p.

[8] DROUAL, R. Notes for Principles of Human Physiology. Disponível em: <<http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Navigation%20Links/Navigation%20Link%20to%20Text%20Notes.html>>. Acesso em: 29 maio 2013.

- [9] BARR, R. C. Basic Electrophysiology. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **The Biomedical Engineering Handbook**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- [10] NICHOLLS, J. G. et al. **From Neuron to Brain**. 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2011. 621 p.
- [11] BEAN, B. P. The action potential in mammalian central neurons. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 451-465, 2007.
- [12] DAMASK, A. C. **Medical Physics**. Vol. I: Physiological Physics, External Probes. New York: Academic Press, 1978.
- [13] REILLY, J. P.; Geddes, L. A.; Polk, C. Bioelectricity. In: DORF, R. C. (Ed.). **The Electrical Engineering Handbook**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1997. 113 p.
- [14] SCHMIDT, R. F. et al. **Neurofisiologia**. 4. ed. São Paulo: EPU, 1979.
- [15] ASSIS, T. A. D.; Miranda, J. G. V.; Cavalcante, S. L. D. P. Dynamics of nervous conduction via the FitzHugh-Nagumo Model. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 32, n. 1, p. 1307-1310, 2010.
- [16] KRUEGER-BECK, E. et al. Potencial de ação: do estímulo à adaptação neural. **Fisioterapia em Movimento**, v. 24, n. 3, p. 535-547, 2011.
- [17] PURVES, D. et al. **Neurociências**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- [18] POTENCIAL DE AÇÃO. In: Wikipédia. 2013. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Potencial_de_a%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em: 4 set. 2013.
- [19] HODGKIN, A. L.; Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **The Journal of Physiology**, v. 117, n. 4, p. 500-544, 1952.

- [20] HOBBIE, R. K.; Roth, B. J. **Intermediate Physics for Medicine and Biology**. 4 ed. New York: Springer, 2006. 616 p.
- [21] SORIANO, D. C.; Ricardo, R. A.; Bassani, J. W. M. Resolvendo o modelo de Hodgkin-Huxley: uma proposta didática. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, 2006, São Pedro. Anais. 2006.
- [22] SAKMANN, B.; Neher, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Annu Rev Physiol**, v. 46, p. 455-72, 1984.
- [23] KOUTSOU, A.; Kanev, J.; Christodoulou, C. Measuring input synchrony in the Ornstein-Uhlenbeck neuronal model through input parameter estimation. **Brain Res**, v. 1536, p. 97-106, 2013.
- [24] GAIARSA, J.-L.; Caillard, O.; Ben-ari, Y. Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 11, p. 564-570, 2002.
- [25] MCBAIN, C. J.; Kauer, J. A. Presynaptic plasticity: targeted control of inhibitory networks. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 19, n. 3, p. 254-262, 2009.
- [26] YANG, Y.; Calakos, N. Presynaptic long-term plasticity. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 5, p. 1-22, 2013.
- [27] NARAYANAN, N. S. et al. Common medial frontal mechanisms of adaptive control in humans and rodents. **Nature Neuroscience**, v. 16, p. 1888-1895, 2013.
- [28] NASRALLAH, F. A.; Tay, H. C.; Chuang, K. H. Detection of functional connectivity in the resting mouse brain. **Neuroimage**, v. 86, p. 417-424, 2014.
- [29] MANGER, P. R. et al. Is 21st century neuroscience too focussed on the rat/mouse model of brain function and dysfunction? **Frontiers of Neuroanatomy**, v. 2, p. 1-7, 2008.

[30] ABBOTT, A. Neuroscience: The rat pack. **Nature News**, v. 465, n. 7296, p. 282-283, 2010.

[31] UNIVERSITY OF UTAH HEALTH SCIENCES. Learn Genetics. Mice are Good Model Organisms for Addiction Research. Disponível em: <<http://learn.genetics.utah.edu/content/addiction/genetics/neurobiol.html>>. Acesso em: 23 ago 2012.

[32] DUBUC, B. The brain from top to bottom. Disponível em: <http://thebrain.mcgill.ca/flash/d/d_02/d_02_cl/d_02_cl_vis/d_02_cl_vis.html>. Acesso em: 15 nov. 2012.

[33] ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE. Laboratory of Neural Microcircuitry. Electrophysiology & Microcircuitry. Disponível em: <<http://markram-lab.epfl.ch/cms/lang/en/pid/81242>>. Acesso em: 03 set. 2013.

[34] NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. NIAAA Publications. Alcohol's effects on the adolescent brain - what can be learned from animal models. Disponível em: <<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh284/213-221.htm>>. Acesso em: 20 mai 2012.

[35] SCORZA, F. A. et al. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 2-A, p. 283-288, 2005.

[36] CASSEL, J.-C. et al. The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. **Progress in Neurobiology**, v. 51, n. 6, p. 663-716, 1997.

[37] SPIRA, M. E.; Hai, A. Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 83-94, 2013.

- [38] BASHIR, Z. I.; VIGNES, M. Electrophysiological recording in brain slices. In: LYNCH, M. A. e O'MARA, S. M. (Ed.). **Neuroscience Labfax**. London: Academic Press, 1997. Cap. 2, p. 13-31.
- [39] HEUSCHKEL, M. O. **Fabrication of multi-electrode array devices for electrophysiological monitoring of in-vitro cell/tissue cultures**. 2001. 188 f. Tese (Doutorado em Microengenharia) - Faculté des Sciences et Techniques de L'ingénieur, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, 2001.
- [40] MILLAR, J. Intracellular and extracellular recording with microelectrodes. In: LYNCH, M. A. e O'MARA, S. M. (Ed.). **Neuroscience Labfax**. London: Academic Press, 1997. 291 p.
- [41] MARMONT, G. Studies on the axon membrane: a new method. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 34, n. 3, p. 351-382, 1949.
- [42] WECKSTROM, M. Intracellular recording. **Scholarpedia**, v. 5, n. 8, p. 2224, 2010. Disponível em: <http://www.scholarpedia.org/article/Intracellular_recording>. Acesso em: 14 ago. 2012.
- [43] FERTIG, N. Patch pipette. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Patch_pipette.jpg>. Acesso em: 16 nov. 2012.
- [44] HUMPHREY, D. R.; Schmidt, E. M. Extracellular Single-Unit Recording Methods. In: (Ed.). **Neurophysiological techniques: applications to neural systems**. Humana Press, v.15, p. 1-64, 1991.
- [45] BUDAI, D. Carbon fiber-based microelectrodes and microbiosensors. In: SOMERSET, V. S. (Ed.). **Intelligent and Biosensors: InTech**, 2010. Cap. 14.
- [46] BRETSCHNEIDER, F.; De Weille, J. R. **Introduction to electrophysiological methods and instrumentation**. Amsterdam: Springer, 2006. 251 p.

- [47] EINEVOLL, G. T. et al. Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 770-785, 2013.
- [48] BUZSAKI, G.; Anastassiou, C. A.; Koch, C. The origin of extracellular fields and currents - EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 407 - 420, 2012.
- [49] GOLD, C. et al. On the origin of the extracellular action potential waveform: a modeling study. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 5, p. 3113-3128, 2006.
- [50] QUIROGA, R. Q. What is the real shape of extracellular spikes? **Journal of Neuroscience Methods**, v. 177, n. 1, p. 194-198, 2009.
- [51] CHEN, C. H. et al. Micro-multi-probe electrode array to measure neural signals. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 7, p. 1911-1917, 2009.
- [52] HUTZLER, M.; Fromherz, P. Silicon chip with capacitors and transistors for interfacing organotypic brain slice of rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 2231-2238, 2004.
- [53] FEJTL, M. et al. On micro-electrode array revival: its development, sophistication of recording, and stimulation. In: TAKETANI, M. e BAUDRY, M. (Ed.). **Advances in network electrophysiology using multi-electrode arrays**. Singapore: Springer, 2006. cap. 2, p.24-37.
- [54] RODGER, D. et al. Flexible parylene-based multielectrode array technology for high-density neural stimulation and recording. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 132, n. 2, p. 449-460, 2008.
- [55] GROSS, G. W. et al. Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 50, n. 2, p. 131-143, 1993.

- [56] JUN, S. B. et al. Optical monitoring of neural networks evoked by focal electrical stimulation on microelectrode arrays using FM dyes. **Med Biol Eng Comput**, v. 48, n. 9, p. 933-40, 2010.
- [57] EGERT, U. et al. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. **Brain Research Protocols**, v. 2, n. 4, p. 229-242, 1998.
- [58] EICK, S. et al. Iridium oxide microelectrode arrays for in vitro stimulation of individual rat neurons from dissociated cultures. **Frontiers in Neuroengineering**, v. 2, p. 1-12, 2009.
- [59] HEUSCHKEL, M. O. et al. A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 114, n. 2, p. 135-48, 2002.
- [60] _____. Development of 3-D multi-electrode arrays for use with acute tissue slices. In: TAKETANI, M. e BAUDRY, M. (Ed.). **Advances in network electrophysiology using multi-electrode arrays**. Singapore: Springer, 2006. cap. 4, p.69-111.
- [61] KOPANITSA, M. V.; Afinowi, N. O.; Grant, S. G. N. Recording long-term potentiation of synaptic transmission by three-dimensional multi-electrode arrays. **BMC Neuroscience**, v. 7, p. 61-61, 2006.
- [62] NAM, Y.; Wheeler, B. C.; Heuschkel, M. O. Neural recording and stimulation of dissociated hippocampal cultures using microfabricated three-dimensional tip electrode array. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 155, n. 2, p. 296-9, 2006.
- [63] CHU, H.-Y. et al. Design and fabrication of novel three-dimensional multi-electrode array using SOI wafer. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 130–131, p. 254-261, 2006.

[64] HAI, A.; SHAPPIR, J.; SPIRA, M. E. In-cell recordings by extracellular microelectrodes. **Nature Methods**, v. 7, n. 3, p. 200-202, 2010.

[65] SUZUKI, I. et al. Carbon nanotube multi-electrode array chips for noninvasive real-time measurement of dopamine, action potentials, and postsynaptic potentials. **Biosens Bioelectron**, v. 49, p. 270-275, 2013.

[66] LI, F. et al. Facile patterning of reduced graphene oxide film into microelectrode array for highly sensitive sensing. **Anal Chem**, v. 83, n. 16, p. 6426-30, 2011.

[67] ROBINSON, J. T. et al. Vertical nanowire electrode arrays as a scalable platform for intracellular interfacing to neuronal circuits. **Nature Nanotechnology**, v. 7, p. 180-184, 2012.

[68] DUAN, X. et al. Intracellular recordings of action potentials by an extracellular nanoscale field-effect transistor. **Nature Nanotechnology**, v. 7, p. 174-179, 2012.

[69] ALPHA-MED SCIENTIFIC. MED64: a low-noise multi-electrode array system for in-vitro extracellular electrophysiology. Disponível em: <<http://www.med64.com/>>. Acesso em: 19 set. 2013.

[70] AXION BIOSYSTEMS. Axion Biosystems: high throughput electrophysiology for systems-level toxicity testing and drug screening. Disponível em: <<http://www.axionbiosystems.com/>>. Acesso em: 19 set. 2013.

[71] MULTI CHANNEL SYSTEMS. Multichannel Systems: innovations in electrophysiology. Disponível em: <<http://www.multichannelsystems.com/>>. Acesso em: 19 set. 2013.

[72] QWANE BIOSCIENCES. Qwane Biosciences: innovative drug discovery tools. Disponível em: <<http://www.qwane.com/>>. Acesso em: 19 set. 2013.

- [73] XIAO, L. et al. Microelectrode array (MEA) as cell-based biosensors. In: WANG, P. (Ed.). **Cell-based biosensors: principles and applications**. Norwood: Artech House, 2009. cap. 4, p.65-96.
- [74] MULTI CHANNEL SYSTEMS. **MC_Rack manual**. Reutlingen: MCS, 2012. 197p.
- [75] _____. **(USB-) MEA-Systems Manual**. Reutlingen: MCS, 2010. 32 p.
- [76] THOMAS JR, C. A. et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. **Experimental Cell Research**, v. 74, n. 1, p. 61-66, 1972.
- [77] SHTARK, M. B. et al. A multielectrode perfusion chamber for tissue culture research. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 78, n. 3, p. 1090-1092, 1978.
- [78] GROSS, G. W. et al. A new fixed-array multi-electrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 6, p. 101-105, 1977.
- [79] GROSS, G. W. Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold microelectrode surface. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. BME-26, n. 5, p. 273-278, 1979.
- [80] PINE, J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 2, p. 19-31, 1980.
- [81] _____. A history of MEA development. In: TAKETANI, M. e BAUDRY, M. (Ed.). **Advances in network electrophysiology using multi-electrode arrays**. Los Angeles: Springer, 2006. cap. 1, p.3-23.

- [82] JOBLING, D. T.; Smith, J. G.; Wheal, H. V. Active microelectrode array to record from the mammalian central nervous system in vitro. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 19, n. 5, p. 553-60, 1981.
- [83] GROSS, G. W.; Lucas, J. H. Long-term monitoring of spontaneous single unit activity from neuronal monolayer networks cultured on photoetched multielectrode surfaces. **J. Electrophysiol. Technol.**, v. 9, p. 55-69, 1982.
- [84] GROSS, G. W.; Wen, W. Y.; Lin, J. W. Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 15, n. 3, p. 243-252, 1985.
- [85] DROGE, M. H. et al. Multielectrode analysis of coordinated, multisite, rhythmic bursting in cultured CNS monolayer networks. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 6, 1986.
- [86] NOVAK, J. L.; Wheeler, B. C. Recording from the aplysia abdominal ganglion with a planar microelectrode array. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. BME-33, n. 2, p. 196-202, 1986.
- [87] _____. Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element microelectrode array. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 23, n. 2, p. 149-59, 1988.
- [88] WHEELER, B. C. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. BME-33, n. 12, p. 1204-1212, 1986.
- [89] REGEHR, W. G. et al. Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 30, n. 2, p. 91-106, 1989.
- [90] LIND, R. et al. Single cell mobility and adhesion monitoring using extracellular electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 6, p. 359-367, 1991.

- [91] CHIEN, C. B.; Pine, J. Voltage-sensitive dye recording of action potentials and synaptic potentials from sympathetic microcultures. **Biophysics Journal**, v. 60, p. 697-711, 1991.
- [92] FROMHERZ, P. et al. A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. **Science**, v. 252, n. 5010, p. 1290-1293, 1991.
- [93] FROMHERZ, P.; Müller, C.; Weis, R. Neuron transistor: electrical transfer function measured by the patch-clamp technique. **Physical Review Letters**, v. 71, n. 24, p. 4079-4082, 1993.
- [94] FROMHERZ, P. Semiconductor chips with ion channels, nerve cells and brain. **Physica E: low-dimensional systems and nanostructures**, v. 16, n. 1, p. 24-34, 2003.
- [95] _____. Joining microelectronics and microionics: nerve cells and brain tissue on semiconductor chips. **Solid-State Electronics**, v. 52, n. 9, p. 1364-1373, 2008.
- [96] BONIFAZI, P.; Fromherz, P. Silicon chip for electronic communication between nerve cells by non-invasive interfacing and analog–digital processing. **Advanced Materials**, v. 14, n. 17, p. 1190-1193, 2002.
- [97] BERGVELD, P.; Wiersma, J.; Meertens, H. Extracellular potential recordings by means of a field effect transistor without gate metal, called OSFET. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. BME-23, n. 2, p. 136-144, 1976.
- [98] REGEHR, W. G.; Pine, J.; Rutledge, D. B. A long-term in vitro silicon-based microelectrode-neuron connection. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 35, n. 12, p. 1023-1032, 1988.
- [99] HÄMMERLE, H. et al. Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 9, n. 9-10, p. 691-696, 1994.

- [100] NISCH, W. et al. A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity in vitro. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 9, n. 9-10, p. 737-41, 1994.
- [101] EGERT, U.; Nisch, W.; Hämmerle, H. Simultaneous recording of the electroretinogram and spike activity with a microelectrode-array. In: **18th Annual International Conference of the IEEE Engineering In Medicine and Biology Society**, 1996, Amsterdam. Proceedings. Amsterdam: p. 377-378, 1996.
- [102] EGERT, U. et al. MEA-Tools: an open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with MatLab. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 117, n. 1, p. 33-42, 2002.
- [103] EGERT, U.; HECK, D.; AERTSEN, A. Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices. **Experimental Brain Research**, v. 142, n. 2, p. 268-74, 2002.
- [104] HALBACH, M. et al. Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures. **Cell Physiol Biochem**, v. 13, n. 5, p. 271-84, 2003.
- [105] STETT, A. et al. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 3, p. 486-495, 2003.
- [106] BONOMINIA, M. P. et al. DATA-MEAns: An open source tool for the classification and management of neural ensemble recordings. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 2, p. 137–146, 2005.
- [107] MAEDA, E.; Robinson, H. P.; Kawana, A. The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 6834-6845, 1995.

- [108] KAMIOKA, H. et al. Planar electrode arrays for long-term measurement of neuronal firing in cultured cortical slices. **Cellular Engineering**, v. 2, p. 148-153, 1997.
- [109] JIMBO, Y.; Torimitsu, K. Modification of evoked responses in cultured cortical networks. In: **21st Annual Conference of Engineering in Medicine and Biology, Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society. BMES/EMBS Conference**: 1999. Proceedings of the First Joint... 1999, vol.1, p. 371.
- [110] JIMBO, Y. et al. The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats. **Biological Cybernetics**, v. 83, n. 1, p. 1-20, 2000.
- [111] OKA, H. et al. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 93, n. 1, p. 61-67, 1999.
- [112] JIMBO, Y.; Tateno, T.; Robinson, H. P. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. **Biophysics Journal**, v. 76, n. 2, p. 670-8, 1999.
- [113] GROSS, G. W. et al. Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, n. 5, p. 373-393, 1997.
- [114] CHANG, J. C.; Brewer, G. J.; Wheeler, B. C. Microelectrode array recordings of patterned hippocampal neurons for four weeks. p. 245-253, 2000.
- [115] WAGENAAR, D. A.; Pine, J.; Potter, S. M. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 138, n. 1-2, p. 27-37, 2004.
- [116] CHEN, C. et al. The origin of spontaneous synchronized burst in cultured neuronal networks based on multi-electrode arrays. **Biosystems**, v. 85, n. 2, p. 137-143, 2006.

- [117] STREIT, J. et al. The generation of rhythmic activity in dissociated cultures of rat spinal cord. **The European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 191-202, 2001.
- [118] TSCHERTER, A. et al. Spatiotemporal characterization of rhythmic activity in rat spinal cord slice cultures. **The European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 179-190, 2001.
- [119] SHAHAF, G.; Marom, S. Learning in networks of cortical neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 22, p. 8782-8788, 2001.
- [120] POTTER, S. M.; Demarse, T. B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 110, n. 1-2, p. 17-24, 2001.
- [121] JUN, S. B. et al. Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-L-lysine on microelectrode arrays. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 160, n. 2, p. 317-26, 2007.
- [122] CHANG, J. C.; Brewer, G. J.; Wheeler, B. C. Modulation of neural network activity by patterning. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 7-8, p. 527-533, 2001.
- [123] WHEELER, B. C.; Brewer, G. J. Designing neural networks in culture. **Proceedings of the IEEE**, v. 98, n. 3, p. 398-406, 2010.
- [124] GRISCOM, L. et al. Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. v. 83, p. 15-21, 2002.
- [125] REN, D.; Miller, J. D. Primary cell culture of suprachiasmatic nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 61, n. 5, p. 547-53, 2003.
- [126] PRADHAPAN, P. et al. Cardiomyocyte MEA Data Analysis (CardioMDA): a novel field potential data analysis software for pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. **PLoS One**, v. 8, n. 9, 2013.

- [127] GHOLMIEH, G. et al. A biosensor for detecting changes in cognitive processing based on nonlinear systems analysis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 7-8, p. 491-501, 2001.
- [128] BOVE, M.; Grattarola, M.; Verreschi, G. In vitro 2-D networks of neurons characterized by processing the signals recorded with a planar microtransducer array. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 44, n. 10, p. 964-977, 1997.
- [129] CHIAPPALONE, M. et al. Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 5-6, p. 627-634, 2003.
- [130] JOHNSTONE, A. F. M. et al. Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. **NeuroToxicology**, v. 31, n. 4, p. 331-350, 2010.
- [131] SCELFO, B. et al. Application of multielectrode array (MEA) chips for the evaluation of mixtures neurotoxicity. **Toxicology**, v. 299, n. 2-3, p. 172-83, 2012.
- [132] NATARAJAN, A. et al. Patterned cardiomyocytes on microelectrode arrays as a functional, high information content drug screening platform. **Biomaterials**, v. 32, n. 18, p. 4267-74, 2011.
- [133] ROSOLEN, S. G. et al. Retinal electrophysiology for toxicology studies: applications and limits of ERG in animals and ex vivo recordings. **Exp Toxicol Pathol**, v. 60, n. 1, p. 17-32, 2008.
- [134] GRAMOWSKI, A. et al. Nanoparticles induce changes of the electrical activity of neuronal networks on microelectrode array neurochips. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 10, p. 1363-9, 2010.
- [135] MORDEL, J. et al. The output signal of purkinje cells of the cerebellum and circadian rhythmicity. **Plos One**, v. 8, n. 3, 2013.

- [136] KLISCH, C.; Mahr, S.; Meissl, H. Circadian activity rhythms and phase-shifting of cultured neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 1-2, p. 181-90, 2006.
- [137] MORDEL, J. et al. Activation of glycine receptor phase-shifts the circadian rhythm in neuronal activity in the mouse suprachiasmatic nucleus. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2287-300, 2011.
- [138] GUENTHER, E.; Herrmann, T.; Stett, A. The retinasensor: an in vitro tool to study drug effects on retinal signaling. In: TAKETANI, M. e BAUDRY, M. (Ed.). **Advances in network electrophysiology using multi-electrode arrays**. Singapore: Springer, 2006. cap. 13, p.321-331.
- [139] HOMMA, K. et al. Detection of localized retinal malfunction in retinal degeneration model using a multielectrode array system. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 9, p. 2175-82, 2009.
- [140] HILL, A. J. et al. Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin suppresses in vitro epileptiform and in vivo seizure activity in adult rats. **Epilepsia**, v. 51, n. 8, p. 1522-32, 2010.
- [141] JONES, N. A. et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n.2, p. 569-577, 2010.
- [142] FENOGLIO, K. et al. Hyperexcitability and hypersynchrony detected in human epileptic hypothalamic hamartoma tissue using a multi-electrode array. **Epilepsia**, v. 48, n. s6, p. 275-276, 2007.
- [143] _____. Blockade of L-type calcium channels significantly reduces network activity in human epileptic hypothalamic hamartoma tissue: a multi-electrode array study. **Epilepsia**, v. 49, n. s7, p. 341-342, 2008.

[144] HOBBS, J. P.; Smith, J. L.; Beggs, J. M. Aberrant neuronal avalanches in cortical tissue removed from juvenile epilepsy patients. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 27, n. 6, p. 380-6, 2010.

[145] YAMAZAKI, Y. et al. Analysis of cytoarchitecture and electrical activity of the human cerebral and cerebellar cortical slices with multi-electrode array system. **Neuroscience Research**, v. 68, p. E440-E441, 2010.

[146] SIMEONE, K. A. et al. L-Type calcium channel blockade reduces network activity in human epileptic hypothalamic hamartoma tissue. **Epilepsia**, v. 52, n. 3, p. 531-40, 2011.

[147] QWANE BIOSCIENCES. **MEA60 biochips user manual**. Lausanne: 2011.

[148] DOMINGUES, M. **Avaliação in vitro dos efeitos de diferentes concentrações do peptídeo YY (1-36) e do peptídeo YY (3-36) sobre neurônios do hipocampo de camundongo C57/BL6**. 2013. Projeto de pesquisa apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) como requisito parcial para a realização de pesquisa de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

[149] COSTA, Z. **Efeito da interleucina-1 β sobre o potencial terapêutico das células mononucleares da medula óssea na epilepsia experimental aguda**. 2013. Projeto de pesquisa apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) como requisito parcial para a realização de pesquisa de pós-doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

[150] PAN, J.-T. et al. Low calcium/high magnesium medium increases activities of hypothalamic arcuate and suprachiasmatic neurons in brain tissue slices. **Neuroscience Letters**, v. 144, n. 1–2, p. 157-160, 1992.

- [151] BEGGS, J. M.; Plenz, D. Neuronal avalanches in neocortical circuits. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 35, p. 11167-11177, 2003.
- [152] OWEISS, K. G.; Aghaholzadeh, M. Detection and classification of extracellular action potential recordings. In: OWEISS, K. G. (Ed.). **Statistical Signal Processing for Neuroscience and Neurotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. 433 p.
- [153] RAGHAVAN, M. et al. A study of epileptogenic network structures in rat hippocampal cultures using first spike latencies during synchronization events. **Physical Biology**, v. 9, n. 5, p. 1-11, 2012.
- [154] MACK, C. et al. Burst and principal components analyses of MEA data for 16 chemicals describe at least three effects classes. **Neurotoxicology**, v. 40, p. 75-85, 2014.
- [155] SANCHEZ-VIVES, M. V.; McCormick, D. A. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 10, p. 1027-1034, 2000.

ANEXO A – DESENHO ESQUEMÁTICO DE INTERFACE ELETRÔNICA

