

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA



**AMANDA FERREIRA NEVES**

QUANTIFICAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR EM IMAGENS  
DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL EM  
INTERFACE COM MATRIZES MULTIELETRODO

UBERLÂNDIA – MG  
SETEMBRO – 2012

**AMANDA FERREIRA NEVES<sup>1</sup>**

**QUANTIFICAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR EM IMAGENS  
DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL EM  
INTERFACE COM MATRIZES MULTIELETRODO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Biomédica.

---

Prof. João Batista Destro Filho, Dr.  
Orientador

---

Prof. Alexandre Cardoso, Dr.  
Coordenador do curso de Pós-Graduação

---

<sup>1</sup> A bolsa de estudo para esta pesquisa foi concedida pelo CNPq , Brasil.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

---

N518q    Neves, Amanda Ferreira, 1988-  
2012        Quantificação da distribuição celular em imagens de culturas primárias de gânglio da raiz dorsal em interface com matrizes multieletrodo / Amanda Ferreira Neves. - 2012.  
              94 f. : il.

Orientador: João Batista Destro Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.  
Inclui bibliografia.

1. Engenharia biomédica - Teses. I. Destro Filho, João Batista.  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia Elétrica. III. Título.

CDU: 62:61

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

**AMANDA FERREIRA NEVES<sup>1</sup>**

**QUANTIFICAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR EM IMAGENS  
DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL EM  
INTERFACE COM MATRIZES MULTIELETRODO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia, perante a banca de examinadores abaixo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

Banca Examinadora:

Prof. João Batista Destro Filho, Dr. – Orientador (UFU)

Prof. Carlos Amilcar Parada, Dr. – Externo (UNICAMP)

Prof. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues, Dr. – Externo – Suplente (UFTM)

Prof.<sup>a</sup> Renata Graciele Zanon, Dr.<sup>a</sup> – Interno (UFU)

Prof.<sup>a</sup> Celina Monteiro da Cruz Lotufo, Dr.<sup>a</sup> – Co-orientadora – Suplente (UFU)

---

<sup>1</sup> A bolsa de estudo para esta pesquisa foi concedida pelo CNPq, Brasil.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

*A todos os meus professores que, com  
sabedoria, me deram as ferramentas para  
construir o ser que sou hoje.*

# AGRADECIMENTOS

Os sinceros agradecimentos a todas as técnicas e colegas de trabalho do Laboratório de Fisiologia (ICBIM/UFU), aos colegas do BIOLAB (FEELT/UFU), aos amigos do Grupo de Estudos Interdisciplinar coordenado pelo prof. Destro, que muitas vezes disponibilizaram seu tempo para me ajudar; e aos grandes amigos da USP–RP e da UFSCar que, mesmo nos encontrando uma vez por ano, sempre estiveram presentes. Especificamente agradeço à Prof<sup>a</sup> Celina, pela paciência e presença nos momentos que mais precisei; à Prof<sup>a</sup> Milena, pelas grandes discussões e ideias; ao Prof. Destro, pelo suporte teórico e apoio emocional. Agradeço também ao Prof. João Fernando (UFV–RP) e ao Prof. Saito (USCar) pela colaboração e confiança a mim prestadas. Em especial, agradeço ainda à Polyana e à Débora, que nunca me deixaram na mão; ao Prof. Beletti e à Mariani, responsáveis pelo Laboratório de Microscopia Confocal (ICBIM/UFU), que colaboraram para o sucesso das imagens.

Muito obrigada a todos que estiveram ao meu lado durante esses dois anos: à minha família, que me ensinou a simplicidade e a honestidade; aos professores e amigos que me acompanham; ao Diego, que esteve comigo em momentos felizes e também nos difíceis, me incentivando a nunca desistir; e à música que representa para mim a realização de um sonho.

Agradeço também à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que promoveram apoio financeiro para os projetos de pesquisa aos quais este trabalho está vinculado. Por fim, minha eterna gratidão ao Prof. Sérgio Martinoia (UniGe, Itália) e à empresa Multichannel Systems Inc. (Alemanha) pela doação das MEAs que foram utilizadas neste trabalho.

# RESUMO

NEVES, Amanda Ferreira. *Quantificação da distribuição celular em imagens de culturas primárias de gânglio da raiz dorsal em interface com matrizes multieletrodo*. Uberlândia: FEELT-UFU, 2012, 94 f.

Este trabalho buscou quantificar e caracterizar a interface neurônio-microeletrodo de culturas primárias do gânglio da raiz dorsal crescidas sobre matrizes multieletrodo (MEA) para determinar a condição de cultivo que proporcionará melhor aquisição da atividade neuronal. Foi realizada uma análise quantitativa da distribuição celular, a partir de imagens obtidas por microscopia confocal, para estabelecer um mapa das distâncias entre neurônios e microeletrodos. Analisou-se também a evolução topológica direta e indireta de culturas crescidas em dispositivos MEA, ao longo de três dias *in vitro*, comparando-as com culturas crescidas sobre recipientes comuns de cultivo. Os resultados mostraram que a proporção de neurônios aderidos às MEAs foi semelhante a da placa comum de cultura, mantendo-se constante ao longo dos três dias *in vitro*. Os valores médios da distância entre neurônio e microeletrodo, em cada tipo de recipiente, também foram aproximadamente os mesmos. Com isso, concluiu-se que a melhor condição de cultivo envolve: aumentar o número de neurônios plaqueados, diminuir a distância neurônio-microeletrodo e reduzir a perda neuronal, aperfeiçoando o contato dos neurônios com os microeletrodos. Por fim, essa análise quantitativa fornece uma descrição simples da cultura em contato com a MEA, sendo possível caracterizar a interface neurônio-microeletrodo e ainda estabelecer estratégias para o registro da atividade elétrica.

**Palavras-chave:** análise *in vitro*, DRG, matrizes multieletrodo, microscopia confocal.



# ABSTRACT

NEVES, Amanda Ferreira. *Quantification of cellular distribution on images of dorsal root ganglion primary cultures interfacing with multi-electrode arrays*. Uberlândia: FEELT-UFU, 2012, 94 f.

This work aims to quantify and characterize the neuron-microelectrode interface of dorsal-root ganglion primary cultures plated on multi-electrode arrays (MEA), in order to establish culture conditions that will enhance neuronal activity recordings. Quantitative analysis of cellular distribution was performed using images obtained by confocal microscopy, in order to compute a map of the distances between neurons and microelectrodes. The direct and indirect topological evolution of cultures plated on MEA devices were also analyzed, during three days *in vitro*, and compared with cultures plated on common cell culture dishes. Results point out that the proportion of adhered neurons on MEA dishes was similar to that on common dishes, remaining unchanged throughout the three days *in vitro*. The mean distance between neuron and microelectrode, for each dish type, was also similar. Thus, the best culture conditions could be summarized as follows: to increase the number of plated neurons, decrease the neuron-microelectrode distance and reduce neuronal loss, making possible to improve the contact with neurons and microelectrodes. Finally, this quantitative analysis provides a simple description of the culture attached to the MEA, so that to characterize the neuron-microelectrode interface and also to allow further insights on electrical activity recordings.

**Keywords:** confocal microscopy, DRG, microelectrode array, *in vitro* analysis.

# SUMÁRIO

|                                                                                                |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                                   | <b>XII</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                                                   | <b>XIV</b>  |
| <b>ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>                                                              | <b>VIII</b> |
| <b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO AO TEMA .....</b>                                                   | <b>1</b>    |
| 1.1 TEMA.....                                                                                  | 1           |
| 1.2 BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                           | 1           |
| 1.3 JUSTIFICATIVAS .....                                                                       | 9           |
| 1.4 OBJETIVOS .....                                                                            | 12          |
| 1.5 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....                                                             | 13          |
| <b>CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                   | <b>14</b>   |
| 2.1 PROCEDIMENTOS BIOLÓGICOS .....                                                             | 14          |
| 2.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS .....                                                                | 15          |
| 2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA.....                                                                | 19          |
| <b>CAPÍTULO 3 – PADRONIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE DRG PARA O<br/>CONTEXTO DAS MEAS .....</b> | <b>26</b>   |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....                                                                           | 26          |
| 3.2 DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS.....                                                         | 26          |
| 3.3 ANÁLISE GERAL DAS IMAGENS .....                                                            | 28          |
| 3.4 DENSIDADE CELULAR DOS EXPERIMENTOS.....                                                    | 34          |
| 3.5 DISCUSSÃO .....                                                                            | 36          |

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6 CONCLUSÕES .....                                                                                                | 39        |
| <b>CAPÍTULO 4 – EVOLUÇÃO DIRETA DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NA<br/>INTERFACE NERUÔNIO-MICROELETRODO .....</b>           | <b>41</b> |
| 4.1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                | 41        |
| 4.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....                                                                                   | 41        |
| 4.3 RESULTADOS .....                                                                                                | 43        |
| 4.4 DISCUSSÃO .....                                                                                                 | 48        |
| 4.5 CONCLUSÕES .....                                                                                                | 50        |
| <b>CAPÍTULO 5 – EVOLUÇÃO INDIRETA DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NA<br/>INTERFACE NERUÔNIO-MICROELETRODO .....</b>         | <b>51</b> |
| 5.1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                | 51        |
| 5.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....                                                                                   | 51        |
| 5.3 RESULTADOS .....                                                                                                | 54        |
| 5.4 DISCUSSÃO .....                                                                                                 | 60        |
| 5.5 CONCLUSÕES .....                                                                                                | 61        |
| <b>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS .....</b>                                                             | <b>63</b> |
| 6.1 CONCLUSÃO GERAL .....                                                                                           | 63        |
| 6.2 TRABALHOS FUTUROS .....                                                                                         | 65        |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                             | <b>66</b> |
| <b>ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFU .....</b>                                                            | <b>71</b> |
| <b>ANEXO 2 – ARTIGO A SER SUBMETIDO QUE UTILIZA QUANTIFICAÇÕES NO<br/>CONTEXTO DE IMAGENS TRIDIMENSIONAIS .....</b> | <b>73</b> |

# LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1</b> – Esquema de estimulação e registro de potenciais de ação por MEAs, através de um tecido cerebral aderido à superfície, a qual contém eletrodos que podem ser utilizados tanto para a estimulação quanto para aquisição (STETT et al., 2003).                                | 03 |
| <b>Figura 1.2</b> – Matriz microeletrodo (MEA), sem a cultura. Ao centro do receptáculo de cultura da matriz, encontram-se 60 microeletrodos dispostos simetricamente.                                                                                                                         | 04 |
| <b>Figura 1.3</b> – Formação do nervo espinal e suas raízes ventral e dorsal (NETTER, 2003).                                                                                                                                                                                                   | 07 |
| <b>Figura 1.4</b> – Esquema de um neurônio sensorial envolvido por células de Schwann e células satélites (BISSELL & STEELE, 2010).                                                                                                                                                            | 08 |
| <b>Figure 1.5</b> – Fotomicrografia de uma cultura de neurônios primários do DRG (em verde) sobre alguns microeletrodos (em preto) da MEA, tirada por microscopia confocal de fluorescência. Escala de 100 µm.                                                                                 | 11 |
| <b>Figura 2.1</b> – Quatro imagens da cultura, abrangendo os 60 microeletrodos. Escala de 200 µm.                                                                                                                                                                                              | 18 |
| <b>Figura 2.2</b> – Aquisição das imagens em séries-z através de microscopia confocal.                                                                                                                                                                                                         | 18 |
| <b>Figura 2.3</b> – Sobreposição da imagem do plano focal do microeletrodo com a imagem plana fluorescente, em A, gerando a imagem B, utilizada para as quantificações. Escala de 200 µm.                                                                                                      | 20 |
| <b>Figura 2.4</b> – Fotografia de quatro microeletrodos com seus campos delimitados. Escala de 100 µm.                                                                                                                                                                                         | 20 |
| <b>Figure 2.5</b> – Diagrama demonstrando a categorização de quatro exemplos de neurônios (em verde). Três neurônios são classificados de acordo com a sua distância ao microeletrodo A: 1-conectado, 2-próximo, 3-distante; sendo que o neurônio 4 pertence à área do microeletrodo B.        | 24 |
| <b>Figure 2.6</b> – Diagrama demonstrando a nova categorização de cinco exemplos de neurônios. Quatro neurônios são classificados de acordo com a sua distância ao microeletrodo A: 1-conectado, 2-próximo, 3-afastado, 4-distante; sendo que o neurônio 5 pertence à área do microeletrodo B. | 24 |
| <b>Figura 3.1</b> – Experimento 01, MEA-11, sem o uso de fluorescência. Escala de 100 µm.                                                                                                                                                                                                      | 29 |
| <b>Figura 3.2</b> – Experimento 02, MEA-21, utilizando fluorescência. Escala de 100 µm.                                                                                                                                                                                                        | 29 |
| <b>Figura 3.3</b> – Experimento 03, MEA-31 em (A) e MEA-32 em (B). Escala de 100 µm.                                                                                                                                                                                                           | 32 |
| <b>Figura 3.4</b> – Experimento 04, MEA-31. Um dia depois das primeiras fotografias. Escala de 100 µm.                                                                                                                                                                                         | 32 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.5</b> – MEA-31 no 3º DIV em (A) e no 4º DIV em (B). Imagem da fluorescência das células, sem os eletrodos ao fundo. Escala de 100 µm.                                                                                                                                                                                                                      | 32 |
| <b>Figura 3.6</b> – Animação 3D da MEA-31 no 4º DIV. Os quadros representam uma altura específica do plano Z, evidenciando mais abaixo os eletrodos, acima os neurônios e no plano entre eles a glia. À direita estão representadas as imagens da cultura demonstrando somente as células, enquanto que a da esquerda mostra também os eletrodos, a fim de comparação. | 33 |
| <b>Figura 3.7</b> – Experimento 05, MEA-41 em (A) e MEA-42 em (B). Os neurônios vivos estão em verde e as células que não estão fluorescentes (mais escuras) estão mortas. Escala de 100 µm.                                                                                                                                                                           | 34 |
| <b>Figura 3.8</b> – Síntese dos valores encontrados na Tabela 3.                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 35 |
| <b>Figura 4.1</b> – Imagens diárias da cultura da MEA-1 (A), da MEA-2 (B) e da PLACA-1 (C). Escala de 200 µm.                                                                                                                                                                                                                                                          | 42 |
| <b>Figura 4.2</b> – Histograma de todos os valores de D (µm) utilizados para a análise de variância.                                                                                                                                                                                                                                                                   | 44 |
| <b>Figura 4.3</b> – Comparação entre os valores (média e erro padrão) da distância entre neurônio e microeletrodo, para cada recipiente de cultura (A) e em relação ao tempo de cultivo (B).                                                                                                                                                                           | 45 |
| <b>Figura 4.4</b> – Quantidade de neurônios estimados nas quatro classes de distâncias e em relação ao tempo de cultivo (dia <i>in vitro</i> ), para cada cultura.                                                                                                                                                                                                     | 46 |
| <b>Figura 5.1</b> – Imagens geradas por microscopia confocal de todas as culturas amostradas neste experimento para o DIV 1 (A), DIV 2 (B) e DIV 3(C). Escala de 200µm.                                                                                                                                                                                                | 53 |
| <b>Figura 5.2</b> – (A) Histograma de todos os valores de D (µm) utilizados para a análise de variância e, em (B), os histogramas do grupo das matrizes multieletrodo e das placas comuns.                                                                                                                                                                             | 55 |
| <b>Figura 5.3</b> – Comparação entre os valores (média e erro padrão) da distância entre neurônio e microeletrodo, para cada recipiente de cultura (A) e em relação ao tempo de cultivo (B).                                                                                                                                                                           | 55 |
| <b>Figura 5.4</b> – Taxa média de neurônios estimados nas quatro classes de distâncias para cada tipo de recipiente de cultura                                                                                                                                                                                                                                         | 56 |
| <b>Figura 5.5</b> – Evolução na densidade celular do número médio $\pm$ erro padrão de neurônios nas quatro classes de distâncias, em relação ao tempo de cultivo (dia <i>in vitro</i> ) e para cada recipiente de cultura.                                                                                                                                            | 59 |

# LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 2.1</b> – Resumo dos principais parâmetros para o imageamento tridimensional.                                                                                                 | 19 |
| <b>Tabela 2.2</b> – Parâmetros de comparação entre neurônios do DRG e células da glia.                                                                                                  | 21 |
| <b>Tabela 3.1</b> – Delineamento dos experimentos realizados.                                                                                                                           | 27 |
| <b>Tabela 3.2</b> – Resultados encontrados na análise geral das imagens a partir do delineamento experimental realizado.                                                                | 30 |
| <b>Tabela 3.3</b> – Densidade celular dos neurônios observados a diferentes distâncias dos eletrodos, para cada MEA amostrada.                                                          | 35 |
| <b>Tabela 4.1</b> – Taxa Neuronal Remanescente.                                                                                                                                         | 45 |
| <b>Tabela 4.2</b> – Resultado da categorização dos neurônios entre as placas e entre cada dia <i>in vitro</i> .                                                                         | 48 |
| <b>Tabela 5.1</b> – Delineamento dos experimentos realizados.                                                                                                                           | 52 |
| <b>Tabela 5.2</b> – Densidade celular de neurônios categorizados em relação a sua distância aos microeletrodos, para todas as culturas e dias <i>in vitro</i> .                         | 57 |
| <b>Tabela 5.3</b> – Densidade celular do número médio de neurônios categorizados em relação a sua distância aos microeletrodos, para cada recipiente de cultura e dia <i>in vitro</i> . | 58 |

# ABREVIATURAS E SIGLAS

|                             |                                                                                                          |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ANOVA</b>                | Análise de Variância – Teste estatístico                                                                 |
| <b>ARA-C</b>                | Citosina Arabinosídeo – Inibidor de crescimento de células gliais                                        |
| <b>DiBAC<sub>4</sub>(3)</b> | <i>Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol</i> – Reagente fluoróforo                           |
| <b>DIV</b>                  | Dia <i>in vitro</i>                                                                                      |
| <b>DMEM</b>                 | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> – Meio de cultura celular                                        |
| <b>DRG</b>                  | <i>Dorsal Root Ganglion</i> (Gânglio da Raiz Dorsal)                                                     |
| <b>H/H</b>                  | Solução de Hank adicionado ao tampão HEPES                                                               |
| <b>HEPES</b>                | N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) – Solução tampão                                 |
| <b>MEA</b>                  | <i>Multi/Micro-electrode Array</i> (Matriz Multieletrodo ou Microeletrodo)                               |
| <b>PGE2</b>                 | Prostaglandina E2                                                                                        |
| <b>SGCs</b>                 | <i>Satellite Glial Cells</i> (Células Gliais Satélites)                                                  |
| <b>SNC</b>                  | Sistema Nervoso Central                                                                                  |
| <b>TRPV1</b>                | <i>Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1</i> (Receptor de Potencial Transiente Vanilóide tipo 1) |
| <b>TTX</b>                  | Tetrodotoxina                                                                                            |

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO AO TEMA

---

### 1.1 TEMA

Os estudos em neurociência cada vez mais têm aproximado áreas biomédicas das áreas da engenharia e computação, o que tem gerado uma variedade de ferramentas que tornam possível compreender e caracterizar o sistema biológico em estudo. Hoje em dia já existem mecanismos nanotecnológicos capazes de traduzir um único impulso nervoso (atividade elétrica neuronal) em informação para circuitos eletrônicos, biossensores, como a matriz multieletrodo (MEA). Estas matrizes micrométricas permitem também monitorar o desenvolvimento morfológico das redes neurais e investigar a relação entre célula e microeletrodo, fundamental para o registro de um sinal de boa qualidade.

### 1.2 BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.2.1 Culturas Celulares

Em condições adequadas, a maioria das células pode viver, se reproduzir e até mesmo expressar suas propriedades em uma placa de cultura ou *in vitro*. Existe um conjunto de técnicas que permite cultivar essas células isoladamente do organismo, mantendo suas características específicas: as culturas celulares. Estas são realizadas a partir da desagregação do tecido vivo original, as células separadas são adicionadas às placas de cultivo contendo meio de cultura,



podendo ser cultivadas como uma camada aderente ou em suspensão no meio nutritivo (COOPER & HAUSMAN, 2007).

Existem basicamente dois tipos de cultura celular. As culturas estabelecidas diretamente de um tecido vivo são denominadas culturas primárias. Quando as células das culturas primárias preenchem toda a superfície da placa, parte delas deve ser removida e colocada em uma nova placa para haver a expansão celular. Esse processo é chamado de “repique” e a cultura dele derivada recebe, por alguns autores, a denominação de “cultura secundária” (ALBERTS et al., 2006). Quando essas culturas são repetidamente subcultivadas, tem-se as culturas denominadas linhagens celulares, as quais são formadas por células geneticamente modificadas, que se proliferam indefinidamente, porém conservando essencialmente as características fenotípicas do tecido de origem (COOPER & HAUSMAN, 2007).

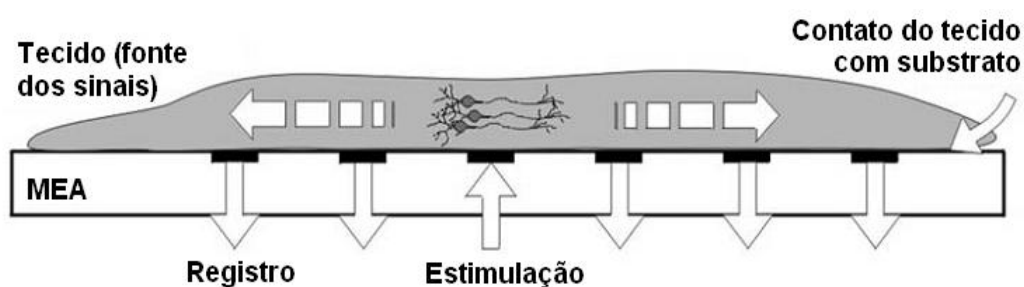
Existem diferentes tipos de células animais utilizadas em culturas, das quais podem-se destacar os neurônios, células especiais capazes de gerar potenciais de ação e restabelecerem conectividade *in vitro*, semelhante àquela presente no tecido vivo. Assim é possível estudar aspectos da comunicação entre neurônios (células eletrogênicas) como, por exemplo, os impulsos elétricos emitidos (potenciais de ação), por meio de biossensores (LAKARD et al., 2005; GRISCOM et al., 2002).

### **1.2.2 Eletrofisiologia em Estudos Farmacológicos**

Os estudos utilizando culturas celulares envolvem principalmente profissionais ligados à pesquisa na área biomédica. Paralelamente, pesquisadores em Engenharia Biomédica desenvolvem mecanismos nanotecnológicos que traduzem um impulso nervoso de um neurônio em informação para circuitos eletrônicos, efetuando um registro digital destes potenciais de ação e, ainda, possibilitando controlar esse impulso local através do conceito de “neuromodulação controlada” (FROMHERZ, 2003). Um exemplo desses nanodispositivos é a matriz multieletrodo

(MEA), na qual é possível estimular e fazer a aquisição de sinais elétricos a partir de culturas neurais (POTTER & DE-MARSE, 2001).

A matriz multieletrodo, desde o seu desenvolvimento nos anos 70, é considerada uma tecnologia potencialmente útil para estudos de processamento de informações em redes do sistema nervoso (MERCER & WHITE, 1978). Além disso, a tecnologia da MEA oferece a possibilidade de se realizar registros extracelulares não-invasivos de pelo menos 60 sítios simultaneamente (STETT et al., 2003). Mas a principal característica de uma MEA é o intercâmbio bidirecional de informação que ela proporciona, no qual atua como uma interface bioeletrônica (Figura 1.1), onde células neurais são cultivadas sob um microcircuito elétrico (RUTTEN, 2002).

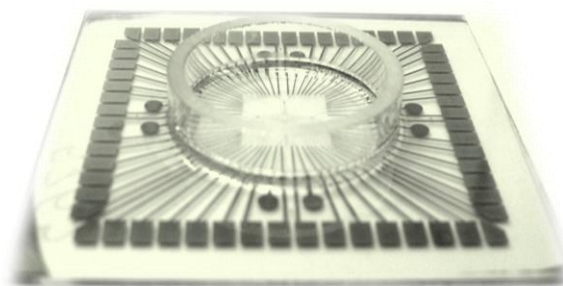


**Figura 1.1** – Esquema de estimulação e registro de potenciais de ação por MEAs, através de um tecido cerebral aderido à superfície, a qual contém eletrodos que podem ser utilizados tanto para a estimulação quanto para aquisição (STETT et al., 2003).

As MEAs representam circuitos de dimensões micrométricas, montados sobre um substrato transparente, integrando um número de 10-100 microeletrodos de 10-30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, geralmente. De fato, as MEAs podem ser consideradas pequenas placas de *Petri* com microeletrodos incorporados no substrato (Figura 1.2). Os eletrodos estão ligados a um sistema de gravação e estimulação que permite, de forma não invasiva, monitorar as atividades eletrofisiológicas de uma cultura neuronal inteira. Essa situação oferece um ambiente controlado no qual as células se aderem a partir de moléculas de adesão conhecidas, possibilitando seu monitoramento constante por um período de dias a semanas (CLAVEROL-TINTURÉ et al.,

2005).

A tecnologia da MEA é comumente utilizada para estudar a atividade e a plasticidade do sistema nervoso durante o desenvolvimento das redes neurais em culturas celulares ou em fatias cerebrais (RUTTEN, 2002; RUTTEN et al., 2001). Isso é possível a partir da aquisição de potenciais elétricos extracelulares, visando a análise de aglomerados ou pequenos grupos de células neurais (FREEMAN, 2000). A atividade originada pelo tecido pode ser gravada com alta resolução espacial e temporal, sendo que o principal pré-requisito para o registro eficiente de um sinal é o contato estreito do tecido com o substrato (STETT et al., 2003).



**Figura 1.2** – Matriz microeletrodo (MEA), sem a cultura. Ao centro do receptáculo de cultura da matriz, encontram-se 60 microeletrodos dispostos simetricamente.

A tecnologia da MEA pode ser aplicada em qualquer tecido que contenha células excitáveis ou eletrogênicas, que exibe características elétricas, como neurônios, cardiomiócitos, células musculares e da retina (MULTI CHANNEL SYSTEMS, 2012). Além disso, a MEA consiste em um sistema *in vitro* ideal para monitorar os efeitos de drogas e toxinas, bem como executar estudos funcionais fisiológicos ou induzidos, sob condições fisiopatológicas que imitam os danos *in vivo*, promovendo conclusões importantes sobre a atuação bioquímica específica para o estudo de novos fármacos (AKAY, 2007; TAKETANI & BAUDRY, 2006).

Existem diferentes modelos de MEAs, os quais oferecem uma ampla variedade de aplicações. Dentro do campo da neurobiologia, as aplicações mais comuns consistem em: neuroregeneração, biologia do desenvolvimento, ritmo circadiano (KLISCH et al., 2009),

registros de potenciais de ação prolongados, microencefalogramas e microretroretinogramas (STETT et al., 2003). Uma aplicação prática da MEA, em médio prazo, são os neuroimplantes, dispositivos protéticos que controlam e ou substituem as funções de um tecido danificado no sistema nervoso (LAKARD et al., 2005; GRISCOM et al., 2002; LITT et al., 2003).

Do outro lado, nos domínios da eletrofisiologia cardíaca (TAKETANI & BAUDRY, 2006), aplicações mais comuns relacionam-se a: medidas da velocidade de condução dos potenciais de ação (NATARAJAN et al., 2006), mapeamento da excitação e ativação celular, assim como caracterização prolongada dos tipos celulares, especialmente células-tronco (HARDING et al., 2007; REPEL & IGELMUND, 2007; HESCHELER et al., 2004), estimulação da cultura (WROBEL & ZHANG, 2007), estudos farmacológicos, monitoramento do prolongamento de QT e arritmias, co-culturas e implantação de modelos de doenças (YEUNG & SOMMERHAGE, 2009).

### **1.2.3 Nocicepção e Estudos de Excitabilidade Neural**

A dor aparece como alerta protetor em resposta a um estímulo nocivo, por isso a sensação da dor é chamada de nocicepção. Mas em determinadas circunstâncias, como lesão e inflamação, os estímulos nocivos provocam dor mais intensa que o normal, neste caso, a hipernocicepção. Existem quatro tipos de dor: fisiológica, inflamatória, neuropática e disfuncional, que são gerados por mecanismos diferentes em cada caso (ROBERT & CLIFFORD, 2009). Por isso, o tratamento adequado para cada tipo de dor consiste na supressão desses mecanismos específicos e não do sintoma da dor.

Durante o processo inflamatório, a produção e/ou liberação de mediadores inflamatórios por células residentes leva à sensibilização dos neurônios nociceptores primários, resultando na dor inflamatória, ou hipernocicepção. A sensibilização dos nociceptores ocorre por uma diminuição do limiar de ativação de potenciais de ação, ou seja, por um aumento na excitabilidade destes

neurônios e estímulos que normalmente não causariam dor tornam-se dolorosos (CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 1991; NAKAMURA E FERREIRA, 1987; SACHS et al., 2002). Um dos principais mediadores responsáveis pela hiperalgesia inflamatória é a prostaglandina E2 (PGE2), a qual é capaz de sensibilizar diretamente neurônios primários sensoriais. Esta sensibilização parece ocorrer através da modulação da abertura de canais de sódio e potássio nos neurônios nociceptores (ENGLAND et al., 1996; EVANS et al., 1999).

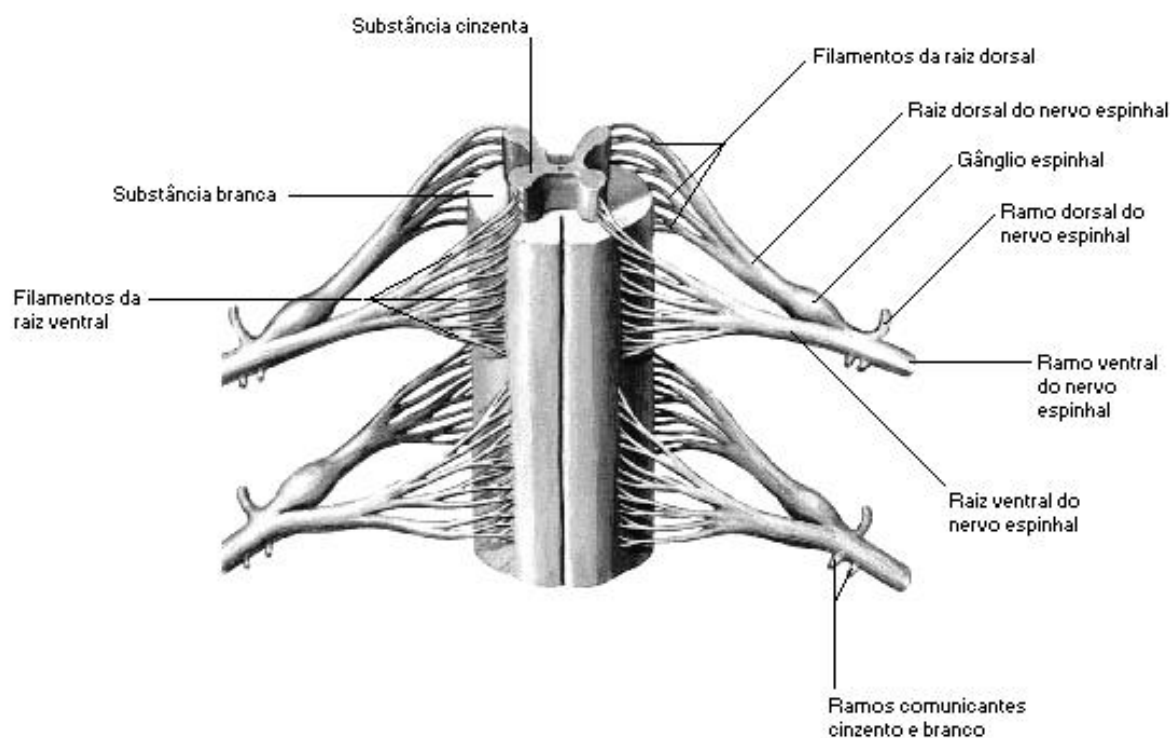
De maneira geral, o processo da excitação dos neurônios primários, ou transdução sensorial, ocorre quando estímulos térmicos, mecânicos e químicos deformam ou alteram os terminais nervosos periféricos. Essa deformação modifica a conformação de canais iônicos altamente especializados nas fibras nociceptoras sensoriais, afetando a permeabilidade iônica e gerando uma corrente despolarizante que inicia um potencial de ação (ROBERT & CLIFFORD, 2009).

Na atualidade, existem diversos agentes farmacológicos com mecanismos de ação que interferem nessa resposta dos neurônios sensitivos primários, para o alívio da dor. Estudos sobre a sensibilização nociceptiva são clinicamente relevantes e as drogas que conseguem interferir neste processo de uma maneira seletiva são bons candidatos para analgésicos. Dentre os analgésicos utilizados até o momento, os opióides e a dipirona são conhecidos por terem efeitos diretos na excitabilidade nociceptora (SACHS et al., 2004). Entretanto, ambas as drogas induzem efeitos adversos que limitam seu uso clínico.

#### **1.2.4 Caracterização das células do gânglio da raiz dorsal**

Cada nervo periférico se conecta na medula espinhal por meio de duas raízes, a dorsal e a ventral (Figura 1.3). A raiz dorsal, também chamada de raiz sensitiva, possui fibras quase exclusivamente sensoriais. Existe uma dilatação na raiz dorsal, próxima à medula, chamada de gânglio da raiz dorsal (DRG), onde estão presentes os corpos dos neurônios aferentes primários (DEVOR, 1999). Fisiologicamente, esses neurônios são responsáveis pela transmissão de

informação da periferia (pele, músculo, víscera e outros órgãos.) ao sistema nervoso central, (SNC) para seu processamento e análise (HANANI, 2005). Alguns desses neurônios possuem uma membrana especializada para iniciar picos de atividade elétrica e ainda são capazes de manter uma atividade cíclica de disparos, na presença de uma despolarização constante.

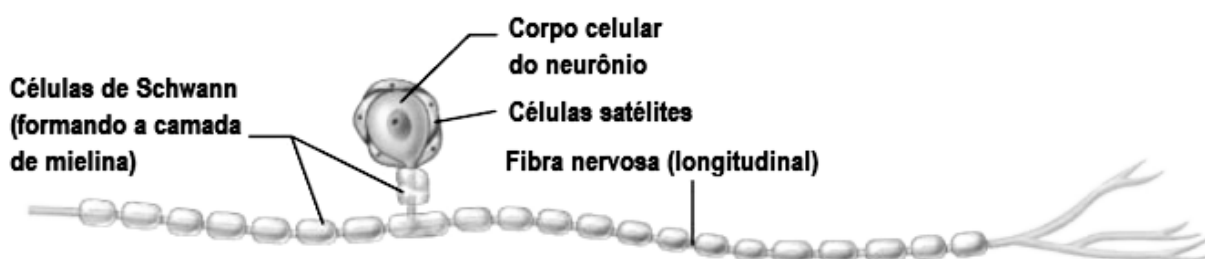


**Figura 1.3** – Formação do nervo espinhal e suas raízes ventral e dorsal (NETTER, 2003).

Anatomicamente, os neurônios do DRG são pseudounipolares, não têm dendritos e possuem um único axônio que, após emergir do corpo celular, se bifurca originando um ramo periférico e um ramo central. O ramo periférico segue até as terminações sensoriais do corpo e o ramo central entra na medula espinhal e segue para o córtex (DEVOR, 1999). Além disso, seus corpos celulares são grandes e esféricos, com diâmetro variando entre 20 a 150  $\mu\text{m}$  em humanos e de 10 a 40  $\mu\text{m}$  em ratos (MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ & CASTELLANOS, 2007).

Primariamente nos gânglios, células especializadas da glia envolvem os neurônios aferentes primários (Figura 1.4), separando uns dos outros por uma camada fina ( $\sim 20\text{ nm}$ ) de membrana

(DEVOR, 1999). Fazendo uma análise ultraestrutural, nota-se que esse envelope é formado por células gliais satélites (SGCs), um tipo específico de células da glia diferente de astrócitos e da microglia (HANANI, 2005). Ao envolver os neurônios do DRG, essas células criam uma barreira mecânica que reduz o acesso de moléculas aos neurônios, exercendo controle sobre o microambiente neuronal. Alguns pesquisadores (WATKINS & MAIER, 2003), inclusive, consideram alterações nas células da glia como sendo a chave para a hiperalgesia e, por isso, as avaliam como alvos essenciais para o desenvolvimento de medicamentos para o controle da dor.



**Figura 1.4** – Esquema de um neurônio sensorial envolvido por células de Schwann e células satélites (MARIEB & HOEHN, 2010).

Dentro de um DRG típico há milhares de neurônios sensoriais com uma grande heterogeneidade entre eles, como os neurônios responsáveis pelas sensações táteis, térmicas e nociceptivas. Por outro lado, é possível estimular tipos específicos de neurônios com a utilização de agentes farmacológicos conhecidos, como a capsaicina que atua em receptores TRPV1 presentes somente em neurônios nociceptores. Outra possível abordagem consiste em inibir os canais de sódio voltagem-dependentes nos neurônios não-nociceptivos, com o uso da tetrodotoxina (TTX), já que os neurônios nociceptores são conhecidos por expressar canais de sódio resistentes à ação do TTX (GOLD et al., 1998; KHASAR et al., 1998).

Por fim, os neurônios primários sensoriais, derivados do gânglio da raiz dorsal de ratos ou camundongos adultos, são facilmente cultivados. Estes neurônios crescem rapidamente em cultura, exibindo longas estruturas a partir de 24-36 horas em cultivo. Frequentemente, nessas

culturas, são encontrados pequenos grupos, ou “aglomerados”, de dois a três neurônios envolvidos por SGCs (HANANI, 2005).

### 1.3 JUSTIFICATIVAS

Os estudos de excitabilidade em neurônios sensoriais realizados até o momento utilizaram métodos eletrofisiológicos como *patch-clamp* ou gravações extracelulares in vivo (LU & GOLD, 2008; HAYAR et al., 2008, PASSMORE, 2005). Para essas técnicas, os neurônios são examinados um por um, o que torna difícil e lenta a realização desse tipo de teste. Por outro lado, a utilização das MEAs em culturas primárias de neurônios sensoriais fornece um método reprodutível e rápido para os estudos da sensibilização nociceptora, já que analisa simultaneamente um conjunto de neurônios, contribuindo para a descoberta de novas drogas analgésicas.

Em estudos de eletrofisiologia é comum encontrar trabalhos que utilizem as técnicas de *patch-clamp* e, mais recentemente, a nanotecnologia das matrizes multieletrodo (MEAs). Ambas representam técnicas eletrofisiológicas, porém existem algumas singularidades para o emprego de ambas. A técnica de *patch-clamp* é bastante específica em relação aos canais iônicos da membrana e às correntes iônicas que fluem de uma única célula (WARD, 1997), enquanto que a MEA é utilizada para estudos que abrangem redes de células. O emprego das MEAs ainda favorece a gravação da atividade da rede neural durante seu desenvolvimento, ou seja, por um longo período de tempo (KLISCH et al., 2009), enquanto que no *patch-clamp*, para a maioria dos experimentos, as células são destruídas com a remoção de parte da membrana plasmática e somente são utilizadas para gravações instantâneas.

O principal fator que corrobora com as vantagens do uso das MEAs em contraposição ao *patch-clamp* consiste nas gravações multicanais. Neste caso, os sinais captados simultaneamente



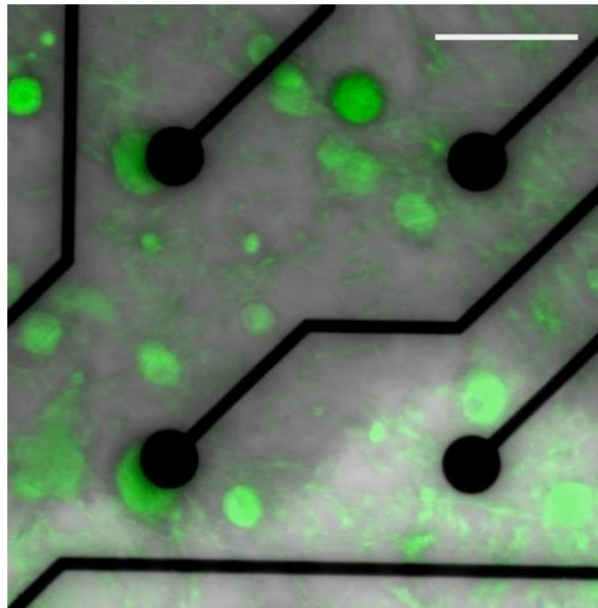
em diferentes sítios da matriz, e ao longo do desenvolvimento celular, possuem características funcionais significativamente semelhantes às observadas *in vivo*, tanto em relação à conectividade, às medidas de atividade, quanto aos efeitos farmacológicos (EYTAN et al., 2004). Não há alterações significativas para as células, até mesmo porque elas preservam os principais receptores e mecanismos sinápticos e celulares responsáveis pela geração dos padrões de atividade (RIJAL & GROSS, 2008).

A MEA também permite monitorar facilmente o desenvolvimento da morfologia das células, já que possui um substrato transparente, adequado para se fazer visualizações em microscópios invertidos, de fluorescência, confocal ou de varredura dupla (POTTER & DEMARSE, 2001). Através da microscopia óptica, o imageamento de redes neuronais crescidas em MEAs permite monitorar o desenvolvimento da rede neuronal, considerando o número e a distribuição espacial de neurônios; captar alterações funcionais de células, através de mudanças na intensidade de fluorescência; e ainda analisar a relação célula-eletrodo, que determina o registro de um sinal de qualidade (VAN PELT et al., 2004). Assim sendo, imagens periódicas tomadas sobre a cultura possibilitam estudos relevantes acerca das características da interface neurônio-microeletrodo.

Os microeletrodos possuem um tamanho reduzido (diâmetro máximo de 30  $\mu\text{m}$ ) e cada microeletrodo pode fazer contato com um único neurônio ou no máximo algumas células. Sabe-se que, para se obter um bom sinal, pelo menos parte substancial do corpo celular do neurônio precisa estar em contato com a superfície do eletrodo, uma vez que os axônios individualmente não conseguem cobrir significativamente a área de um eletrodo (VAN PELT et al., 2004).

Além disso, os neurônios DRG são relativamente maiores que outros neurônios do sistema nervoso, como os neurônios corticais ou hipocámpais, e em média, possuem diâmetro de 30  $\mu\text{m}$ . Dessa maneira, as culturas de neurônios DRG tem maior probabilidade de cobrir completamente os eletrodos (Figura 1.5), e ainda, utilizado inibidores de crescimento de células não-neronais,

pode-se também conter a agregação de glia em torno dos neurônios e, como resultado, a geometria da interface neurônio-eletrodo pode ser visualizada por vários dias *in vitro* (RUTTEN, 2001). Assim sendo, para os estudos pioneiros com neurônios primários sensoriais, é importante que se realizem testes experimentais para descobrir qual a melhor condição de cultivo que proporcionará melhor contato dessas células com os microeletrodos e, assim, um sinal de melhor qualidade.



**Figure 1.5** – Fotomicrografia de uma cultura de neurônios primários do DRG (em verde) sobre alguns microeletrodos (em preto) da MEA, tirada por microscopia confocal de fluorescência. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .

Do outro lado, atualmente grupos de pesquisa que estudam as respostas neuronais, via MEA, ainda utilizam a cultura primária de neurônios corticais (NOVELINO et al., 2003; POTTER, 2001; VAN PELT et al., 2004). São poucos os trabalhos que utilizam a MEA em culturas de neurônios periféricos (STETT et al., 2003) e, quando se investiga o uso de MEAs para culturas de neurônios primários sensoriais, como os do gânglio da raiz dorsal, há poucos artigos (RUTTEN, 2001; GREVE, 2007). Entretanto já é possível encontrar alguns trabalhos (AOYAGI et al., 2003; STEIN et al., 2004; WEBER et al., 2007) que utilizam as MEAs para registrar a atividade simultânea de populações de neurônios sensoriais *in vivo*. Além disso, no

conhecimento do autor, só há um artigo que estuda a nocicepção utilizando a MEA como plataforma de trabalho (ZHAO, 2009).

Portanto, para se iniciar uma pesquisa dentro desta abordagem, faz-se necessário uma padronização e caracterização da cultura primária de neurônios sensoriais, a qual precisa ser adequada ao contexto dos dispositivos MEA, para descobrir a melhor condição de cultivo que proporcionará melhor contato dessas células com os microeletrodos. Este estudo pode ser considerado um trabalho de base para possibilitar futuros estudos com o registro dos sinais das culturas de neurônios primários sensoriais em dispositivos MEA.

A ideia de se testar a aplicabilidade da MEA, em estudos de sensibilização nociceptora, consiste em avaliar os efeitos de agentes conhecidos que afetam a excitabilidade nociceptora em culturas primárias do gânglio da raiz dorsal. A MEA, neste caso, pode ser um método relevante para detectar as mudanças na excitabilidade de uma população de neurônios. Desta forma, acredita-se que o modelo *in vitro* com neurônios DRG em MEA pode representar um método eficiente de *screening* para estudos de farmacologia segura na área de dor e analgesia.

## 1.4 OBJETIVOS

O trabalho em questão teve quatro objetivos gerais, os quais estão associados ao processamento de imagens tomadas em culturas DRG crescidas sobre dispositivos MEA, que foi implementado fisicamente nos laboratórios do ICBIM-ARFIS/UFU:

- Padronizar a cultura primária de neurônios sensoriais em dispositivos de MEA, de forma a possibilitar futuros registros de atividade elétrica destes neurônios.
- Caracterizar a evolução topológica (distribuição celular) da interface neurônio-microeletrodo, a partir da análise das imagens da rede neural em diferentes dias *in vitro*.
- Confirmar que os microeletrodos da MEA não influenciam na adesão celular das

culturas do DRG crescidas sobre a MEA, comparando a evolução da rede neural com culturas crescidas sobre recipientes comuns de cultura.

- Descobrir a melhor condição de cultivo que proporcionará melhor contato dos neurônios sensoriais primários com os microeletrodos da MEA.

## 1.5 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Os capítulos deste manuscrito estão organizados, do trabalho mais simples para os mais elaborados, de forma que se possa perceber o processo adotado para se atingir os objetivos propostos.

O Capítulo 2 expõe detalhadamente os materiais e métodos utilizados para a realização de todos os experimentos deste trabalho. No Capítulo 3 é apresentado o trabalho inicial realizado para padronizar a cultura primária de neurônios sensoriais no contexto da MEA. Após os primeiros testes, foram iniciados os estudos mais elaborados com o intuito de caracterizar a evolução topológica de culturas do DRG crescidas sobre a MEA, em diferentes dias *in vitro* e comparar com culturas crescidas em recipientes comuns de cultivo. O Capítulo 4 apresenta o trabalho que compara a evolução direta da distribuição celular na interface neurônio-microeletrodo, para imagens da mesma cultura adquiridas ao longo dos três primeiros dias de cultivo. No Capítulo 5, alguns problemas que surgiram no trabalho anterior são evitados e, por isso, o trabalho representa uma comparação da evolução indireta da distribuição celular na interface neurônio-microeletrodo.

Por fim, no Capítulo 6 são analisadas as contribuições de todos os experimentos aqui realizados, além de apresentar sugestões de trabalhos futuros que surjam para complementar e aprimorar este trabalho.

# CAPÍTULO 2

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 2.1 PROCEDIMENTOS BIOLÓGICOS

#### 2.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, mantidos em sala com temperatura e luminosidade controladas e acesso à água e comida *ad libitum* até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983). Os procedimentos experimentais também foram analisados e aprovados (ANEXO 1) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFU).

#### 2.1.2 Cultura primária de células dos gânglios das raízes dorsais

As culturas foram realizadas conforme protocolo descrito por (LINHART, 2003). Ratos Wistar, machos ou fêmeas, de 1 mês (100 g) foram anestesiados por inalação de halotano e eutanasiados por decapitação. Os gânglios das raízes dorsais da região lombar e torácica foram removidos (16 a 20 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram dissociadas por incubação a 37°C durante 75 minutos em solução salina de Hank contendo 0,28 U/ml de collagenase (tipo 2, Sigma) e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Para interromper o processo enzimático, os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10 % de

soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina e 50 mg/ml de streptomicina. As células, então, foram dissociadas mecanicamente e contadas com “*trypan blue*” em câmara de Neubauer para determinar a viabilidade celular.

As células foram adicionadas e cultivadas diretamente nas matrizes multieletrodo e em placas usuais de cultura, ambas cobertas com Matrigel (matriz natural condicionada), e deixadas por uma hora na estufa, para o assentamento das células. Depois se adicionou o mesmo meio de cultura já descrito e finalmente as placas foram mantidas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C até o dia do experimento. É importante ressaltar que as condições de plaqueamento foram semelhantes tanto nas culturas das MEAs, quanto naquelas crescidas nas placas comuns: foi utilizada a mesma quantidade e área de Matrigel; o mesmo volume da suspensão celular foi adicionado; e o tempo de assentamento das células, antes da adição do meio de cultura, também foi o mesmo.

### **2.1.3 Matrizes Multieletrodos**

Foram utilizadas matrizes multieletrodos do fabricante *Multichannel Systems* (Reutlingen, Alemanha), modelo *standard MEA 200/30* (eletrodos de 30 µm de diâmetro a uma distância de 200 µm entre si), que podem ser esterilizadas. As MEAs foram doadas pelo professor Sergio Martinoia, coordenador do Grupo de Neuroengenharia e Biotecnologia da *Università degli Studi di Genova* (UNIGE), - Itália. Neste trabalho não foi realizado registros de sinais, somente foi analisada a adaptação da rede neural da cultura ao dispositivo, através de investigações quantitativas em imagens das culturas.

## **2.2 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS**

### **2.2.1 A incubação do fluoróforo**

Para permitir a aquisição das imagens de células vivas, foi empregado nas culturas o reagente fluoróforo atóxico DiBAC<sub>4</sub>(3), 5µM, *Molecular Probes*, que é um marcador de

potencial de membrana utilizado para avaliar alterações no potencial de repouso de células vivas. Este marcador é uma molécula carregada negativamente que atravessa livremente a membrana celular, distribuindo-se conforme o gradiente eletroquímico e que fluoresce apenas no ambiente lipofílico da membrana celular. Portanto, uma maior fluorescência indica potenciais de repouso menos negativos. Nesse trabalho, esse marcador fluorescente foi utilizado apenas para permitir a visualização de células vivas através do imageamento das culturas.

Primeiramente, retiram-se as culturas a serem utilizadas uma a uma da estufa, transferindo-as para um ambiente estéril. Dentro da capela de fluxo laminar, retira-se o meio de cultivo da placa, com auxílio de um pipetador automático, e lava-se três vezes com a solução de Hank/HEPES (H/H) já descrita. Então, incuba-se a cultura com o DiBAC<sub>4</sub>(3) diluído em H/H e imediatamente a placa é levada ao microscópio para o imageamento. Nos experimentos, algumas culturas foram descartadas após a aquisição das imagens, mas para aquelas que retornaram à estufa foi necessário fazer outro procedimento de lavagem para a remoção do fluoróforo. Para isso, a cultura foi lavada duas vezes com DMEM completo e na terceira suspendeu-se 1ml do mesmo meio para a manutenção da cultura novamente na estufa.

### **2.2.2 Aquisição de imagens bidimensionais**

A aquisição das imagens foi realizada através de microscopia confocal (*Zeiss, LSM510 Meta*), utilizando objetiva de 10x. As imagens foram adquiridas em dois canais, sendo um canal de fluorescência e um de luz transmitida. Para compor a imagem do canal de fluorescência, o fluoróforo foi excitado utilizando um laser de argônio (Ar/ArKr 488 nm) associado a um filtro de 510-574 nm para impedir que luzes com comprimento de onda diferentes da emitida alcançassem o fotomultiplicador. O canal da luz transmitida foi utilizado para capturar o formato e a posição dos microeletrodos da MEA, que não estão presentes nas imagens formadas no canal de fluorescência.

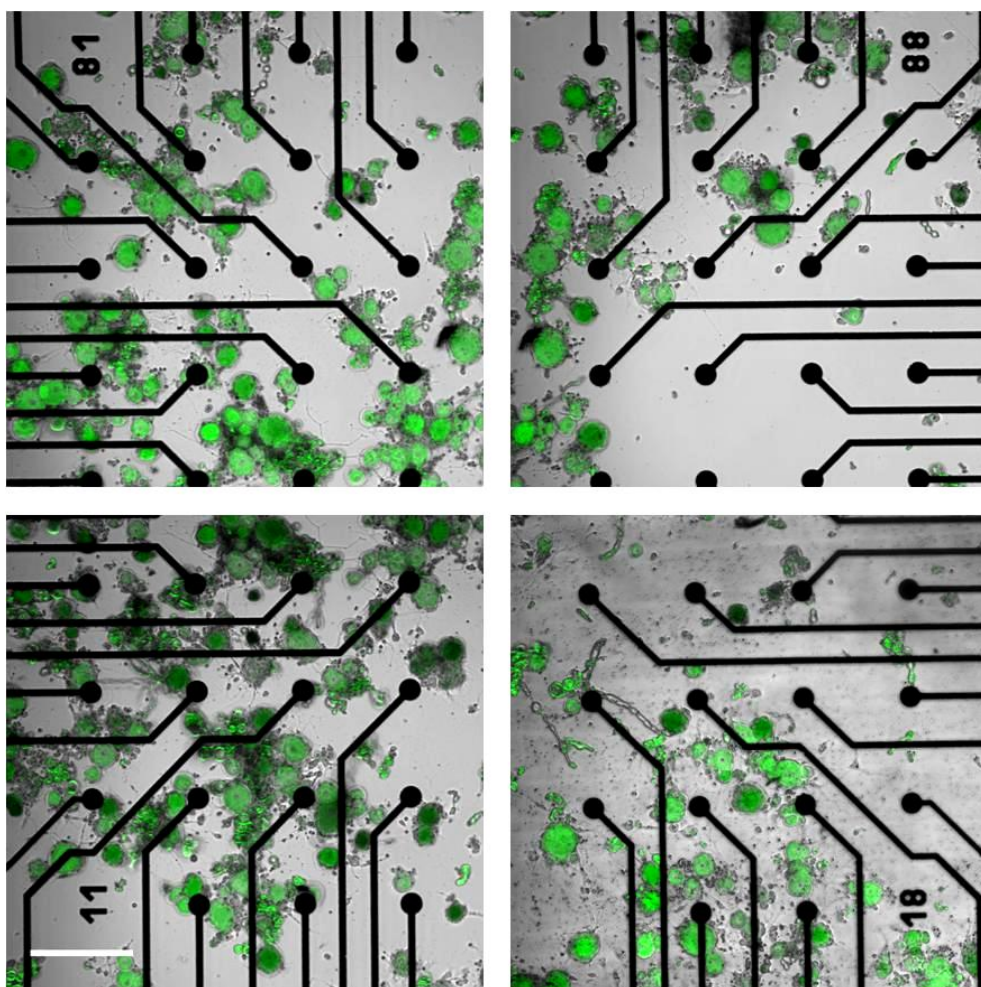
Durante a aquisição das imagens, cada MEA foi dividida em quatro partes: quadrante superior esquerdo (*qSE*), quadrante superior direito (*qSD*), quadrante inferior esquerdo (*qIE*) e quadrante inferior direito (*qID*). Dessa maneira, foi possível fotografar toda a rede neural presente sobre a área dos 60 microeletrodos, como mostra a Figura 2.1. Inicialmente, as fotografias foram realizadas para as mesmas culturas, diariamente, durante os três primeiros dias de cultivo. Devido à grande perda celular nesses procedimentos, posteriormente decidiu-se por fotografar cada cultura somente em um dia *in vitro*, sendo que três culturas diferentes foram necessárias para capturar as imagens dos três primeiros dias *in vitro* (DIVs).

### **2.2.3 Aquisição de imagens tridimensionais**

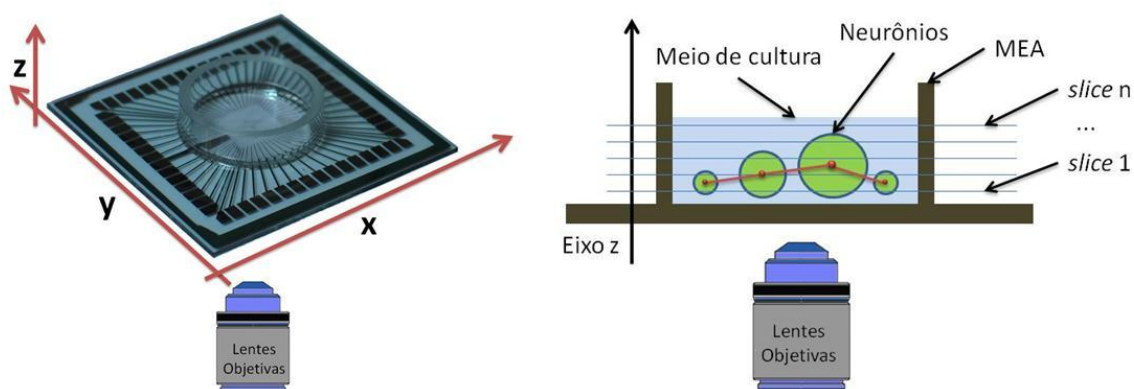
Durante os experimentos, foi observado que os microeletrodos se encontram em um plano abaixo das células, gerando um erro de refração que inviabiliza medidas da dimensão de células e microeletrodos nas imagens. Como forma de minimizar esse erro da refração originada pela diferença de plano focal do microeletrodo para as células, decidiu-se por fazer uma aquisição em séries-z, que contém informações tridimensionais ou volumétricas das amostras. A Figura 2.2 ilustra o processo de aquisição e formação das imagens volumétricas, realizado pelo escaneamento do microscópio.

Vários testes foram realizados para padronizar o processo de aquisição das imagens tridimensionais ou séries-Z, por meio de microscopia confocal de varredura laser, das culturas DRG crescidas em MEAs (quantificações tridimensionais associadas a essas imagens podem ser encontrados no ANEXO 2). Foi visto que nem sempre a maior qualidade de imagem oferece a melhor condição do imageamento. Resolução alta e velocidade lenta são condições que oferecem maior detalhamento das estruturas biológicas, porém prejudicam a amostragem causando o chamado efeito *photobleaching*, que consiste na perda de fluorescência do fluorocromo, além de possível dano às células vivas, devido ao tempo de exposição ao laser.





**Figura 2.1** – Quatro imagens da cultura, abrangendo os 60 microeletrodos. Escala de 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.2** – Aquisição das imagens em séries-z através de microscopia confocal.

Por isso foi necessário estabelecer parâmetros que aumentassem a relação entre a qualidade da imagem e o dano celular. Entre os parâmetros estabelecidos para imagear as culturas, foram testados: tamanho do quadro; velocidade da varredura; profundidade dos pixels; diâmetro do *Pinhole* e padrões da série-Z. Os valores escolhidos para os principais parâmetros testados, assim como a importância de cada um deles na análise das imagens, podem ser vistos na Tabela 2.1.

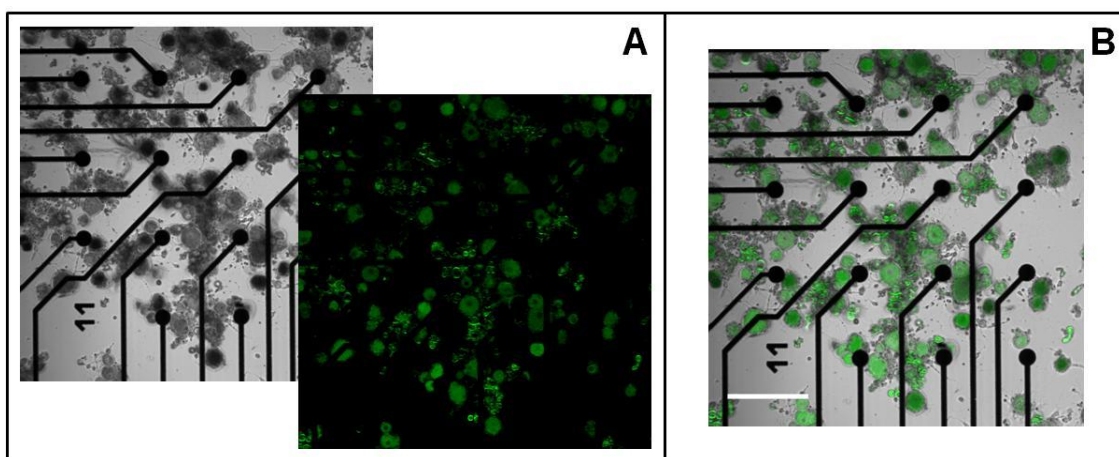
**Tabela 2.1** – Resumo dos principais parâmetros para o imageamento tridimensional.

| Parâmetros                              | Valor        | Importância                                 |
|-----------------------------------------|--------------|---------------------------------------------|
| Lente Objetiva                          | 10x          | Aumento óptico ideal                        |
| Resolução                               | 1024x1024    | Nº de pixel da imagem 2D                    |
| Voxel                                   | 12 bits      | Profundidade de Pixel                       |
| Velocidade de varredura                 | 8x           | Tempo gasto para imagear                    |
| Abertura do pinhole                     | 1 unidade    | Controla o excesso de luz na imagem         |
| Nº imagens por MEA                      | 4 quadrantes | Reconstrução da rede neural                 |
| Distância entre <i>slices</i> (Série-Z) | Automático   | Software define o valor a partir da série z |

Após a aquisição das imagens, foi realizada uma soma de todas as imagens da série-z do canal de fluorescência, o que gerou uma imagem plana representativa da imagem volumétrica que possibilitou a melhor visualização das células. No canal de luz transmitida, onde são vistos os microeletrodos, somente a imagem do plano focal do microeletrodo foi selecionada. Por fim, as duas imagens, imagem plana representativa da série-z fluorescente e a imagem do plano focal do microeletrodo, foram sobrepostas a fim de possibilitar a melhor visualização das células sobre os microeletrodos (Figura 2.3).

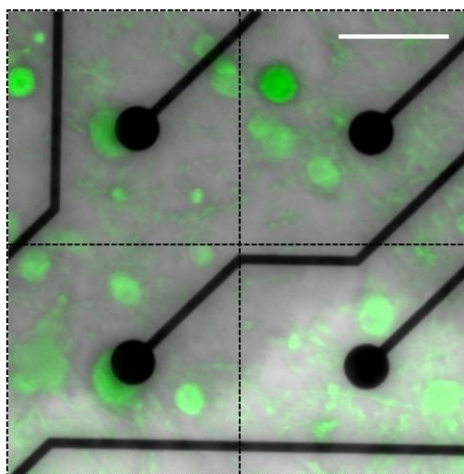
## 2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA

A tarefa de separar visualmente os neurônios de artefatos de cultura (restos de células que permanecem em cultura após os procedimentos de dissociação) e de células satélites da glia é subjetiva e requer uma visão de especialistas. Por isso, para identificar os neurônios do DRG,



**Figura 2.3** – Sobreposição da imagem do plano focal do microeletrodo com a imagem plana fluorescente, em A, gerando a imagem B, utilizada para as quantificações. Escala de 200  $\mu\text{m}$ .

foram estabelecidos alguns parâmetros de comparação relativos à dimensão, geometria e plano focal dos dois tipos celulares em questão (Tabela 2.2). A fluorescência do marcador celular não foi considerada como um parâmetro de diferenciação, uma vez que os artefatos também podem apresentar fluorescência. Em síntese, estes neurônios são grandes e esféricos e possuem aproximadamente a mesma dimensão dos microeletrodos, como pode ser visto na Figura 2.4.



**Figura 2.4** – Fotografia de quatro microeletrodos com seus campos delimitados. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .

Para saber se um neurônio pertencia ao campo de um microeletrodo, foi delimitada uma área quadrada de 200  $\mu\text{m}$  de arestas cujo centro estava o microeletrodo. Como a distância entre

microeletrodos nas MEAs utilizadas é de 200  $\mu\text{m}$ , foi estabelecido então que o campo dos microeletrodos seria uma área quadrada de 200  $\mu\text{m}$  de arestas, assim como ilustra a Figura 2.4. Dessa maneira, toda a superfície da matriz, dividida em 60 campos equivalente aos 60 microeletrodos, pode ser considerada para a contagem.

**Tabela 2.2** – Parâmetros de comparação entre neurônios do DRG e células da glia.

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

### 2.3.1 Medidas das Distâncias

Para avaliar o desenvolvimento neuronal em torno dos microeletrodos foi realizada a análise das imagens das culturas utilizando o software de domínio livre *ImageJ* (versão 1.37c, *National Institute of Health*, USA. Esse software é um processador de imagem baseado em Java, que consegue ler diversos formatos de imagens, faz cálculos de área e pixel selecionados pelo usuário e é capaz de medir distancias e ângulos, dentre outras ferramentas (RASBAND, 2011).

Para cada cultura, apurou-se o número de neurônios e microeletrodos presentes nas imagens, possibilitando estimar a taxa de neurônios por microeletrodo, e foram medidas as distâncias entre esses ( $D$ ) para obter o valor médio das distâncias ( $D'$ ) em cada cultura. A contagem e as medidas de distância foram realizadas manualmente, através das funções do software, e não foi realizado tratamento prévio nas imagens. Primeiro um microeletrodo foi marcado usando a ferramenta “*Point Selections*” do software *ImageJ* e, posteriormente, os neurônios que se encontram em seu campo também foram selecionados. Com a ferramenta “*Analyse Measure*” descobriu-se as coordenadas X e Y de todos os pontos marcados e então foi realizado o cálculo das distâncias entre neurônio e microeletrodo a partir da fórmula usual da distância entre dois pontos:

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

Onde:

D - distância entre neurônio e microeletrodo

Xb - coordenada X do neurônio

Xa - coordenada X do microeletrodo

Yb - coordenada Y do neurônio

Ya - coordenada Y do microeletrodo

Por fim, em alguns momentos as fotografias obtidas foram transformadas em imagens tridimensionais, a fim de visualizar o acoplamento entre neurônios e microeletrodos.

### **2.3.2 Primeira Categorização Utilizada**

Para cada imagem, o número de microeletrodos e de neurônios foram contados, somente considerando os neurônios que estivessem dentro campo dos microeletrodos, ou seja, a um raio de 100 µm do centro dos microeletrodos. Dessa maneira foi possível estimar a taxa de neurônios por microeletrodo e ainda, através das medidas de distância, fazer uma análise geral da topologia da rede neural em relação à matriz por meio de uma categorização dos neurônios.

A categorização ou classificação dos neurônios é importante porque a proximidade com os microeletrodos afeta a qualidade da gravação do sinal, realizado pela matriz. De acordo com a literatura (VAN PELT, 2004), uma parte substancial do neurônio precisa estar em contato com a superfície microeletrodo para se alcançar um bom sinal registrado. Por causa disso, a categorização dos neurônios foi criada com base nas dimensões entre microeletrodos e neurônios, medidas essas relativas à soma dos diâmetros do microeletrodo (30 µm) com o dos neurônios maiores (40 µm). Como o diâmetro dos microeletrodos (30 µm) tem mais ou menos a mesma dimensão dos maiores neurônios do DRG (30-40 µm), os neurônios foram classificados

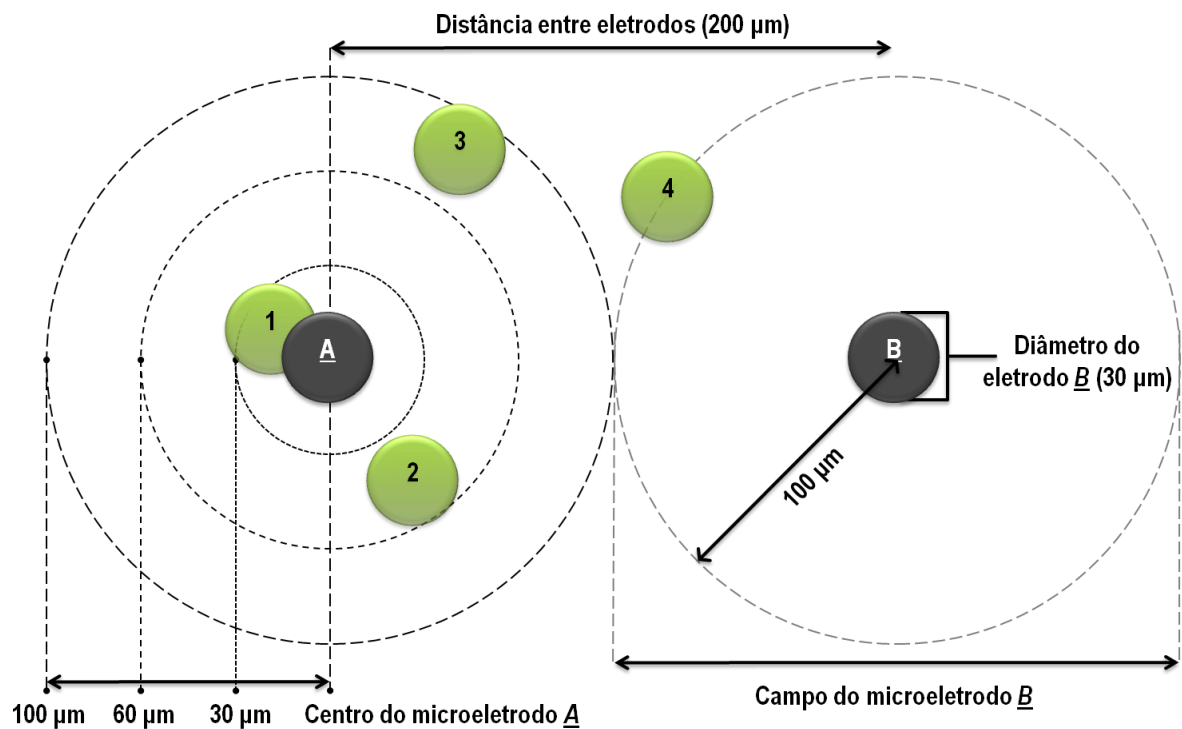
de acordo com a sua distância ao microeletrodo ( $D$ ):

- ▶ neurônios fixados há até 30  $\mu\text{m}$  ( $D < 30 \mu\text{m}$ ) dos microeletrodos foram categorizados como “potencialmente em contato”, assim como o neurônio 1 na Figura 2.5;
- ▶ neurônios localizados entre 31 e 60  $\mu\text{m}$  de distância ( $31 < D < 60 \mu\text{m}$ ) foram considerados “próximos”, como mostra o neurônio 2 na Figura 2.5;
- ▶ neurônios que estavam a mais de 61  $\mu\text{m}$  dos microeletrodos ( $61 < D < 100 \mu\text{m}$ ), foram classificados como “distantes”, exemplificado pelo neurônio 3 na Figura 2.5.

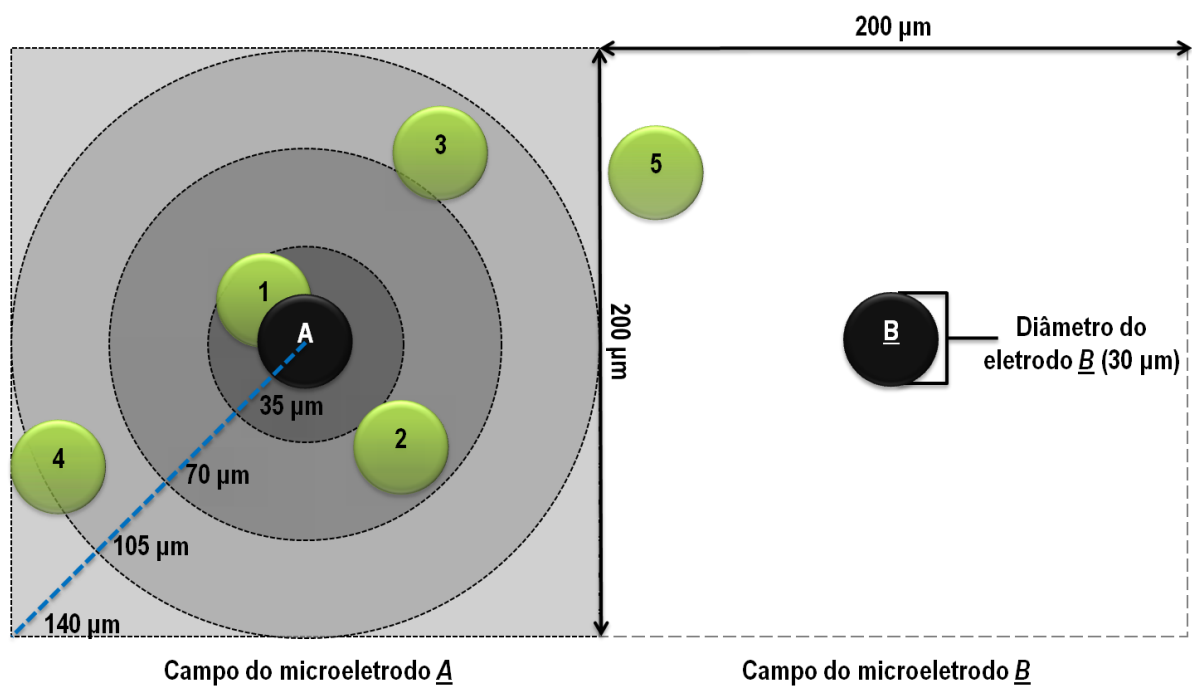
Ao longo das análises, percebeu-se a necessidade de aprimorar a categorização dos neurônios. Nesse primeiro método, alguns neurônios que estavam a mais de 100  $\mu\text{m}$  dos microeletrodos foram desconsiderados da quantificação, porém eles ainda se encontravam dentro do campo dos microeletrodos (área quadrada de 200  $\mu\text{m}$  de arestas). Para que estes neurônios pudessem ser considerados, a categorização neuronal foi remodelada. Por isso, este manuscrito apresenta trabalhos iniciais que utilizaram o primeiro método (Capítulos 3 e ANEXO 2) e trabalhos posteriores (Capítulos 4 e 5), que utilizaram a nova categorização.

### **2.3.3 Aprimoramento da Categorização Neuronal**

Na nova categorização foi necessário aumentar o limite das distâncias para considerar os neurônios que anteriormente não eram contados. Para determinar esse limite, foi calculado o valor da diagonal do quadrado, representado pelo campo do microeletrodo, que foi de aproximadamente 282,84  $\mu\text{m}$ . Dividindo esse valor por dois, encontrou-se o valor máximo do raio a ser considerado em cada campo de um microeletrodo, que aqui foi arredondado para 140  $\mu\text{m}$ . Dessa maneira, somente os neurônios localizados até aproximadamente 140  $\mu\text{m}$  de distância de um microeletrodo foram considerados pertencentes a ele, sendo que neurônios mais distantes que isso estariam mais próximos do microeletrodo seguinte.



**Figure 2.5** – Diagrama demonstrando a categorização de quatro exemplos de neurônios (em verde). três neurônios são classificados de acordo com a sua distância ao microeletrodo A: 1-conectado, 2-próximo, 3-distante; sendo que o neurônio 4 pertence à área do microeletrodo B.



**Figure 2.6** – Diagrama demonstrando a nova categorização de cinco exemplos de neurônios. Quatro neurônios são classificados de acordo com a sua distância ao microeletrodo A: 1-conectado, 2-próximo, 3-afastado, 4-distante; sendo que o neurônio 5 pertence à área do microeletrodo B.

Como o limite para a categorização dos neurônios foi aumentado, houve então a necessidade de redividir essa área de maneira homogênea e mantendo a proporção anteriormente definida de acordo com o diâmetro dos microeletrodos (30  $\mu\text{m}$ ), que é mais ou menos o mesmo diâmetro dos maiores neurônios do DRG (30-40  $\mu\text{m}$ ). Assim, foi criada uma quarta categoria para classificar aqueles neurônios mais afastados, que não eram considerados no método anterior:

- ▶ neurônios fixados há até 35  $\mu\text{m}$  ( $D < 35 \mu\text{m}$ ) dos microeletrodos foram categorizados como “potencialmente em contato”, assim como o neurônio 1 na Figura 2.6;
- ▶ neurônios localizados entre 36 e 70  $\mu\text{m}$  de distância ( $36 < D < 70 \mu\text{m}$ ) foram considerados “próximos”, como mostra o neurônio 2 na Figura 2.6;
- ▶ neurônios localizados entre 71 e 105  $\mu\text{m}$  dos microeletrodos ( $71 < D < 105 \mu\text{m}$ ), foram classificados como “afastados”, exemplificado pelo neurônio 3 na Figura 2.6.
- ▶ neurônios que estavam a mais de 105  $\mu\text{m}$  dos microeletrodos ( $105 < D < 140 \mu\text{m}$ ), foram classificados como “distantes”, exemplificado pelo neurônio 4 na Figura 2.6.

Em alguns momentos deste texto, foram discutidos os valores absolutos e a porcentagem de neurônios contados em cada distância em relação aos microeletrodos, sem considerar a dimensão das áreas. Juntamente com os resultados da densidade celular, que considera as diferentes áreas, esses valores permitem ao leitor avaliar a distribuição das células em relação aos microeletrodos, o que não é detalhado pela densidade celular.



## CAPÍTULO 3

### **PADRONIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE DRG PARA O CONTEXTO DAS MEAS**

---

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Para iniciar uma pesquisa sobre a nocicepção utilizando a MEA como plataforma de trabalho, faz-se necessário uma caracterização e padronização da cultura primária de neurônios sensoriais, a qual precisa ser adequada ao contexto dos dispositivos MEA. Dessa maneira, este trabalho em questão objetivou padronizar a cultura primária de neurônios sensoriais em dispositivos de MEA, de forma a possibilitar registros futuros de atividade elétrica destes neurônios. Para a padronização, o trabalho investigou: (A) a densidade celular apropriada para esta cultura em dispositivos MEA; (B) como ocorre o desenvolvimento morfológico das células em torno dos microeletrodos; (C) quais as principais dificuldades associadas ao cultivo dessas células em MEAs e como superá-las.

#### **3.2 DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS**

Os animais utilizados possuíam as mesmas características já descritas no Capítulo 2 deste manuscrito, assim como o protocolo utilizado para fazer as culturas e as matrizes multieletródos. Vale ressaltar que, para este trabalho em questão, não foram feitos experimentos com placas usuais de cultura e a aquisição das imagens foram feitas somente no terceiro dia *in vitro* (DIV 3)

e, quando possível, os procedimentos foram repetidos para as mesmas culturas também durante o quarto dia *in vitro* (DIV 4). Além disso, nos primeiros experimentos não foi utilizado o marcador DiBAC<sub>4</sub>(3) para a aquisição das imagens.

### 3.2.1 Desenho Experimental

Foram realizados cinco experimentos principais, nos quais se testou: diferentes quantidades celulares; variações entre microscopia invertida comum ou com fluorescência, para visualização das células e captura das fotografias; os reflexos do tempo de cultivo para as culturas, em termos de morte celular e crescimento de glia; e a ação do ARA-C (Citosina Arabinosídeo) como inibidor de crescimento de células gliais. Os experimentos são mais detalhados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** – Delineamento dos experimentos realizados.

| Experimentos                   | 01                    | 02                    | 03                    | 04                    | 05                    |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Amostras                       | MEA-11;<br>MEA-12     | MEA-21;<br>MEA-22     | MEA-31;<br>MEA-32     | MEA-31;<br>MEA-32     | MEA-41;<br>MEA-42     |
| Número de células adicionadas  | ~ 1,3x10 <sup>4</sup> | ~ 1,5x10 <sup>4</sup> | ~ 3,0x10 <sup>4</sup> | ~ 3,0x10 <sup>4</sup> | ~ 3,0x10 <sup>4</sup> |
| Com fluorescência              | Não                   | Sim                   | Sim                   | Sim                   | Sim                   |
| Com inibidor de célula da glia | Não                   | Não                   | Não                   | Não                   | Sim                   |
| DIV fotografado                | 3º dia                | 3º dia                | 3º dia                | 4º dia                | 3º dia                |

A partir desse delineamento, foi possível conferir se existe diferença significativa, para a análise visual das imagens de microscopia invertida comum para as de microscopia invertida com fluorescência, em culturas com densidades celulares semelhantes (experimento 01 x 02). Além disso, também foi testado se havia diferença significativa no número de neurônios em contato, próximos ou distantes dos eletrodos para culturas com densidades celulares diferentes (experimento 02 x 03); para a mesma cultura fotografada em dois dias diferentes (experimento 04); e em culturas sem e com um fator inibidor de proliferação celular (ARA-C), para diminuir a presença de células da glia na cultura (experimento 03 x 05).

Para as análises estatísticas, foram consideradas fotografias de quatro campos abrangendo todos os microeletrodos da MEA. Nas imagens, foi avaliado o número total de neurônios presentes na área central da MEA e, após a contagem dos neurônios, foi utilizada a primeira categorização (ver Capítulo 2, item 2.3.2) para quantificar o número de neurônios possivelmente conectados, próximos e distantes dos microeletrodos, o que corresponde às distâncias entre neurônio e microeletrodo de 1-30  $\mu\text{m}$ , 31-90  $\mu\text{m}$  e 91-120  $\mu\text{m}$ , respectivamente, para cada MEA amostrada. Por fim, foi calculada a densidade celular total nas diferentes MEAs e também para cada classe de distância.

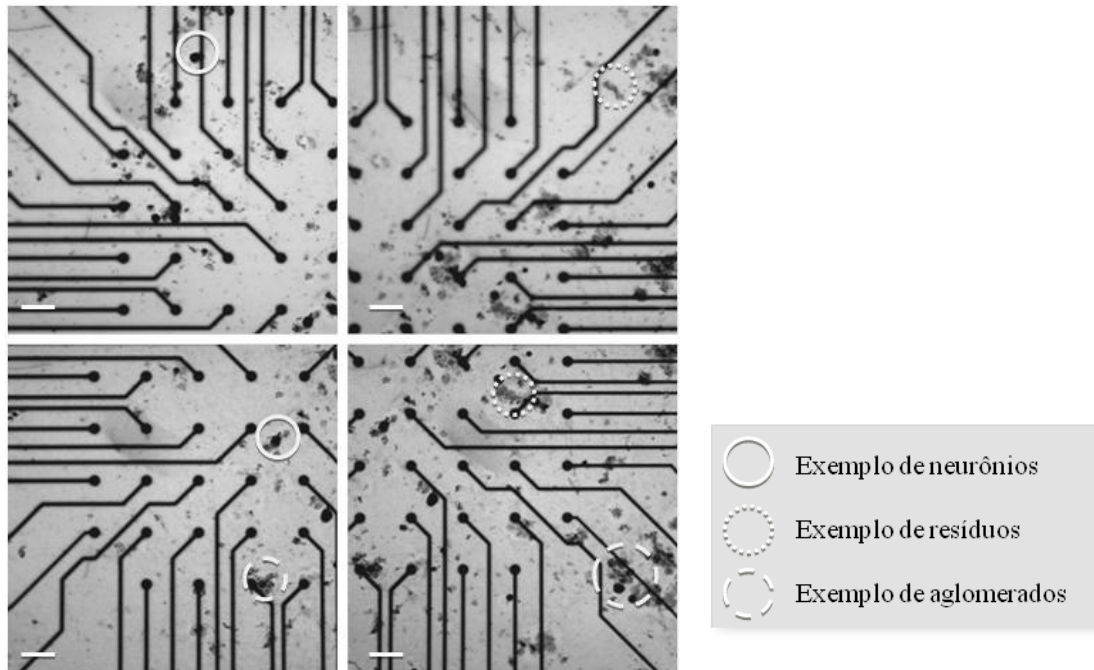
### **3.3 ANÁLISE GERAL DAS IMAGENS**

De maneira geral, os neurônios do DRG se adaptaram muito bem à matriz multieletródo. Em todos os experimentos foi possível visualizar um razoável número de células vivas. Apesar disso, em alguns experimentos também se notou um número considerável de neurônios mortos, resíduos (fragmentos de membranas celulares) e aglomerados (grupos de neurônios, vivos ou mortos, unidos por células da glia). Houve perda de cultura em três experimentos, em decorrência ao desprendimento das células no substrato. Por este motivo, para os experimentos 01, 02 e 04 o tamanho da amostra foi reduzido para uma matriz multieletródo. A seguir, cada um dos experimentos foi abordado individualmente e os resultados estão resumidos na Tabela 3.2.

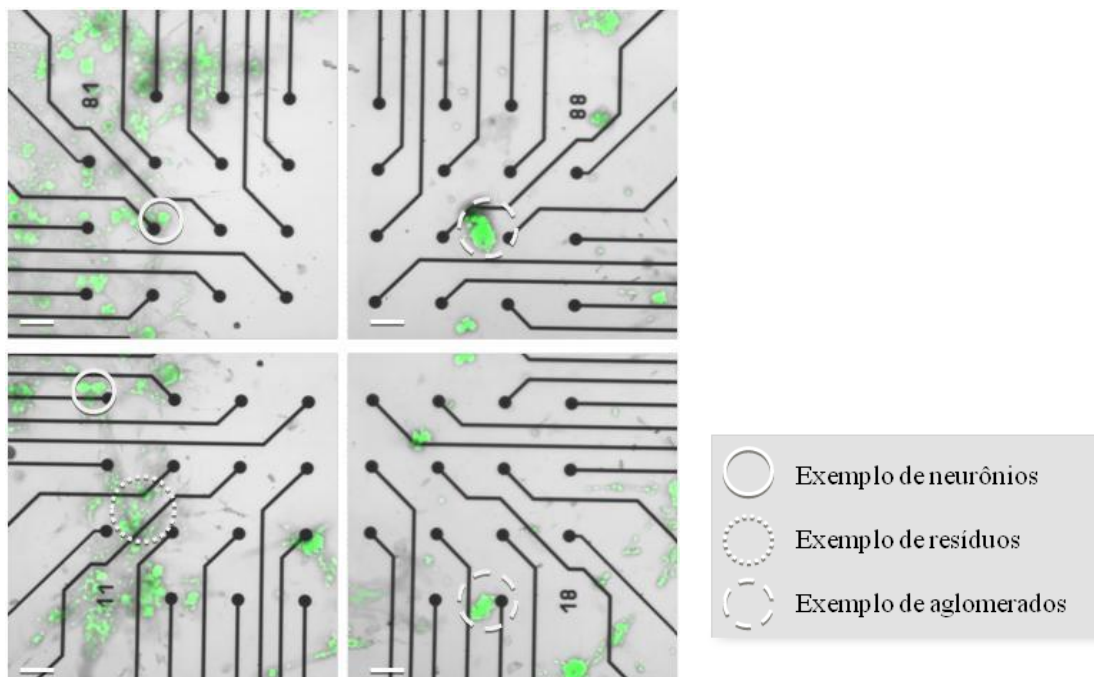
#### **3.3.1 Experimento 01 – Microscopia Comum**

Foram plaqueadas duas MEAs com aproximadamente  $1,3 \times 10^4$  células, porém em uma delas a cultura da MEA-12 foi perdida. Independentemente, a placa restante MEA-11 apresentou boas imagens da microscopia confocal, porém a ausência de reagente fluoróforo como marcador celular dificultou a análise visual das imagens, principalmente na diferenciação entre neurônios e eletrodos e entre células vivas e células mortas (Figura 3.1). Verificou-se também uma grande

quantidade de resíduos e aglomerados nessa placa, o que comprometeu ainda mais a contagem e a medição das distâncias. Por este motivo, optou-se por não fazer as análises deste experimento e sim utilizá-lo somente como padrão de comparação visual entre as imagens.



**Figura 3.1** – Experimento 01, MEA-11, sem o uso de fluorescência. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.2** – Experimento 02, MEA-21, utilizando fluorescência. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 3.2** – Resultados encontrados na análise geral das imagens a partir do delineamento experimental realizado.

| <b>Experimentos</b>                                          | <b>01</b>         | <b>02</b>         | <b>03</b>         |                   | <b>04</b>         | <b>05</b>         |                   |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Amostras                                                     | MEA-11            | MEA-21            | MEA-31            | MEA-32            | MEA-31            | MEA-41            | MEA-42            |
| Número aproximado de células adicionadas                     | $1,3 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^4$ | $3,0 \times 10^4$ | $3,0 \times 10^4$ | $3,0 \times 10^4$ | $3,0 \times 10^4$ | $3,0 \times 10^4$ |
| Com fluorescência                                            | Não               | Sim               | Sim               | Sim               | Sim               | Sim               | Sim               |
| Com inibidor de célula da glia                               | Não               | Não               | Não               | Não               | Não               | Sim               | Sim               |
| Número total de neurônios contados                           | —                 | 38                | 123               | 140               | 53                | 123               | 234               |
| Densidade celular total observada (células/mm <sup>2</sup> ) | —                 | 14,84             | 48,04             | 54,69             | 20,70             | 48,05             | 91,41             |
| Neurônios em contato (até 30 $\mu$ m) com os eletrodos       | —                 | 0                 | 1                 | 3                 | 0                 | 4                 | 3                 |
| Neurônios próximos (31 a 90 $\mu$ m) aos eletrodos           | —                 | 13                | 48                | 52                | 19                | 60                | 92                |
| Distância média entre célula e eletrodo ( $\mu$ m)           | —                 | 145,676           | 135,450           | 114,852           | 138,090           | 110,257           | 111,574           |
| Desvio padrão das distâncias observadas                      | —                 | 95,580            | 91,063            | 67,731            | 95,660            | 78,018            | 61,460            |

### 3.3.2 Experimento 02 – Microscopia de Fluorescência

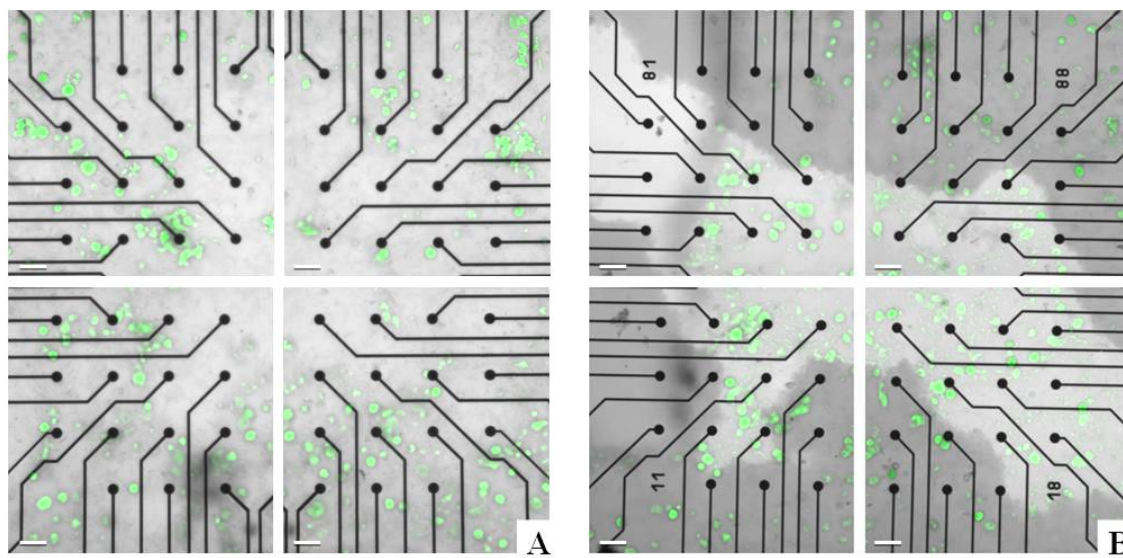
Foram plaqueadas duas MEAs com número de células semelhante ao do experimento 01 ( $1,5 \times 10^4$  células), mas uma delas foi perdida. Porém as fotos tiradas da MEA-21 restante, utilizando o procedimento de fluorescência, mostraram imagens melhores para a diferenciação das células (Figura 3.2). Quanto à análise no *ImageJ*, foram contados um total de 38 neurônios na MEA-21 dispostos a uma distância média de  $\bar{D}_{21} = 145,68 \pm 95,58 \mu\text{m}$  dos eletrodos.

### 3.3.3 Experimento 03 – Maior Densidade Celular

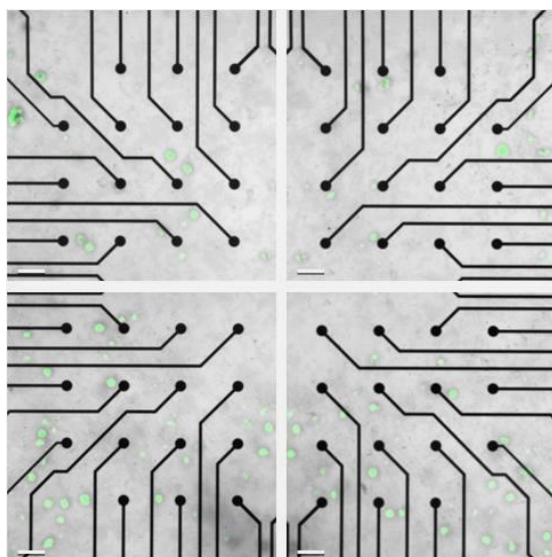
Neste experimento não houve perda de nenhuma das duas culturas e, por este fato, tanto a MEA-31 quanto a MEA-32 foram fotografadas. O número de neurônios na MEA-31 foi de 123 unidades e a distância média para os eletrodos  $\bar{D}_{31} = 135,45 \pm 91,00 \mu\text{m}$ , enquanto que na MEA-32 foram contados 140 neurônios, localizados a uma distância média de  $\bar{D}_{32} = 114,85 \pm 67,73 \mu\text{m}$ . Fazendo uma análise das imagens desse experimento (Figura 3.3), nota-se claramente a maior quantidade de células em relação ao experimento 02, no qual as MEAs foram plaqueadas com metade da quantidade de células do experimento 03 (aprox.  $3,0 \times 10^4$  células).

### 3.3.4 Experimento 04 – Comparação do Tempo de Cultura

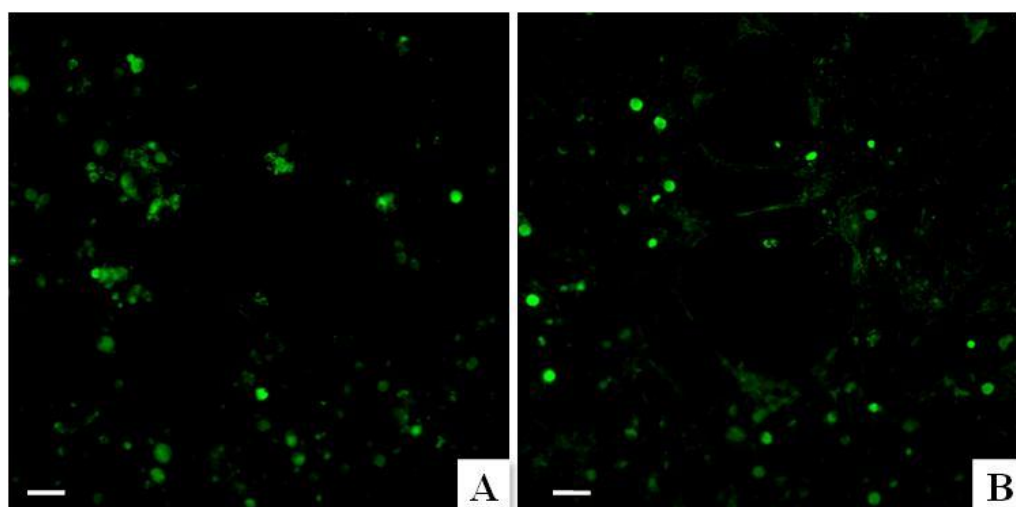
Neste experimento foram utilizadas as mesmas culturas do experimento 03, fotografadas no 4º DIV, porém a cultura MEA-32 se despreendeu do substrato, impossibilitando sua fotografia. Analisando as imagens da MEA-31 no dia seguinte, nota-se uma diferença grande na quantidade de neurônios, em relação à MEA-31 no 3º DIV (Figura 3.4), sendo contados 53 neurônios, dispostos a uma distância média de  $\bar{D}_{(31)} = 138,09 \pm 95,66 \mu\text{m}$  dos eletrodos. Confrontando as imagens da cultura celular em ambos os dias (Figura 3.5) nota-se um aumento na quantidade de células da glia. Através das imagens tridimensionais (Figura 3.6), é possível observar que a glia forma uma espécie de tapete celular entre os eletrodos e os neurônios.



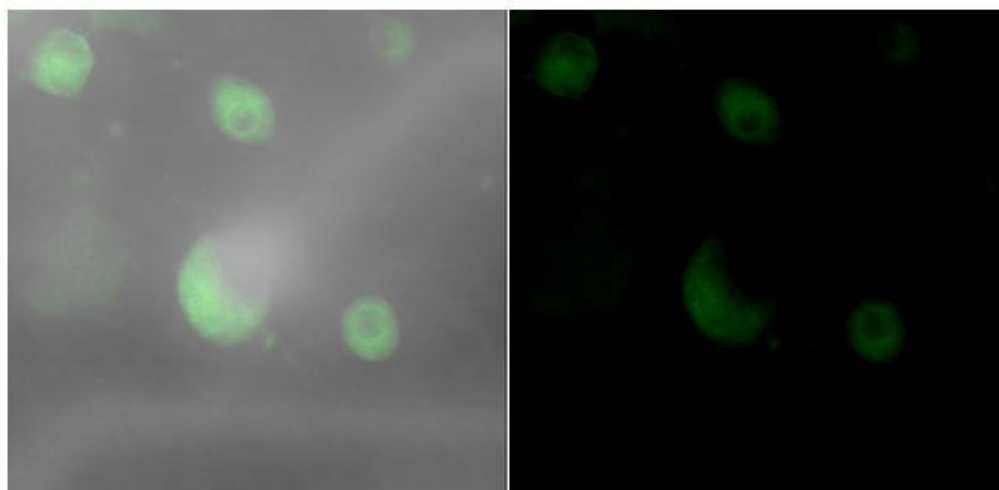
**Figura 3.3** – Experimento 03, MEA-31 em (A) e MEA-32 em (B). Escala de 100  $\mu\text{m}$ .



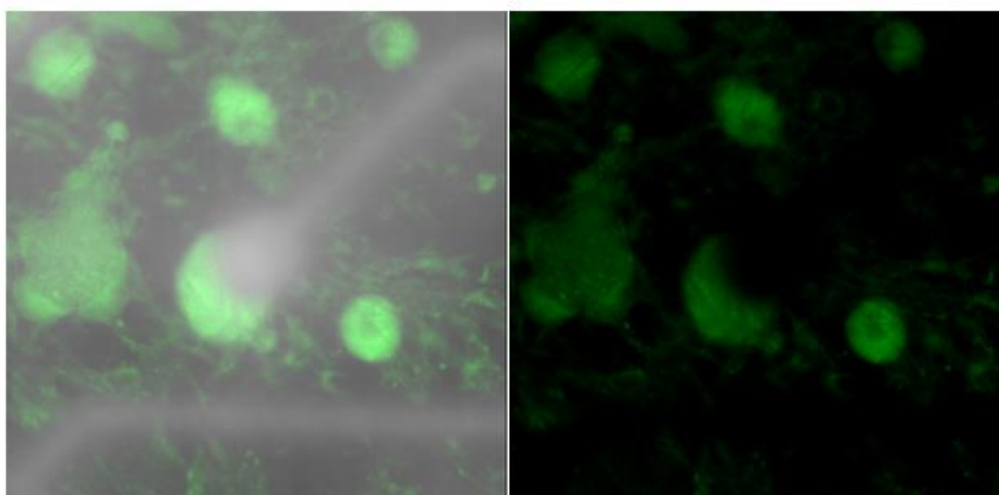
**Figura 3.4** – Experimento 04, MEA-31. Um dia depois das primeiras fotografias. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .



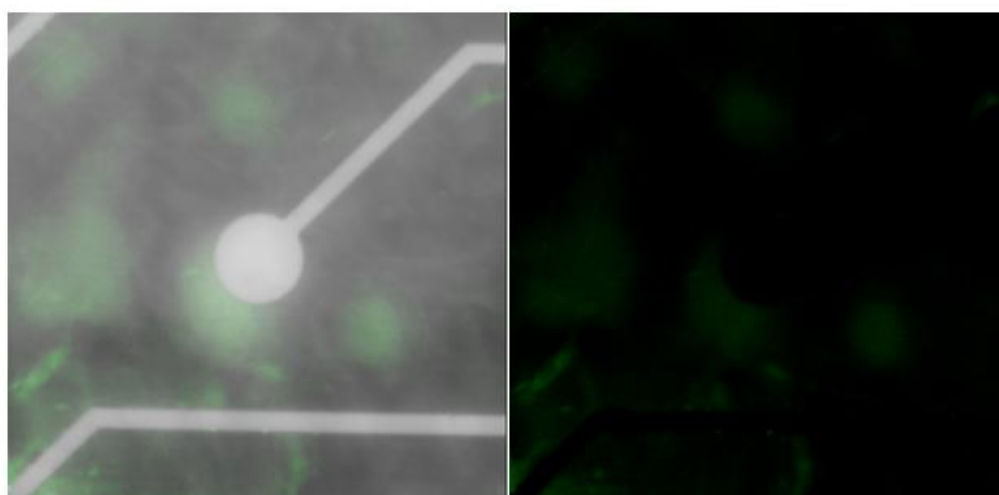
**Figura 3.5** – MEA-31 no 3° DIV em (A) e no 4° DIV em (B). Imagem da fluorescência das células, sem os eletrodos ao fundo. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .



**Quadro superior**



**Quadro central**



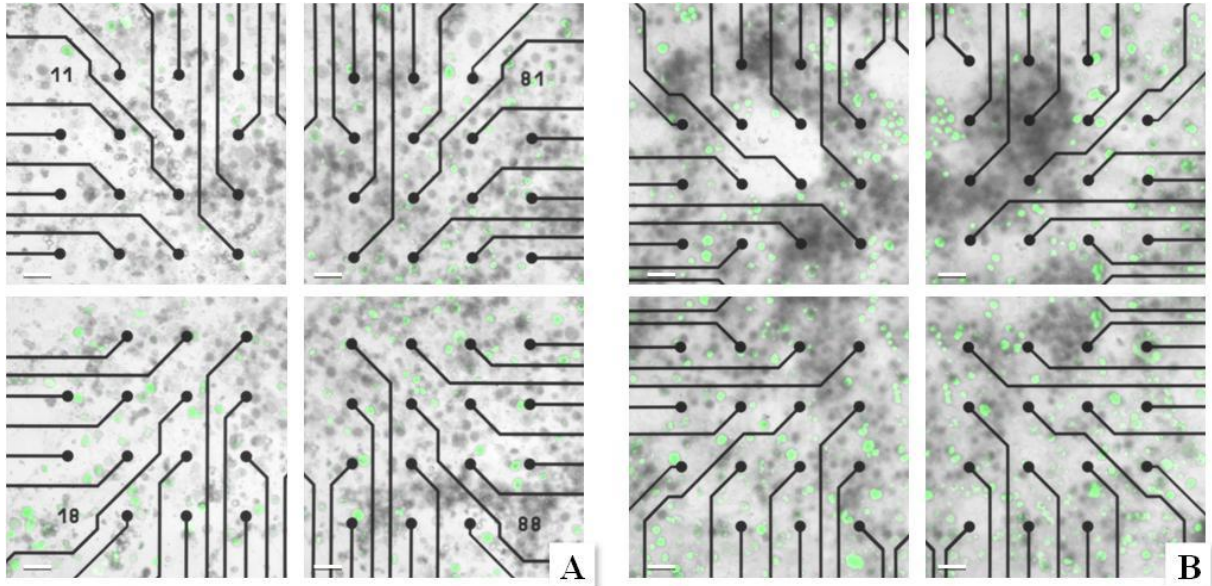
**Quadro inferior**

**Figura 3.6** – Animação 3D da MEA-31 no 4º DIV. Os quadros representam uma altura específica do plano Z, evidenciando mais abaixo os eletrodos, acima os neurônios e no plano entre eles a glia. À direita estão representadas as imagens da cultura demonstrando somente as células, enquanto que a da esquerda mostra também os eletrodos, a fim de comparação.



### 3.3.5 Experimento 05 – Inibidor de Células da Glia

Foram plaqueadas duas MEAs com número de células semelhante ao do experimento 03 ( $3,0 \times 10^4$  células) e foi possível fotografar tanto a MEA-41 quanto a MEA-42. Foram contados 123 neurônios na MEA-41 e a distância média em relação aos eletrodos foi de  $\bar{D}_{41} = 110,26 \pm 78,02 \mu\text{m}$ , enquanto que na MEA-42 foram contados 234 neurônios, localizados a uma distância média de  $\bar{D}_{42} = 111,57 \pm 61,46 \mu\text{m}$ . Fazendo a análise visual das imagens das MEAs deste experimento (Figura 3.7), nota-se grande quantidade de células mortas, mas o número de neurônios vivos foi maior, em comparação ao experimento 03.



**Figura 3.7** – Experimento 05, MEA-41 em (A) e MEA-42 em (B). Os neurônios vivos estão em verde e as células que não estão fluorescentes (mais escuras) estão mortas. Escala de  $100 \mu\text{m}$ .

## 3.4 DENSIDADE CELULAR DOS EXPERIMENTOS

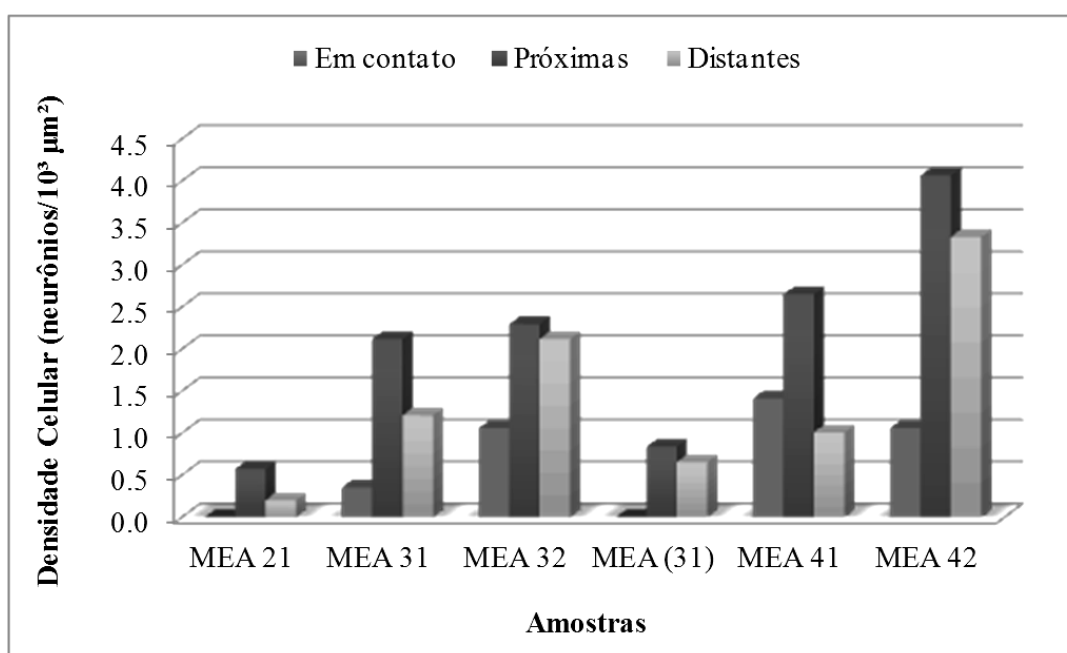
Os resultados obtidos através da avaliação da densidade celular dos neurônios presentes em contato (até  $30 \mu\text{m}$ ), próximas ( $31$  a  $90 \mu\text{m}$ ) e distantes (até  $30 \mu\text{m}$ ) dos eletrodos para cada MEA amostrada, podem ser vistos na Tabela 3.3 e no gráfico da Figura 3.8. A MEA 21 representa o

experimento 02, as MEAs 31 e 32 representam o experimento 03, a MEA (31) representa o experimento 04 e as MEAs 41 e 42 representam o experimento 05.

Em todas as culturas foi visto um número muito baixo de células em contato direto com os microeletrodos. De fato, até mesmo considerando a densidade celular nota-se que a média de todos os experimentos foi de  $0,65 \times 10^{-3}$  células por micrômetros quadrados na área que corresponde até 30  $\mu\text{m}$  de distância do microeletrodo.

**Tabela 3.3** – Densidade celular dos neurônios observados a diferentes distâncias dos eletrodos, para cada MEA amostrada.

|              |          | <b>Densidade Celular (<math>10^{-3}</math> neurônios / <math>\mu\text{m}^2</math>)</b> |                                      |                                        |
|--------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| Experimentos |          | Em contato<br>(até 30 $\mu\text{m}$ )                                                  | Próximas<br>(31 a 90 $\mu\text{m}$ ) | Distantes<br>(91 a 120 $\mu\text{m}$ ) |
| 02           | MEA 21   | 0,000                                                                                  | 0,575                                | 0,202                                  |
| 03           | MEA 31   | 0,354                                                                                  | 2,122                                | 1,213                                  |
|              | MEA 32   | 1,061                                                                                  | 2,299                                | 2,122                                  |
| 04           | MEA (31) | 0,000                                                                                  | 0,840                                | 0,657                                  |
| 05           | MEA 41   | 1,415                                                                                  | 2,653                                | 1,010                                  |
|              | MEA 42   | 1,061                                                                                  | 4,067                                | 3,335                                  |
| Média        |          | 0,649                                                                                  | 2,093                                | 1,423                                  |



**Figura 3.8** – Síntese dos valores encontrados na Tabela 3.

### **3.5 DISCUSSÃO**

Em praticamente todas as imagens foi visto grande quantidade de neurônios mortos, resíduos e aglomerados, o que já era esperado para uma cultura primária. Para as culturas primárias, como neste caso, espera-se que pelo menos um terço das células adicionadas morra em cultura, por causa do choque causado pelo isolamento dessas células de tecidos vivos e também pelas condições adversas de cultivo em ambiente alheio (POTTER & DE-MARSE, 2001). A presença de resíduos e aglomerados também é bastante comum neste tipo de cultura, pois são artefatos originados durante a dissociação enzimática do gânglio (HANANI, 2005).

O desprendimento de várias culturas durante os experimentos foi algo incomum para este tipo de cultura. Não se sabe ao certo o que pode ter causado isso, porém não há evidências de que a causa esteja no substrato de adesão celular utilizado (Matrigel), uma vez que as culturas se desprenderam das placas junto com a camada de Matrigel. Acredita-se que alguma impureza deve ter permanecido após os procedimentos de limpeza das MEAs, interferindo na adesão do Matrigel à matriz.

#### **3.5.1 Desenvolvimento Neural Em Torno Dos Microeletrodos**

Em todos os experimentos, quando analisadas distâncias de até 120  $\mu\text{m}$ , os neurônios foram encontrados em maior quantidade a 31-90  $\mu\text{m}$  de distância dos eletrodos, o que também corresponde à área de maior densidade celular nas MEAs. Isto sugere um padrão para a adesão celular, mesmo sem utilizar técnicas de direcionamento neuronal sobre a matriz, o que contraria Rutten e colaboradores (2001) que afirmaram que a adesão celular, neste caso, é aleatória. Mas, levando em consideração que os eletrodos possuem diâmetro de 30  $\mu\text{m}$  e os maiores neurônios 50  $\mu\text{m}$ , sugere-se então que a probabilidade de ocorrer neurônios a distâncias de 31 a 90  $\mu\text{m}$  é maior por causa da distribuição dos eletrodos na MEA.

Era esperado que todas as classes de distâncias aos microeletrodos (em contato, próximas, distantes) apresentassem resultados semelhantes da densidade celular, uma vez que a adesão das células seria aleatória. Porém, foi visto uma densidade muito baixa de neurônios conectados aos eletrodos, em relação às outras classes de distâncias que apresentaram densidade celular semelhante na maioria dos experimentos. Dessa maneira, sugere-se uma possível influência dos microeletrodos na adesão dos neurônios, seja por causa da geometria desses ou então, menos provável, por influências químicas. Porém, o mais provável seja que a área utilizada para os neurônios em contato (um raio de 30  $\mu\text{m}$  ao redor do centro dos eletrodos) não tenha sido suficiente para englobar uma amostra confiável para o cálculo da densidade celular.

### **3.5.2 Densidade celular**

No Experimento 02, cuja MEA-21 continha metade do número de células adicionadas, foi contada uma quantidade menor de neurônios, sugerindo que a densidade celular emplacada altera a quantidade de neurônios visualizados. Porém, também se observa que existem variações na densidade celular, para cada classe de distância, em um mesmo experimento, como no caso do Experimento 03 e 05 e, provavelmente estas são variações comuns de uma cultura para outra.

Para futuras análises, sugere-se repetir os tratamentos utilizando um tamanho amostral maior e concentrações celulares mais altas. Isso pode ser feito aproveitando a mesma quantidade de células, porém adicionando uma solução concentrada dessas células somente ao centro da matriz, onde são encontrados os eletrodos.

Neste trabalho, as células foram diluídas em meio de cultura e adicionadas ao receptáculo de cultura da MEA, cujo volume é 1 mL. O que se propõe é colocar somente uma gota de solução celular concentrada, em um volume de 50 a 100  $\mu\text{L}$ , apenas na região central dos eletrodos da MEA e deixá-la na estufa até que as células se fixem no substrato (aproximadamente 1 hora) (POTTER & DE-MARSE, 2001). Dessa maneira, o volume total do

receptáculo de cultura da MEA seria completado com meio de cultura somente após a fixação das células, evitando a adesão esparsa na matriz.

### **3.5.3 As Células da Glia**

Nas placas sem adição de ARA-C foi observada uma rápida proliferação das células da glia. Nas imagens tridimensionais, foi possível observar que, em 36-48 horas, as células da glia formaram um “tapete” por baixo dos neurônios, interferindo no contato entre neurônios e eletrodos, assim como Van Pelt e colaboradores (2004) observaram. Futuramente, isso poderá dificultar a aquisição dos sinais eletrofisiológicos dos neurônios. A solução para este problema seria a utilização de agentes antimitóticos, como o ARA-C, que inibem o crescimento de células gliais, por impossibilitar a mitose.

Como os neurônios não realizam mitose, o ARA-C teoricamente não interviria nos neurônios, porém existem estudos que já comprovam que a ausência de glia como condição de cultivo de neurônios promove morte neuronal (WALLACE & JOHNSON-JR, 1989; AULD & ROBITAILLE, 2003). Por este fato, o resultado das culturas com ARA-C (MEA-41 e MEA-42 do Experimento 05), que demonstraram ter neurônios mais próximos e em maior número do que aquelas sem ARA-C, não corresponde à literatura. O ARA-C pode diminuir ou, no máximo, não alterar a sobrevivência dos neurônios, mas nunca aumentar, como foi o caso. Portanto, acredita-se que neste experimento ocorreu um erro de percurso durante a contagem das células, das quais uma maior quantidade do que a contada foi plaqueada nas MEAs.

### **3.5.4 Dificuldades Associadas**

O Experimento 01 resultou em dificuldade para diferenciar neurônios e eletrodos e, ainda, células vivas de células mortas, por causa da ausência de marcador celular. Grande parte dessa dificuldade está associada ao fato de que alguns neurônios possuem mesmos tamanhos e coloração, no caso das imagens sem fluorescência, que os eletrodos. Dessa maneira, foi

praticamente impossível apurar o número de células em contato, próximas e distantes dos eletrodos, para este experimento. Porém, nos experimentos seguintes, o uso de fluorescência resolveu este problema.

No Experimento 04, houve grande redução do número de neurônios visualizados quando a cultura da MEA-31 foi fotografada também no dia seguinte. Isto sugere que o procedimento de fotografar as culturas em ambiente aberto, de forma que estas ficaram por um tempo longo fora da incubadora e em solução tampão, provoca alteração significativa na adesão e na sobrevivência desses neurônios. Vale lembrar que a temperatura do ambiente e o próprio laser utilizado no confocal podem também causar danos às células durante aquisição das imagens, caso as fotografias não sejam feitas de forma rápida. Portanto, para aprimorar esse procedimento, é necessário utilizar recipientes selados, como foi descrito por Potter e De-Marse (2001), para evitar o contato da cultura com a atmosfera não esterilizada.

### 3.6 CONCLUSÕES

Existem vários aspectos a considerar para se definir o protocolo ideal de cultivo dos neurônios do gânglio da raiz dorsal em MEAs. Primeiramente, deve-se tentar reduzir a presença de artefatos originados da dissociação enzimática dos gânglios, a partir de uma manipulação experimental mais cuidadosa. Para a aquisição das imagens, a utilização de fluorescência ajudou bastante na diferenciação entre células e eletrodos e também entre células vivas de células mortas. Dessa maneira, torna-se possível fazer aferições mais precisas e, futuramente, até mesmo automáticas, através de *softwares* específicos.

A baixa densidade de neurônios conectados aos eletrodos pode implicar em uma possível influência dos microeletrodos na adesão dos neurônios. Essa interferência pode surgir devido à geometria dos microeletrodos ou à incompatibilidade química desses com o matrigel (polímero

de adesão celular), ou então a área utilizada para calcular a densidade de neurônios em contato foi insuficiente. Para comprovar essas hipóteses, seriam necessários novos experimentos utilizando controles, ou seja, culturas celulares crescidas em placas comuns sem microeletrodos.

Para diminuir a distância entre neurônios e eletrodos é necessário aumentar a densidade celular plaqueada para além de  $3,0 \times 10^4$  células, ou então, concentrar a adição de neurônios apenas na região central da MEA, onde os eletrodos são encontrados. Dessa maneira, é possível aprimorar a aquisição dos sinais eletrofisiológicos, devido à maior proximidade dos neurônios com os eletrodos. Além disso, o uso de recipientes selados evitaria o contato da cultura com a atmosfera não esterilizada, fazendo com que o índice de morte neuronal diminua. Assim, seria possível analisar o crescimento da rede neuronal na MEA por vários dias seguidos.

Por fim, para evitar que o desenvolvimento acelerado de células gliais sem prejudicar a viabilidade dos neurônios, faz-se necessário testar outros possíveis agentes antimitóticos, além do ARA-C. Dessa maneira, evitaria que a camada de glia, formada entre os eletrodos e os neurônios, dificultasse a adesão neuronal à matriz.

## CAPÍTULO 4

### **EVOLUÇÃO DIRETA DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NA INTERFACE NEURÔNIO-MICROELETRODO**

---

#### **4.1 INTRODUÇÃO**

Nociceptores é a denominação dada aos neurônios sensoriais primários, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG), especializados em detectar os estímulos de dor. As MEAs são, provavelmente, um bom meio para se detectar alterações na excitabilidade dos nociceptores, e um primeiro passo para testar esta aplicação é monitorar a evolução da topologia da cultura neural. Dessa maneira, imagens periódicas tomadas sobre a cultura possibilitam caracterizar a interface que surge entre neurônio e microeletrodo, estudos estes essenciais para a captação de um sinal de qualidade. Assim, o trabalho em questão teve por objetivo caracterizar e comparar a evolução topológica dos nociceptores crescidos sobre os microeletrodos da MEA e sobre placas usuais de cultura ao longo do tempo. Por se tratar das mesmas culturas, pode-se dizer que a evolução topológica estudada aqui é diretamente relacionada ao longo do tempo.

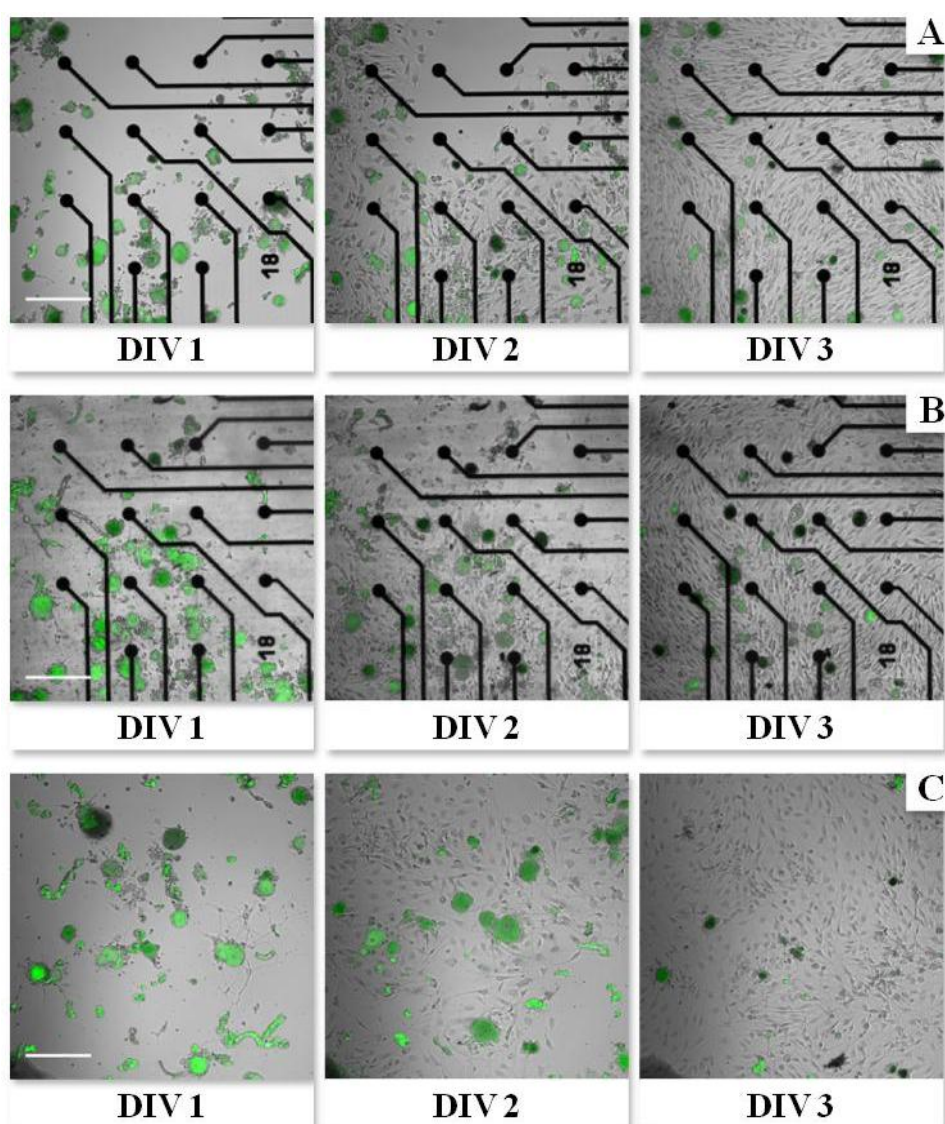
#### **4.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL**

Foi realizada uma análise quantitativa em termos da distribuição espacial das células, com o intuito de calcular um mapa das distâncias entre os neurônios e os microeletrodos. Para isso,



foram utilizadas imagens adquiridas de uma mesma cultura em diferentes dias *in vitro* (DIVs), ou seja, com diferentes tempos de cultivo, através de microscopia confocal de fluorescência.

No trabalho em questão, foram realizadas três culturas de neurônios do DRG, conforme protocolo descrito no Capítulo 2, sendo que duas dessas cresceram sobre MEAs e a outra sobre uma placa comum de cultura. A aquisição das imagens foi realizada, para as mesmas culturas, diariamente durante o 1º, 2º e 3º dias de cultivo, conforme mostra a Figura 4.1, utilizando o marcador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3). A primeira cultura (MEA-1) é representada pela Figura 4.1A, a segunda (MEA-2) aparece na Figura 4.1B e a terceira (PLACA-1) na Figura 4.1C.



**Figura 4.1** – Imagens diárias da cultura da MEA-1 (A), da MEA-2 (B) e da PLACA-1 (C). Escala de 200  $\mu$ m

A partir dessas imagens, foi possível calcular se existe diferença significativa entre as distâncias médias para cada cultura crescida em MEAs ou em placas usuais de cultivo. Primeiro foi verificada a normalidade dos dados através da análise do histograma de todas as amostras e, para detectar as diferenças entre as placas e também entre cada dia *in vitro*, foi utilizada a análise de variância bifatorial (ANOVA), com nível de confiabilidade de 95% ( $\alpha=0,05$ ).

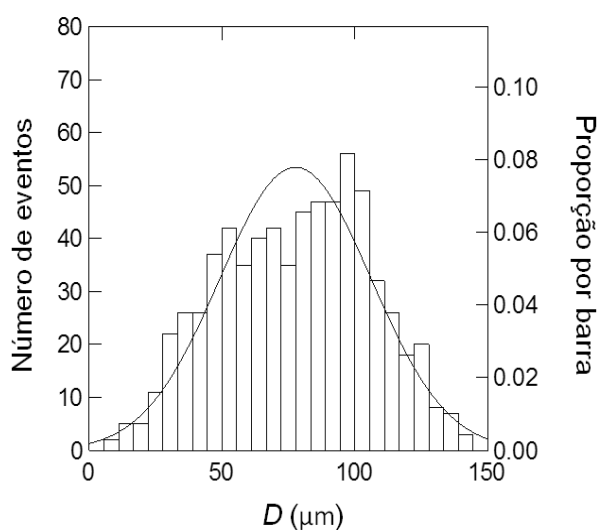
Nas imagens também foi avaliado o número de microeletrodos e de neurônios, possibilitando estimar a taxa de neurônios por microeletrodo. Para calcular as distâncias entre neurônio e microeletrodo nas placas comuns de cultura, que não possuem microeletrodos, essa distância foi calculada utilizando as coordenadas cartesianas dos microeletrodos encontrados nas imagens das MEAs.

Para verificar se existe alguma propensão das células para se aderirem próximas ou distantes dos microeletrodos, neste trabalho foi utilizada a segunda categorização (ver Capítulo 2) para quantificar o número de neurônios potencialmente em contato ( $D < 35 \mu\text{m}$ ), próximos ( $36 < D < 70 \mu\text{m}$ ), afastados ( $70 < D < 105 \mu\text{m}$ ) e distantes ( $105 < D < 140 \mu\text{m}$ ) dos microeletrodos, em cada cultura amostrada.

## **4.3 RESULTADOS**

### **4.3.1 Análises Estatísticas**

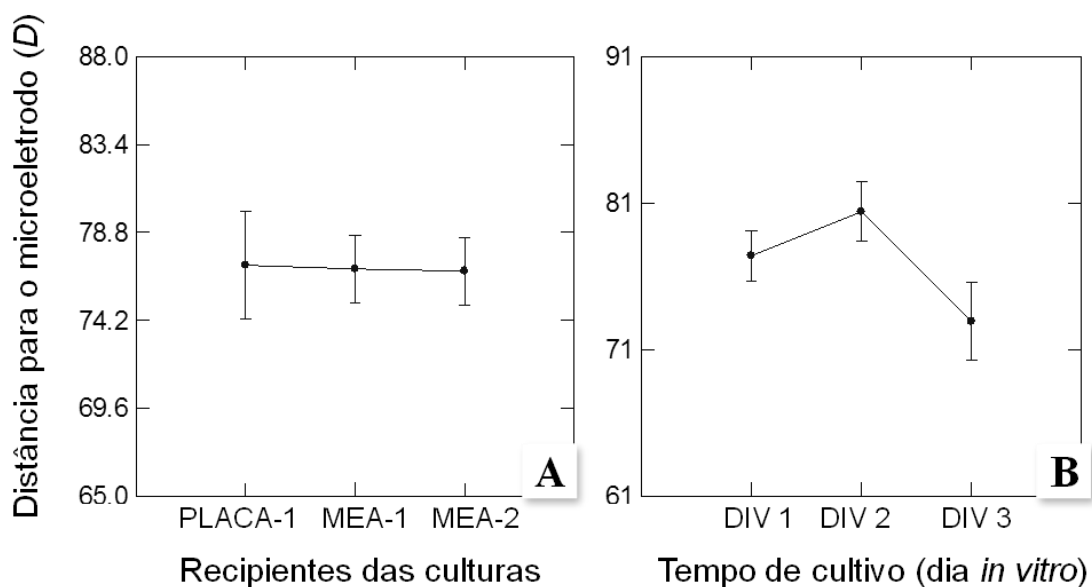
Inicialmente foi verificada a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Apesar da distribuição normal dos dados não ter sido confirmada ( $P < 0,001$ ), não foi necessário normalizar os valores das distâncias amostrados para a análise de variância, porque a distribuição da amostra é similar à normal (Figura 4.2). De acordo com Zar (1999), se a amostra dos dados for grande ( $n > 30$ ) e se os desvios de normalidade não forem muito expressivos, ainda pode-se utilizar a ANOVA, por se tratar de um teste robusto.



**Figura 4.2** – Histograma de todos os valores de  $D$  ( $\mu\text{m}$ ) utilizados para a análise de variância.

A partir da análise de variância bifatorial, foram testadas três hipóteses: a primeira ( $H_{01}$ ) afirma que não existe diferença entre os valores de  $D$  para cada placa (MEA-1, MEA-2 e PLACA-1); a segunda ( $H_{02}$ ) afirma que não existe diferença entre os valores de  $D$  para cada um dos dias *in vitro*; e a terceira hipótese testada ( $H_{03}$ ) assegura que os efeitos entre as placas e os dias *in vitro* não são dependentes um do outro.

Os resultados obtidos da ANOVA confirmaram todas as três hipóteses. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de  $D$  para cada placa ( $F = 0,004$ ;  $P = 0,996$ ). De fato, observando o gráfico da Figura 4.3A, as médias de  $D$  e os desvios-padrão em cada cultura são muito próximos ( $\bar{D}_{PLACA1} = 76,42 \pm 29,48 \mu\text{m}$ ;  $\bar{D}_{MEA1} = 78,16 \pm 28,25 \mu\text{m}$ ;  $\bar{D}_{MEA2} = 77,54 \pm 28,25 \mu\text{m}$ ). Também não houve diferenças estatísticas significativas entre os valores de  $D$  para os três dias *in vitro* ( $F = 2,507$ ;  $P = 0,082$ ). Contudo, nota-se na Figura 4.3B uma ligeira queda no valor médio de  $D$  encontrado no DIV 3 ( $\bar{D}_{DIV3} = 71,79 \pm 28,79 \mu\text{m}$ ), em relação ao DIV 1 ( $\bar{D}_{DIV1} = 78,82 \pm 28,49 \mu\text{m}$ ) e ao DIV 2 ( $\bar{D}_{DIV2} = 79,94 \pm 27,66 \mu\text{m}$ ).

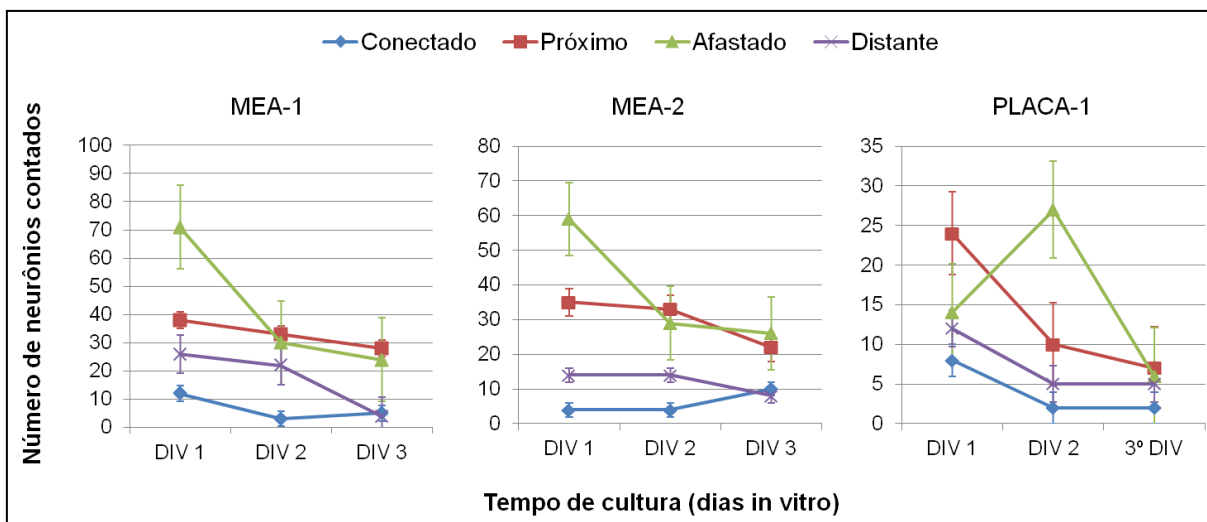


**Figura 4.3** – Comparação entre os valores (média e erro padrão) da distância entre neurônio e microeletrodo, para cada recipiente de cultura (A) e em relação ao tempo de cultivo (B).

Por fim, os resultados da ANOVA também demonstraram que os dois fatores não são dependentes entre si ( $F = 1,935$ ;  $P = 0,103$ ), ou seja, os valores encontrados para o tipo de recipiente de cultura não variam de acordo com os DIVs e os valores encontrados para os DIVs não variam de acordo com o tipo de recipiente de cultura.

#### 4.3.2 Categorização dos Neurônios

**Comparação entre as MEAs** – De maneira geral, as duas culturas crescidas sobre as MEAs tiveram uma evolução topológica parecida, apesar da quantidade de neurônios observada ter sido diferente (Figura 4.4). Inicialmente, um razoável número de neurônios foi encontrado próximo aos microeletrodos ( $36 < D < 70 \mu\text{m}$ ), mas muito pouco foi visto em contato direto com eles ( $D < 35 \mu\text{m}$ ). Também se observou poucos neurônios às maiores distâncias ( $106 < D < 140 \mu\text{m}$ ) e a maioria dos neurônios estava localizada afastada dos microeletrodos ( $71 < D < 105 \mu\text{m}$ ).



**Figura 4.4** – Quantidade de neurônios estimados nas quatro classes de distâncias e em relação ao tempo de cultivo (dia *in vitro*), para cada cultura.

Considerando-se o tempo de cultura, nas MEAs foi observada uma redução na quantidade de neurônios amostrados entre os três DIVs, restando no DIV 3, em média, 49% dos neurônios inicialmente contados, como visto na Tabela 4.1 que faz uma média dos resultados das duas MEAs e compara com o resultado da PLACA-1. O decréscimo mais significativo ocorreu do DIV 1 para o DIV 2, no qual houve uma perda neuronal de 35%. Entretanto, no DIV 3 a perda neuronal foi menor, em relação à quantidade de neurônios observados no DIV 2, sendo que somente 16% dos neurônios desapareceram.

**Tabela 4.1** – Taxa Neuronal Remanescente.

|                           | Conectados | Próximos | Afastados | Distantes | Total |
|---------------------------|------------|----------|-----------|-----------|-------|
| Média das Culturas da MEA |            |          |           |           |       |
| 1º DIV                    | 100%       | 100%     | 100%      | 100%      | 100%  |
| 2º DIV                    | 44%        | 90%      | 45%       | 90%       | 65%   |
| 3º DIV                    | 94%        | 68%      | 38%       | 30%       | 49%   |
| Cultura da PLACA-1        |            |          |           |           |       |
| 1º DIV                    | 100%       | 100%     | 100%      | 100%      | 100%  |
| 2º DIV                    | 25%        | 42%      | 193%      | 42%       | 76%   |
| 3º DIV                    | 25%        | 29%      | 43%       | 42%       | 34%   |

Por outro lado, a perda de neurônios ocorreu em maior proporção para aqueles localizados a distâncias maiores dos microeletrodos, sendo que ao final do DIV 3 somente 38% dos neurônios afastados ( $71 < D < 105 \mu\text{m}$ ) e 30% dos neurônios distantes ( $106 < D < 140 \mu\text{m}$ ) permaneceram nas MEAs. Em contrapartida, manteve-se a proporção de 94% dos neurônios conectados ( $D < 35 \mu\text{m}$ ) e 68% daqueles observados próximos ( $36 < D < 70 \mu\text{m}$ ) aos microeletrodos.

**Comparação entre as MEAs e a PLACA-1** – Primeiramente, essa comparação só foi possível porque as condições de plaqueamento foram as mesmas em ambos os recipientes. A diferença mais significativa entre os dois recipientes foi observada na quantidade de células aderidas no DIV 1, que na PLACA-1 foi de apenas 58 neurônios, enquanto nas MEAs a média foi de 130 neurônios. Ao final dos três DIVs, a placa comum também apresentou menor número de neurônios, 76% no DIV 2; e 34% no DIV 3. Da Tabela 4.2, pode-se constatar que o desvio-padrão da distância média  $D$  é relativamente maior para a cultura crescida na placa, revelando uma maior variação da distribuição dessas células.

Observando os resultados da densidade celular, na Tabela 4.2, nota-se que cada placa possui um padrão diferente da adesão celular no primeiro dia. Na MEA-1 são vistos cerca de  $3,0 \times 10^{-3}$  neurônios/ $\mu\text{m}^2$  para as classes de neurônios conectados, próximos e afastados, mas para aqueles distantes o resultado foi metade dos demais,  $1,5 \times 10^{-3}$  neurônios/ $\mu\text{m}^2$ . Para a MEA-2, a maior densidade celular ( $2,5$  a  $3,0 \times 10^{-3}$  neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) foi obtida para os neurônios próximos e afastados dos microeletrodos, mas pouco ( $0,5$  a  $1,0 \times 10^{-3}$  neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) foi visto em contato direto e às maiores distâncias.

Se houvessem eletrodos na PLACA-1, notar-se-ia um padrão da adesão dos neurônios no DIV 1 diferente ao visto em cada MEA. Na PLACA-1, a maior densidade celular ( $2,0 \times 10^{-3}$  neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) foi obtida para as classes de neurônios conectados e próximos, mas para aqueles afastados e distantes o resultado foi de  $0,5 \times 10^{-3}$  neurônios/ $\mu\text{m}^2$ .

**Tabela 4.2** – Resultado da categorização dos neurônios entre as placas e entre cada dia *in vitro*.

|         |        | Densidade Celular ( $10^{-3}$ neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) |             |             |           | Total ( $10^{-5}$ neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) | Célula/<br>Eletrodo | $D$ ( $\mu\text{m}$ )* |
|---------|--------|------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-----------|------------------------------------------------|---------------------|------------------------|
|         |        | Conectados                                                 | Próximos    | Afastados   | Distantes |                                                |                     |                        |
| MEA-1   | 1º DIV | <u>3,12</u>                                                | <u>3,29</u> | <u>3,07</u> | 1,54      | 5,74                                           | 2,49                | $79,96 \pm 28,37$      |
|         | 2º DIV | 0,78                                                       | 2,86        | 1,30        | 1,30      | 3,44                                           | 1,49                | $81,75 \pm 28,21$      |
|         | 3º DIV | 1,30                                                       | 2,43        | 1,04        | 0,24      | 2,38                                           | 1,03                | $71,30 \pm 24,93$      |
| MEA-2   | 1º DIV | 1,04                                                       | <u>3,03</u> | <u>2,56</u> | 0,83      | 4,38                                           | 1,90                | $81,28 \pm 26,54$      |
|         | 2º DIV | 1,04                                                       | 2,86        | 1,26        | 0,83      | 3,13                                           | 1,36                | $76,93 \pm 28,71$      |
|         | 3º DIV | 2,60                                                       | 1,91        | 1,13        | 0,47      | 2,58                                           | 1,12                | $61,42 \pm 29,86$      |
| PLACA-1 | 1º DIV | <u>2,08</u>                                                | <u>2,08</u> | 0,61        | 0,71      | 2,27                                           | 0,98                | $70,99 \pm 31,55$      |
|         | 2º DIV | 0,52                                                       | 0,87        | 1,17        | 0,30      | 1,72                                           | 0,75                | $83,34 \pm 22,74$      |
|         | 3º DIV | 0,52                                                       | 0,61        | 0,26        | 0,30      | 0,78                                           | 0,34                | $76,93 \pm 34,30$      |

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

## 4.4 DISCUSSÃO

Todas as culturas apresentaram uma adesão neuronal difusa, na qual a maior parte dos neurônios, no DIV 1, foi encontrada próxima ou afastada ( $36 < D < 105 \mu\text{m}$ ) dos microeletrodos, sendo que poucos foram vistos distantes ou em contato direto com os mesmos (Figura 4.4). De acordo com Rutten e colaboradores (2001), esse resultado era esperado, uma vez que não foi utilizada nenhuma técnica para orientar ou direcionar o crescimento neuronal ao redor dos microeletrodos.

Por outro lado, era esperado que houvesse maior homogeneidade nos valores da densidade celular para cada classe de distância, o que não ocorreu, demonstrando novamente que pode haver alguma influência dos microeletrodos na adesão celular. Porém não foi possível constatar isso, porque cada cultura obteve um padrão de adesão neuronal diferente, dificultando a comparação estatística.

Considerando o tempo de cultura, no DIV 3, o número de células reduziu para 49%, em média, nas MEAs. A diminuição mais significativa, nas MEAs, ocorreu entre o DIV 1 e o DIV 2, onde 65% dos neurônios permaneceram (Tabela 4.1), enquanto que na PLACA-1 o decréscimo significativo ocorreu entre o DIV 2 e o DIV 3, que de 76% caiu para 34% de neurônios inicialmente contados. No contexto de culturas primárias, como é o caso, é esperado que no mínimo um terço das células plaqueadas morram sob as condições de cultura (POTTER & DEMARSE, 2001). Isso ocorre porque essas células sofrem estresses desde seu isolamento dos tecidos vivos e, também, por causa do ambiente adverso onde são mantidas.

Observou-se também que a morte neuronal, em ambos os recipientes, ocorreu principalmente para as células localizadas a distâncias maiores (Tabela 4.1), de modo que 94% dos neurônios conectados e 68% dos neurônios vizinhos permaneceram nas MEAs. De fato, os resultados da análise estatística mostraram uma redução do valor médio de  $D$  no DIV 3 (Figura 4.3B). Portanto, pode-se dizer que não houve redução significativa na quantidade dos neurônios próximos e conectados aos microeletrodos e, ainda, as distâncias entre neurônio e microeletrodo diminuíram no DIV 3. Dessa maneira, os resultados sugerem que o sinal registrado a partir da MEA poderia permanecer, durante três dias, sem perdas importantes na amplitude e na qualidade, já que a proximidade do neurônio com o microeletrodo é um fator essencial para a formação de um sinal de qualidade na MEA (VAN PELT, 2004).

Nos resultados, é interessante observar também que os valores médios das distâncias entre neurônio e microeletrodo (representado na Figura 4.3A e pela variável  $D$  na Tabela 4.2), assim como o desvio-padrão desses, praticamente não variaram de uma cultura para outra, o que também foi comprovado pela análise estatística. Isso indica que ambas as culturas mantiveram o mesmo padrão de distribuição e perda neuronal, com uniformidade entre os dados, o que valida os resultados obtidos.



## 4.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, buscou-se caracterizar e comparar a evolução topológica direta de culturas de neurônios do DGR, crescidas sobre os microeletrodos da MEA e sobre placas usuais de cultura ao longo do tempo.

Apesar de ter sido feita uma cultura controle em uma placa comum, sem microeletrodos, não foi possível constatar influências dos microeletrodos na adesão celular. Isso se deve ao fato de que cada cultura obteve um padrão de adesão neuronal diferente, o que dificultou a comparação estatística. Para isso, seriam necessários mais repetições em cada experimento para anular as variações comuns de uma cultura para outra.

Quanto à evolução da distribuição celular, observou-se um decréscimo na quantidade de células após os três dias em cultura, fato comum em se tratando de uma cultura primária. Porém, a perda mais significativa ocorreu nos neurônios mais distantes dos microeletrodos cuja atividade elétrica participa sutilmente no sinal da MEA, inclusive, nota-se uma redução das distâncias no DIV 3. Dessa maneira, mantendo-se a maior parte dos neurônios mais próximos aos microeletrodos, ao longo dos dias, espera-se que o sinal registrado praticamente seja o mesmo.

Além disso, não se encontrou grandes diferenças entre a distribuição celular nas MEAs e na placa comum de cultura ao longo dos três dias *in vitro*. De fato, os resultados observados nas matrizes multieletrodo podem ser até mais satisfatórios que o visto na placa comum, mas não é possível afirmar isso já que, novamente, pode ser somente uma variação natural dos dados.

Por fim, esta nova quantificação revela que é possível caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, a partir de imagens da rede neural, afim de que se possa melhorar a qualidade do sinal da MEA.

# CAPÍTULO 5

## EVOLUÇÃO INDIRETA DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NA INTERFACE NEURÔNIO- MICROELETRODO

---

### 5.1 INTRODUÇÃO

No trabalho anterior, as fotografias foram realizadas para as mesmas culturas, diariamente, durante os três primeiros dias de cultivo. Por causa disso, foi visto que ao final de três dias em cultura, apenas 50% dos neurônios aderidos no DIV 1 eram vistos nas placas. Para contornar o problema de perda celular nesses procedimentos, decidiu-se por fotografar cada cultura somente em um dia *in vitro* (DIVs). Desta forma, foi avaliada a progressão da cultura com o passar dos dias, porém sem expor as células ao ambiente externo e ao laser para aquisição das imagens. Assim, novamente o objetivo foi caracterizar e comparar a evolução topológica dos nociceptores crescidos sobre os microeletrodos da MEA e sobre placas usuais de cultura, porém indiretamente ao longo do tempo, por se tratar de culturas diferentes.

### 5.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Novamente foi realizada uma análise quantitativa em termos da distribuição espacial das células, com o intuito de calcular um mapa das distâncias entre os neurônios e os microeletrodos. Para isso, foram utilizadas imagens adquiridas de várias culturas ao longo dos três primeiros dias de cultivo, cada cultura sendo fotografada somente uma vez, em um dia específico. Dessa

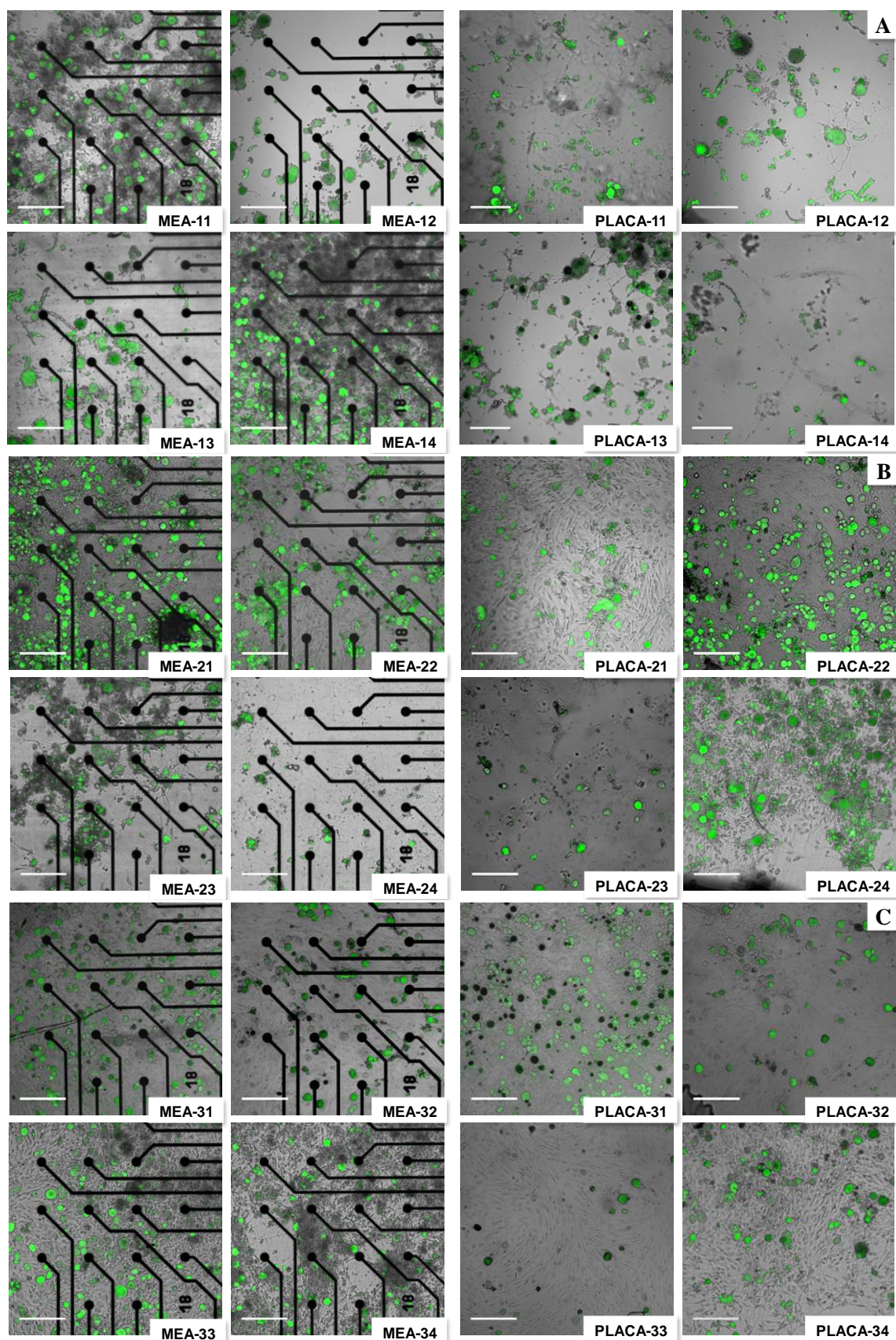
maneira, três culturas semelhantes foram utilizadas para capturar as imagens nos três primeiros DIVs. As culturas foram feitas seguindo o protocolo descrito no Capítulo 2, sendo que algumas dessas cresceram sobre MEAs e o restante sobre uma placa comum de cultura. A aquisição das imagens foi realizada através de microscopia confocal, utilizando o marcador fluorescente DiBAC4(3).

Inicialmente aos experimentos, foi realizada uma aleatorização da amostra (distribuição ao acaso dos animais) para garantir que não haja interferência do pesquisador e que as diferenças encontradas sejam somente devido aos tratamentos. Para definir o tamanho amostral foi realizado o cálculo do número mínimo do grau de liberdade do resíduo, de acordo com (PIMENTEL-GOMES, 2000) e o tamanho da amostra utilizado foi de quatro repetições para cada tratamento (matrizes multieletrodo e placas usuais de cultura) e dia *in vitro* (DIV 1, DIV 2 e DIV 3), como pode ser visto na Tabela 5.1

**Tabela 5.1** – Delineamento dos experimentos realizados.

| <b>Culturas</b>          | <b>DIV 1</b>                           | <b>DIV 2</b>                          | <b>DIV 3</b>                          |
|--------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Matrizes multieletrodo   | MEA11; MEA12;<br>MEA13; MEA14.         | MEA21; MEA22;<br>MEA23; MEA24.        | MEA31; MEA32;<br>MEA33; MEA34.        |
| Placas usuais de cultura | PLACA11; PLACA12;<br>PLACA13; PLACA14. | PLACA21; PLACA22;<br>PLACA23; PLACA24 | PLACA31; PLACA32;<br>PLACA33; PLACA34 |

A partir das imagens dessas culturas (Figura 5.1), foi possível comparar a adesão celular em ambos os recipientes. No primeiro momento, foi verificada a normalidade dos dados através do histograma de todas as amostras. Para detectar as diferenças entre as distâncias médias para cada placa e também para cada dia *in vitro*, foi utilizada a análise de variância bifatorial (ANOVA), com nível de confiabilidade de 95% ( $\alpha=0,05$ ). Quando detectada diferenças entre as amostras, foi utilizado um teste de comparação de média, teste de Tukey, para testar toda e qualquer diferença entre as amostras.



**Figura 5.1** – Imagens geradas por microscopia confocal de todas as culturas amostradas neste experimento para o DIV 1 (A), DIV 2 (B) e DIV 3(C). Escala de 200µm.

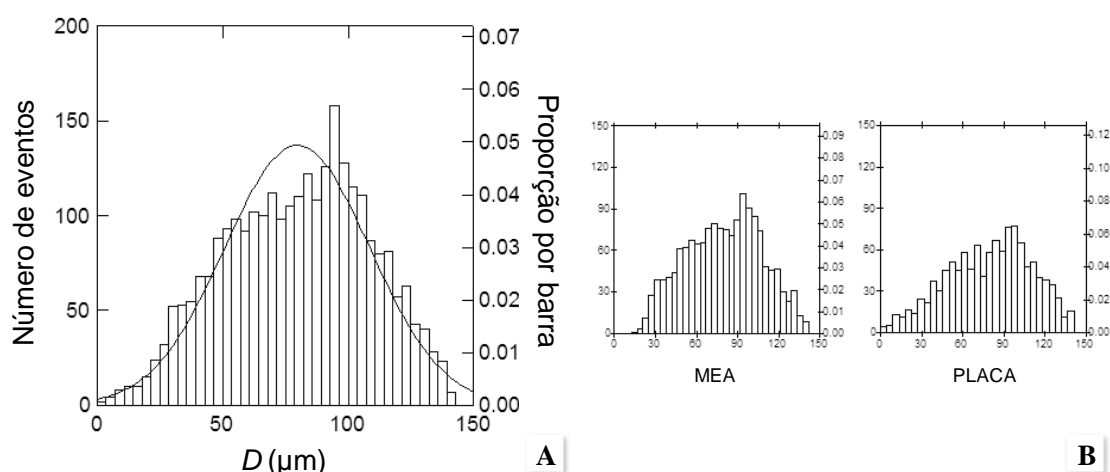
Neste trabalho também foram utilizadas as coordenadas cartesianas dos microeletrodos das imagens das MEAs para calcular as distâncias entre neurônio e microeletrodo nas placas comuns de cultura. Após contar neurônios e microeletrodos e medir as distâncias entre eles, foi utilizada a segunda categorização (ver Capítulo 2), na qual os neurônios foram classificados de acordo com a sua distância aos microeletrodos ( $D$ ): conectado ( $D < 35 \mu\text{m}$ ), próximo ( $36 < D < 70 \mu\text{m}$ ), afastado ( $71 < D < 105 \mu\text{m}$ ) e distante dos microeletrodos ( $106 < D < 140 \mu\text{m}$ ) para cada cultura. Dessa maneira foi possível verificar se existe alguma propensão das células para se aderirem próximas ou distantes dos microeletrodos, de acordo com o DIV e conforme o recipiente utilizado.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Análises Estatísticas

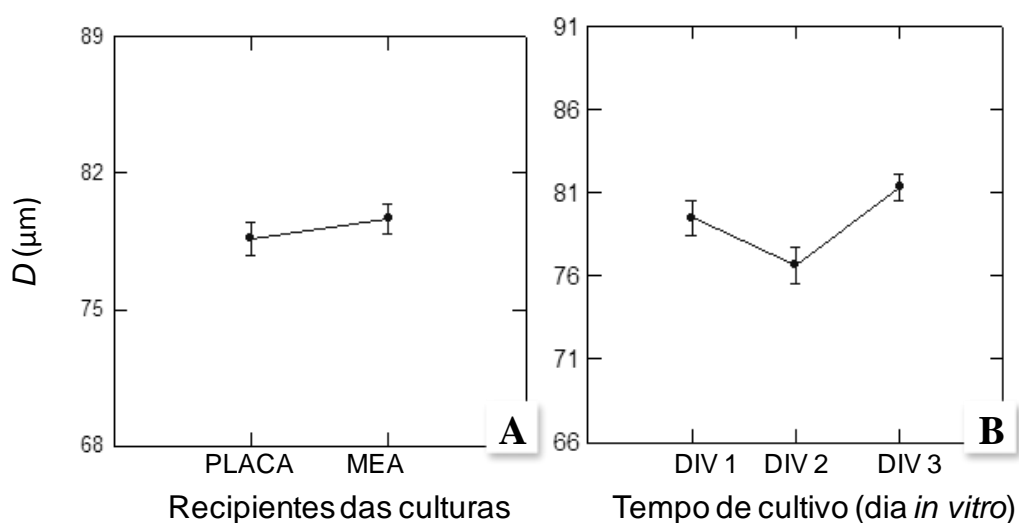
Apesar da distribuição normal dos dados não ter sido confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ( $P < 0,001$ ), não foi necessário normalizar os valores das distâncias amostrados para a análise de variância, porque a distribuição da amostra total e de cada grupo do fator recipiente de cultura (MEA e PLACA) é similar à normal, como mostra os histogramas da Figura 5.2A e 5.2B, respectivamente. A análise de variância ou ANOVA é um teste robusto e pode ser utilizado se a amostra dos dados for grande ( $n > 30$ ) e os desvios de normalidade não forem muito expressivos (ZAR, 1999).

A partir da análise de variância bifatorial, foram testadas três hipóteses: a primeira ( $H_{01}$ ) afirma que não existe diferença entre os valores de  $D$  para cada tipo de recipiente (matrizes multielectrodo e placas comuns); a segunda ( $H_{02}$ ) afirma que não existe diferença entre os valores de  $D$  para cada um dos dias *in vitro*; e a terceira hipótese testada ( $H_{03}$ ) assegura que os efeitos entre as placas e os dias *in vitro* não são dependentes um do outro.



**Figura 5.2** – (A) Histograma de todos os valores de  $D$  ( $\mu\text{m}$ ) utilizados para a análise de variância e, em (B), os histogramas do grupo das matrizes multieletrodo e das placas comuns.

Os resultados obtidos da ANOVA confirmaram a primeira ( $H_{01}$ ) e a terceira hipótese ( $H_{03}$ ). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de  $D$  para cada tipo de recipiente ( $F = 0,794$ ;  $P = 0,373$ ). De fato, observando o gráfico da Figura 5.3A, as médias de  $D$  em cada uma das culturas é aproximadamente a mesma ( $\bar{D}_{PLACAS} = 79,54 \pm 30,49 \mu\text{m}$  e  $\bar{D}_{MEAS} = 79,84 \pm 27,58 \mu\text{m}$ ). Também foi confirmado que os dois fatores não são dependentes entre si ( $F = 2,512$ ;  $P = 0,081$ ), ou seja, um fator não varia de acordo o outro.



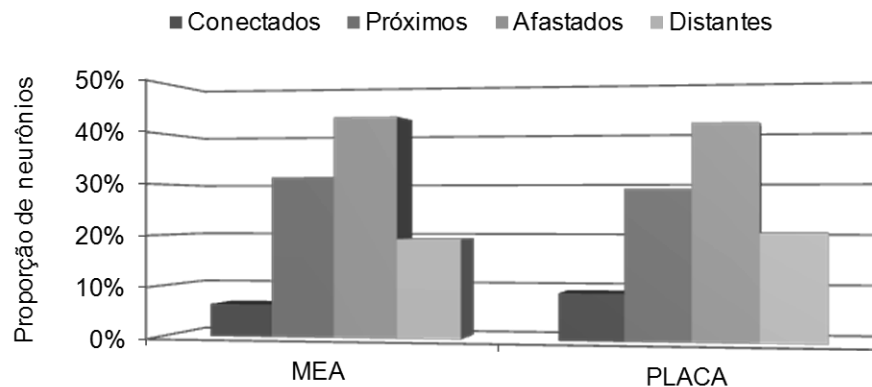
**Figura 5.3** – Comparação entre os valores (média e erro padrão) da distância entre neurônio e microeletrodo, para cada recipiente de cultura (A) e em relação ao tempo de cultivo (B).

Por outro lado, os resultados da ANOVA rejeitaram a segunda hipótese ( $H_{02}$ ), demonstrando que houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de  $D$  para os três dias *in vitro* ( $F = 5,732$ ;  $P = 0,003$ ). Nota-se na Figura 5.3B uma ligeira queda no valor médio de  $D$  no DIV 2 ( $\bar{D}_{DIV2} = 76,86 \pm 29,31 \mu\text{m}$ ), em relação ao DIV 1 ( $\bar{D}_{DIV1} = 79,76 \pm 27,85 \mu\text{m}$ ) e ao DIV 3 ( $\bar{D}_{DIV3} = 79,94 \pm 27,66 \mu\text{m}$ ). Ao realizar o Teste de Tukey para descobrir qual grupo destaca-se aos outros, confirmou-se que a diferença estatística se encontra nos valores do DIV 2, enquanto que os resultados obtidos para o DIV 1 e DIV 3 não são estatisticamente diferentes.

### 5.3.2 Categorização dos Neurônios

As culturas foram comparadas conforme o recipiente e o dia *in vitro* e os neurônios quantificados de acordo com a sua distância aos microeletrodos. Os resultados dessas quantificações podem ser vistos na Tabela 5.2 para todas as culturas.

**Quanto à Distribuição Espacial** – Ao considerar eletrodos nas placas comuns de cultura, é possível notar que ambos recipientes de cultura apresentaram padrão idêntico da distribuição dos neurônios em relação aos microeletrodos, como ilustra a Figura 5.4. Para os dois tipos de recipientes, em média, menos de 10% dos neurônios foram vistos em contato direto com microeletrodos e aproximadamente 30% desses estavam próximos. Mais de 40 % estavam afastados dos microeletrodos e só 20% dos neurônios foram encontrados a maiores distâncias.



**Figura 5.4** – Taxa média de neurônios estimados nas quatro classes de distâncias para cada tipo de recipiente de cultura

**Tabela 5.2** – Densidade celular de neurônios categorizados em relação a sua distância aos microeletrodos, para todas as culturas e dias *in vitro*.

|                   |       | Densidade Celular ( $10^{-3}$ neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) |          |           |           | Total ( $10^{-5}$ neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) | Célula/<br>Eletrodo | $D$ ( $\mu\text{m}$ )* |                   |
|-------------------|-------|------------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|------------------------------------------------|---------------------|------------------------|-------------------|
|                   |       | Conectados                                                 | Próximos | Afastados | Distantes |                                                |                     |                        |                   |
| Culturas na MEA   | DIV 1 | MEA-11                                                     | 0,52     | 3,64      | 2,34      | 1,48                                           | 4,80                | 2,08                   | $82,71 \pm 26,77$ |
|                   |       | MEA-12                                                     | 3,12     | 3,29      | 3,07      | 1,54                                           | 5,74                | 2,49                   | $79,96 \pm 28,37$ |
|                   |       | MEA-13                                                     | 1,04     | 3,20      | 2,56      | 0,83                                           | 4,45                | 1,93                   | $80,15 \pm 25,46$ |
|                   |       | MEA-14                                                     | 2,34     | 4,59      | 3,33      | 2,01                                           | 6,76                | 2,93                   | $80,16 \pm 26,14$ |
|                   | DIV 2 | MEA-21                                                     | 2,86     | 5,37      | 3,55      | 1,30                                           | 6,91                | 3,00                   | $76,02 \pm 25,00$ |
|                   |       | MEA-22                                                     | 1,82     | 1,82      | 1,43      | 1,12                                           | 3,13                | 1,36                   | $19,12 \pm 30,02$ |
|                   |       | MEA-23                                                     | 2,86     | 2,94      | 1,52      | 1,42                                           | 4,06                | 1,76                   | $79,11 \pm 29,79$ |
|                   |       | MEA-24                                                     | 0,00     | 0,52      | 0,39      | 0,35                                           | 0,82                | 0,36                   | $89,90 \pm 23,25$ |
|                   | DIV 3 | MEA-31                                                     | 4,16     | 6,06      | 2,82      | 2,96                                           | 7,85                | 3,41                   | $78,48 \pm 30,57$ |
|                   |       | MEA-32                                                     | 2,86     | 4,24      | 2,86      | 2,72                                           | 6,72                | 2,92                   | $82,43 \pm 30,07$ |
|                   |       | MEA-33                                                     | 2,08     | 3,38      | 2,86      | 1,30                                           | 5,27                | 2,29                   | $82,25 \pm 26,27$ |
|                   |       | MEA-34                                                     | 2,08     | 3,81      | 2,82      | 1,24                                           | 5,39                | 2,34                   | $77,91 \pm 25,62$ |
| Culturas na PLACA | DIV 1 | PLACA-11                                                   | 0,26     | 0,35      | 0,30      | 0,41                                           | 0,74                | 0,32                   | $91,68 \pm 32,19$ |
|                   |       | PLACA-12                                                   | 0,52     | 1,47      | 0,69      | 0,95                                           | 1,99                | 0,86                   | $85,48 \pm 32,77$ |
|                   |       | PLACA-13                                                   | 2,08     | 3,81      | 2,90      | 1,06                                           | 5,35                | 2,32                   | $77,82 \pm 25,85$ |
|                   |       | PLACA-14                                                   | 3,90     | 2,68      | 1,82      | 1,18                                           | 4,22                | 1,83                   | $74,77 \pm 33,49$ |
|                   | DIV 2 | PLACA-21                                                   | 2,60     | 1,39      | 1,00      | 0,95                                           | 2,54                | 1,10                   | $78,70 \pm 36,41$ |
|                   |       | PLACA-22                                                   | 2,60     | 3,12      | 2,47      | 0,83                                           | 4,57                | 1,98                   | $74,77 \pm 28,44$ |
|                   |       | PLACA-23                                                   | 0,78     | 0,35      | 0,48      | 0,47                                           | 1,02                | 0,44                   | $85,04 \pm 31,25$ |
|                   |       | PLACA-24                                                   | 3,12     | 2,77      | 1,52      | 0,65                                           | 3,52                | 1,53                   | $69,53 \pm 30,89$ |
|                   | DIV 3 | PLACA-31                                                   | 2,08     | 5,11      | 3,77      | 2,96                                           | 7,97                | 3,46                   | $83,80 \pm 27,22$ |
|                   |       | PLACA-32                                                   | 3,12     | 3,03      | 1,95      | 1,66                                           | 4,69                | 2,03                   | $78,63 \pm 31,32$ |
|                   |       | PLACA-33                                                   | 0,78     | 1,13      | 1,13      | 0,71                                           | 2,11                | 0,92                   | $83,21 \pm 25,58$ |
|                   |       | PLACA-34                                                   | 4,94     | 4,24      | 3,12      | 3,61                                           | 7,85                | 3,41                   | $83,22 \pm 32,59$ |

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

A diferença mais significativa entre os dois recipientes foi observada na densidade de células aderidas nos DIVs 1 e 2, como mostra a Tabela 5.3, que nas culturas da placa comum foi cerca de  $3,0 \times 10^{-3}$  neurônios/ $\mu\text{m}^2$ , enquanto que nas culturas da MEA foram encontrados 5,44



neurônios/ $10^3 \mu\text{m}^2$  no DIV 1 e 3,73 neurônios/ $10^3 \mu\text{m}^2$  no DIV 2. Para o DIV 3, comparando ambas as placas, a densidade média de neurônios foi menos discrepante, aproximadamente 6,0 neurônios/ $10^3 \mu\text{m}^2$  nas culturas da MEA e mais de 5,5 neurônios/ $10^3 \mu\text{m}^2$  nas culturas da placa comum. Essas comparações só foram possíveis porque foram utilizadas condições de plaqueamento semelhantes em ambos os recipientes.

**Tabela 5.3** – Densidade celular do número médio de neurônios categorizados em relação a sua distância aos microeletrodos, para cada recipiente de cultura e dia *in vitro*.

|                      |       | Densidade Celular ( $10^{-3}$ neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) |          |           |           | Total ( $10^{-5}$ neurônios/ $\mu\text{m}^2$ ) | Célula/<br>Eletrodo | $D$ ( $\mu\text{m}$ )* |
|----------------------|-------|------------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|------------------------------------------------|---------------------|------------------------|
|                      |       | Conectados                                                 | Próximos | Afastados | Distantes |                                                |                     |                        |
| Culturas na<br>MEA   | DIV 1 | 1,75                                                       | 3,68     | 2,83      | 1,46      | 5,44                                           | 2,36                | $80,45 \pm 26,48$      |
|                      | DIV 2 | 1,88                                                       | 2,66     | 1,72      | 1,05      | 3,73                                           | 1,62                | $78,36 \pm 27,45$      |
|                      | DIV 3 | 2,79                                                       | 4,37     | 2,84      | 2,05      | 6,31                                           | 2,74                | $80,20 \pm 28,58$      |
| Culturas na<br>PLACA | DIV 1 | 1,69                                                       | 2,08     | 1,43      |           | 3,08                                           | 1,33                | $78,53 \pm 30,13$      |
|                      | DIV 2 | 2,27                                                       | 1,91     | 1,36      | 0,90      | 2,91                                           | 1,26                | $74,94 \pm 31,48$      |
|                      | DIV 3 | 2,73                                                       | 3,38     | 2,49      | 0,72      | 5,65                                           | 2,45                | $82,47 \pm 29,89$      |

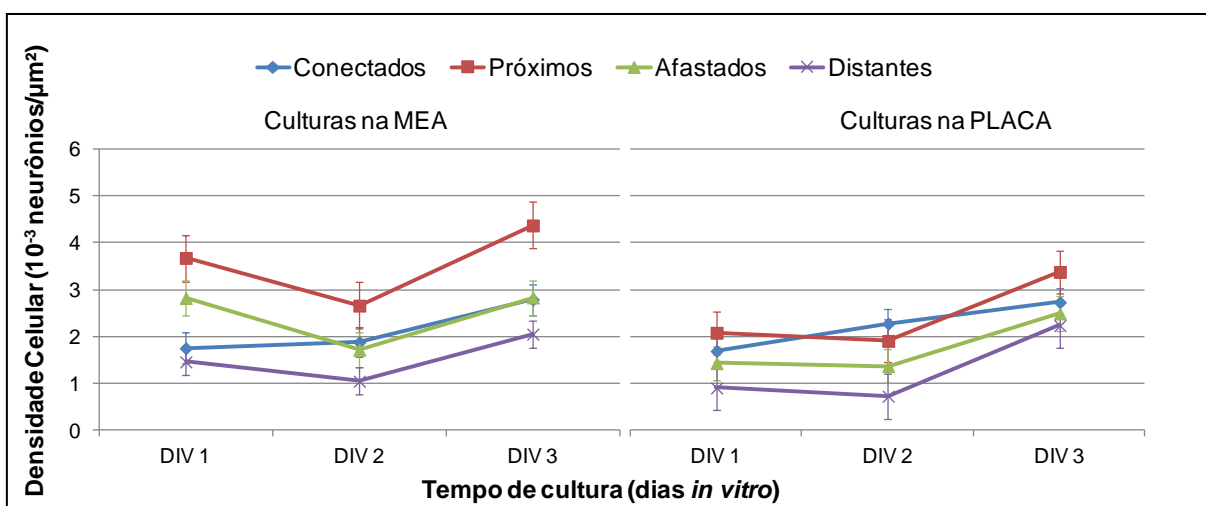
\* Os resultados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão.

Na Tabela 5.3, que apresenta a média da densidade celular para cada recipiente de cultura, pode-se ver que os valores médios de  $D$  nos DIVs 1 e 2 também são menores nas culturas da placa comum, mas no DIV 3 a menor distância média é vista para as culturas da MEA. Além disso, os valores do desvio-padrão de  $D$  são relativamente maiores nas culturas crescidas na placa comum, revelando maior variação da distribuição dos neurônios.

**Quanto à Evolução Topológica** – Neste trabalho a evolução topológica foi analisada indiretamente para as culturas diferentes ao longo dos dias. De maneira geral, as culturas crescidas sobre os dois recipientes tiveram uma evolução topológica semelhante, apesar da quantidade de neurônios observada ter sido menor para as culturas na placa comum (Figura

5.5). Além disso, notou-se também uma maior homogeneidade nos valores da densidade celular em cada classe de distância, ao longo dos três dias de cultura e para ambos os recipientes.

Considerando o tempo de cultura, em ambos recipientes existe uma redução no número de neurônios do DIV 1 para o DIV 2, sendo que o decréscimo mais significativo ocorreu nas culturas da MEA. Entretanto, ao final do DIV 3 houve um aumento neuronal, em relação à quantidade de neurônios observados no DIV 2, que geralmente foi maior também comparado ao DIV 1, e esse aumento foi similar em ambos recipientes.



**Figura 5.5** – Evolução na densidade celular do número médio  $\pm$  erro padrão de neurônios nas quatro classes de distâncias, em relação ao tempo de cultivo (dia *in vitro*) e para cada recipiente de cultura.

Em relação aos grupos de neurônios da categorização, a evolução topológica ocorreu muito semelhante entre as placas, como mostra a Figura 5.5. Houve uma perda significativa do DIV 1 para o DIV 2 no número de neurônios encontrados próximos, afastados e distantes dos microeletrodos, mas para aqueles encontrados conectado ao microeletrodo quase não houve diferença, ao contrário, parece haver um pequeno aumento do DIV 1 para o DIV 2. No DIV 3 foi visto um número maior de neurônios para todos os grupos de distâncias, mas o acréscimo mais significativo ocorreu nos neurônios encontrados próximos, afastados e distantes dos microeletrodos.

## 5.4 DISCUSSÃO

Todas as culturas apresentaram padrão semelhante da distribuição dos neurônios em relação aos microeletrodos para os dois tipos de recipientes. Esse resultado contraria os trabalhos anteriores, rejeitando a hipótese de que pode existir influência dos microeletrodos da MEA na adesão dos neurônios. Na verdade, esses resultados podem ser considerados muito mais confiáveis que os obtidos anteriormente, visto que foram realizadas várias repetições em cada experimento, o que anulou as variações comuns de uma cultura para outra.

Neste trabalho a evolução topológica não foi analisada diretamente, para as mesmas culturas ao longo dos dias; culturas diferentes foram utilizadas para cada dia de cultivo e, por isso, a evolução pode ser constatada indiretamente. Mas diferente do trabalho anterior, no qual a evolução topológica foi analisada diretamente, neste o DIV 3 apresentou uma quantidade neuronal semelhante à do DIV 1, o que foi confirmado também pela análise estatística. Visto que os neurônios não proliferam, esses resultados indicam que não parece haver morte celular se as placas forem mantidas na estufa durante os três dias *in vitro*, confirmando o fato de que os neurônios morreram no experimento anterior por causa das condições durante a aquisição das imagens.

No DIV 3 em que a porcentagem de neurônios aderidos foi semelhante em ambos recipientes e a menor distância média foi vista nas culturas da MEA. Ao aumentar a concentração de células do DRG plaqueadas, aumenta-se a probabilidade de encontrar várias células por região do microeletrodo, estando essas mais próximas do microeletrodo, um fator essencial para aprimorar a aquisição dos sinais eletrofisiológicos pela MEA (VAN PELT et al., 2004). Por isso, essa redução do valor médio de  $D$  nas MEAs, apesar de não constatada no teste estatístico, pode indicar que o DIV 3 seria o mais adequado para realizar o registro dos sinais.

Nos resultados, é interessante observar também que os valores médios das distâncias entre neurônio e microeletrodo (representado na Figura 5.3A e pela variável  $D$  na Tabela 5.3), assim como o desvio-padrão desses, praticamente não variaram de um recipiente para o outro, o que também foi comprovado pela análise estatística. Isso indica que ambas as culturas mantiveram o mesmo padrão de distribuição neuronal, com uniformidade entre os dados, o que valida os resultados obtidos.

## 5.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, buscou-se caracterizar e comparar a evolução topológica indireta dos neurônios do DGR, considerando estudos da interface neurônio-eletrodo de dispositivos MEA comparados a recipientes comuns de cultura ao longo do tempo. A análise da evolução topológica, ou da distribuição celular, aqui apresentada mostrou resultados muito semelhantes com os da análise da evolução direta, expostos no Capítulo 4. Além disso, esse método alternativo de usar culturas diferentes para cada dia de cultivo contorna o problema da perda celular ocorrida ao final do DIV 3 com o experimento anterior. Portanto, a evolução da distribuição celular pode ser constatada indiretamente e sem grandes prejuízos, comparada com análise da evolução topológica direta.

Comparando a distribuição dos neurônios categorizados em diferentes recipientes de cultura, não houve diferença entre a adesão celular nas MEAs e na placa comum de cultura e esse padrão se manteve ao longo dos três dias em cultura. Isso confirma que os trabalhos anteriores indicavam apenas as variações comuns de cada cultura e não um padrão real da distribuição, por causa da falta de uma amostragem maior. Porém, para descartar totalmente uma possível influência dos microeletrodos, seria necessário analisar estas mesmas imagens considerando

microeletrodos fictícios, que estivessem localizados a distâncias diferentes daqueles reais, em relação às mesmas células avaliadas, para provar que esse padrão homogêneo se mantém.

Além disso, os resultados observados nas matrizes multieletrodo podem ser até mais satisfatórios que o visto na placa comum, pois apresentaram maior quantidade total de neurônios aderidos e maior densidade celular (Tabela 5.3). Esses parâmetros são relevantes, porque levam ao aprimoramento da aquisição dos sinais eletrofisiológicos, devido à maior proximidade dos neurônios com os microeletrodos.

Os resultados sugerem que, com exceção do DIV 2, ambos DIV 1 e DIV 3 seriam os mais adequados para se realizar a aquisição dos sinais eletrofisiológicos pela MEA. Portanto, a caracterização da interface neurônio-microeletrodo, a partir da análise das imagens da rede neural, revela indícios de como melhorar a qualidade dos sinais registrados pela MEA somente analisando a distribuição neuronal e a evolução dessa distribuição ao longo do tempo.

# CAPÍTULO 6

## CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

---

### 6.1 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho buscou quantificar a interface neurônio-microeletrodo de culturas primárias do gânglio da raiz dorsal crescidas em dispositivos MEA para aperfeiçoar a aquisição da atividade neuronal de uma cultura. Criou-se assim um instrumento metodológico que, utilizando imagens de microscopia confocal, propõe caracterizar bidimensionalmente uma rede neural cultivada em recipientes com matrizes de microeletrodos incorporados, comparados a recipientes comuns de cultura, ao longo do tempo. Assim sendo, foi investigado o número de neurônios e a distância média de todos os neurônios individualmente amostrados nas imagens, considerando os três primeiros dias *in vitro* (DIVs).

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

eletrofisiológicos.

No trabalho que compara a evolução direta da distribuição celular, após três dias em cultura, foi observado um decréscimo neuronal de metade das células aderidas inicialmente. Apesar da maior parte dos neurônios se manterem próximos aos microeletrodos, fotografar as culturas consecutivamente por três dias, provocou alteração significativa na sobrevivência desses neurônios. Além disso, percebeu-se que a troca constante de meio — primeiro trocou o meio de cultura para uma solução tampão com o fluoróforo e depois trocou o tampão para meio de cultura — e as lavagens entre as trocas, mesmo sendo cuidadosamente executadas, promove agitação suficiente para que alguns neurônios se desprendam do fundo, sendo então descartados juntamente com o meio lavado. O ideal seria se as fotografias pudessem ser feitas na própria sala de cultura, como o uso de recipientes selados, e imediatamente fossem devolvidas à incubadora, evitando, ao máximo, trocas excessivas de meio.

Ao contornar os problemas de perda celular, nos experimentos que comparam a evolução indireta da distribuição celular em diferentes recipientes de cultura, constatou-se que a hipótese de uma possível influência dos microeletrodos na adesão dos neurônios, observada nos primeiros trabalhos, pode não ser verdadeira. Mas seria necessário confrontar esses resultados com novas quantificações utilizando microeletrodos fictícios para estas mesmas culturas. Somente assim poder-se-á afirmar que o padrão de adesão neuronal se mantém homogêneo, o que descartaria essa hipótese.

Por fim, os resultados observados nas MEAs podem ser melhores que os nas placas comuns de cultura. A partir disso, percebeu-se que a melhor condição de cultivo que proporcionará melhor contato dos neurônios sensoriais primários com os microeletrodos da MEA envolve: (a) maior quantidade de neurônios aderidos; (b) menor distância entre neurônio e microeletrodo; (c) menor perda neuronal, evitando o imageamento prolongado e lavagens excessivas de meio nas culturas; e os dias *in vitro* que apresentaram essas características foram o primeiro e o terceiro.

A análise quantitativa aqui realizada fornece uma descrição simples da cultura ligada à MEA. Assim, é possível caracterizar a interface neurônio-microeletrodo, de modo a permitir gravações eficientes da atividade elétrica que permitem novas investigações da excitabilidade nociceptora destas células. Por isso, em longo prazo, o registro da atividade elétrica dos neurônios sensoriais primários pelas MEAs representa, também, uma possível ferramenta para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas, por exemplo.

## **6.2 TRABALHOS FUTUROS**

As perspectivas deste trabalho, em curto prazo, envolvem testar novos procedimentos biológicos para aumentar o tempo de vida das culturas e a quantidade de neurônios em contato com os microeletrodos. Espera-se também realizar experimentos que testem diferentes substratos de adesão celular para comparar o desenvolvimento das culturas. Dentre os substratos que podem ser utilizados, encontram-se o matrigel, a poli-L-lisina, a laminina-111 e a fibronectina, L1Ig6. Além disso, vê-se necessário confirmar, ou não, se existe influência dos microeletrodos na adesão dos neurônios e se este fato pode ser válido para qualquer substrato utilizado.

Por outro lado, é importante também analisar apropriadamente a densidade de células gliais, uma vez que elas podem interferir na adesão neuronal sobre os microeletrodos. Por isso, faz-se necessário comparar esses resultados com experimentos que utilizam agentes antimitóticos, ou bloqueadores do crescimento de células da glia como o ARA-C.

Trabalhos futuros incluem também aprimorar o processamento das imagens, ao passo que outros parâmetros poderão ser utilizados para melhor caracterizar a interface entre a cultura de neurônios sensoriais do DRG e os microeletrodos das MEAs. E, evidentemente, deve ser realizado o registro da atividade eletrofisiológica de culturas primárias do gânglio da raiz dorsal, por meio de matrizes multieletrodo, para validar o método aqui discutido.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AKAY, M. **Handbook of neural engineering**. Hoboken, NJ: Wiley Press, 662 p., 2007.
- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 866 p., 2006.
- AOYAGI, Y.; STEIN, R. B.; BRANNER, A.; PEARSON, K. G.; NORMANN, R. A. Capabilities of a penetrating microelectrode array for recording single units in dorsal root ganglia of the cat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 128, p. 9-20, 2003.
- AULD, D.; ROBITAILLE, R. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. **Neuron**, v. 40, p. 389-400, 2003.
- CLAVEROL-TINTURÉ, E.; GHIRARDI, M.; FIUMARA, F.; ROSELL, X.; CABESTANY, J. Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. **Journal of Neural Engineering**, v.2, p.L1-L7, 2005.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R.E. **A célula - uma abordagem molecular**. Porto Alegre: Artmed, 736 p., 2007.
- CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v.104, p.765-767, 1991.
- CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p.660-664, 1992.
- DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain Supplement**, v.6, p.S27-S35, 1999.
- ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R. J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **Journal of Physiology**, v.495, pt 2, p.429-440, 1996.
- EVANS, A.R.; VASKO, M. R.; NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **Journal of Physiology**, v.516, pt 1, p.163-178, 1999.
- EYTAN, D., MINERBI, A., ZIV, N. & MAROM, S. Dopamine-induced dispersion of correlations between action potentials in networks of cortical neurons. **Journal of Neurophysiology**, v.92, p.1817-1824, 2004.
- FREEMAN, W. J. **Neurodynamics: An Exploration in Mesoscopic Brain Dynamics**. Londres: Springer, 408 p., 2000.
- FROMHERZ, P. Neuroelectronic interfacing: semiconductor chips with ion channels, nerve, cells, and brain. In: Waser, R. (Ed.), **Nanoelectronics and Information Technology**. Wiley-VCH, Berlin, p.781-810, 2003.
- GOLD, M. S.; LEVINE, J. D.; CORREA, A. M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons *in vitro*. **Journal of Neuroscience**, v.18, p.10345-10355, 1998.

- GREVE, F.; FRERKER, S.; BITTERMANN, A. G.; BURKHARDT, C.; HIERLEMANN, A.; HALL, H. Molecular design and characterization of the neuron-microelectrode array interface. **Biomaterials**, v.28, p.5246-5258, 2007.
- GRISCOM, L.; DEGENAAR, P.; LEPIOUFLE, B.; TAMIYA, E.; HIROYUKI, F. Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. **Sensors and Actuators B**, v.83, p.15–21, 2002.
- HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Research Reviews**, v. 48 p. 457-476, 2005.
- HARDING, S. E.; ALI, N. N.; MARTINS, M.B.; GORELIK, J. The human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte as a pharmacological model. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113, p.341–353, 2007.
- HAYAR, A.; GU, C.; AL-CHAER, E.D. An improved method for patch clamp recording and calcium imaging of neurons in the intact dorsal root ganglion in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v.173, n. 1, p.74–82, 2008.
- HESCHELER, J.; HALBACH, M; EGERT, U.; et. al. Determination of Electrical Properties of ES Cell-derived Cardiomyocytes Using MEAs. **Journal of Electrocardiology**, v.37, p.110–116, 2004.
- KHASAR, S. G.; GOLD, M. S.; LEVINE, J. D. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. **Neuroscience Letters**, v.256, p.17–20, 1998.
- KLISCH, C.; INYUSHKIN, A.; MORDEL, J.; KARNAS, D.; PÉVET, P.; MEISSEL H. Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus *in vitro*. **European Journal of Neuroscience**, v.30, p.65–75, 2009.
- LAKARD, S.; HERLEM, G.; VALLES-VILLAREAL; MICHEL, G.; PROPPER, A.; GHARBI, T.; FAHYS, B. Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v.20, p.1946–1954, 2005.
- LINHART, O., OBREJA, O., KRESS, M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience**, v.118, p.69-74, 2003.
- LITT, M.D’ALESSANDRO B. et al. Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy. **Proc. 1st Int. IEEE EMBS Conf. on Neural Engineering**, Capri Island, Italy, 2003, p.485-492.
- LU, S.G.; GOLD, M.S. Inflammation-induced increase in evoked calcium transients in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v.153, n. 1, p.279–288, 2008.
- MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Human Anatomy and Physiology**. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 1264 p., 2010.
- MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, M.; CASTELLANOS, J.E. Morphological and biochemical characterisation of sensory neurons infected *in vitro* with rabies virus. **Acta Neuropathologica**, v.114, p.263–269, 2007.
- MERCER, H. D.; WHITE, R. L. Photolithographic fabrication and physiological performance of microelectrode arrays for neural stimulation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v.25, n. 6, p.494–500, November 1978.

- MULTI CHANNEL SYSTEMS. **Microelectrode Array (MEA) - User Manual**. Germany, 2012, 54p. Disponível em: < [http://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/manuals/MEA\\_Manual.pdf](http://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/manuals/MEA_Manual.pdf)>. Acessado em: Julho/2012.
- NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v.135, p.145–153, 1987.
- NATARAJAN, A.; MOLNAR, P.; SIEVERDES, K.; et. al. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.375–381, 2006.
- NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana**. Porto Alegre: Artmed, 542 p, 2003.
- NOVELINO, A.; CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; BOVE, M.; TEDESCO, M. B.; MARTIONIA, S. Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays. **Neurocomputing**, v.52, p.661-669, Fevereiro 2003.
- PASSMORE, G. M.. Dorsal root ganglion neurones in culture: A model system for identifying novel analgesic targets. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.51, n. 3, p.201–208, 2005.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental – 14ª Edição**. Piracicaba: USP; 477p., 2000.
- POTTER, S. M; DE-MARSE, T.B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 110, p. 1–24, 2001.
- RASBAND, W.S. **ImageJ**, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <<http://imagej.nih.gov/ij/>>, 1997-2011.
- REPPPEL, M.; IGELMUND, P.; et. al. Effect of Cardioactive Drugs on Action Potential Generation and Propagation in Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.19, p.213–224, 2007.
- RIJAL, S. O. & GROSS, G. W. Dissociation constants for GABA receptor antagonists determined with neuronal networks on microelectrode arrays. **Journal of Neuroscience Methods**, v.173, p.183–192, 2008.
- ROBERT S. G.; CLIFFORD J. W. Farmacologia da Analgesia. In **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia** (Eds. GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., pp. 240 - 259, 2009.
- RUTTEN, W. L. C.; RUARDIJ, T. G. MARANI, E.; ROELOFSEN, B. H. Towards a Cultured Neural Probe: Patterning of Networks and their Electrical Activity, In **Handbook of Neural Engineering** (Ed. M. AKAY) John Wiley & Sons, Inc., USA, pp. 357 - 367, 2007.
- RUTTEN, W. L. C. Selective electrical interfaces with the nervous system. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.4, p.407–452, 2002.
- RUTTEN, W. L. C.; MOUVEROUX, J. M.; BUITENWEG, J.; HEIDA, C.; RUARDIJ, T.; MARANI, E.; LAKKE, E. Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a culture probe. **Proceeding of the IEEE**, v. 89, n. 7, p. 1013-1029, 2001.
- SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K+

- channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.3680–3685, 2004.
- SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain**, v.96, p.89–97, 2002.
- STEIN, R. B.; AOYAGI, Y.; WEBER, D. J.; SHOHAM, S.; NORMANN, A. Encoding mechanisms for sensory neurons studied with a multielectrode array in the cat dorsal root ganglion. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.82, n. 8-9, p.757–768, 2004.
- STETT, A.; EGERT, U.; GUENTHER, E.; HOFMANN, F.; MEYER, T.; NISCH, W.; HAEMMERLE, H. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.377, p.486–495, 2003.
- TAKETANI, M.; BAUDRY, M. **Advances in Network Electrophysiology - Using Multi Electrode Arrays**. New York: Springer Press, 478 p., 2006.
- VAN PELT, J.; WOLTERS, P. S.; CORNER, M. A.; RUTTEN, W. L.; RAMAKERS, G. J. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 51, n. 11, p. 2051-2062, 2004.
- WALLACE, T.L.; JOHNSON-JR, E.M. Cytosine Arabinoside Kills Postmitotic Neurons: Evidence That Deoxycytidine May Have a Role in Neuronal Survival That Is Independent of DNA Synthesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 115-124, Janeiro de 1989.
- WARD, J. M. Patch-Clamping and Other Molecular Approaches for the Study of Plasma Membrane Transporters Demystified. **Plant Physiology**, v.114, p. 1151–1159, 1997.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a Novel Drug Discovery Target for Clinical Pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 973-985, 2003.
- WEBER, D. J. ; STEIN, R. B.; EVERAERT, D.G.; PROCHAZKA, A. Limb-state feedback from ensembles of simultaneously recorded dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neural Engineering**, v. 4, p. S168-S180, 2007.
- WROBEL, G.; ZHANG, Y.; et. al. Influence of the first amplifier stage in MEA systems on extracellular signal shapes. **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, p.1092–1096, 2007.
- YEUNG, C.; SOMMERHAGE, F.; et. al. To establish a pharmacological experimental platform for the study of cardiac hypoxia using the microelectrode array. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.59, p.146 – 152, 2009.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4th Ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 663 p., 1999.
- ZHAO, X. Y.; LIU, M. G.; YUAN, D. L.; WANG, Y.; HE, Y.; WANG, D. D.; CHEN, X. F.; ZHANG, F. K.; LI, H.; HE, X. S.; CHEN, J. Nociception-induced spatial and temporal plasticity of synaptic connection and function in the hippocampal formation of rats: A multi-electrode array recording. **Molecular Pain**, v.5, n. 55, 2009.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.



# ANEXO 1

---

## **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFU**



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 064/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 023/10**

Projeto Pesquisa: "Estudo da sensibilização de neurônios sensitivos primários em cultura com base em experimentos eletrofisiológicos e análise de imagens".

Pesquisador Responsável: João Batista Destro Filho

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.**

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

.

Uberlândia, 27 de abril de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes  
Coordenador do CEUA/UFU

## ANEXO 2

---

**ARTIGO A SER SUBMETIDO QUE UTILIZA  
QUANTIFICAÇÕES NO CONTEXTO DE IMAGENS  
TRIDIMENSIONAIS**



# QUANTIFYING NEURON-ELECTRODE INTERFACE OF MICRO-ELECTRODE ARRAYS BASED ON THREE-DIMENSIONAL IMAGING

**João-Fernando Mari<sup>1,2</sup>, Amanda Ferreira-Neves<sup>3</sup>, José Hiroki-Saito<sup>2,4</sup>, Celina-Monteiro Da Cruz-Lotufo<sup>5</sup>, Michela Chiappalone<sup>6</sup>, João-Batista Destro-Filho<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Exact Sciences and Technology - Federal University of Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Rodovia MG-230, Km 7 - 38810-000 - Rio Paranaíba, MG, BRAZIL*

<sup>2</sup>*Department of Computer Science - Federal University of São Carlos - Rodovia Washington Luis, Km 235 - 13565-905 - São Carlos, SP, BRAZIL.*

<sup>3</sup>*School of Electrical Engineering - Federal University of Uberlândia - Campus Santa Mônica - Av João Naves de Avila, 2121 - 38400-902 - Uberlândia, MG, BRAZIL*

<sup>4</sup>*Faculty of Campo Limpo Paulista - Rua Guatemala, 167 - 13231-230 - Campo Limpo Paulista, SP, BRAZIL.*

<sup>5</sup>*Department of Physiological Sciences - Institute of Biomedical Sciences - Federal University of Uberlândia - Campus Umuarama - Av Pará 1720 - 38400-902 - Uberlândia, MG, BRAZIL.*

<sup>6</sup>*Department of Neuroscience and Brain Technologies, Italian Institute of Technology – IIT, Via Morego 30 - 16163 - GENOVA – ITALY.*

joaofmari@gmail.com; amanda.nvs@gmail.com; saito@dc.ufscar.br; celotufo@icbim.ufu.br;  
michela.chiappalone@iit.it; jbdestro@ufu.br

## ABSTRACT

Microelectrode arrays (MEAs) can stimulate and record extracellular electrical activities from neurons in culture over long periods and neuronal arrangements can greatly influence the electrical activity recorded by MEAs. This setup is a very interesting platform for neuroprosthesis studies. Using images obtained by confocal fluorescence microscopy, we propose methodological tools aimed at quantitatively studying neural network topology on microelectrodes, based on a three-dimensional perspective. Here, we propose a system that generates polygonal 3D representations, which is capable to perform full-automated quantitative analysis, in terms of cell morphology and distribution with respect to microelectrodes, that was applied to dorsal root ganglia (DRG) cultures. Information about microelectrodes shape and position are extracted directly from a transmission light channel of the microscope, and it is used to compute a map of the distances between the neurons and the microelectrodes. Results point out that our proposal is capable of efficiently reducing false-positive reconstructions in an interactive way, and that quantitative analysis provides a simple description of the culture attached to the MEA, in terms of cell density, cell spatial distribution, neuronal vicinity to microelectrodes, glial cell density. Thus, it is possible to characterize the neuron-electrode interface, so that to compare different biological protocols in order to enable efficient electrical activity recordings.

**KEYWORDS:** Microelectrode array, confocal fluorescence microscopy, dorsal-root-ganglia culture, neuron-electrode interface, three-dimensional visualization, automated quantitative analysis, polygonal mesh.

## 1. INTRODUCTION

Studies in neuroscience have gradually approached the biomedical research community to engineering and computing areas, leading to the emergence of a variety of tools that make possible to understand and characterize the biological system under study. In addition, nanotechnology can also provide devices capable of translating a nerve impulse into information for electronic circuits, as is the case of the Multi-Micro-Electrode Array (MEA) [1,2]. Since its development on 70's [3], MEA technologies have been widely used for studying information processing in biological neural networks under normal developmental conditions [4-6], as well as under induced pathological conditions, which were applied to pharmacological studies [7-9]. In addition, the MEA technology has been applied to neuroscience research, such as studies of the neurodynamics for understanding information processing in the brain (learning and memory) [10-12]; diseases such as epilepsy [13]; pharmacological research [7,14].

MEAs allow studying the distributed patterns of electrical activities in intact two-dimensional slices of cortex, as well as in dissociated cultures of brain tissues, composed by neurons and glia [10,11]. The study of *in vitro* nervous system offers a number of advantages over the *in vivo* approaches. Cultures of dissociated neurons are able to develop organotypic synaptic connections, i.e., the synapses continue to develop as if the cells were still in the body, and present a rich variety of distributed electrical activities patterns. *In vitro* systems are much more accessible to imaging by light microscopy, and pharmacological manipulation, than *in-vivo* systems [15].

Standard planar MEA devices represent a transparent substrate coated by 10-100 microelectrodes of 10 to 30  $\mu\text{m}$  diameter. In fact, the MEAs may be considered as Petri dishes with electrodes embedded in the substrate. The electrodes are connected to a recording and stimulating system that allows non-invasively monitoring of the electrophysiological activities on an entire neuronal culture for long periods, ranging from three months up to one year [11,16]. The main feature of MEA is the two-way information exchange from the biological to the electronic background, providing a bioelectronic interface where neural cells can be plated to grown on micrometer-sized circuits [10,17,18]. There are several MEA designs, each of them allows a wide variety of applications, e.g., the neural implant, a prosthetic device that controls and can replace functions of a damaged tissue in the nervous system [19-21].

These micrometric arrays also allow easily monitoring the electrophysiological development of neural networks and even the cell culture topology by means of inverted microscopy, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. Morphological monitoring still permits to investigate the relation between the cell and the electrode, which is critical to recording a good-quality signal [4]. In consequence, periodic images taken of the cultures enable us to describe the neuron-microelectrode interface and also represent essential investigations to achieving the neural implant [22-24].

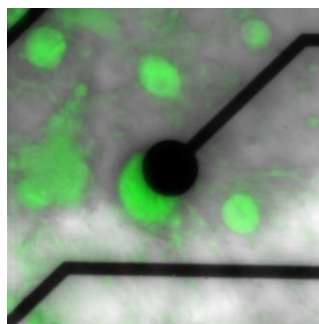
Particularly, the imaging of neuronal networks on MEAs by optical microscopy enables the development of processing and visualization techniques leading to: (a) network development monitoring on MEA, considering the number of cells and cell surface area [16]; (b) information regarding the spatial distribution of neurons, which is of paramount relevance for the development of biological neural-network theoretical models and simulations [25,26]; (c) automatic tracking of the functional activities of imaged cells by means of changes in fluorescence intensity [27].

On the other hand, three-dimensional microscopy techniques have great advantage over two-dimensional ones, since the cells and tissues are three-dimensional entities, and the neuronal networks are spatially distributed [28]. They are able to obtain a series of optical sections (2D images) at different focal planes along of z axis, comprising a z-series. The optical sections in a z-series can be combined to reconstruct a 3D image of the specimen. Compared to conventional 3D microscopy (widefield), the confocal microscope presents better lateral resolution and depth discrimination, since it is capable of reducing the number of out-of-focus light reaching the detector by means of a pinhole [28,29]. Additionally, the use of fluorescent markers allows imaging specific cellular structures.

However, to the authors' knowledge, very few works in the literature perform quantitative analysis derived from three-dimensional imaging applied to MEA cultures. We should cite [27], who focused his work on confocal microscopy for performing automated tracking of individual cell activity, and for assessing calcium flux, both in terms of three-dimensional imaging, but he has not either addressed the quantification of the culture morphology, or provided 3D visualization. In [30], both transmission and scanning electronic microscopy were employed to assess some quantitative characteristics of the neuron-electrode interface between chicken DRG neurons, such as the average neurite length, as well as the thickness of the absorbed protein layers composing the interface between the neuronal membranes and microelectrode surface.

Considering now the more general context of neuronal cultures plated on common dishes, some studies already report three-dimensional microscopy tools applied for studying morphological modifications of these cells. In [31], authors focus on the morphology of the dendritic structure (e.g., branching patterns and spine geometry), for which it is possible to estimate physiological decrease that underlies some brain disorders. In this work, authors developed three-dimensional techniques capable to analyze variations on local and on global network structures; as well as to reconstruct entire neurons from stacks of images obtained by laser-scanning microscopy, which is applied to cultured mice-hippocampus CA3 pyramidal neurons. In [32], authors describe a methodology to outline and classify key structures from three-dimensional multi-parameter images of rat brain tissue, obtained by confocal microscopy. This tool perform quantitative analysis and surface rendering, considering intrinsic measurements (spatial positions, sizes, cellular morphologies, lengths and branching patterns, vessels width, membrane surface areas), but it focuses on brain slices, not on dissociated cultures. The parameters are applied to classify astrocytes, microglia, neurons, and endothelial cells, as well as the relationship among them.

Moreover, current research on neuronal activity based on MEA mainly employs cultures of cortical neurons [8,16, 33]. In fact, there are few studies in the literature considering the application of MEA to DRG sensory neurons, e.g., analysis of *in vivo* recordings [34-36], and just recently works started to investigate MEA applications for DRG neurons culture, based on an *in vitro* context [30,37]. Notice that rat-DRG neurons, as well as MEA microelectrodes, have diameters ranging from 10 to 40  $\mu\text{m}$  [38]. As identified by [4], a substantial part of neuron soma must be in contact with the microelectrode surface to record a good signal. In consequence, DRG neurons are more likely to cover the MEA microelectrodes [39] and, thus, the DRG culture on MEA devices represents an ideal system for monitoring neuron-microelectrode interface (Figure 1).



**Figure 1:** Photograph of a DRG neuron (green) and microelectrode (black) interfacing in culture, taken by confocal fluorescent microscopy.

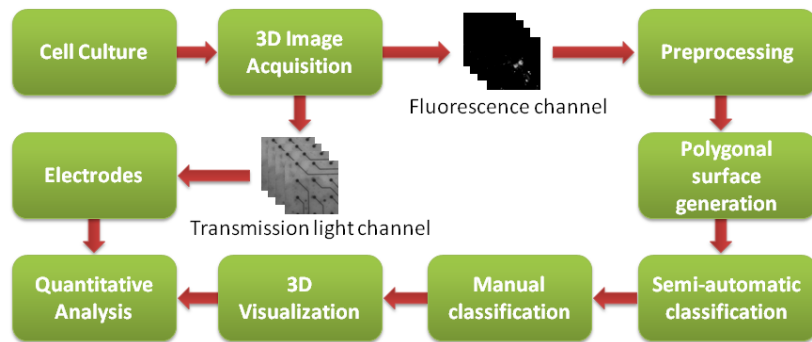
In order to summarize the current state-of-the-art on the subject of this paper, one could state the following. Three-dimensional microscopy tools to perform morphological quantitative analysis on live and slice of mice-pyramidal neurons [31] and on rat-brain slices [32], both in context of common culture dishes, is a very promising research topic. These investigations can be applied to multi-neuron networks, but they are more suitable to individual neurons, than dissociated cultures with hundreds of neurons. There are very few works using these 3D tools to investigate neuron-microelectrode interface on MEA, even in dissociated cultures of cortical neurons [27,40], however

they have also not addressed any morphological measurements. In contrast, this kind of interface quantification can be seen in the two-dimensional images, taken by electronic microscopy, for cultured chicken-DRG neurons [30].

In order to tackle with such difficulties and drawbacks, in this paper we propose a system for assessing quantitative characteristics of the neuron-electrode interface of DRG cells, using two- and three-dimensional images taken by confocal fluorescence microscopy. In each image, we analyzed parameters related to morphology and spatial distribution of cells, intended to describe and reconstruct the biological neural networks established on MEAs from a tridimensional viewpoint. Our long-term interest is to apply MEA devices for studying the nociceptor excitability in DRG cultures, in the context of applied pharmacology, which is clinically relevant for investigating new analgesic drugs. From the literature point of view, several works have studied morphological changes in DRG neurons regarding the speed of nerve impulse conduction [41], but little is known about the electrophysiological characteristics of the excitability of these neurons [42]. In addition, beyond the neuron characteristics that provide an ideal system for neuron-interface assays, DRG sensory neurons are an essential element in pain sensation. Moreover, the study of these neurons are clinically relevant as inflammation and other conditions are able to sensitize nociceptive primary neurons, in a process referred as “hyperalgesia” or “hypernociception”, in which the excitation threshold of the neuron is diminished, resulting in enhanced pain sensation [43].

## 2. METHODS

The workflow in Figure 2 summarizes organotypic the proposed system. These steps are described in the following sections. The workflow starts with the biological preparation of the dissociated neurons plated on MEA, followed by the 3D image acquisition using an optical confocal fluorescence microscopy. The preprocessing stage is performed using the ImageJ software [44]. The polygonal surface generation is performed by the ImageJ plugin called “3D Viewer” [45]. Semi-automatic and manual classification, 3D visualization, and automated quantitative analysis were developed by the authors, using Java programming language and the VTK library [46] for visualization. The histograms and distances matrices were generated with MATLAB (www.mathworks.com).



**Figure 2:** Workflow summarizing methods for 3D visualization

### 2.1 – Biological procedures and 2D-manual assessment

#### 2.1.1 Culture preparation

Dissociated cell cultures were prepared from Wistar young rats (100 g), of either sex, anesthetized with CO<sub>2</sub> and sacrificed by decapitation in accordance with the International Association for the Study of Pain (IASP) and approved by the local Ethic Committee of Animal Experiments (CEUA/UFU). Lumbar and thoracic DRGs were harvested and transferred to Hank’s buffered saline solution containing HEPES (10 mM). Ganglia were incubated in Hank’s solution

containing collagenase 0.28 U/ml (*type 2, Sigma*) for 75 minutes at 37°C and next in trypsin solution 0.25% (*Sigma*) for 12 minutes. After three washes in DMEM supplemented with 10% inactivated fetal calf serum, penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 mg/ml), ganglia were dissociated using a fire-polished glass Pasteur pipette. Dissociated cells were then plated on 60-channel MEAs (*Multichannel Systems*), precoated with matrigel, and kept in a humid 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, with the same medium described above.

### 2.1.2 Confocal imaging

Cells were imaged under a laser scanning confocal microscope (*Zeiss LSM 510 META*), after 24-48 hours in culture. Previously, cultures were incubated with DiBAC4(3), 5µM, *Molecular Probes*, a voltage-sensitive fluorescent dye. Afterwards, stack images were taken with an Ar/ArKr laser, emitting at 488 nm, associated to a barrier filter of 510-574 nm and using 10x and 20x magnification, thus leading to a fluorescent image for adequate living cell visualization. Images were taken in two channels, a fluorescence channel and a light-transmission one. An “EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27” air immersion objective lens was used for both channels. The transmission-light channel was used to assess the shape and position of the MEA microelectrodes.

### 2.1.3 – 2D Neuron Manual Assessment

In order to study the neuronal development around microelectrodes, two different DRG neuron cultures, based on the same protocol, were used for imaging: high-cell-density and low-cell-density cases. Quantification was manually performed using the “cell counter” and “multi-measure” functions of the public domain IMAGEJ software (*version 1.37c, National Institute of Health, USA*). No previous processing was made on images.

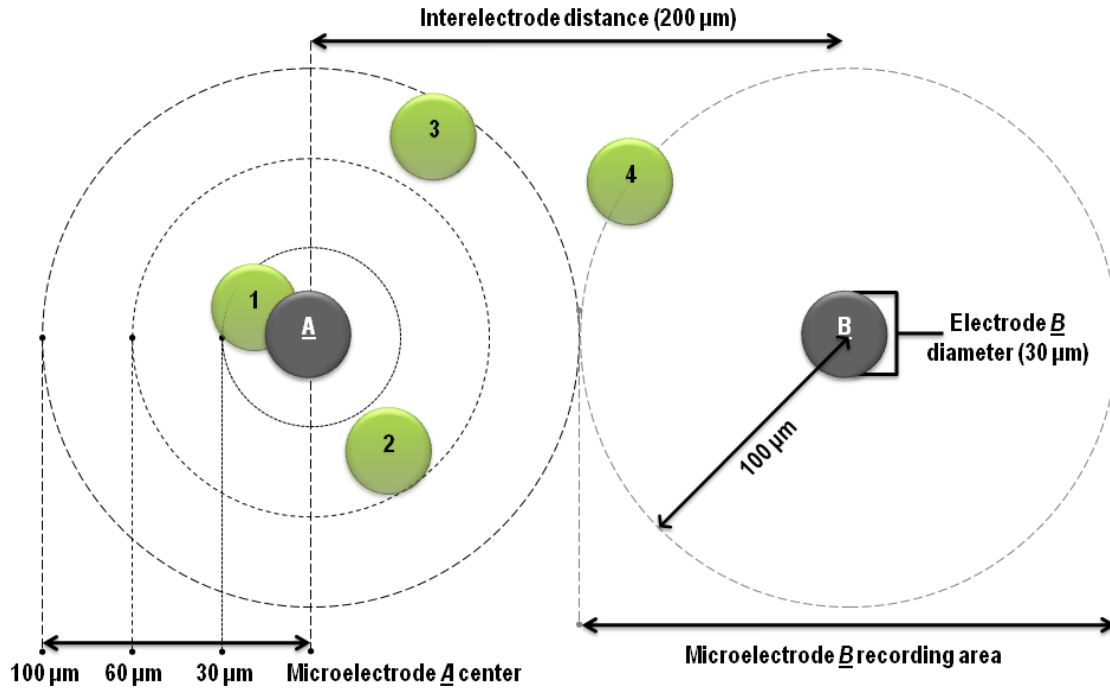
The task of visually separating neurons from glial cells and from culture artifacts (rest of cells that remains on culture after dissociation procedures) is subjective and requires an expert outlook. In order to identify DRG neurons, it was set some specific parameters: these neurons are large and spherical (10-40 µm in diameter), almost as the same size of the microelectrode diameter (Figure 1). Particularly, they present fluorescence at different levels of intensity. On the other hand, fluorescence was not considered as a marker, since glial cells and artifacts can also present it.

For each culture, the number of microelectrodes and neurons on images were counted, but considering only cells located at most 100 µm radius far from electrode center. In consequence, since the electrode-to-electrode distance is 200 µm, the counted neurons lie within the recording area, leading to the estimation of the rate of cells per microelectrode. As the microelectrode diameter (30 µm) is more or less the same dimension as the large DRG cells diameter (30-40 µm), neurons were classified according to their distance to microelectrode ( $D$ ) as potentially connected ( $D < 30$  µm), such as neuron 1 in Figure 3; neighboring ( $30 < D < 60$  µm), such as neuron 2 in Figure 3; and distant ( $D > 60$  µm), as shown in neuron 3 of Figure 3.

From the results, we calculated the mean distances ( $D'$ ) between microelectrodes and the neurons standing within its recording area, i.e., neurons located at most 100 µm radiuses far from microelectrode center. Also, it was necessary to measure the cell size in order to quantify the area taken by neurons on the array. Thus, simple geometric measurements were calculated as the mean surface area ( $A'$ ) and the mean membrane perimeter ( $P'$ ) of all neurons individually, as well as the mean Feret's diameter ( $F'$ ), a statistical tool for measuring particle size, which represents the longest distance between any two points on opposite sides along the boundary [47].

### 2.1.4 - Immunofluorescence

Intended for imaging with a laser scanning confocal microscope, DRG neurons were primary fixed and then we performed indirect immunocytochemistry of the cells to discriminate sensory neurons from glial satellite cells. After 48 h in vitro, cultures were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then fixed with paraformaldehyde 4% (PFA), rinsed in PBS, for 20 min at room temperature (RT). After three washes with PBS 10 mM, cultures were incubated with 0,1% Triton X-100 in PBS for 5 minutes to permeabilize the cell membrane and then incubated in blocking



**Figure 3:** Diagram outlining the proposed quantification of four examples neurons (in green).

solution, consisting of 3% bovine serum albumin (BSA) rinsed in PBS, for 30 min at RT. In the primary incubation, we use rabbit anti-MAP2 (1:1000) antiserum to mark neurons and goat anti-GFAP to mark glial satellite cells, both antisera diluted in a solution containing BSA and Triton X-100 in 10 mM PBS, pH 7.4. After three washes with PBS 10 mM, the sections were incubated for an hour with Cy3 or Cy2-conjugated secondary antisera (1:350) in a dark chamber at room temperature. The cultures were then washed three times with PBS 10mM and then incubated in a mixture (3:1) of glycerol and PBS. The cultures had been kept in refrigerator and were observed using a laser scanning confocal microscope (*Zeiss LSM 510 META*). The excitation wavelength for CY-2 fluorescence was 488 nm and for CY-3 fluorescence was 568 nm.

### 2.1.5 - Glial Satellite Cells Manual Assessment

Quantification was performed in three representative images of the same culture of DRG neurons and satellite cells using IMAGEJ software. Previously, images had contrast enhanced and, then, the integrated density of pixels was measured in 20 representative square areas in the region of satellite-cell ramifications. This quantification method measures the intensity of fluorescence per  $\mu\text{m}^2$  in a given image, and has been used in previous studies [48].

## 2.2 – Automated 3D Quantification System

### 2.2.1 - Image preprocessing

The preprocessing applied to volumetric images aims to reduce noise, to improve images contrast, and to avoid the mistakes of sub-segmentation, that may take place during the polygonal surfaces extraction. In this context, sub-segmentation occurs when two or more closely-located cells are reconstructed by a single polygonal surface. In order to reduce noise, a Gaussian blur filter was applied over each individual optical section. Histogram normalization was applied for contrast improvement, so that each optical section was normalized considering the intensity information present in all the optical sections. Cells located very close to each other were manually separated, in order to avoid sub-segmentation errors.

### 2.2.2 - Polygonal Surface Generation

In order to obtain a polygonal representation of the cells surfaces from the volumetric images, it was used an implementation of the well-known “marching-cubes algorithm” [49], that comes on the “3D Viewer software”, an ImageJ plug-in. The “3D Viewer” is also available as an API for new applications development. The marching cubes algorithm works by selecting a threshold value, so that the voxels with lower intensity than the defined threshold value (outside) are separated from the voxels with greater intensity (inside) by a polygonal surface [46]. Larger threshold values will result in smaller surfaces, whereas smaller values will result in larger surfaces. Thus, the measures concerning to surface area of the cells are directly affected by the choice of this value. Other measures relating the distance between cells and electrodes are less affected because they are computed using the center of mass of the polygonal surface (see section 3.2.1). In this work, the threshold values are manually selected by the user by visual inspection.

The polygonal surfaces generated from the volumetric image are stored in an OBJ-format file, as a unique list of triangles. The list is segmented into a set of sub-lists, so that each sub-list is composed only of triangles that form the surface of a single object. A new list is generated, wherein each element is a polygonal representation of a distinct object in the volumetric image.

Due to the presence of residues in the culture, and to the noise inherent to the image acquisition process, even after the preprocessing stage, a large number of the generated polygonal surfaces do not correspond to neurons. These objects are called “false positives”. In order to identify and remove these false-positives, a classification method composed by an semi-automatic and a manual step are proposed. Although subjective, determining neurons and false positives considers some parameters: DRG neurons are large (15-50  $\mu\text{m}$  in diameter) and spherical, and they exhibit fluorescence at different levels of intensity.

### 2.2.3 - Semi-automatic Classification

The semi-automatic classification step aims to identify and remove most of the false positives, based on the knowledge that they are, in most cases, larger or smaller than neurons. The list containing the polygonal surfaces is sorted in ascending order in terms of its surface area, and most of false positives are eliminated by interactively establishing a lower threshold value and a higher one. The objects whose surface areas are not within such interval are considered false positives and are eliminated from the list.

### 2.2.4 - Software Assisted Manual Classification

The semi-automatic classification is able to remove most of the false positives, but many of the objects located among the defined thresholds do not correspond to neuronal cells. These objects cannot be considered during quantitative analysis. We developed a tool to identify and eliminate the false positives in an interactive way, by means of the mouse and a graphical user interface (GUI).

### 2.2.5 - Automated Quantitative Analysis

After cell segmentation following the approach described in previous sections, it is possible to perform an automated quantitative analysis of *in vitro* cell cultures. We developed a system that automatically calculates a series of quantitative measures by means of the polygonal surfaces processing produced in the previous step, and of the information about the position of the microelectrodes of the MEA. These quantitative measures are important for monitoring the development of the neurons plated on MEA; and to study the relationship among electrophysiological activities recorded by the electrodes, cells morphology, and the spatial distribution observed by means of the microscope. The quantitative measures calculated by the system are: (a) number of cells presents in the image; (b) surface area of each cell (in  $\mu\text{m}^2$ ); (c) center of mass (CoM) of the cells; (d) the distances between the cells, in the 3D-space; and 2D-plane; (e) the distances between the microelectrodes and the cells.

The number of cells present in each image is naturally granted from the manual classification step, wherein the number of remaining polygonal surfaces is the number of identified

cells. The surface area of each cell is calculated by the summation of the areas of each triangle that composes the cell surface, according to (1).

$$Cell\ Area = \sum_{i=1}^{i=N} Triangle\ Area_i \quad (1)$$

where N is the number of triangles of the surface. This measure is very influenced by the selection of the threshold value.

The center of mass (CoM) of the cell is obtained as below.

$$CoM_{cell}(x, y, z) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} v_i(x, y, z) \quad (2)$$

where  $v_i$  is the center of the triangle  $i$ . The CoM is used to calculate the distances between the cells, and the distances between the microelectrodes and the cells.

The Euclidean distances between all pair of cells, in the tridimensional space, are calculated and stored in a distance matrix, considering its center of mass.

$$Distance(i, j) = \|CoM_i(x, y, z) - CoM_j(x, y, z)\|, \quad i, j = 1, \dots, N \quad (3)$$

where N is the number of cells.

The same procedure is performed in the x-y plane, disregarding the information of z-axis positioning as if all cells were positioned in the same plane, according to (4).

$$Distance(i, j) = \|CoM_i(x, y) - CoM_j(x, y)\|, \quad i, j = 1, \dots, N \quad (4)$$

The distances between each microelectrode and all the cells are calculated and stored in distance matrices, considering only the positioning information in the x-y plane, according to (5).

$$Distance(cell(i), elec(j)) = \|CoM_{cell(i)}(x, y) - CoM_{elec(j)}(x, y)\|, \quad i = 1, \dots, N; j = 1, \dots, M \quad (5)$$

where N is the number of cells and M is the number of electrodes.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 – Bidimensional Manual Quantification

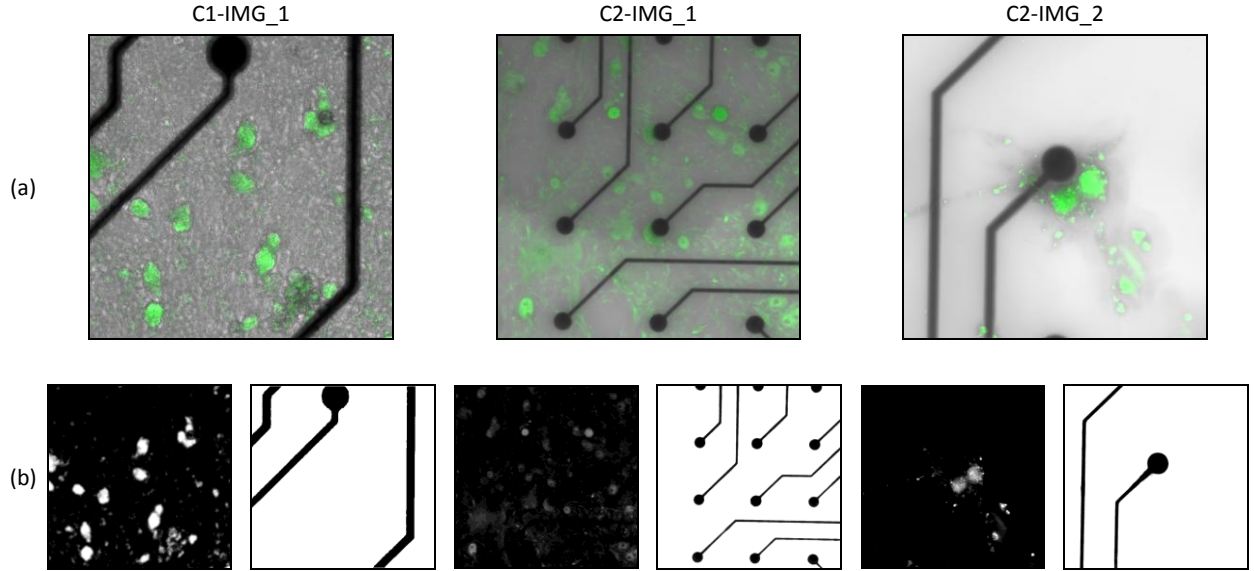
##### 3.1.1 – DRG neurons

Neuron counting and neuron-microelectrode distances assessments were performed using the images depicted at Figure 4, which were compared to each other, and the quantification results can be seen at Table 1. It is relevant to analyse neuronal distances since their vicinity to microelectrodes controls the quality of signal recording by the array and a substantial part of the neuron soma need to be in contact with the microelectrode surface in order to generate a good signal [4].

Each image presented different patterns of neuron adhesion and, considering only cells located at most 100  $\mu m$  radius far from microelectrode center, most part of neurons were classified as distant ( $D > 60 \mu m$ ) from microelectrode and few neurons were found either neighboring ( $30 < D < 60 \mu m$ ) or connected ( $D < 30 \mu m$ ) with them (Figure 5). According to [39], this result was expected since we did not used any technique to guide neuronal growth, thus this arrangement of several neurons found away from microelectrodes surface can make difficult the neural activity recording.

As we cannot control the cell adhesion exactly on the top of the microelectrode surface, the main goal is to establish an optimal cell density to be plated, promoting higher adherence of neighbouring neurons to microelectrodes, thus leading to higher amplitude of the recorded signal. In this context, C2-IMG\_2, taken from a low-cell-density culture, represents the ideal condition of minimum distance between neurons and microelectrode ( $D' = 39.6 \pm 1.2 \mu m$ ).





**Figure 4:** Confocal fluorescence microscope images: (a) Transmission light and fluorescence channel are superimposed. Spherical microelectrodes (30  $\mu\text{m}$  diameter) and tracks are represented in black, whereas neurons are depicted in green. (b) The fluorescence channel visualized by Maximum Intensity Projection - MIP (left image). The shape and positioning of microelectrodes are obtained by directly processing of the transmission light channel (right image). C1-IMG\_1 and C2-IMG\_1 correspond to a high-cell-density culture; C2-IMG\_2 corresponds to a low-cell-density culture.

**Table 1** – Measurements regarding neuron-microelectrode distances.

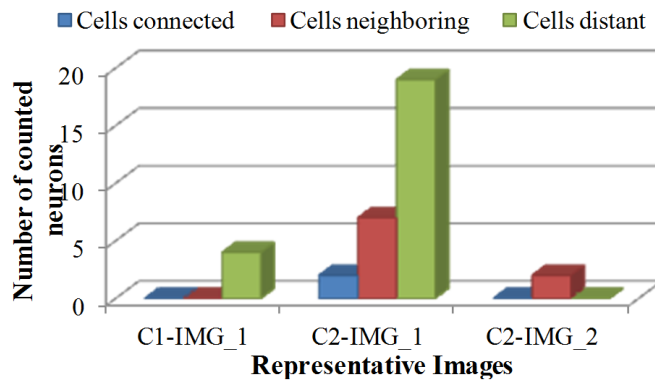
|          | Number of electrodes | Cells/electrode | Cells connected | Cells neighboring | Cells distant | $D'$ ( $\mu\text{m}$ )* |
|----------|----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------|-------------------------|
| C1-IMG_1 | 1                    | 4.0             | 0               | 0                 | 4             | $92.5 \pm 12.9$         |
| C2-IMG_1 | 9                    | 3.1             | 2               | 7                 | 19            | $73.4 \pm 28.2$         |
| C2-IMG_2 | 1                    | 2.0             | 0               | 2                 | 0             | $39.6 \pm 1.2$          |

Based on these considerations, approaching the neurons to microelectrodes or increasing the amount of cells within the recording area are alternative techniques to improve performance. However, the most important point in both situations involves raising the ratio between the recording area and the area taken by neurons. In consequence, we also calculated the mean surface area ( $A'$ ), the mean perimeter ( $P'$ ) and the mean Feret's diameter ( $F'$ ) of all neurons separately (Table 2). Our results demonstrate that C2-IMG\_1, which represents a high-cell-density culture, presents the largest neurons ( $A' = 687.7 \pm 279.7 \mu\text{m}^2$ ;  $P' = 102.2 \pm 24.6 \mu\text{m}$ ;  $F' = 34.1 \pm 7.6 \mu\text{m}$ ). Therefore, this new assessment points out once more that a high concentration of cells is the best condition to improve the quality of MEA signal.

### 3.1.2 - Glial Satellite Cells Quantification

Glial cells do not produce action potentials as neurons and can also widely grow on the dish, promoting an electrical insulation and influencing the neuron-microelectrode linkage [4], hindering the neuronal activity recordings by the array. However, glial cells are necessary for promoting neuronal development and ramification [50] and the absence of these cells, under a neuron culture condition, generates neuronal loss [51]. So, it is relevant to grow neurons along with glial cells, but we need to focus on an ideal culture condition to decrease or slow the glial expansion.

Under these considerations, three representative images (Figure 6A) of one DRG culture were used to quantify glial satellite cell growth and coverage on MEA dishes. The integrated density of pixels was estimated, and this density is similar in all images: area (I) presented  $93.97 \text{ pixels}/\mu\text{m}^2$  of glia coverage, area (II) showed  $98.66 \text{ pixels}/\mu\text{m}^2$  and area (III) presented  $98.09 \text{ pixels}/\mu\text{m}^2$ ,



**Figure 5:** Amount of neurons estimated at different distances to the microelectrodes.

**Table 2** – Measurements of neuron size.

|                 | $A' (\mu\text{m}^2)^*$ | $P' (\mu\text{m})^*$ | $F' (\mu\text{m})^*$ |
|-----------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>C1-IMG_1</b> | $164.6 \pm 87.6$       | $47.9 \pm 13.6$      | $17.2 \pm 5.0$       |
| <b>C2-IMG_1</b> | $687.7 \pm 279.7$      | $102.2 \pm 24.6$     | $34.1 \pm 7.6$       |
| <b>C2-IMG_2</b> | $549.7 \pm 12.4$       | $92.8 \pm 2.3$       | $29.5 \pm 1.3$       |

\* Data are reported as mean  $\pm$  standard deviation.

representing respectively rates of 36.6%, 38.4% and 38.2% of glia coverage in each picture (Figure 6B).

Since these measurements were performed bidimensionally, care should be taken for discussing rates in Figure 6. In the literature, satellite glial cells from DRG are described involving neurons like a sheath, and they are apart from each other by a thin layer ( $\sim 20$  nm) of membrane [52,53]. This is an evidence that glial cells, under culture conditions, are able to grow below neurons, in a tridimensional view, and can even take the whole area of the dish surface. For this reason, the best condition for this DRG-neuron culture is to keep as low as possible the number of satellite glial cells.

### 3.2 - 3D Assessments

In order to evaluate the system performance, three volumetric images obtained from two different cultures were considered (Figure 4(b)). A cell-high-density region was observed in Culture 1 (C1-IMG\_1). Two different regions were monitored from Culture 2, a cell-high-density one (C2-IMG\_1), and a cell-low-density one (C2-IMG\_2). They were obtained from *in vitro* cultures in two channels, as described in section 2.2. Figure 4 shows the shape and positioning of the microelectrodes, extracted directly from the volumetric image of the transmission light channel. Table 3 depicts the main parameters used for imaging the cultures by means of confocal microscopy.

#### 3.2.1 Polygonal Surface Generation

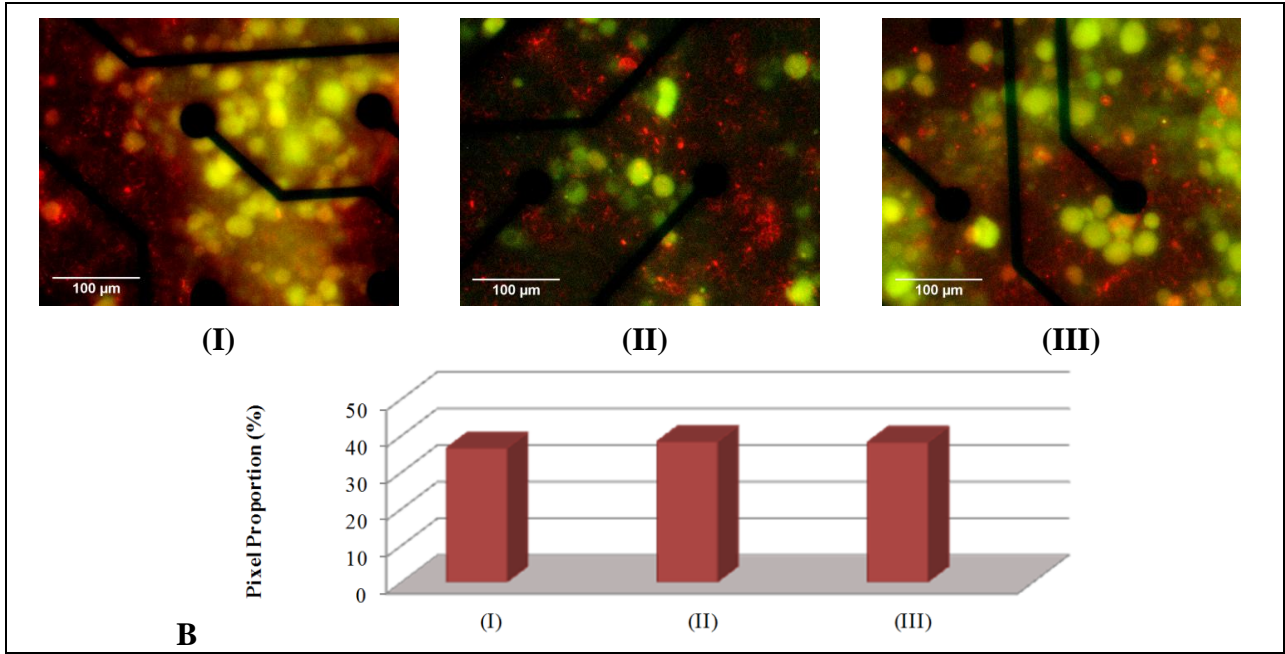
The marching cubes algorithm was applied, setting the threshold value 50 for images C1-IMG\_1 and C2-IMG\_2, 80 for image C2-IMG-1. Figure 7 shows the result of step generation polygonal surfaces. It is possible to assess a large number of false positives, i.e., reconstructed surfaces that do not correspond to neural cells.

#### 3.2.2 - Semi-automatic Classification

The charts in Figure 8(a) illustrate the surfaces reconstructed in the previous step. Each bar of the graph represents the area of one polygonal surface (in  $\mu\text{m}^2$ ), in ascending order. The chart also shows the lower and upper threshold, both defined interactively by a biologist, which are necessary for eliminating false positives. Table 4 shows the number of false positives eliminated in this step. Figure 8(b) shows the visualization of the images after the semi-automated classification.

#### 3.2.3 - Software Assisted Manual Classification

Figure 9 shows the final classified neurons in the three considered images, wherein the microelectrodes are also depicted below the neuron images, after the application of all steps of our system. At the end of this step, it's expected that most of the false positives have been removed. In this Figure, the image C1-IMG\_1, obtained from Culture 1, presents only one microelectrode, and



**Figure 6:** A- Confocal fluorescence microscope images: microelectrodes and tracks are represented in black, spherical neurons (maximum 40  $\mu\text{m}$  diameter) are in green; glial cell ramification are in red; and the superposition of neurons and glia are in yellow. B- Proportion of glia coverage on the images samples.

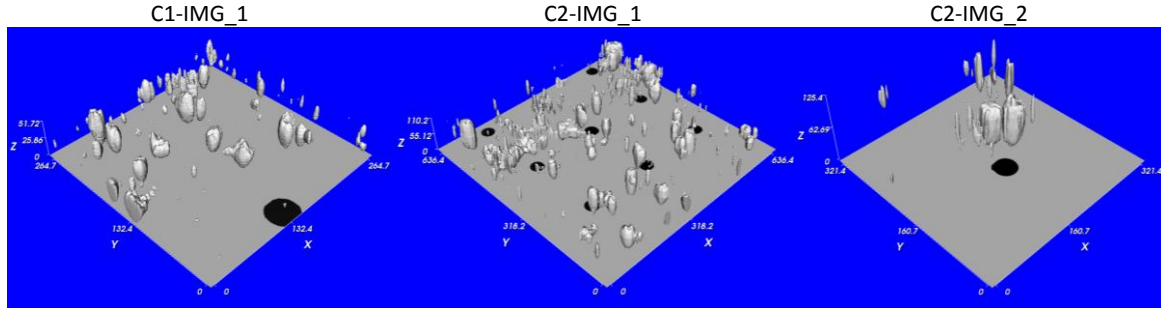
**Table 3.** The main imaging parameters of the volumetric images

| Parameters                     | Culture 1                          | Culture 2                         |                                     |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
|                                | <i>Low Density</i>                 | <i>Low Density</i>                | <i>High Density</i>                 |
| <b>Name:</b>                   | C1-IMG_1                           | C2-IMG_1                          | C2-IMG_2                            |
| <b>Frame size (x-y):</b>       | 512 x 512                          | 1024 x 1024                       | 1024 x 1024                         |
| <b>Size of z-series:</b>       | 56                                 | 12                                | 13                                  |
| <b>Voxel size (X x Y x Z):</b> | 0.52 x 0.52 x 1 $\mu\text{m}$      | 0.62 x 0.62 x 10 $\mu\text{m}$    | 0.31 x 0.31 x 10 $\mu\text{m}$      |
| <b>Image size (X x Y x Z):</b> | 264.71 x 264.71 x 55 $\mu\text{m}$ | 636.4 x 636.4 x 110 $\mu\text{m}$ | 321.43 x 321.43 x 120 $\mu\text{m}$ |
| <b>Pinhole:</b>                | 74 $\mu\text{m}$                   | 240 $\mu\text{m}$                 | 240 $\mu\text{m}$                   |
| <b>Barrier Filter:</b>         | 510-572 nm                         | 510-572 nm                        | 510-572 nm                          |
| <b>Excitation wavelength:</b>  | 488 nm                             | 488 nm                            | 488 nm                              |

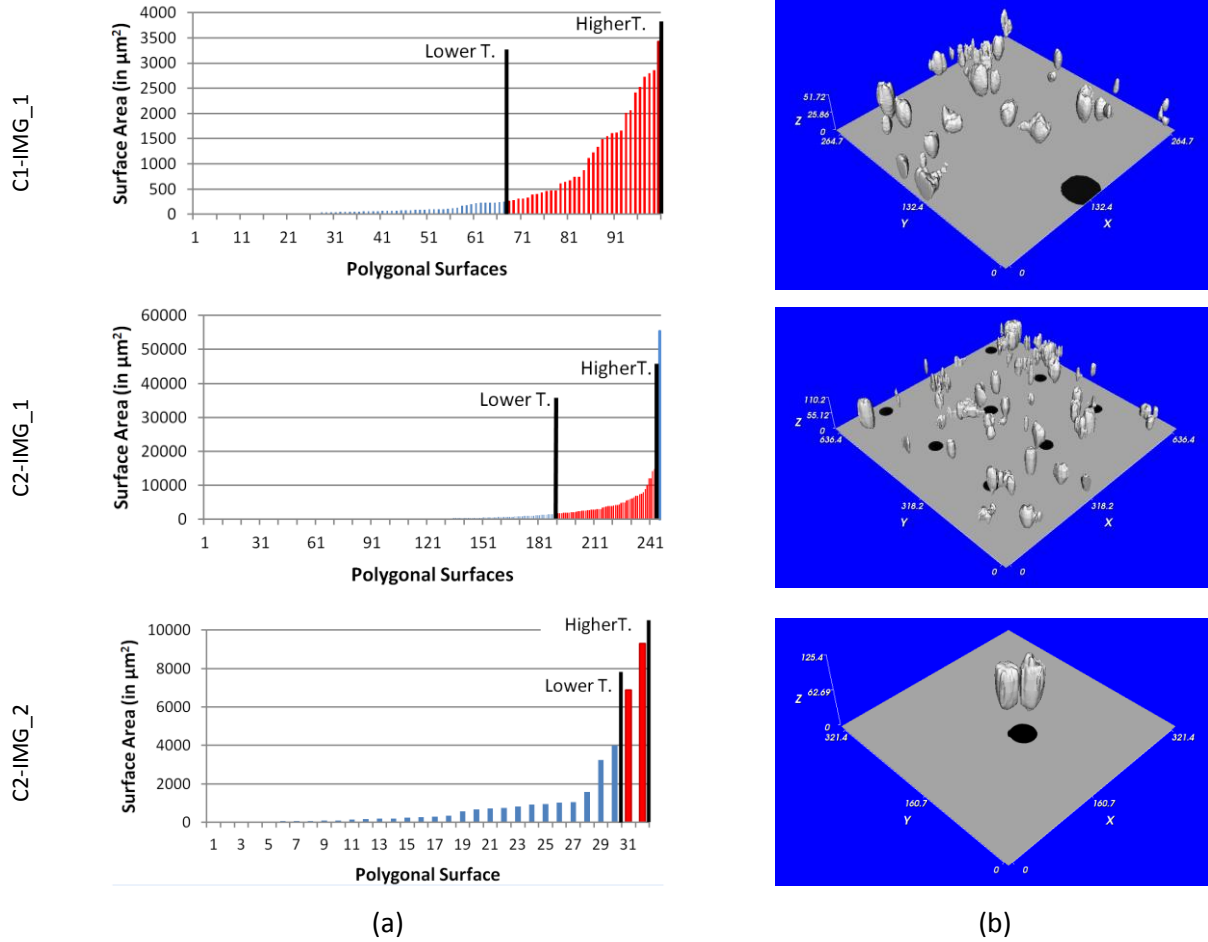
the reconstructed neurons are smaller than those associated to Culture 2 (C2-IMG\_1 and C2-IMG\_2). The image C2-IMG\_1 presents 9 microelectrodes and 28 reconstructed neural cells, the image C2-IMG\_2 presents only one microelectrode and 2 neural cells.

### 3.2.4 Semi-automatic and Manual Classification Validation

In order to validate the proposed method, the neural cells were identified and manually delimited by an expert biologist. Figure 10 shows the classifications performed by the expert. Table 4 points out the efficiency of each step, considering the number of false positives eliminated at each step of the whole procedure. The surface generation step reconstructed 100 objects for C1-IMG\_1, from which 80 (80 %) are false positives; 246 objects for C2-IMG\_1, where 218 (88%) are false positives, and 32 objects for C2-IMG\_2, where 32 (93%) are false positive. The semi-automatic classification step leaves 13 false positives (16%) to be removed by the manual classification step for C1-IMG\_1, 28 false positives (12%) for C2-IMG\_1, and 0 (zero) false positives for C2-IMG\_2. In fact, one may conclude from this table that the semi-automatic classification process was able to eliminate most of the false-positive reconstructions, leaving a small quantity to be deleted using the interactive-manual classification step.



**Figure 7:** The result of polygonal surface generation.



**Figure 8:** (a) Each bar on the charts represents one object reconstructed in the polygonal surface generation step. The lower and higher thresholds, defined in the semi-automatic classification step, are highlighted. Only objects within this interval are considered cells, the other ones are classified as false positives and eliminated. (b) A diagonal side of view of the semiautomatic classification step results.

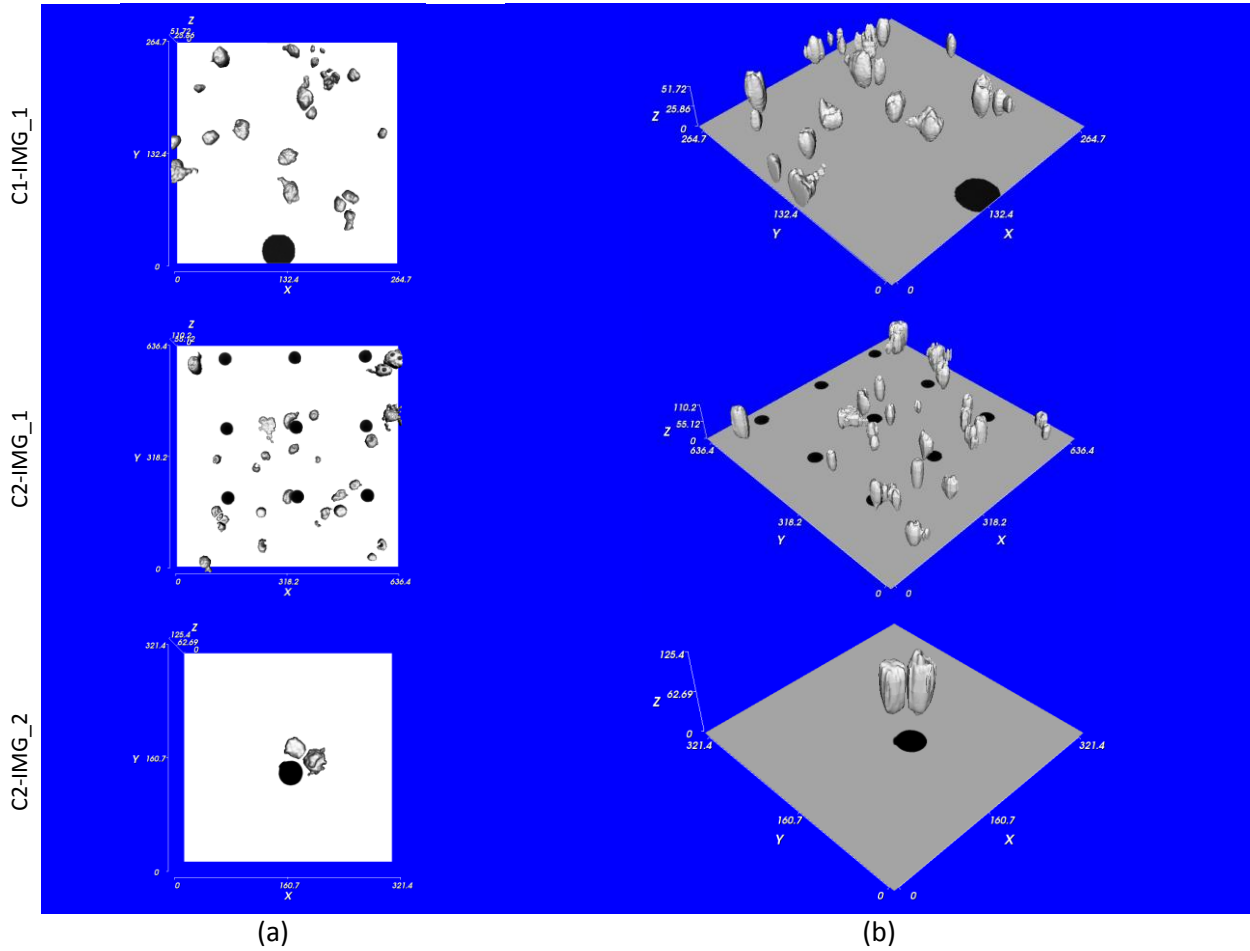
### 3.2.5 - Automated Quantitative Analysis

The bar charts in Figure 11(a) show the surface area of cells (in  $\mu\text{m}^2$ ), sorted in ascending order, after the application of all steps of our system. Figure 11(b) shows histograms of the distribution of the surface areas of cells, divided in six intervals, or bins, except for image C2-IMG\_2. The segment length for the histogram was individually defined for each image, by dividing the range between the smaller and the bigger cell in six equal bins.

Results of Fig. 11 point out that C1-IMG\_1 represents a low-density cell situation, including neurons of quite different sizes, due to the high value of standard values. On the other hand, C2-IMG\_1 presents a bigger amount composed of mainly little cells. Results in Fig. 11 should be compared to Table 2, column A'. Notice that the definition of surface area presented in Table 2 (A') is different from the surface area in Figure 11. The first one corresponds to the area of a two-

**Table 4.** “Cells” refers to the number of cells identified by the expert biologist. “Surface generation” shows the number of reconstructed surfaces during the surface generation step (3D Viewer), and the number of false positives. “Semi-automatic” and “Manual” presents respectively the number of false-positives removed and remaining cells on semi-automatic / manual classification steps.

|                 | Cells | Surface generation |                        | Semi-automatic |                  | Manual         |                  |
|-----------------|-------|--------------------|------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
|                 |       | <i>Objects</i>     | <i>False positives</i> | <i>Removed</i> | <i>Remaining</i> | <i>Removed</i> | <i>Remaining</i> |
| <b>C1-IMG_1</b> | 20    | 100                | 80 (80%)               | 67 (83%)       | 33               | 13 (16%)       | 20               |
| <b>C2-IMG_1</b> | 28    | 246                | 218 (88%)              | 190 (87%)      | 56               | 28 (12%)       | 28               |
| <b>C2_IMG_2</b> | 2     | 32                 | 30 (93%)               | 30 (100%)      | 2                | 0 (0%)         | 2                |

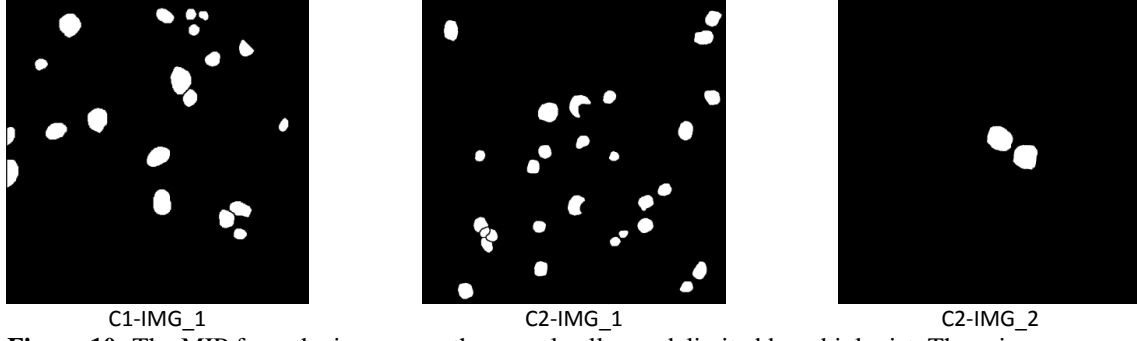


**Figure 9:** The polygonal surface reconstruction of the cultured cells after the manual false-positive removal. (a) Front side of view. (b) Diagonal side of view.

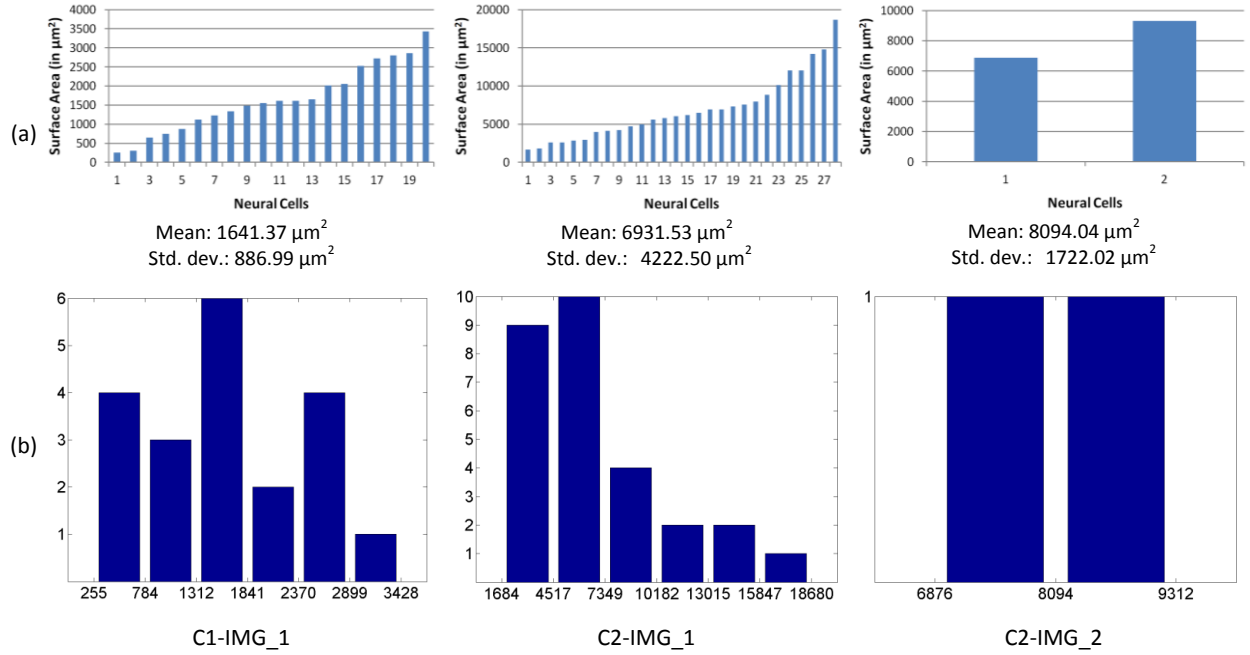
dimensional projection of the cell into the x-y plane (considering a circle of radius 100  $\mu\text{m}$  within a reference placed at the microelectrode center), whereas the second one is the measurement of the area of the surface involving the cell in the 3D space (considering all the MEA image) , i.e., a 2D-manifold, and consequently, much larger than  $A'$ . The standard deviations of Fig. 11 are also higher than those of Table 2.

In Figure 12 one may see, for each culture, the distances between all pairs of cells, in the form of a distance matrix, considering the CoM (2) of the cells, so that their position is considered in the three-dimensional space. Results for C2-IMG\_1 point out that cells are far way from each other and distributed all over the MEA surface, whereas for C1-IMG\_1, neurons are concentrated at a particular site. The distances between all pairs of cells were also computed in the two-dimensional plane (x and y axes positioning). Since these results are quite similar to those achieved by 3D considerations (Fig. 12), they are just presented at Table 5.





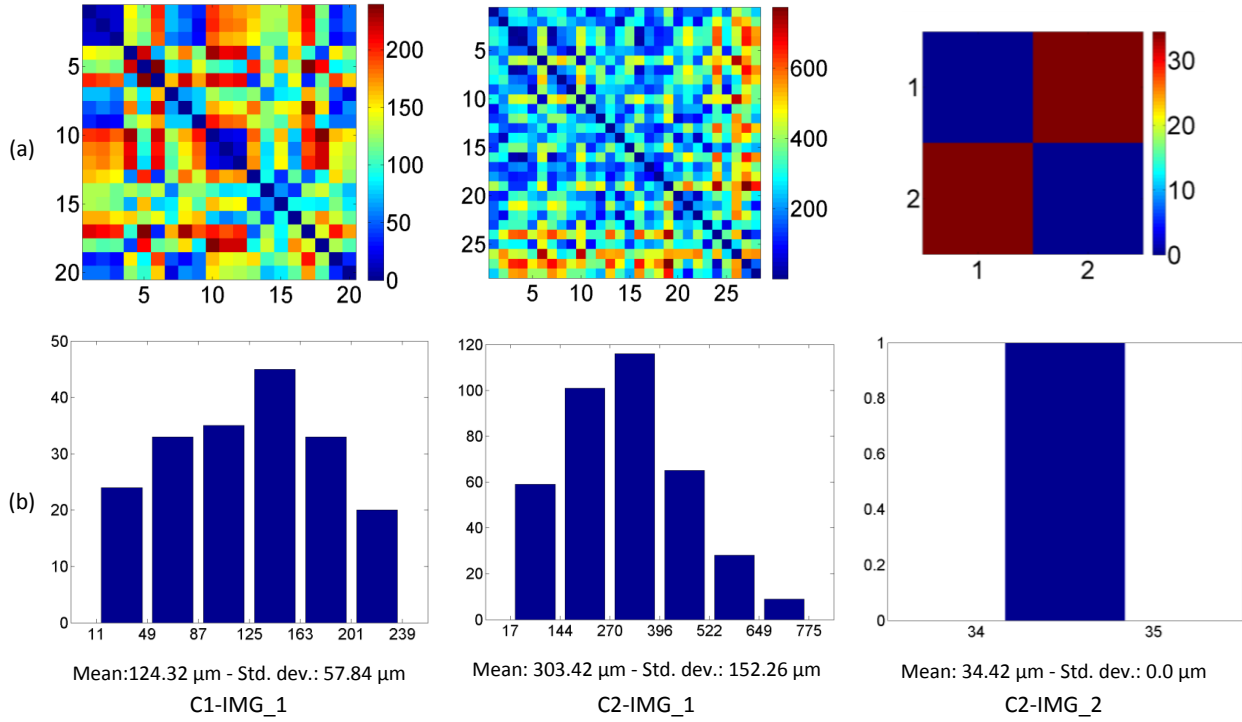
**Figure 10:** The MIP from the images, as the neural cells are delimited by a biologist. These images are used to validate the proposed classification method.



**Figure 11:** (a) Each bar represents the surface area of the classified neurons (in  $\mu\text{m}^2$ ), considering ascending order. (b) The histograms show the surface area distribution for each image. Except by image C2-IMG\_2, which presents only two cells, each histogram is divided in six bins. From the left to the right, the first and second bins counts the number of small cells, the third and fourth bins the number of average cells, and the fifth and sixth bins counts the number of large cells. The mean and the standard deviation of the cell surface area values are depicted in the Figure.

The results presented in Figure 12 lead to a topological description of the neural network in the culture. Neurons close to each other are more likely to present or to develop synaptic connections when compared to neurons separated by greater distances. Based on the distances between all pair of neurons, considering both 2D and 3D viewpoints, it is possible to estimate groups of cells with a high degree of connectivity, and along with the electrophysiological activity recorded by means of the MEA, it will provide a valuable tool for increasing the studies on the dynamics of the information processing in cultured neurons.

Figure 13(a) presents, for each image, the distances between the microelectrodes and all the cells in the form of distance matrices, similarly to Figure 12. These distances were computed considering only the coordinates in the x-y plane, because it was impossible to define the MEA substrate position along the z-axis, due to the confocal microscopy technique limitations.

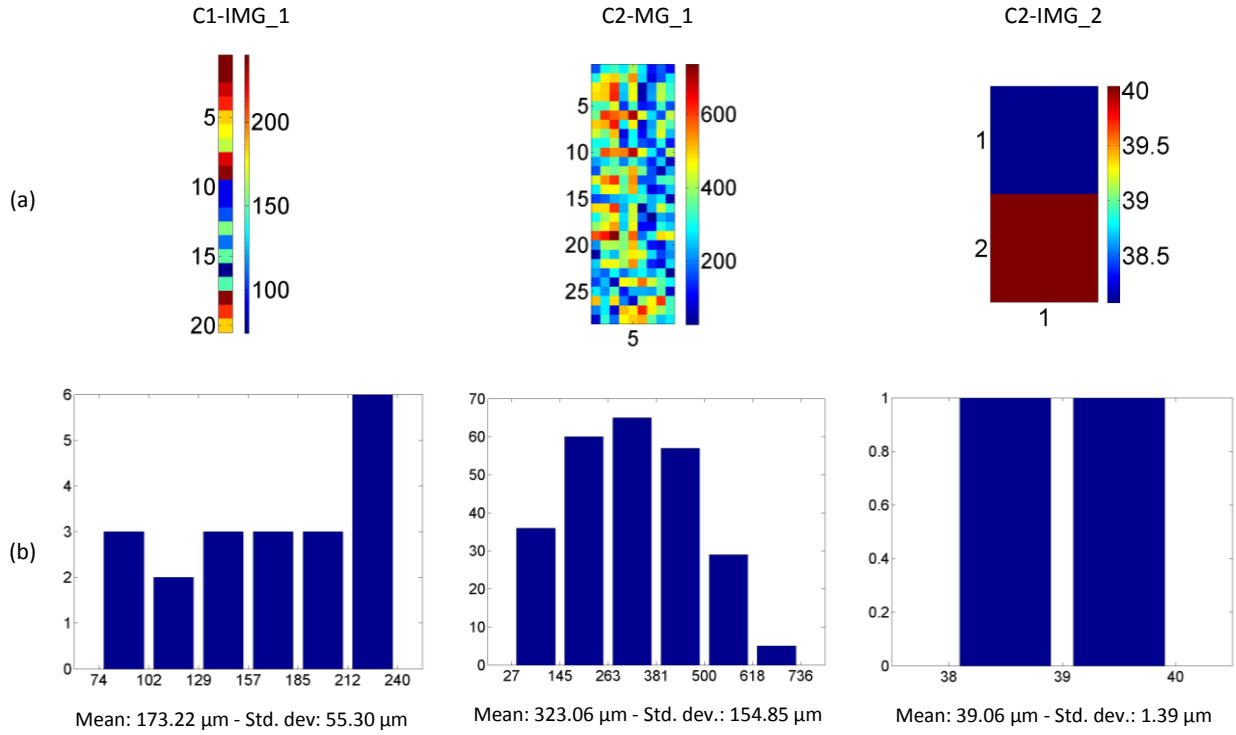


**Figure 12:** (a) Three-dimensional distance matrices stores the distances between neurons computed in the three-dimensional space. The distances between each pair of cells, identified by the indices of the line and column, are represented by a color. The color bar, at the right side, indicates de distances (in  $\mu\text{m}$ ). (b) Histograms of the distribution of de distances are computed. The histogram range is defined between the shortest distance and the largest one. Except for image C2-IMG-2, which presents only two neurons, and consequently one distance, the intervals were equally divided in six bins. From the left to the right, the first and second bins contain pair of cells close to each other, the third and fourth bins pairs of cells separated by an average distance, and the fifth and sixth bins contain distant pairs of cells. The mean and the standard deviation of the distances values are written in the Figure.

Figure 13(b) shows histograms of the distribution of the distances between microelectrodes and neurons. The results presented in Figure 13 are extremely important, since they allow obtaining information about the spatial relationship between the neurons and the electrodes. The cells located over the electrodes, or very close to them, are more likely to have their electrophysiological signal recorded. Particularly, results for C1-IMG\_1 disclose that most of cells are mainly located very far away from the single microelectrode, whereas neurons from C2-IMG\_1 are located nearer to electrodes, but their spatial distribution is much more irregular than cells of the previous picture.

Results of Fig. 13 should be compared to column D' of Table 1. This last one corresponds the mean distance between each electrode and the neurons located at most 100  $\mu\text{m}$  far from the electrode center, obtained by manual assessment. Figure 13 and the column "Dists. 2D cells-electrodes" in Table 5 show the mean distance between all cells and electrodes (in the x-y plane) computed by means of the automated system, considering all the image. One may point out that, despite the small differences of the two methodologies, the values are quite close to each other, and both methods (manual and automated) lead to similar results. In the case of image C2\_IMG-2, for which all neurons are at located a distance less than 100  $\mu\text{m}$ , the difference between results is just 1  $\mu\text{m}$ .

Table 5 summarizes the measurements obtained during the automated assessment analysis step. From this Table, by comparing different quantities, one may conclude the following points. For image C1-IMG\_1, there are few neurons, almost all of them with the same size, cells are located far away from each other and far away from microelectrodes. They seem to be concentrated at some specific site of the MEA. For image C2-IMG\_1, neurons present too much different sizes, cells seem to be irregularly distributed all over the MEA surface, neurons are located far away from each



**Figure 13:** (a) Bidimensional distances between microelectrodes and cells are computed and stored in distance matrices. Each column represents one microelectrode and each line one cell, the color of the element in the intersection represents the distance between that electrode and that cell in the x-y plane. The color bar, at the right side, indicates the distance in  $\mu\text{m}$ . (b) Histograms regarding the distribution of the distances among microelectrodes and neurons were computed, as well as the mean and standard deviation. Except for image C2-IMG\_2, the histograms were divided up into six bins, similarly to the histograms in Figures 13 and 15. From the left to the right, the first and second bins contain electrodes near the cells, the third and fourth bins electrodes and cells separated by an average distance, and the fifth and sixth bins contain distant electrodes and cells.

**Table 5.** The mean and standard deviation of all quantitative parameters automatically computed. “Surface area” summarizes the area of all cells in each image (Fig. 11). “Dists. Cell-Cell 3D” is for the distances between all pair of cells computed in the 3D space (Figure 12). “Dists. Cell-Cell 2D” is for the distances between all pairs in the 2D space (disregarding z-axis positioning). “Dists. Cells-Electrodes 2D” is for the bidimensional distances between electrodes and cells (Fig. 13).

|          | Surface Area ( $\mu\text{m}^2$ ) |           | Dists. Cell-Cell 3D ( $\mu\text{m}$ ) |           | Dists. Cell-Cells 2D ( $\mu\text{m}$ ) |           | Dists. Cells-Electrodes 2D ( $\mu\text{m}$ ) |           |
|----------|----------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|----------------------------------------|-----------|----------------------------------------------|-----------|
|          | Mean                             | Std. Dev. | Mean                                  | Std. Dev. | Mean                                   | Std. Dev. | Mean                                         | Std. Dev. |
| C1-IMG_1 | 1641.37                          | 889.89    | 124.32                                | 57.84     | 124.27                                 | 57.85     | 173.22                                       | 55.30     |
| C2-IMG_1 | 6931.53                          | 4222.50   | 303.42                                | 152.26    | 302.98                                 | 152.33    | 323.06                                       | 154.85    |
| C2-IMG_2 | 8094.04                          | 1722.02   | 34.42                                 | 0.0       | 34.32                                  | 0.0       | 39.06                                        | 1.39      |

other and far away from microelectrodes. Regarding image C2-IMG\_2 there are cells with very large size, most of them present almost the same size, and cells are very close to each other and very close to microelectrodes.

#### 4. CONCLUSION

By providing quantitative measures regarding cell morphology and topology, this study aimed to offer to the electrophysiological community a methodological tool, using confocal microscope imaging, in order to characterize a neural network cultivated on dishes embedded with extracellular microelectrodes arrays (MEAs). We investigate the number of neurons located at the microelectrode array, the mean neuron-microelectrode distance and the mean surface area, membrane perimeter and Feret’s diameter of all neurons individually sampled on images, under different culture conditions: high- and low-cell density. Finally, glial cell growth and ramification, regarding glia coverage on MEA dishes, were also investigated. Results summarized in Table 5 point out that simple assessments may indeed provide comparisons between different cultures and



protocols, since quantitative parameters attain quite different values depending on cells topology (which may disclose functional connection information), on their morphology and on their spatial distribution regarding microelectrodes.

As a result, for DRG cultures, few neurons were observed around the microelectrodes ( $30 < D < 60 \mu\text{m}$ ) and even less were in direct contact with them ( $D < 30 \mu\text{m}$ ), but most of neurons were located at distances larger than  $60 \mu\text{m}$ . Thus, we noted that considerable number of neurons lying farther than microelectrodes, which can be explained by the diffuse adhesion of these cells on the array, since we do not use any technique to guide neuronal growth.

In contrast, we found more neurons located within the recording area (until  $100 \mu\text{m}$  radius far from microelectrode) in cultures with a high-cell-density then in low-cell-density condition. For primary cultures, as in this case, it is expected that at least one third of the plated cells die under culture conditions because the cells were stressed by the isolation from living tissues and also by the adverse environment of the room culture [16]. In order to propose better approaches for studies with electrophysiological and image processing, a high concentration of DRG cells must be added (more than  $3,0 \times 10^4$  cells/mL) on MEAs so that to lead to a higher probability to find several cells per microelectrode. In consequence, we can enhance the acquisition of electrophysiological signals, due to the vicinity of neurons with respect to microelectrodes.

The proposed system generates a tridimensional representation of *in vitro* neuron cells, cultured in MEAs, using fluorescence confocal microscopy to obtain the volumetric images. Results show that semi-automatic and manual classification steps efficiently eliminate false positives based on an interactive procedure, leading to a success of about 90%. In addition, full-automated quantitative analysis, as a result of polygonal-surface processing, leads to the morphological description in terms of number of cells within the culture, of neuronal surface, the distance between cells, and the distances between the electrodes and the cells. The distance among cells is very important, since it may describe the topology of cell distribution within the three-dimensional culture surface. The distance between the microelectrodes and the cells makes possible to discuss the relationship of the electrophysiological activity of cells and the signal recorded by MEA. In addition, if one compares 2D-manual assessments and 3D-automated analysis (such as Fig. 11 and Table 2; or Fig. 13 and Table 1), then it is clear that information provided is not the same, so tridimensional analysis is of paramount relevance for biological purposes.

Future works include the following developments: (a) improvements in the preprocessing step, (b) pattern classification algorithms for the semi-automatic classification, (c) more intuitive tools for the software-guided manual classification; (d) proposition of new measurements in the quantitative analysis, especially regarding glia cells; (e) simulation of the culture development using the results of quantitative analysis; (f) image acquisition and quantitative analysis of entire cultures, comparing different protocols or different sealing substances to be used at the neuron-electrode interface, so that the quantitative analysis may be able to point out more efficient biological procedures and reagents.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

This work has been developed under CNPq grant number 558114/2010-5, which funds the fellowship of A.F. Neves. In addition, microscopy procedures are funded by FAPEMIG grant number TEC- APQ-02143-10. Authors are also indebted to Prof. Sergio Martinoia, DIBE / Genova University, Italy; as well as to *Multichannel Systems Inc.*, Germany, for kindly and promptly providing us with MEA devices, necessary for experimentations. We are grateful to the Histology Department of UFU for confocal microscopy imaging, particularly to the technician Mariane Silva and to Prof. M.E. Beletti for their regular technical support. Special thanks are also addressed to all the technical staff of Biophysics Laboratory, Institute for Biomedical Sciences / UFU.

## 6. REFERENCES

- [1] TAKETANI, M.; BAUDRY, M. **Advances in Network Electrophysiology - Using Multi Electrode Arrays**. New York: Springer Press, 478 p., 2006.

- [2] AKAY, M. **Handbook of neural engineering**. Hoboken, NJ: Wiley Press, 662 p., 2007.
- [3] GROSS, G.W.; RIESKE, E.; KREUTZBERG, G.W.; MEYER, A. A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. **Neuroscience Letters**, v.6, p.101-106, 1977.
- [4] VAN PELT, J.; WOLTERS, P.S.; CORNER, M.A.; RUTTEN, W.L.; RAMAKERS, G.J. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v.51, n.11, p.2051-2062, November 2004.
- [5] CHIAPPALONE, M.; BOVE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. **Brain Research**, v.1093, p.41-53, 2006.
- [6] BLANKENSHIP, A.G.; FELLER, M.B. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. **Nature Reviews of Neuroscience**, v.11, p.18-29, January 2010.
- [7] STETT, A.; EGERT, U.; GUENTHER, E.; HOFMANN, F.; MEYER, T.; NISCH, W.; HAEMMERLE, H. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.377, p.486-495, 2003.
- [8] MARTINOIA, S.; BONZANO, L.; CHIAPPALONE, M.; TEDESCO, M. Electrophysiological activity modulation by chemical stimulation in networks of cortical neurons coupled to microelectrode arrays: A biosensor for neuropharmacological applications. **Sensors and Actuators B**, v.108, p.589-596, 2005.
- [9] CORNER, M.A.; BAKER, R.E.; VAN PELT, J. Physiological consequences of selective suppression of synaptic transmission in developing cerebral cortical networks in vitro: Differential effects on intrinsically generated bioelectric discharges in a living 'model' system for slow-wave sleep activity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.32, p.1569-1600, October 2008.
- [10] MORIN, F.O.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. Investigating Neuronal Activity with Planar Microelectrode Arrays: Achievements and New Perspectives. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.2, p.131-143, 2005.
- [11] POTTER, S.M.. Distributed processing in cultured neuronal networks. In: Nicolelis, M.A.L. (Ed) **Progress in Brain Research**, v.130, p.49-62, 2001.
- [12] MARON, S.; SHAHAF, G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. In **Quarterly Reviews of Biophysics**, Cambridge University Press, v.35, n.1, p.63-87, 2002
- [13] BOIDO, D. et al. Cortico-hippocampal hyperexcitability in synapsin I/II/III knockout mice: age-dependency and response to the antiepileptic drug levetiracetam. **Neuroscience**, v.171, n.1, p.268-283, 2010.
- [14] EGERT, U.; HÄMMERLE, H. Application of the microelectrode-array (MEA) technology in pharmaceutical drug research. In: BASELT, J.P.; GERLACH, G. (Eds), **Sensoren im Fokus neuer Anwendungen**. w.e.b. Universitätsverlag, Dresden, p.51-54, 2002.
- [15] POTTER, S.M.; WAGENAAR, D.A.; DEMARSE, T.B. Closing the loop: Stimulation feedback systems for embodied MEA cultures. In: TAKETANI, M.; BAUDRY, M. (Eds.) **Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays**, Springer, 32 p, 2005.
- [16] POTTER, S.M.; DE-MARSE, T.B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. **Journal of Neuroscience Methods**, v.110, p.17-24, 2001.
- [17] ECKMANN, J.P.; FEINERMAN, O.; GRUENDLINGER, L.; MOSES, E.; SORIANO, J.; TLUSTY, T. The physics of living neural networks. **Physics Reports**, v.449, p.54-76, 2007.
- [18] HALES C.M.; ROLSTON J.D.; POTTER S.M. How to Culture, Record and Stimulate Neuronal Networks on Micro-electrode Arrays (MEAs). **Journal of Visualized Experiments**, v.39, 7 p., 2010.

- [19] MAHER, M.P.; PINE, J.; WRIGHT, J.; TAI, Y.C. The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v.87, p. 45-56, 1999.
- [20] LITT, B.; D'ALESSANDRO, A.; ESTELLER, R.; ECHAUZ, J.; VACHTSEVANOS, G. Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy. **Proceedings of the 1st International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering**, Capri Island, Italy, p.485-488, March 2003.
- [21] BERGER, T.W.; HAMPSON, R.E.; SONG, D.; GOONAWARDENA, A.; MARMARELIS, V.Z.; DEADWYLER, S.A. A cortical neural prosthesis for restoring and enhancing memory. **Journal of Neural Engineering**, v.8, 11 p., 2011.
- [22] FROMHERZ, P. Neuroelectronic interfacing: semiconductor chips with ion channels, nerve, cells, and brain. In: WASER, R. (Ed.), **Nanoelectronics and Information Technology**. Wiley-VCH, Berlin, p.781-810, 2003.
- [23] POTTER, S.M.; BOOTH, M.C.; BRUMFIELD, J.R.; PASSARO, P.A.; RAMBANI, K.; TOWAL, R.B. Combining Time-lapse Optical Microscopy and Multi-electrode Arrays to Study Learning in Vitro. **Microscopy and Microanalysis**, v.10, p.1238-1239, 2004.
- [24] POTTER, S.M. Two-photon microscopy for 4D imaging of living neurons. In: YUSTE, R.; KONNERTH, A. (Eds.), **Imaging in Neuroscience and Development: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 59-70, 2005.
- [25] BRETTE, R.; RUDOLPH, M.; CARNEVALE, T.; HINES, M.; BEEMAN, D.; BOWER, J.M.; DIESMANN, M.; MORRISON, A.; GOODMAN, P.H.; HARRIS, F.C.JR; ZIRPE, M.; NATSCHLÄGER, T.; PECEVSKI, D.; ERMENTROUT, B.; DJURFELDT, M.; LANSNER, A.; ROCHEL, O.; VIEVILLE, T.; MULLER, E.; DAVISON, A.P.; EL-BOUSTANI, S.; DESTEXHE, A. Simulation of networks of spiking neurons: a review of tools and strategies. **Journal of Computational Neuroscience**, v.23, p. 349-398, 2007.
- [26] ESCOLÁ, R.; POUZAT, C.; CHAFFIOL, A.; YVERT, B.; MAGNIN, I.E.; GUILLEMAUD, R. SIMONE: A Realistic Neural Network Simulator to Reproduce MEA-Based Recordings. **IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering**, v.16, n.2, 2008.
- [27] ROSS, J. **Microstimulation and multicellular analysis: a neural interfacing system for spatiotemporal stimulation**. 2008. 151f. Thesis (Doctor Degree). Georgia Institute of Technology, Georgia, USA.
- [28] MERCHANT, F.A. Three-dimensional imaging. In: WU, Q.; MERCHANT, F.; CASTLEMAN, K.R. (Eds), **Microscope Image Processing**, Academic Press, p.329-399, 2008.
- [29] CONCHELLO J.A.; LICHTMAN, J.W. Optical sectioning microscopy, **Nature Methods**, v.2, n.12, p. 920-931, 2005.
- [30] GREVE, F.; FRERKER, S.; BITTERMANN, A.G.; BURKHARDT, C.; HIERLEMANN, A.; HALL, H. Molecular design and characterization of the neuron-microelectrode array interface. **Biomaterials**, v.28, p.5246-5258, 2007.
- [31] WEARNE, S.L.; RODRIGUEZ, A.; EHLENBERGER, D.B.; ROCHER, A.B.; HENDERSON, S.C.; HOF, P.R. New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. **Neuroscience**, v.136, p.661-680, 2005.
- [32] BJORNSSON, C.S.; LIN, G.; AL-KOFAHI, Y.; NARAYANASWAMY, A.; SMITH, K.L.; SHAIN, W.; ROYSAM, B. Associative image analysis: a method for automated quantification of 3D multi-parameter images of brain tissue. **Journal of Neuroscience Methods**, v.170, n.1, p.165-178, 2008.
- [33] BERDONDINI, L.; MASSOBRIO, P.; CHIAPPALONE, M.; TEDESCO, M.; IMFELD, K.; MACCIONE, A.; GANDOLFO, M.; KOUDELKA-HEP, M.; MARTINOIA, S. Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays couple d to dissociate d cortical cultures. **Journal of Neuroscience Methods**, v.177, p.386-396, 2009.
- [34] AOYAGI, Y.; STEIN, R. B.; BRANNER, A.; PEARSON, K.G.; NORMANN, R.A. Capabilities of a penetrating microelectrode array for recording single units in dorsal root ganglia of the cat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.128, p.9-20, 2003.

- [35]STEIN, R. B.; AOYAGI, Y.; WEBER, D. J.; SHOHAM, S.; NORMANN, A. Encoding mechanisms for sensory neurons studied with a multielectrode array in the cat dorsal root ganglion. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.82, n. 8-9, p.757–768, 2004.
- [36]WEBER, D.J.; STEIN, R.B.; EVERAERT, D.G.; PROCHAZKA, A. Limb-state feedback from ensembles of simultaneously recorded dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neural Engineering**, v.4, p.S168-S180, 2007.
- [37]ZHAO, X. Y.; LIU, M. G.; YUAN, D. L.; WANG, Y.; HE, Y.; WANG, D. D.; CHEN, X. F.; ZHANG, F. K.; LI, H.; HE, X. S.; CHEN, J. Nociception-induced spatial and temporal plasticity of synaptic connection and function in the hippocampal formation of rats: A multi-electrode array recording. **Molecular Pain**, v.5, n.55, 2009.
- [38]MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, M.; CASTELLANOS, J.E. Morphological and biochemical characterisation of sensory neurons infected in vitro with rabies virus. **Acta Neuropathologica**, v.114, p.263–269, 2007.
- [39]RUTTEN, W. L. C.; MOUVEROUX, J. M.; BUITENWEG, J.; HEIDA, C.; RUARDIJ, T.; MARANI, E.; LAKKE, E. Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a culture probe. **Proceeding of the IEEE**, v.89, n.7, p.1013-1029, 2001.
- [40]POTTER, S.M.; FRASER, S.E.; PINE, J. The greatly reduced photodamage of 2-photon microscopy enables extended 3-dimensional time-lapse imaging of living neurons. **Proceedings of Scanning**, v.18, p.147, 1996.
- [41]HARPER, A.A.; LAWSON, S.N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. **The Journal of Physiology**, v.359, p.31-46, 1985.
- [42]CUNHA, T.M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.L.; SOUZA, G.R.; VERRI-JR, W.A.; FUNEZ, M.I.; DIAS, Q.M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALL, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma / AKT / nNOS / NO / KATP signaling pathway. **PNAS**, v.107, n.9, p.4442-4447, 2010.
- [43]VERRI, W.A.J.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.
- [44]RASBAND, W.S. **ImageJ**, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <<http://imagej.nih.gov/ij/>>, 1997-2011.
- [45]SCHMID, B. et al. A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. **BMC Bioinformatics**, v.11, n.274, 2010.
- [46]SCHROEDER, W.; MARTIN, K.M.; LORENSEN, W.E. **The visualization toolkit: an object-oriented approach to 3D graphics**. 4. Ed. Prentice-Hall, Inc., 2006.
- [47]WALTON, W. H. Feret's statistical diameter as a measure of particle size. **Nature**, v.162, p.329-330, 1948.
- [48]ZANON, R.G.; OLIVEIRA, A.L.R. MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. **Experimental Neurology**, v.200, p.521-531, 2006.
- [49]LORENSEN, W.E.; LINE, H.E. Marching cubes: a high-resolution 3D surface reconstruction algorithm. **ACM SIGGRAPH Computer Graphics**, v.21, n.4, p.163-169, 1987.
- [50]BLONDEL, O.; COLLIN, C.; MCCARRAN, W.J.; ZHU, S.; ZAMOSTIANO, R.; GOZES, I.; BRENNEMAN, D.E.; MCKAY, R.D.G. A Glia-Derived Signal Regulating Neuronal Differentiation. **The Journal of Neuroscience**, vol.20, n.21, p.8012-8020, 2000.
- [51]AULD, D.; ROBITAILLE, R. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. **Neuron**, v.40, p.389-400, 2003.
- [52]DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain Supplement**, v.6, p.S27-S35, 1999.

[53] HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Research Reviews**, v.48 p.457- 476, 2005.