

Revista da Graduação

Vol. 5

No. 2

2012

12

Seção: Faculdade de Física

Título: TESTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA MATRIZ
MULTIELETRODO PARA REGISTRO DE SINAIS
ELETROFISIOLÓGICOS IN VITRO

Autor: Carolina de Barros Vidor

Este trabalho está publicado na Revista da Graduação.

ISSN 1983-1374

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/editor/submission/12422>

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FÍSICA

CAROLINA DE BARROS VIDOR

**TESTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA MATRIZ MULTIELETRODO PARA
REGISTRO DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS *IN VITRO***

Porto Alegre

2012

CAROLINA DE BARROS VIDOR

**TESTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA MATRIZ MULTIELETRODO PARA
REGISTRO DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS *IN VITRO***

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Física Médica pela
Faculdade de Física da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo

Porto Alegre

2012

CAROLINA DE BARROS VIDOR

**TESTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA MATRIZ MULTIELETRODO PARA
REGISTRO DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS *IN VITRO***

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Física Médica pela
Faculdade de Física da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo (orientador)

Profa. Dra. Maria Eulália Pinto Tarragó

Me. Daniel Rodrigo Marinowic

Porto Alegre

2012

Dedico este trabalho à minha avó
Ida (*in memorium*), cuja vida sempre tão
dedicada e sofrida me ensinou a mais
dura e importante lição que uma mulher
deve aprender: a alma feminina não
apenas faz perguntas a respeito de nós
mesmas, da nossa família, dos nossos
projetos e da maneira como levamos a
vida, mas *exige* respostas.

Nossa compreensão convencional está baseada em suposições que foram passadas a nós, suposições que dependem de formas convencionais de percepção. Fomos ensinados a dar nome às coisas, atribuindo-lhes uma realidade que não possuem. A mente convencional é muito linear, pulando de um pensamento para outro. Podemos nos imaginar como pensadores multifacetados, cujas ideias formam algo como um mosaico, mas somos tão somente seres que mudam muito depressa. Todos os conceitos e pensamentos que surgem na mente, na verdade toda a nossa experiência da realidade, não são muito diferentes de desenhos feitos com o dedo sobre a superfície da água. No próprio ato em que uma imagem está sendo criada, ela deixa de existir.

Chagdud Tulku Rinpoche

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar uma matriz multieletrodo (MEA) e implementar procedimentos de medidas de sinais eletrofisiológicos *in vitro*. Esse trabalho foi realizado como etapa preliminar à execução de um projeto de pesquisa que prevê o desenvolvimento e o teste de dispositivos MEAs customizados para a investigação *in vitro* da epilepsia em fatias cerebrais humanas. A caracterização da MEA foi realizada através da obtenção de imagens por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura, além de análise qualitativa de composição química através de espectroscopia de raios x por energia dispersiva. A implementação de procedimentos de medida exigiu a construção de um interfaceamento eletrônico entre a MEA e o sistema de aquisição de dados. Esse interfaceamento se mostrou eficiente para a realização de um teste preliminar de utilização da MEA. O teste foi realizado a partir da estimulação elétrica de células mesenquimais em cultura retiradas de medula óssea humana, após a aplicação um protocolo de neurodiferenciação. A análise das medidas realizadas consistiu na avaliação qualitativa dos sinais registrados através da discriminação e identificação visual de resposta celular eletrofisiológica. Os resultados obtidos se mostraram promissores. Como perspectiva futura, pretende-se realizar testes sistemáticos com estimulação de cultura celular a fim de se avaliar através de análise estatística os parâmetros eletrofisiológicos envolvidos na resposta celular à estimulação elétrica artificial com o uso da MEA.

Palavras-chave: Matriz multieletrodo. MEA. Arranjo de múltiplos eletrodos. Registro eletrofisiológico. Registro extracelular. Epilepsia.

ABSTRACT

The main goal of this work was to describe a multi-electrode array (MEA) and to implement procedures for measuring electrophysiologic signals *in vitro*. It was conducted as a previous stage for a broader research project that aims to develop and test customized MEAs for *in vitro* investigation of epilepsy in human brain slices. The MEA characterization was obtained by optical and scanning electrical microscopy images and after qualitative analysis of the chemical composition through energy-dispersive X-ray spectroscopy. The measurements with the sensor required the development of an electronical interface between the MEA and the data collecting system. The developed interfaced proved to be very effective for a preliminary MEA usage test. Electric stimuli were applied to human mesenchymal stem cell culture, which was submitted to a protocol of neural differentiation. The analysis of this work consisted of qualitative evaluation of every registered signal found after visual identification of the electrophysiological cell response. The preliminary recording results proved to be promising. As future perspective, it is intended to conduct additional systematic measurements on cell cultures in order to perform more complex statistical analysis of all the electrophysiological patterns involved in cellular response to artificial electric stimulation with the use of the MEA.

Keywords: Multi-electrode array. MEA. Electrophysiological recording. Extracellular recording. Epilepsy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura de um neurônio típico.	18
Figura 2 – Diagrama representando a geração e a propagação de um potencial de ação ao longo da membrana axonal. As setas indicam o fluxo iônico. Em (a) a membrana está em repouso; em (b) a membrana recebe um estímulo; (c) e (d) mostram a propagação do potencial de ação.	21
Figura 3 – Gráfico do potencial de membrana em função do tempo, mostrando as fases de um potencial de ação. O gráfico A representa o potencial de ação teórico, enquanto o gráfico B representa o potencial de ação conforme medido experimentalmente.	23
Figura 4 – Condução saltatória do impulso nervoso. As setas indicam o fluxo iônico através da membrana neuronal.	24
Figura 5 – Fluxo de íons sódio Na^+ e potássio K^+ (indicado pelas setas no desenho A) através da membrana celular em repouso e circuito equivalente (mostrado em B). O símbolo V_m indica potencial de membrana e C_m indica capacitância de membrana.	28
Figura 6 – Circuito equivalente representando o fluxo de corrente I entre uma célula e o aparato experimental para registro eletrofisiológico. As setas indicam o fluxo da corrente.	29
Figura 7 – Comparação entre (A) a estrutura da membrana celular e (B) um circuito equivalente evidenciando a característica resistiva da membrana em relação ao fluxo iônico. A resistência equivalente R_{eq} resultante da associação em paralelo de dois resistores é igual a duas vezes o valor da condutância G	30
Figura 8 – Comparação entre (A) a estrutura da membrana celular e (B) um circuito equivalente evidenciando a característica capacitiva da membrana, análoga a uma associação em paralelo de capacitores. A capacitância equivalente (C_{eq}) é igual a duas vezes o valor da capacitância (C).	30
Figura 9 – Circuito elétrico resistivo-capacitivo (indicado pela letra A) equivalente à membrana celular (indicada por B). R e C representam, respectivamente, a resistência e a capacitância da membrana.	31

Figura 10 – Circuito equivalente para o modelo de corrente de membrana I_m de Hodgkin-Huxley, onde C_m é a capacitância de membrana; V_m é o potencial de membrana; V_{Na} , V_K e V_L são os potenciais de equilíbrio para os íons sódio, potássio e outro íons não determinados, respectivamente; e R_{Na} , R_K e R_L são as resistências associadas aos fluxos iônicos.....	32
Figura 11 – Esquema de uma micropipeta de vidro para registros intracelulares (<i>sharp electrode</i>).	34
Figura 12 – Registros intracelulares e extracelulares de potenciais de ação: (A) potencial de ação bifásico registrado por microeletrodo extracelular, característico de um potencial de ação não-propagado; (B) potencial de ação trifásico registrado por microeletrodo extracelular, característico de um potencial de ação propagado; (C) potencial de ação com formato de onda complexa registrado por microeletrodo extracelular, característico de uma composição de potenciais de ação produzidos pela excitação sequencial do segmento inicial e do soma de um neurônio; (D) potenciais de ação registrados por microeletrodo intracelular (a seta indica artefato resultante do estímulo aplicado).	36
Figura 13 – Esquema da técnica <i>current clamp</i> para estimulação intracelular.	37
Figura 14 – Respostas eletrofisiológicas da membrana celular à aplicação artificial de corrente elétrica. A curva mostrada em A pode representar a resposta passiva de uma célula excitável ou de uma não-excitável. A curva mostrada em B indica potenciais de ação deflagrados em sequência devido à aplicação de um estímulo supralimiar.	38
Figura 15 – Esquema de aplicação da técnica <i>voltage clamp</i>	39
Figura 16 – Esquema de um arranjo experimental para a técnica <i>patch clamp</i> (à esq.). A corrente de junção representa a corrente de fuga que flui através da micropipeta, mas não flui através da membrana. Essa fuga causa um aumento no ruído eletrônico sobre a corrente medida. O sinal captado está representado à direita.	41
Figura 17 – Diferentes configurações experimentais da técnica <i>patch clamp</i>	42
Figura 18 – Aplicação da MEA para estimulação de fatia cerebral e de cultura celular. Fatia de hipocampo de rato (à esq.) e cultura de células cardíacas de rato (à dir.), sobre MEAs com diferentes configurações de microeletrodos.	43

Figura 19 – Corte esquemático do microchip de uma MEA fabricado pela empresa Qwane Biosciences.....	44
Figura 20 – Esquema de células sobre MEAs com microeletrodos em configuração 3D (à esq.) e planar (à dir.).....	44
Figura 21 – Esquema da câmara de registro sobre a MEA.....	45
Figura 22 – Exemplo de uma matriz multieletrodo fabricada pela empresa Qwane Biosciences. A configuração final do dispositivo é uma placa com dimensões de 5 cm x 5 cm.	45
Figura 23 – Esquema do paradigma de estimulação por aplicação de pulsos pareados.....	22
Figura 24 – Registro de campo mostrando o primeiro e o segundo potencial pós-sináptico excitatório (EPSP) obtidos através do paradigma de estimulação por pulsos pareados.....	23
Figura 25 – Interface do programa CyberAmp para ajuste de parâmetros de estimulação.....	23
Figura 26 – Fotografia mostrando arranjo experimental dos aparatos utilizados e sistema de aquisição de dados, indicados pelos números: (1) fixador de corrente; (2) conversor analógico-digital; (3) amplificador; (4) condicionador de sinais; (5) estimulador programável; (6) microcomputador; (7) sensor conectado ao sistema de aquisição de dados; (8) mesa antivibracional e (9) gaiola de Faraday.....	25
Figura 27 – Esquema mostrando as partes do sinal obtido em um registro de campo. As letras indicam: (a) pulso de aplicação do estímulo; (b) resposta celular passiva causada pelo componente capacitivo da membrana; e (c) curva de deflexão característica de um EPSP, causada pela resposta ativa da membrana.	26
Figura 28 – Interface do software Clampfit 9.2 exibindo registro obtido pela estimulação da cultura celular sobre a MEA por aplicação de pulsos pareados.....	26
Figura 29 – Visão geral do microcircuito da MEA. A letra A indica o substrato de vidro e a letra B indica a placa de circuito impresso (PCI). A região delimitada pelo retângulo indica a conexão entre o microeletro e a PCI; a região delimitada pelo quadrado mostra a parte central do microcircuito. As setas indicam um dos quatro pares de eletrodos terra.	18
Figura 30 – Arranjo dos microeletrodos da MEA mostrado por microscopia óptica. .	19
Figura 31 – Arranjo dos microeletrodos da MEA mostrado por microscopia eletrônica de varredura obtida nos modos SE (imagem A) e BSE (imagem B). O número 1	

indica um microeletrodo, o número 2 indica uma trilha do microcircuito e o número 3 indica o substrato de vidro.	20
Figura 32 – Imagens de um microeletrodo de estimulação e registro obtidas por MEV nos modos SE (imagem A) e BSE (imagem B). O número 1 indica o microeletrodo e o número 2 indica a trilha do microcircuito.	21
Figura 33 – Detalhe de um microeletrodo terra mostrado por MEV no modo SE. As marcações na imagem indicam as regiões da MEA nas quais se aplicou identificação de composição química por EDS: (1) microeletrodo; (2) trilha do microcircuito e (3) substrato.	22
Figura 34 – Identificação por EDS da composição química do substrato do sensor. O resultado indica predominância de silício (Si) e menores quantidades de carbono (C) e oxigênio (O). A presença de ouro (Au) é causada pela metalização do sensor. O gráfico representa o número de contagens (eixo y) por energia (eixo x) da ordem de kilovolts (kV).	22
Figura 35 - Identificação por EDS da composição química do microeletrodo (imagem A) e da trilha do microcircuito do sensor (imagem B). O resultado indica predominância de platina (Pt) no microeletrodo e predominância de ouro (Au) na trilha, com menores quantidades de carbono (C) e oxigênio (O). Os gráficos representam o número de contagens (eixo y) por energia (eixo x) da ordem de kilovolts (kV).	23
Figura 36 – Configuração experimental construída para utilização do sensor, mostrando a MEA (1), a placa de Petri (2) e o cabo IDE 40 vias (3).	24
Figura 37 – Interface entre o sensor e o sistema de aquisição de dados. A numeração indica: (1) sensor; (2) cabo IDE 40 vias; (3) chave <i>dip switch</i> ; (4) <i>proto-board</i> ; (5) cabos com terminais BCN.	24
Figura 38 – Registro obtido após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de 10ms entre si. É possível constatar a deflagração de EPSP (indicado pela seta) após o segundo estímulo.	25
Figura 39 - Registro obtido após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de tempo de 20ms entre si. É possível constatar a deflagração de EPSP (indicado pela seta) após o segundo estímulo.	26
Figura 40 – Registros obtidos após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de tempo de 40ms entre si. A imagem “A” mostra a ausência de resposta ativa da	

membrana celular; por outro lado, a imagem “B” mostra a deflagração de EPSPs (indicados pelas setas).26

Figura 41 - Registros obtidos após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de tempo de 100ms (imagem A) e 120ms (imagem B) entre si. A deflagração de EPSPs (indicados pelas setas) ficou evidente.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDNF - fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês *brain derived neurotropic factor*)
- BSE – detector de elétrons retroespalhados (do inglês *backscattered scanning electron*)
- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
- CEMM - Centro de Microscopia e Microanálises da PUCRS
- CMI - Centro de MicroNano Tecnologia da EPFL
- DMEM – meio de cultura celular
- ECG – eletrocardiografia
- EDS - espectroscopia de raios X por dispersão de energia (do inglês *energy-dispersive X-ray spectroscopy*)
- EEG - eletroencefalografia
- EMG - eletromiografia
- ENoG - eletroneurografia
- EOG - eletro-oculografia
- EPFL – École Polytechnique Fédérale de Lausanne
- ERG – eletrorretinografia
- EPSP - potencial sináptico pós-excitatório (do inglês *excitatory postsynaptic potencial*)
- GCSF - fator estimulador de colônia de granulócitos (do inglês *granulocyte colony stimulating factor*)
- HH – Modelo dinâmico de membrana de Hodgkin e Huxley
- HSL – Hospital São Lucas da PUCRS
- hMSC - células-tronco mesenquimais humanas (do inglês *human mesenchymal stem cell*)
- InsCer – Instituto do Cérebro
- IPB – Instituto de Pesquisas Biomédicas do HSL
- LMN - Laboratório de Materiais e Nanociências
- LMIS4 - Laboratório de Microsistemas 4 da EPFL
- MEA – matriz multieletrodo ou arranjo de múltiplos eletrodos (do inglês *multi-electrode array*)
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- NANOPUC – Grupo de Nanoestruturas e Nanoscopia da PUCRS
- NeuroLab - Laboratório de Neurociências

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCI – placa de circuito impresso

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RPMI – meio de cultura celular desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
(do inglês *Roswell Park Memorial Institute*)

SE – elétrons secundários (do inglês *secondary electrons*)

TECNO PUC – Parque Tecnológico e Industrial da PUCRS

TMC - Technical Manufacturing Corporation

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag - prata

AgCl – cloreto de prata

Au - ouro

C – capacitância elétrica

C_{eq} – capacitância equivalente

Ca^{++} - íons cálcio

Cl^- - íons cloro

C_m – capacitância de membrana

cm - centímetro

F - constante de Faraday

G – condutância iônica

GΩ - gigaohm

HH – modelo de membrana e Hodgkin-Huxley

I_K – corrente resultante do fluxo de íons potássio

I – corrente elétrica

I_L – corrente resultante do fluxo de íons não especificados (do inglês *linkage current*)

I_m – corrente total de membrana

I_{ion} - corrente iônica de membrana

I_c - corrente capacitiva de membrana

I_{Na} – corrente resultante do fluxo de íons sódio

$[íon]_{ext}$ - concentração iônica no meio extracelular

$[íon]_{int}$ - concentração iônica no meio intracelular

K^+ - íons potássio

$[K^+]_{ext}$ - concentração do íon potássio no meio extracelular

$[K^+]_{int}$ - concentração do íon potássio no meio intracelular

KCl – cloreto de potássio

kV - kilovolt

mA – miliampère

mL - mililitro

mm - milímetro

ms – milissegundo

mV – milivolt

$M\Omega$ - megaohm

Na^+ - íons sódio

$[Na^+]_{ext}$ - concentração do íon sódio no meio intracelular

$[Na^+]_{int}$ - concentração do íon sódio no meio intracelular

pA – picoampère

pF - picoFarad

P_k – permeabilidade relativa ao íon potássio

P_{Na} - permeabilidade relativa ao íon sódio

Pt - platina

Q_m - carga máxima do capacitor de membrana

$q(t)$ - carga do capacitor em um instante de tempo t qualquer

R - constante universal dos gases

R – resistência elétrica

RC – circuito resistivo-capacitivo

R_{eq} – resistência equivalente

R_m – resistência de membrana

R_K - resistência de membrana à passagem de íons potássio

R_{Na} - resistência de membrana à passagem de íons sódio

T - temperatura absoluta

t – tempo

V_K – potencial de equilíbrio para o íon potássio

V_L – potencial de equilíbrio para íons não especificados

V_m – potencial de membrana ou potencial transmembrana

V_{Na} – potencial de equilíbrio para o íon sódio

z - carga (número de valência) do íon

μm - micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Justificativa	20
1.2 Objetivos.....	21
1.2.1 Objetivo geral	21
1.2.2 Objetivos específicos	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Células neuronais.....	18
2.1.1 Potencial de repouso.....	20
2.1.2 Potencial de ação.....	21
2.2 Bioeletricidade.....	25
2.2.1 Potencial de membrana	25
2.2.2 Corrente de membrana.....	27
2.2.3 Resistência de membrana e condutância iônica.....	29
2.2.4 Capacitância de membrana	30
2.2.5 A membrana como circuito resistivo-capacitivo.....	31
2.3 Modelo dinâmico de Hodgkin-Huxley (HH)	32
2.4 Registros eletrofisiológicos	34
2.4.1 Clampeamento de corrente (current clamp)	37
2.4.2 Clampeamento de voltagem (voltage clamp).....	39
2.4.3 Fixação de membrana (patch clamp)	40
2.4.4 Matriz multieletrodo (MEA)	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Procedimento experimental	18
3.1.1 Caracterização dos sensores.....	18
3.1.2 Interfaceamento entre o sensor e o sistema de aquisição de dados	19
3.1.3 Cultura celular	19
3.1.4 Teste preliminar para registro eletrofisiológico	21
3.2 Aparato experimental	24

	16
3.3 Análise dos dados preliminares.....	25
4 RESULTADOS.....	18
4.1 Caracterização dos sensores	18
4.2 Interfaceamento entre o sensor e o sistema de aquisição de dados	23
4.3 Cultura celular	25
4.4 Teste preliminar para registro eletrofisiológico	25
5 CONCLUSÕES	18
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	18
REFERÊNCIAS.....	19

1 INTRODUÇÃO

O estudo dos princípios físico-químicos da bioeletrogênese constitui a base para a compreensão dos processos eletrofisiológicos que ocorrem no corpo humano. Diversos testes clínicos - como eletrorretinografia (ERG), eletro-oculografia (EOG), eletroencefalografia (EEG), eletrocardiografia (ECG), eletromiografia (EMG), eletroneurografia (ENoG), entre outros - estão fundamentados no registro e na interpretação de sinais bioelétricos provenientes da propagação de potenciais de ação em órgãos e tecidos especializados. O registro de potenciais de ação *in vivo* pode ser realizado através do uso de eletrodos dispostos externamente ao corpo - sobre a superfície da pele, por exemplo - ou internamente, diretamente sobre um órgão - como é o caso do coração. O registro *in vitro*, por sua vez, pode ser feito através de microeletrodos conectados diretamente a fatias de tecidos ou cultura celular (NEUMAN, 2000).

Basicamente, o potencial de ação é gerado a partir de “uma perturbação do estado de repouso da membrana celular, com conseqüente fluxo de íons, por meio da membrana e alteração da concentração iônica nos meios intra e extracelular” (KRUEGER-BECK et al, 2011). As manifestações bioelétricas ou eletrofisiológicas que ocorrem no corpo humano são aquelas relacionadas à condução de potenciais de ação em tecidos nervosos, em tecidos musculares e nos órgãos responsáveis pelos sentidos.

Os neurônios são as células especializadas na geração e transmissão de sinais elétricos nos tecidos nervosos. A principal característica do tecido nervoso é que a excitação celular a partir de um estímulo localizado é rapidamente transmitida às outras regiões do tecido, e o registro desse sinal pode ser feito diretamente na célula nervosa. Os potenciais gerados nos tecidos musculares são similares àqueles nos tecidos nervosos, porém seu registro só pode ser realizado a partir de grupos de fibras, o que implica na medida de uma soma de potenciais elétricos em vez de um único potencial. As células sensoriais, por sua vez, só podem ser excitadas a partir de estímulos específicos (luz, som, odor, calor, pressão, etc). Esses estímulos causam alterações elétricas nas células, as quais acabam por deflagrar a geração do impulso nervoso sensorial (GRINGS, 1954).

Além da compreensão de processos eletrofisiológicos normais, o entendimento da dinâmica de condução nervosa a partir de modelos animais experimentais e a caracterização eletrofisiológica de diferentes células possibilitam

principalmente a elucidação da fisiopatogenia de diversos transtornos. Nessa perspectiva, a Neurologia é uma das áreas médicas que mais se beneficia com estudos eletrofisiológicos. Tais estudos auxiliam a indicar o diagnóstico de desordens neurológicas, a detectar lesões estruturais no cérebro, a monitorar a integridade funcional de determinadas estruturas neurais durante um procedimento operatório, a avaliar a acuidade visual ou auditiva de pacientes incapazes de cooperar com testes comportamentais, entre outras utilidades clínicas (GREENBERG et al, 1996). Além disso, também possibilitam o desenvolvimento e a avaliação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dessas desordens. As diversas pesquisas realizadas atualmente propondo o uso de células-tronco ou o emprego de novos fármacos, por exemplo, não representariam alternativas terapêuticas às neuropatologias caso os mecanismos de excitação celular não fossem investigados (ENGEL et al, 2005)

Dentre as disfunções cerebrais mais frequentes, está a epilepsia, doença que afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo todo e é caracterizada clinicamente por alterações comportamentais súbitas conhecidas como *crises epilépticas*. A epilepsia é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma questão de saúde pública, pois é um problema que ocorre com alta frequência na população, acarreta um risco significativo de morte ou invalidez e sobrecarrega o indivíduo afetado, sua família, comunidade e a sociedade como um todo (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2012).

Apesar de serem publicados anualmente inúmeros livros e artigos científicos retratando as últimas pesquisas relacionadas ao diagnóstico e ao tratamento de diversos aspectos da epilepsia, pouco tem sido feito em relação à busca e à disseminação de estratégias que possam ter um impacto importante sobre o controle de crises epilépticas e sua prevenção. A imprevisibilidade de ocorrência de crises epilépticas expõe o paciente a danos físicos e psicológicos, causando assim um impacto negativo sobre o seu desenvolvimento social, integração e qualidade de vida em geral (ENGEL et al, 2005).

Desta maneira, é de extrema importância que sejam desenvolvidas intervenções capazes de prever e prevenir a ocorrência de crises epilépticas. Novas abordagens terapêuticas como a infusão local de drogas antiepilépticas e a estimulação elétrica direta do cérebro, por exemplo, exigem a compreensão dos

mecanismos de geração das crises (epileptogênese), do local no cérebro onde os estímulos devem ser aplicados e a determinação de que tipo de estimulação seria mais eficaz a fim de modular ou inibir a função neuronal.

Com base nessas considerações, encontra-se em andamento um projeto de pesquisa¹ realizado em acordo de cooperação bilateral entre o Brasil (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS) e a Suíça (*École Polytechnique Fédérale de Lausanne* – EPFL). O objetivo principal do projeto é desenvolver e testar sensores customizados para a investigação *in vitro* da epilepsia em fatias cerebrais humanas (*human brain slices*). Mais especificamente, os sensores empregados correspondem a matrizes multieletrodo (ou arranjos de múltiplos eletrodos, do termo em inglês *multi-electrode array* – MEA). A proposta da pesquisa baseia-se na aplicação dos sensores para a detecção de alterações eletroquímicas relacionadas aos diferentes estados elétricos do tecido epiléptico, a fim de elucidar aspectos-chave relacionados à epileptogênese.

Este trabalho, portanto, insere-se no âmbito da referida pesquisa e corresponde a um estágio anterior à execução do projeto inicialmente proposto. Desta maneira, pretende-se investigar as variáveis envolvidas na utilização das matrizes multieletrodo para o registro de sinais eletrofisiológicos *in vitro*.

1.1 Justificativa

As técnicas usualmente disponíveis em um laboratório de neurociência para o registro de sinais eletrofisiológicos *in vitro* apresentam limitações inerentes que dificultam o estudo dos mecanismos associados à epileptogênese, como a impossibilidade de se avaliar diferenças específicas de regiões (*site-specific differences*) e padrões de atividade neuronal através de fatias de cérebro. Nesse contexto, o uso de MEAs pode evidenciar as diferenças e interconexões no interior de redes de epilepsia.

¹ ***Development of Biosensors to Investigate Mechanisms of Epileptogenesis: Addressing Neglected Issues in Epilepsy.*** Este projeto atende ao edital do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico) Nº 01/2011 para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação no âmbito da cooperação científica e tecnológica com a Suíça.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar uma matriz multieletrodo (MEA) e implementar procedimentos de medidas de sinais eletrofisiológicos *in vitro* utilizando esse dispositivo.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a MEA.
- Construir a interface entre a MEA e o sistema de medida.
- Testar o uso da MEA para registro de sinais eletrofisiológicos *in vitro* através da estimulação elétrica de células em cultura.

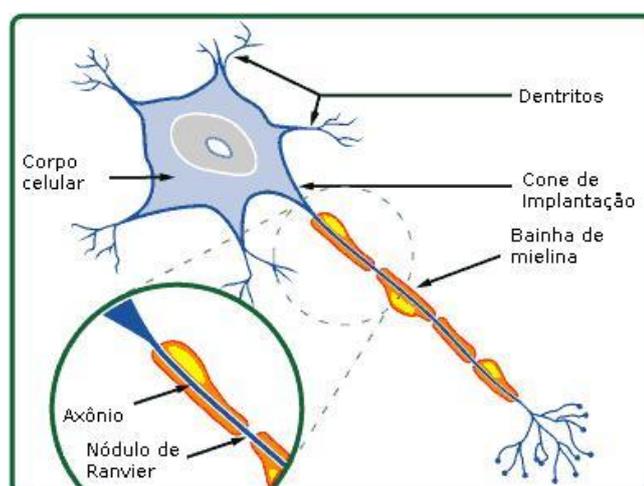
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo introduz os conceitos básicos necessários ao entendimento dos mecanismos biológicos responsáveis pela geração e transmissão de sinais elétricos no tecido nervoso e descreve os principais métodos utilizados para a estimulação de células e registro de sinais eletrofisiológicos *in vitro*.

2.1 Células neuronais

Os diferentes tipos celulares que compõem o sistema nervoso podem ser classificados de forma geral em dois grupos: neurônios e células gliais. Estima-se que existam cerca de 100 bilhões de neurônios no encéfalo humano, os quais são responsáveis principalmente pela recepção e transmissão de estímulos entre o exterior e o interior do corpo. As células gliais estão presentes no encéfalo em quantidade aproximadamente dez vezes superior ao número de neurônios, e contribuem para a atividade encefálica principalmente por isolar, sustentar e nutrir os neurônios vizinhos (BEAR et al, 2008). A Figura 1 representa de maneira simplificada um neurônio, também chamado de célula nervosa.

Figura 1 – Estrutura de um neurônio típico.



Fonte: adaptado de HowStuffWorks International, Inc. (2012).

Um neurônio típico pode ser dividido em três regiões principais: corpo celular (também chamado de soma), dendritos e axônio. Nos neurônios mielinizados, o axônio é envolto de maneira descontínua pela bainha de mielina, formada por

camadas sobrepostas de membranas de células gliais. Os espaços nos quais a bainha de mielina é interrompida, deixando pequenas regiões da membrana axonal expostas, são chamados de *nódulos de Ranvier*. Os neurônios mielinizados são comumente referidos como fibras nervosas, e feixes de fibras nervosas são chamados de nervos.

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

Os dendritos são prolongamentos do soma designados coletivamente pelo termo “árvore dendrítica”. Esse conjunto é especializado na recepção de informação, pois a membrana dendrítica é recoberta de proteínas responsáveis pela detecção de neurotransmissores na fenda sináptica (região que separa as membranas pré- e pós-sinápticas).

Os axônios, por sua vez, são estruturas altamente especializadas nos processos de transferência de informações ao longo do sistema nervoso. A parte inicial do axônio (conectada ao soma) é o cone de implantação, seguido por uma região intermediária (o axônio propriamente dito) e finalmente pelo terminal axonal. Essa extremidade faz a junção especializada, chamada de sinapse, do axônio com outros neurônios ou tipos celulares. O lado pré-sináptico é representado pelo terminal axonal, enquanto o lado pós-sináptico pode ser um dendrito ou o soma de outro neurônio, ou qualquer outra célula que faça a ligação sináptica com o neurônio. A transmissão sináptica consiste na transferência de informação através de uma sinapse, de maneira que:

[...] quando um impulso nervoso chega ao terminal axonal pré-sináptico, são liberadas moléculas de neurotransmissores das vesículas sinápticas na fenda sináptica. Os neurotransmissores então se ligam a proteínas receptoras específicas, desencadeando a geração de sinais elétricos ou químicos na célula pós-sináptica (BEAR et al, 2008, p. 39).

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

impulso nervoso. Ela recobre todo o neurônio (embora sua composição protéica varie de acordo com a região da célula), delimita o citosol dos fluidos externos e é semipermeável à passagem de algumas substâncias, como íons sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{++}), cloro (Cl^-), proteínas e glicose, entre outras (KRUEGER-BECK et al, 2011).

As proteínas inseridas na membrana neuronal podem formar dois tipos de estruturas funcionais, que são responsáveis pelo estabelecimento dos gradientes de concentração iônica: os canais iônicos e as bombas iônicas. Os canais iônicos funcionam como “portões” que se abrem e fecham através da membrana a fim de permitir ou impedir o fluxo de íons a favor do gradiente de concentração, e funcionam de maneira seletiva, ou seja, cada canal é específico (ou permeável) a determinado íon. Por sua vez, as bombas iônicas são mecanismos que gastam energia para transportar íons através da membrana contra o gradiente de concentração (BARR, 2000).

Desta maneira, o movimento de íons através da membrana neuronal pode ocorrer por dois fenômenos distintos: difusão a favor do gradiente de concentração ou diferença de potencial elétrico através da membrana. Define-se potencial de membrana (V_m - também designado potencial transmembrana) como sendo o potencial elétrico através da membrana neuronal em qualquer momento, causado pela distribuição desigual de carga elétrica (diferentes concentrações iônicas).

As diferentes concentrações de íons ao logo da membrana neuronal garantem as condições necessárias à transmissão do impulso nervoso ou potencial de ação, que representa uma breve inversão do potencial de repouso da membrana. Ambos os fenômenos serão descritos nos subitens a seguir.

2.1.1 Potencial de repouso

O potencial de repouso da membrana neuronal representa a situação na qual a membrana encontra-se polarizada, ou seja, o citosol em contato com a superfície interna da membrana possui carga elétrica negativa em relação ao exterior, e não há transmissão de impulso nervoso. Em um neurônio típico, o valor do potencial de repouso é de aproximadamente $V_m = -65 \text{ mV}$ (BEAR et al, 2008). Nessa situação, o

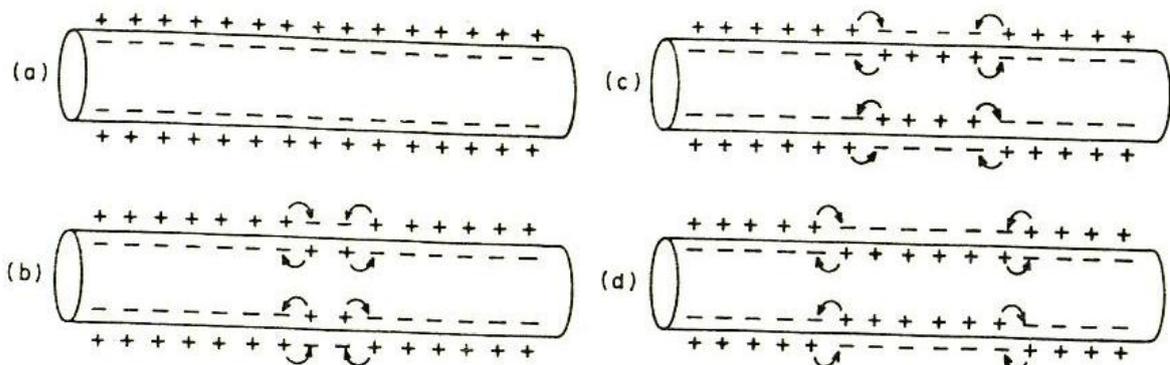
íon K^+ apresenta maior concentração no meio intracelular, enquanto os íons Na^+ e Ca^{++} apresentam maiores concentrações no meio extracelular.

A fim de manter o potencial de repouso, a atividade da bomba de sódio e potássio produz e mantém um alto gradiente de concentração de potássio através da membrana. Uma vez que a membrana neuronal em repouso é altamente permeável ao íon K^+ devido à existência de canais de potássio, o movimento do íon através da membrana, a favor do gradiente de concentração, deixa o interior do neurônio carregado negativamente (BEAR et al, 2008).

2.1.2 Potencial de ação

O potencial de ação (*spike potential*) da membrana neuronal é a situação na qual ocorre uma rápida inversão do potencial de repouso, de modo que a região da membrana em contato com o interior celular torna-se carregada positivamente em relação ao exterior celular. Essa condição, caracterizada pela despolarização da membrana, acontece devido à abertura de canais de sódio, o que permite o influxo de íons Na^+ e, por conseguinte, torna a membrana menos negativa. A repolarização, por sua vez, é causada pelo efluxo de íons K^+ da célula. O fluxo iônico através da membrana axonal está representado esquematicamente na Figura 2.

Figura 2 – Diagrama representando a geração e a propagação de um potencial de ação ao longo da membrana axonal. As setas indicam o fluxo iônico. Em (a) a membrana está em repouso; em (b) a membrana recebe um estímulo; (c) e (d) mostram a propagação do potencial de ação.



Fonte: adaptado de Damask (1978).

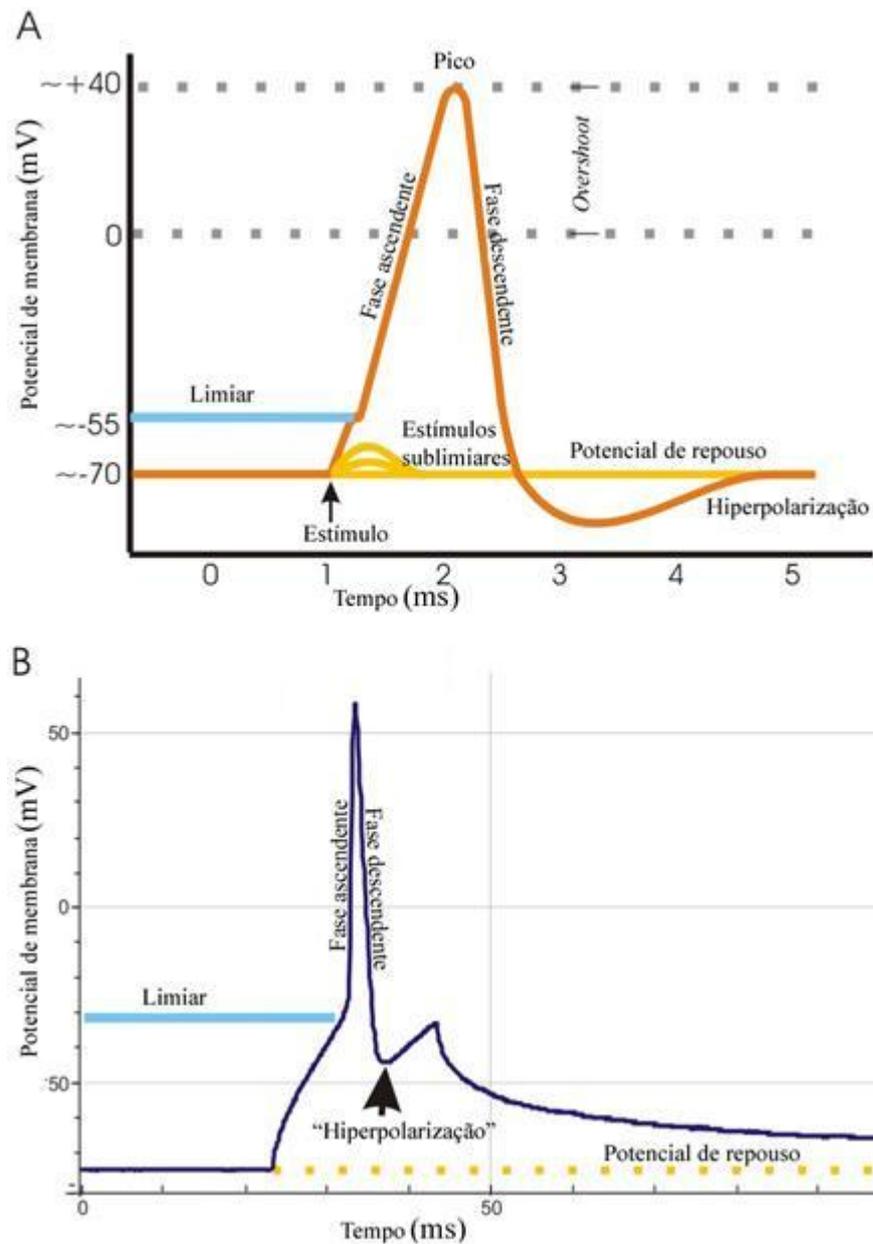
Inicialmente em repouso (situação “a”), a membrana recebe um estímulo em determinada região (situação “b”), causando o influxo de Na^+ e tornando o interior celular localmente positivo. Assim, ocorre uma redução no potencial de

membrana na região próxima ao local estimulado, provocando o efluxo de íons K^+ . Quando a diferença de potencial atingir determinado limiar, essa região da membrana se tornará permeável ao sódio e estimulará a região adjacente e assim sucessivamente (situações “c” e “d”), até que a onda de despolarização percorra toda a membrana (DAMASK, 1978).

No entanto, a geração de um potencial de ação ocorrerá somente quando a despolarização alcançar ou superar determinado nível crítico, denominado potencial limiar excitatório ou limiar de despolarização (ASSIS et al, 2010). Tal processo é conhecido como “efeito tudo-ou-nada” (*all-or-none response*), pois a aplicação de uma despolarização crescente a um neurônio não causará a transmissão de um impulso nervoso a menos que seja atingido o limiar. Em situações nas quais o neurônio sofre despolarização contínua acima do nível do limiar de despolarização, são gerados sucessivos potenciais de ação. A intensidade do estímulo despolarizante determina a taxa de geração (“frequência de disparo”) dos potenciais de ação. Além da despolarização causada pelos diferentes mecanismos biológicos de entrada de íons na célula, um neurônio também pode ser despolarizado ao receber aplicação de corrente elétrica, observando-se que a intensidade da corrente elétrica aplicada seja o suficiente para atingir o potencial limiar excitatório (PURVES et al, 2010).

O comportamento elétrico da membrana axonal durante a geração de um potencial de ação pode ser representado em um gráfico do potencial de membrana em função do tempo, conforme demonstrado na Figura 3 a seguir. O gráfico A apresenta a resposta neuronal de acordo com o modelo teórico. A fase ascendente corresponde à rápida despolarização da membrana, causada pela entrada de íons Na^+ através de canais de sódio dependentes de voltagem. O termo *overshoot* indica situação na qual o potencial de membrana é positivo, e o valor máximo (pico) atinge cerca de $V_m = 40$ mV. A fase descendente é causada pela inativação dos canais de sódio e a saída de íons K^+ através de canais de potássio dependentes de voltagem, e representa uma rápida repolarização da membrana, atingindo um potencial mais negativo do que o potencial de repouso (aproximadamente $V_m = -80$ mV). A fase de hiperpolarização representa a restauração gradual do potencial de repouso (BEAR et al, 2008; PURVES et al, 2010).

Figura 3 – Gráfico do potencial de membrana em função do tempo, mostrando as fases de um potencial de ação. O gráfico A representa o potencial de ação teórico, enquanto o gráfico B representa o potencial de ação conforme medido experimentalmente.



Fonte: adaptado de Wikipédia (2012).

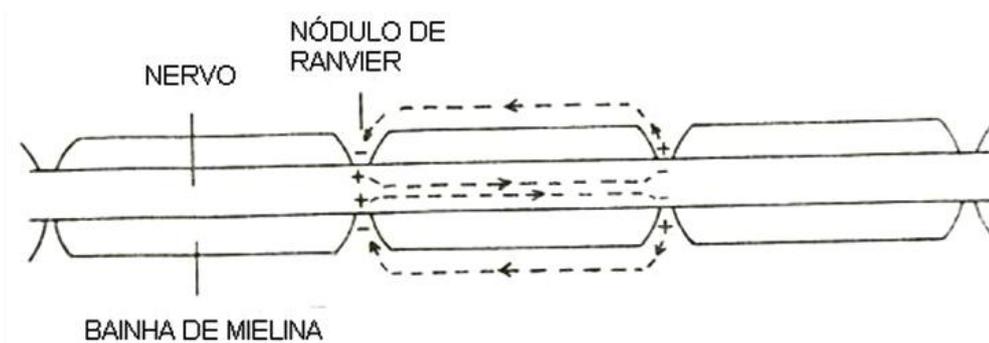
O gráfico B mostra de que modo a membrana do axônio reage à aplicação de um estímulo elétrico, conforme mensurado em um experimento de registro eletrofisiológico intracelular (esse paradigma de estimulação será explicado no item 2.4 deste trabalho). O potencial de repouso da célula considerada é de $V_m = -75$ mV, e o pulso de estimulação aplicado teve duração constante. O “limiar” indicado nos gráficos representa o potencial no qual se inicia a rápida entrada de Na^+ na célula (potencial limiar ou limiar de excitação celular). A aplicação de um estímulo

supralimiar deflagrou na célula a resposta ativa. Uma vez que o estímulo foi capaz de elevar rapidamente o potencial de membrana acima do repouso, houve uma queda acentuada da resistência da membrana. Nesse momento, ocorreu um grande influxo de íons sódio, o que tornou o meio intracelular positivo e causou a geração do potencial de ação.

O processo de condução do impulso nervoso dura em média 2 ms, contudo esse valor varia de acordo com o tipo de neurônio (KRUEGER-BECK et al, 2011). O período necessário para a membrana restaurar seu potencial de repouso é chamado de período refratário, e está relacionado às permeabilidades relativas dos íons. Durante o *período refratário absoluto*, mesmo que a membrana receba o estímulo necessário, será impossível a geração de um novo potencial de ação. Caso a célula esteja sujeita a um *período refratário relativo*, o potencial de ação ocorrerá novamente apenas mediante um estímulo muito intenso (REILLY et al, 1997).

Apesar de o impulso nervoso representar a transmissão de um sinal elétrico, as propriedades elétricas dos neurônios são fundamentalmente diferentes daquelas verificadas em um condutor metálico. Nos neurônios, a condução nervosa ocorre de maneira “muito mais lenta, regular e sem mudanças de intensidade” (ASSIS et al, 2010, p. 1307-1). Além disso, o isolamento elétrico da membrana axonal causado pelo envoltório de mielina faz com que a condução nervosa ocorra de maneira “saltatória” através da despolarização dos nódulos de Ranvier, diferindo assim fundamentalmente do fluxo de elétrons nos condutores metálicos (KRUEGER-BECK et al, 2011). O fluxo iônico através do axônio mielinizado está representado esquematicamente na Figura 4.

Figura 4 – Condução saltatória do impulso nervoso. As setas indicam o fluxo iônico através da membrana neuronal.



Fonte: adaptado de Damask (1978).

Finalmente, a informação transmitida pelo impulso nervoso é codificada no sistema nervoso através da frequência de disparo e do padrão dos impulsos elétricos transmitidos, além da distribuição e do número de neurônios disparando potenciais de ação em determinado nervo ou região cerebral (MICHELI-TZANAKOU, 2000).

2.2 Bioeletricidade

O termo bioeletricidade é comumente empregado para designar os fenômenos elétricos produzidos por organismos vivos. Nestes, os processos bioelétricos naturais são responsáveis por suas funções nervosas e musculares, resultantes das propriedades especializadas da membrana celular e que ocorrem devido a dois fatores fundamentais: as diferentes concentrações de íons nos meios intra e extracelular e a presença de moléculas especializadas (canais iônicos, bombas iônicas e transportadores de carga) capazes de transportar esses íons através da membrana (REILLY et al, 1997; BARR, 2000). A fim de avaliar os movimentos iônicos sob uma perspectiva elétrica, os principais conceitos em eletricidade envolvidos na descrição dos mecanismos subjacentes à condução nervosa são apresentados a seguir.

2.2.1 Potencial de membrana

O potencial de membrana ou potencial transmembrana (V_m) de uma célula é resultado do gradiente de concentração iônica e corresponde à diferença de potencial entre os meios intracelular e extracelular. Em células típicas o valor de V_m normalmente é da ordem de milivolts (mV ou 10^{-3} V).

Devido ao fato de a membrana ser seletivamente permeável a alguns íons, o fluxo difusional (passagem do meio de maior concentração para o meio de menor concentração) de um íon gera uma diferença de potencial elétrico entre os lados da membrana. Assim, origina-se também um gradiente de potencial elétrico, cujo fluxo elétrico resultante irá se opor ao fluxo difusional. O potencial de repouso da membrana, portanto, representa a situação na qual não há fluxo líquido de corrente (o influxo e o efluxo de íons se igualam) através da membrana, constituindo assim uma condição de equilíbrio eletroquímico. O potencial de ação, por sua, representa

uma breve perturbação desse equilíbrio, seguida pelo fluxo iônico necessário para restaurar o potencial de equilíbrio.

O potencial de equilíbrio eletroquímico V_{ion} de determinado íon representa a condição na qual o seu fluxo através da membrana é nulo e pode ser calculado pela equação de Nernst-Planck (equação 1):

$$V_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{int}} \quad (1)$$

onde R é a constante universal dos gases ($R=8,31$ J/mol.K); T é a temperatura absoluta ($T=310$ K, considerando-se a temperatura média do corpo humano); z é a carga (número de valência) do íon; F é a constante de Faraday ($F=96500$ C/mol); $[ion]_{ext}$ e $[ion]_{int}$ indicam a concentração iônica nos meios extra e intracelular, respectivamente (REILLY et al, 1997). Em concentrações diluídas, íons em soluções aquosas se comportam como moléculas gasosas. Por essa razão, a constante universal dos gases R é aplicada na modelagem do fluxo iônico celular (VARGHESE, 2000).

Por não considerar a permeabilidade iônica, a equação de Nernst-Planck supõe o equilíbrio eletroquímico para determinado íon como se a membrana fosse permeável somente a este íon. No entanto, essa situação não representa a realidade. Desta maneira, o cálculo do potencial de repouso exige que sejam consideradas também as permeabilidades relativas a cada íon envolvido no processo, conforme proposto pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz (equação 2), que prediz o valor do potencial de repouso medido experimentalmente em um neurônio:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{(P_K[K^+]_{ext} + P_{Na}[Na^+]_{ext})}{(P_K[K^+]_{int} + P_{Na}[Na^+]_{int})} \quad (2)$$

onde R , T e F são os mesmos parâmetros da equação (1); P_K e P_{Na} são as permeabilidades relativas aos íons potássio e sódio, respectivamente; $[K^+]_{ext}$ e $[K^+]_{int}$ são as concentrações do íon potássio nos meios extra e intracelulares; $[Na^+]_{ext}$ e $[Na^+]_{int}$ são as concentrações do íon sódio nos meios extra e intracelular (PURVES et al, 2010).

Tendo em vista que os canais iônicos determinam o influxo e o efluxo de íons através da membrana, e conseqüentemente são responsáveis pela manutenção da

diferença de potencial entre os meios intra e extracelular, pode-se considerar que essas estruturas moleculares atuam como baterias nas células (MDS ANALYTICAL TECHNOLOGIES, 2008). Essa analogia é elucidada pelo modelo dinâmico de Hodgkin-Huxley (HH), conforme será apresentado posteriormente neste trabalho.

2.2.2 Corrente de membrana

A corrente que flui por células está relacionada a dois fatores. O primeiro diz respeito ao fluxo de íons através de canais iônicos e obedece à Lei de Ohm, pois a corrente através da membrana é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada entre os meios intra e extracelular. O segundo fator refere-se à corrente de natureza capacitiva correspondente à estrutura dielétrica lipídica da membrana, que atua como um capacitor de membrana (VARGHESE, 2000; GARCIA, 2002). Esse aspecto será elucidado no subitem 2.2.4 deste trabalho.

Portanto, tem-se que a corrente total de membrana (I_m) é dada pela equação (3), onde I_{ion} corresponde à corrente iônica e I_c corresponde à corrente capacitiva:

$$I_m = I_{ion} + I_c \quad (3)$$

Durante o repouso, a corrente total I_m que atravessa a membrana é nula, pois o influxo de íons sódio I_{Na} é equilibrado pelo efluxo de íons potássio I_K , conforme representado na equação (4):

$$I_m = I_{Na} + I_K \quad (4)$$

A diferença de potencial que atua como gradiente causador da corrente iônica é igual à diferença entre o potencial de membrana (V_m) e o potencial de equilíbrio do íon (V_{ion}). Considerando-se que a membrana oferece resistência (R_{ion}) à passagem de determinado íon, tem-se, para Na^+ (equação 5) e K^+ (equação 6) que:

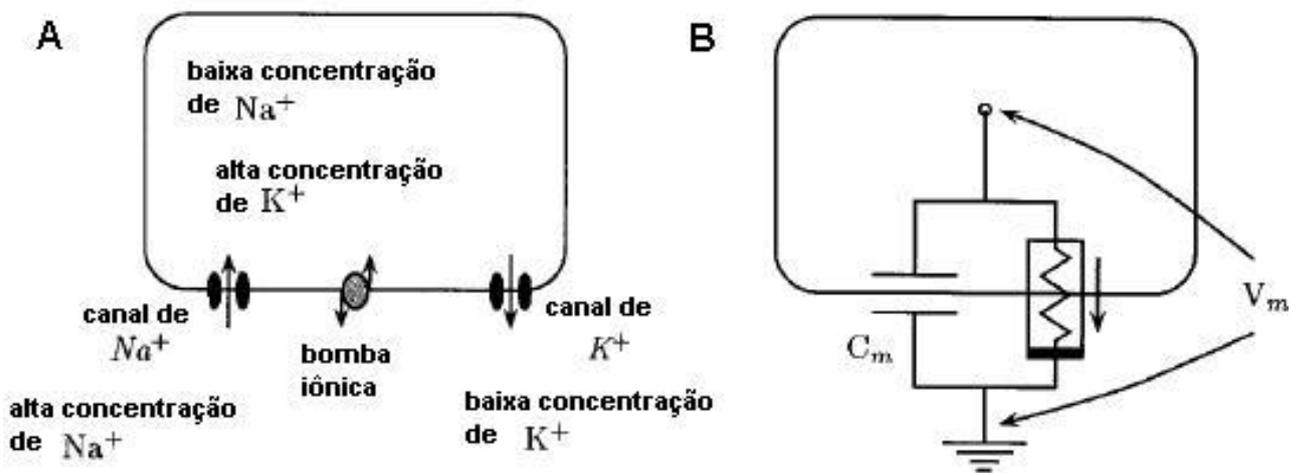
$$V_m - V_{Na} = I_{Na} \cdot R_{Na} \quad (5)$$

$$V_m - V_K = I_K \cdot R_K \quad (6)$$

Esse fluxo de corrente pode ser representado através de um circuito elétrico equivalente, conforme mostrado na Figura 5. A situação "A" representa a membrana em repouso, quando o meio intracelular se encontra negativo em relação ao meio

extracelular. Nessa situação, há baixa concentração de íons sódio (Na^+) e alta concentração de íons potássio (K^+) no interior da célula, enquanto essas concentrações são opostas no meio extracelular. As setas indicam o sentido do fluxo iônico. O circuito equivalente a esse modelo é representado em “B”, onde C_m indica a capacitância de membrana e V_m indica o potencial de membrana. Os canais iônicos são representados pela bateria do circuito.

Figura 5 – Fluxo de íons sódio Na^+ e potássio K^+ (indicado pelas setas no desenho A) através da membrana celular em repouso e circuito equivalente (mostrado em B). O símbolo V_m indica potencial de membrana e C_m indica capacitância de membrana.

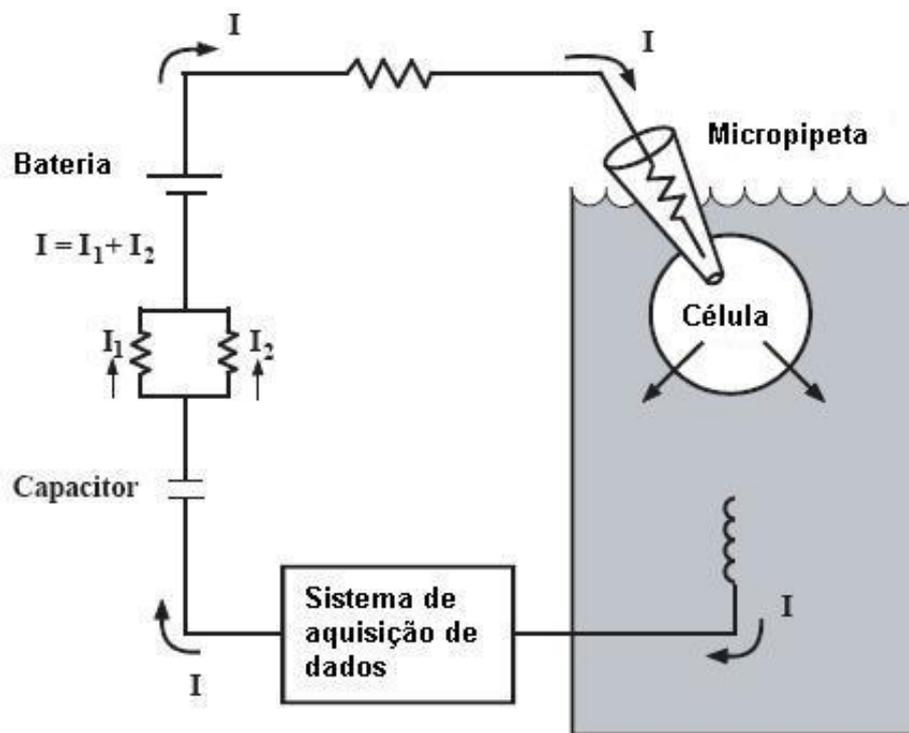


Fonte: adaptado de Varghese (2000).

Um valor típico de corrente de membrana é normalmente da ordem de picoamperes (pA ou 10^{-12}A). Por exemplo, estima-se que, quando um único canal de sódio é aberto, cerca de 10^4 íons Na^+ atravessam a membrana por segundo, o que equivale a uma corrente elétrica de $1,6\text{pA}$ (MDS ANALYTICAL TECHNOLOGIES, 2008).

Além disso, a corrente (I) que flui entre a célula e o aparato experimental, quando se realiza o estudo do potencial de membrana *in vitro*, também pode ser representada por um circuito equivalente, conforme mostrado na Figura 6 a seguir.

Figura 6 – Circuito equivalente representando o fluxo de corrente I entre uma célula e o aparato experimental para registro eletrofisiológico. As setas indicam o fluxo da corrente.



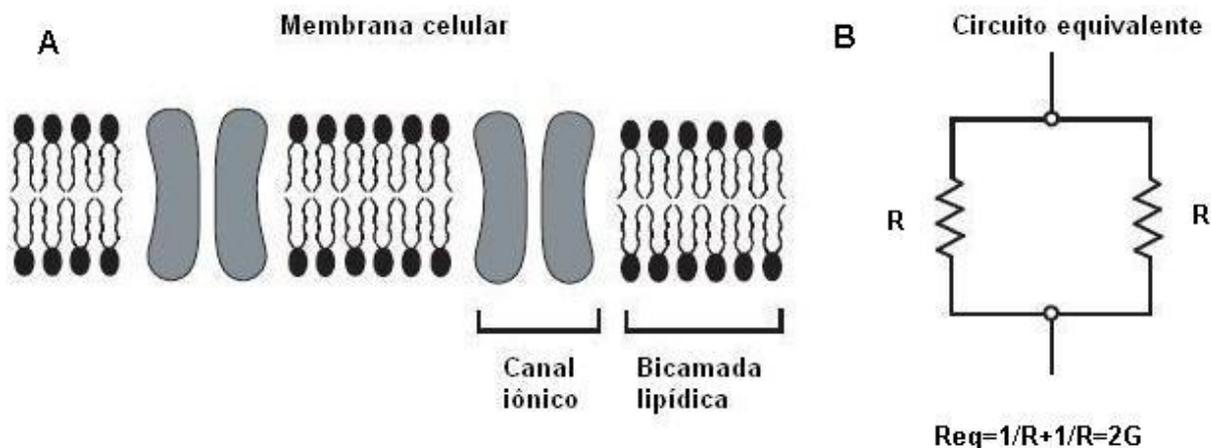
Fonte: adaptado de MDS Analytical Technologies (2008).

2.2.3 Resistência de membrana e condutância iônica

A resistência de membrana (R) está relacionada à resistência oferecida à passagem de íons através da membrana. Um valor típico é da faixa de 1.000 a $8.000\Omega \text{ cm}^2$ (GARCIA, 2002). Contudo, esse fluxo iônico é usualmente discutido em termos de condutância iônica G , que representa a grandeza inversa à resistência e está “intimamente relacionada, embora não seja idêntica, à permeabilidade da membrana” (PURVES et al, 2010, p. 46). Assim, a corrente iônica que flui através da membrana será nula quando não houver gradiente eletroquímico ($V_m - V_{\text{ion}} = 0$) e ou quando esta for impermeável a determinado íon ($G = 0$).

Durante o repouso, a condutância iônica permanece constante, e o potencial de membrana normalmente é invariável. Quando diversos canais iônicos estão abertos simultaneamente na membrana, a condutância equivalente ou total corresponde à soma das condutâncias dos canais iônicos abertos individualmente. Essa situação pode ser representada por um circuito equivalente, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Comparação entre (A) a estrutura da membrana celular e (B) um circuito equivalente evidenciando a característica resistiva da membrana em relação ao fluxo iônico. A resistência equivalente R_{eq} resultante da associação em paralelo de dois resistores é igual a duas vezes o valor da condutância G .

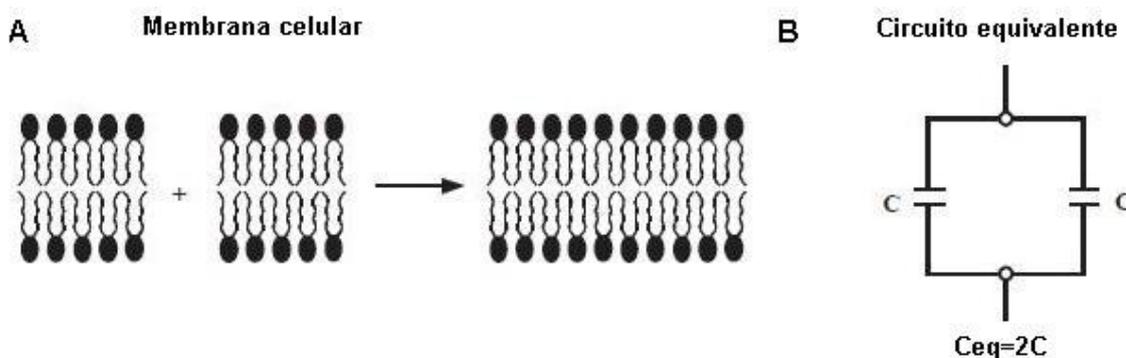


Fonte: adaptado de MDS Analytical Technologies (2008).

2.2.4 Capacitância de membrana

A configuração da membrana celular em bicamada lipídica é responsável por sua qualidade dielétrica. Essa característica, aliada à permeabilidade relativa aos diferentes íons e à assimetria na distribuição iônica entre os meios intra e extracelular permite à membrana apresentar propriedades capacitivas. Além disso, quanto maior o tamanho da célula, maior a sua propriedade capacitiva. Esse fato permite uma analogia entre a membrana celular e uma associação de capacitores em paralelo, conforme demonstrado na Figura 8. Um valor de capacitância celular típico é da ordem de $0,01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ (10^{-8} F/m^2) (MDS ANALYTICAL TECHNOLOGIES, 2008).

Figura 8 – Comparação entre (A) a estrutura da membrana celular e (B) um circuito equivalente evidenciando a característica capacitiva da membrana, análoga a uma associação em paralelo de capacitores. A capacitância equivalente (C_{eq}) é igual a duas vezes o valor da capacitância (C).



Fonte: adaptado de MDS Analytical Technologies (2008).

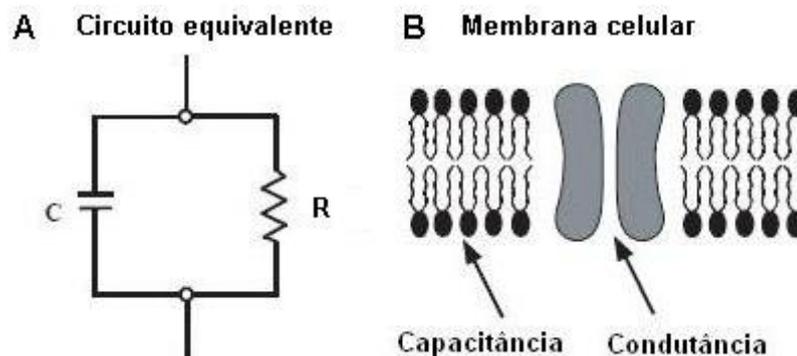
O componente capacitivo (I_c) da corrente de membrana ocorre somente durante o intervalo de tempo t no qual há variação do potencial de membrana (dV_m/dt). Assim, I_c é nulo durante o potencial de repouso, contudo deve ser considerado não-nulo durante os processos de despolarização e repolarização celular. Então a corrente que passa pelo capacitor de membrana é dada pela equação (7):

$$I_C = C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (7)$$

2.2.5 A membrana como circuito resistivo-capacitivo

As considerações apresentadas anteriormente permitem concluir que a membrana celular apresenta comportamento elétrico passivo semelhante a uma associação do tipo resistor-capacitor em paralelo (circuito RC), conforme representado na Figura 9.

Figura 9 – Circuito elétrico resistivo-capacitivo (indicado pela letra A) equivalente à membrana celular (indicada por B). R e C representam, respectivamente, a resistência e a capacitância da membrana.



Fonte: adaptado de MDS Analytical Technologies (2008).

Nesse caso, a corrente que flui através do resistor de membrana é aquela causada pelo descarregamento do capacitor de membrana, e varia conforme a equação (8), onde $q(t)$ é a carga do capacitor em um instante de tempo t qualquer; Q_m é a carga máxima do capacitor; e $R_m C_m$ é o produto entre a resistência e a capacitância de membrana e representa a constante de tempo do circuito:

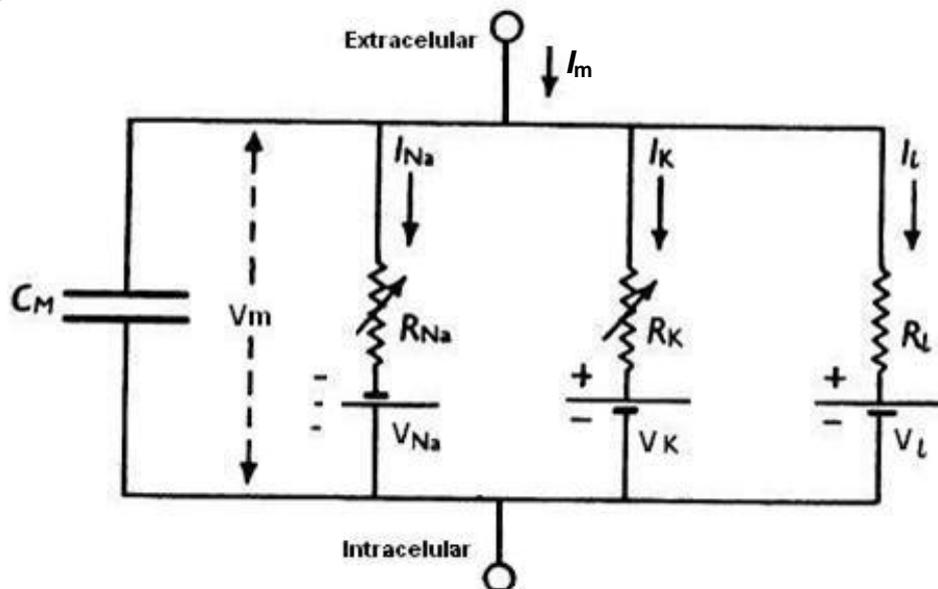
$$q_1(t) = Q_m e^{-t/R_m C_m} \quad (8)$$

2.3 Modelo dinâmico de Hodgkin-Huxley (HH)

O primeiro modelo que propôs uma explicação para a dinâmica de condução nervosa fundamentada nos mecanismos de base iônica foi o modelo desenvolvido em 1952 por Alan Lloyd Hodgkin e Andrew Fielding Huxley. Os pesquisadores ganharam o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina no ano de 1963 por esse trabalho, que serve de base até hoje para muitos outros modelos de predição da excitação e condução nervosa (KRUEGER-BECK et al, 2011).

Após realizarem estudos sobre o fluxo de corrente elétrica através da membrana de um axônio gigante de lula (*Loligo forbesi* – o axônio é dito “gigante”, pois apresenta diâmetro de cerca de 1 mm, enquanto neurônios humanos apresentam diâmetro entre 0,01 e 0,05 mm), Hodgkin e Huxley (1952) concluíram que o comportamento elétrico da membrana poderia ser descrito por um circuito equivalente conforme representado na Figura 10. O experimento que os conduziu a esse resultado será detalhado no item 2.4.2 deste trabalho.

Figura 10 – Circuito equivalente para o modelo de corrente de membrana I_m de Hodgkin-Huxley, onde C_m é a capacitância de membrana; V_m é o potencial de membrana; V_{Na} , V_K e V_L são os potenciais de equilíbrio para os íons sódio, potássio e outro íons não determinados, respectivamente; e R_{Na} , R_K e R_L são as resistências associadas aos fluxos iônicos.



Fonte: adaptado de Hodgkin e Huxley (1952).

Nessa descrição, os pesquisadores consideraram que a membrana neuronal apresentava a propriedade de armazenar cargas como se fosse um capacitor, e também era capaz de resistir ao fluxo de cargas, como um resistor. Assim, o fluxo de corrente na membrana seria possível quando o capacitor de membrana estivesse carregado ou quando houvesse movimento de íons através das baterias em paralelo com o capacitor. Ou seja, “as diferenças de concentrações dos íons atuam como baterias com forças eletromotrizes correspondentes aos potenciais de equilíbrio calculados pela equação de Nernst” (SORIANO et al, 2006, p. 29). Então V_{Na} , V_K , V_L representam, respectivamente, o potencial de equilíbrio para o íon sódio, para o íon potássio e outros íons não previamente determinados; e R_{Na} , R_K e R_L são as resistências associadas aos fluxos desses íons.

A corrente iônica total I_m é a soma das correntes iônicas resultantes do movimento de íons sódio (I_{Na}) e de íons potássio (I_K), e ainda por uma “corrente de fuga” (*leakage current* - I_L) causada por cloretos e outros íons. A corrente de fuga se apresenta como uma complicada combinação de correntes, cujos detalhes ainda não são totalmente compreendidos (HOBBIE e ROTH, 2006).

Cada componente da corrente iônica pode então ser estimado como uma diferença de potencial elétrico e um coeficiente de permeabilidade nas mesmas dimensões da condutância iônica. Desta maneira, a corrente iônica I_{ion} causada pelo fluxo de determinado íon é igual à condutância G_{ion} para este íon multiplicada pela diferença entre o potencial de membrana V_m e o potencial de equilíbrio iônico V_{ion} . Para o fluxo de sódio (9) e de potássio (10) tem-se que:

$$I_{Na} = G_{Na} \cdot (V_m - V_{Na}) \quad (9)$$

$$I_K = G_K \cdot (V_m - V_K) \quad (10)$$

O modelo HH estabeleceu as bases para o surgimento do conceito de canal iônico, até então inexistente, por constatar que as condutâncias associadas aos íons sódio e potássio eram variáveis e altamente dependentes da voltagem aplicada através da membrana neuronal. As condutividades para esses íons foram então descritas por um conjunto de equações diferenciais não-lineares capazes de prever com grande aproximação os valores medidos nos axônios gigantes de lula. Entretanto, evidências diretas da existência de canais iônicos só foram obtidas

décadas mais tarde a partir da realização do experimento desenvolvido por Erwin Neher e Bert Sakmann, conforme será detalhado no subitem 2.4.3 deste trabalho.

2.4 Registros eletrofisiológicos

Células excitáveis podem ser estimuladas ao receberem a aplicação de corrente elétrica externa. Esse fato permite o estudo *in vitro* das propriedades eletrofisiológicas de células isoladamente, quando os estímulos são aplicados em cultura celular; ou o estudo do comportamento de agrupamentos celulares, quando são utilizadas fatias cerebrais (*brain slices*) (BASHIR e VIGNES, 1997).

O registro de um potencial de ação pode ser realizado a partir de duas configurações básicas: intracelular ou extracelular. Na configuração intracelular, um microeletrodo é colocado em contato com o citosol, isto é, ocorre o “empalamento” da célula. Nesse caso, o microeletrodo deve ser pequeno o suficiente para não causar dano à membrana celular capaz de alterar seu funcionamento normal (MILLAR, 1997).

Os microeletrodos comumente utilizados para registros intracelulares são micropipetas de vidro (Figura 11), cuja haste possui diâmetro de aproximadamente 1 a 2 mm e é preenchida com solução salina concentrada a fim de proporcionar alta condutividade eletrolítica e que tem composição iônica similar ao fluido intracelular (usualmente utiliza-se cloreto de potássio - KCl). Além disso, em ambas as configurações (intracelular e extracelular), um fio metálico é inserido na micropipeta de vidro para conectar a solução eletrolítica ao circuito de amplificação e processamento do sinal eletrofisiológico captado (MILLAR, 1997).

Figura 11 – Esquema de uma micropipeta de vidro para registros intracelulares (*sharp electrode*).



Fonte: adaptado de Bretschneider e Weille (2006).

Considerando-se que o diâmetro de neurônios humanos varia de 5 μm a 50 μm , dependendo do tipo do neurônio, a ponta da micropipeta intracelular deve idealmente ter diâmetro entre 0,1 e 1 μm , a fim de se evitar ruptura brusca da membrana neuronal e o conseqüente extravasamento do conteúdo intracelular. Para

que essa ponta extremamente fina seja obtida, a micropipeta deve ser submetida imediatamente antes da utilização (devido a sua extrema fragilidade) a um “estirador” (*puller*), um equipamento especial que aquece a micropipeta e estica a parte fundida do vidro, até formar a estrutura necessária. Por essa razão, o uso da micropipeta intracelular também é conhecido como *sharp electrode technique* (“técnica do eletrodo pontudo”), e permite apenas o registro de sinais provenientes de uma única célula (*single-unit recording*) (HUMPHREY e SCHMIDT, 1991).

As micropipetas intracelulares apresentam alta resistência, que pode variar entre 10 e 500 M Ω . Esse valor está relacionado à condutividade do fluido salino usado para preencher a haste e à área seccional da ponta, e serve como referência para determinar a qualidade da micropipeta. Quanto maior a resistência obtida, maior será o ruído eletrônico gerado. Micropipetas que apresentam resistência da ordem de 50M Ω , normalmente também exibem ruído de cerca de 0,5 a 1mV (MILLAR, 1997). Consequentemente, filtros eletrônicos devem ser acoplados ao sistema de registro de sinais para diminuir o ruído do sinal captado.

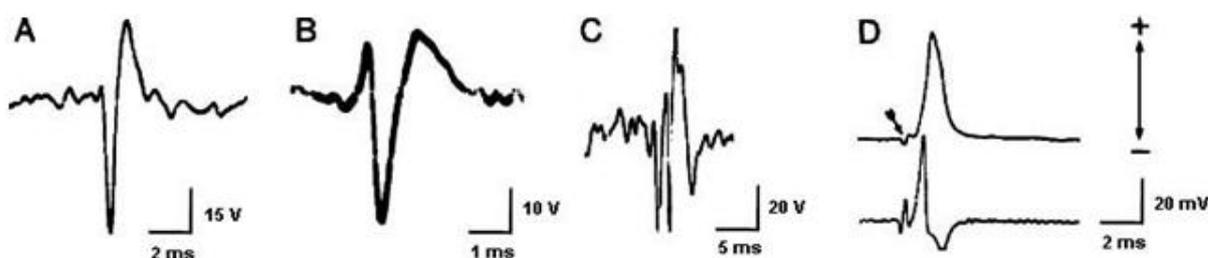
Na configuração extracelular, o eletrodo é localizado próximo à célula, mas não ocorre o empalamento. Uma vez que a atividade elétrica celular é caracterizada pelo fluxo de íons através da membrana neuronal, essa atividade pode ser detectada sem que o eletrodo penetre na célula e a danifique, o que representa uma vantagem em relação aos registros intracelulares. No entanto, a intensidade dos potenciais de ação detectados nessa situação pode ser de 10 a 100 vezes menor quando comparado aos registros intracelulares, uma vez que a detecção do sinal dependerá da localização do eletrodo em relação ao corpo celular ou ao axônio do neurônio (MILLAR, 1997).

Os microeletrodos utilizados para registro extracelular podem ser micropipetas de vidro (cujas pontas são relativamente maiores do que as micropipetas intracelulares, pois apresentam cerca de 1 a 5 μm de diâmetro) preenchidas com solução de cloreto de sódio (NaCl); ou podem ser microeletrodos metálicos, usualmente de tungstênio ou fibra de carbono. Outra vantagem da micropipeta extracelular em relação à intracelular é a possibilidade de se registrar o sinal proveniente de duas ou mais células ao mesmo tempo (*multi-unit recording*), devido ao maior diâmetro da ponta.

Normalmente, nas técnicas de registro extracelular dá-se preferência ao uso de microeletrodos metálicos, pois a alta resistência da micropipeta de vidro causa um ruído eletrônico ainda maior quando utilizada para registros extracelulares. Contudo, é necessário considerar que os microeletrodos metálicos, por serem condutores, trocam elétrons da sua superfície em contato com a solução eletrolítica, o que permite aos íons gerarem uma capacitância na solução. Assim, o registro extracelular exige que haja um controle rígido da temperatura, do pH e da concentração iônica da solução para se evitar um ruído elevado na captação do sinal (MILLAR, 1997).

Tanto na realização de registros intracelulares quanto extracelulares, as medidas elétricas podem ser realizadas de dois modos: (a) empregando-se dois eletrodos, sendo que um é utilizado para estimular e captar a resposta eletrofisiológica, e o segundo é imerso na solução que banha (*bathing medium*) a célula ou a fatia de tecido e serve como referencial terra (eletrodo de referência); ou (b) empregando-se três eletrodos, de modo que dois são dispostos sobre a cultura celular ou fatia de tecido, sendo um deles utilizado para a aplicação do estímulo e o outro para o registro da resposta eletrofisiológica, enquanto o terceiro é usado como eletrodo de referência. A Figura 12 compara a forma do sinal captado quando o registro da resposta eletrofisiológica é feito no meio intracelular ou extracelular.

Figura 12 – Registros intracelulares e extracelulares de potenciais de ação: (A) potencial de ação bifásico registrado por microeletrodo extracelular, característico de um potencial de ação não-propagado; (B) potencial de ação trifásico registrado por microeletrodo extracelular, característico de um potencial de ação propagado; (C) potencial de ação com formato de onda complexa registrado por microeletrodo extracelular, característico de uma composição de potenciais de ação produzidos pela excitação sequencial do segmento inicial e do soma de um neurônio; (D) potenciais de ação registrados por microeletrodo intracelular (a seta indica artefato resultante do estímulo aplicado).



Fonte: adaptado de Wood (2011).

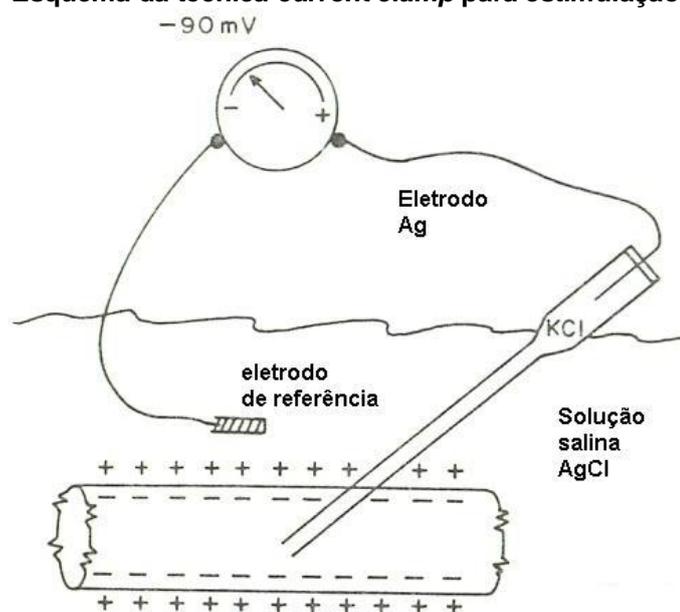
Percebe-se que os registros extracelulares (imagens A, B e C da Figura 12) apresentam picos negativos, enquanto registros intracelulares apresentam picos

positivos (imagem D). Essa diferença é devido ao fato de que, na realização de medidas extracelulares, o sinal captado representa não a atividade individual de um neurônio, mas sim o comportamento geral da população neural, chamado de *potencial de campo local*. Desta maneira, o registro do potencial de campo local fornece a diferença relativa de cargas no meio extracelular antes e após a aplicação do estímulo, causada por disparos conjuntos de potenciais de ação da população de neurônios (potencial de ação coletivo ou *population spike*).

2.4.1 Clampeamento de corrente (*current clamp*)

A técnica de *current clamp* (“método de fixação ou *clampeamento* de corrente”) consiste na estimulação nervosa através da aplicação de uma corrente (constante ou variável) por meio de um microeletrodo, seguida do registro da resposta eletrofisiológica pelo mesmo eletrodo, conforme mostra a Figura 13. Essa técnica pode ser utilizada para a obtenção de registros intracelulares ou extracelulares. Através da aplicação de corrente, o potencial de membrana é livre para variar, e o amplificador registra qualquer voltagem que a célula tenha gerado como resposta ao estímulo aplicado. O *current clamp* é muito utilizado para simular a corrente elétrica produzida pelas conexões sinápticas.

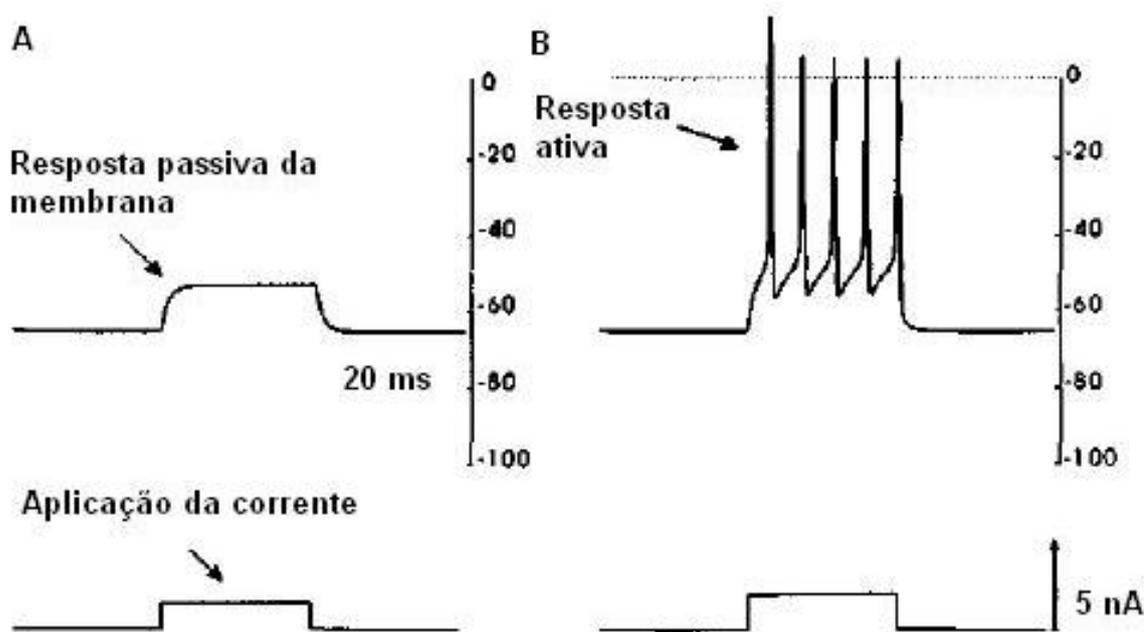
Figura 13 – Esquema da técnica *current clamp* para estimulação intracelular.



Um fio de prata (Ag) é inserido na micropipeta de vidro a fim de conectar eletricamente a solução de cloreto de potássio (KCl) ao amplificador. Fonte: adaptado de Damask (1978).

A Figura 14 demonstra as possíveis respostas eletrofisiológicas obtidas quando uma corrente é aplicada a uma célula através de um microeletrodo intracelular. A situação apresentada em A pode ser interpretada de duas maneiras: (i) a célula não é excitável, logo o sinal obtido representa apenas a resposta passiva resultante das características capacitivo-resistivas da membrana; (ii) a célula é excitável, mas o potencial aplicado não foi intenso o suficiente para atingir o limiar de excitação celular, não deflagrando assim o disparo de um potencial de ação. Por outro lado, a situação B representa a resposta obtida quando uma célula excitável (por exemplo, um neurônio) é estimulada adequadamente. A sequência de potenciais de ação gerados é determinada pela intensidade do estímulo aplicado, quando o limiar excitatório da célula é ultrapassado.

Figura 14 – Respostas eletrofisiológicas da membrana celular à aplicação artificial de corrente elétrica. A curva mostrada em A pode representar a resposta passiva de uma célula excitável ou de uma não-excitável. A curva mostrada em B indica potenciais de ação deflagrados em sequência devido à aplicação de um estímulo supralimiar.

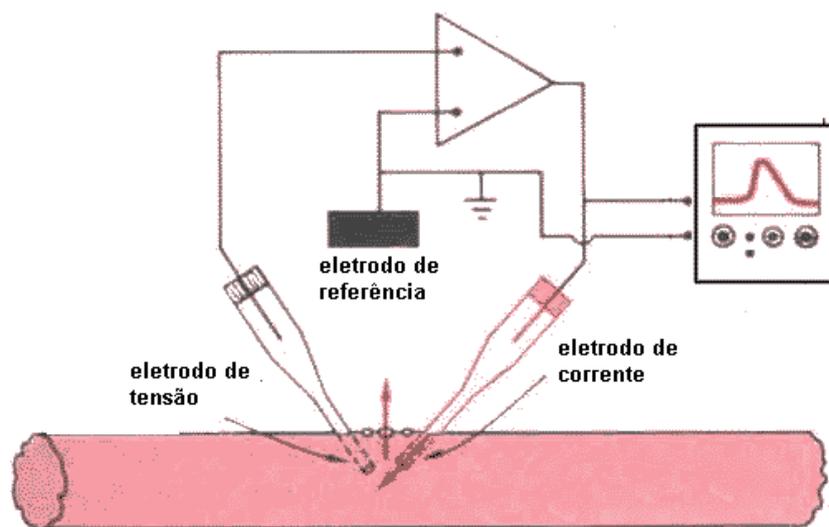


Fonte: adaptado de Huguenard e McCormick (1994).

2.4.2 Clampeamento de voltagem (*voltage clamp*)

A técnica de *voltage clamp* (“método de fixação ou *clampeamento* de voltagem”) foi desenvolvida no final da década de 1940 por Hodgkin, Huxley e colaboradores com o propósito de analisar o comportamento da membrana neuronal quando o potencial de membrana fosse mantido constante. O experimento foi realizado inserindo-se dois eletrodos metálicos em um axônio gigante de lula, um para a corrente e outro para a tensão, e um eletrodo adicional no meio extracelular como referência. A estimulação foi feita utilizando-se um amplificador com sistema de *feedback* que permitia aplicar a corrente necessária para que a tensão fosse mantida constante em um valor pré-determinado. A aplicação do método está demonstrada na Figura 15 a seguir.

Figura 15 – Esquema de aplicação da técnica *voltage clamp*.



Fonte: adaptado de EBME (2012).

A análise dos dados obtidos permitiu a Hodgkin e Huxley (1952) concluir que, variando-se a concentração iônica no meio extracelular, era possível separar a corrente iônica fluindo através da membrana nas suas componentes causadas pelo fluxo de íons, e a partir de então determinar como a permeabilidade iônica variava de acordo com o tempo e com o potencial de membrana.

Apesar de esse método não reproduzir uma condição fisiológica como o *current clamp*, seu desenvolvimento possibilitou um enorme avanço no entendimento dos processos de condução nervosa por permitir o controle do parâmetro

responsável pela abertura e fechamento dos canais iônicos. Além disso, a fixação da tensão aplicada permitiu eliminar brevemente a corrente capacitiva gerada na membrana, o que possibilitou o estudo da corrente de membrana (MDS ANALYTICAL TECHNOLOGIES, 2008). Assim, Hodkin e Huxley comprovaram que o fluxo de corrente iônica através da membrana, quando esta se encontrava despolarizada, era determinado por “três diferentes processos sensíveis à voltagem: (1) ativação da condutância de Na^+ , (2) ativação da condutância de K^+ e (3) inativação da condutância de Na^+ ” (PURVES et al, 2010, p. 48).

2.4.3 Fixação de membrana (*patch clamp*)

A técnica de *patch clamp* (“método de fixação de membrana”) foi desenvolvida por Erwin Neher e Bert Sakmann na década de 1970 com o propósito de registrar a corrente de membrana que flui por um único canal iônico, e assim investigar os mecanismos moleculares responsáveis pela geração e transmissão do impulso nervoso. Por este trabalho (SAKMANN e NEHER, 1984), os pesquisadores conquistaram o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1991.

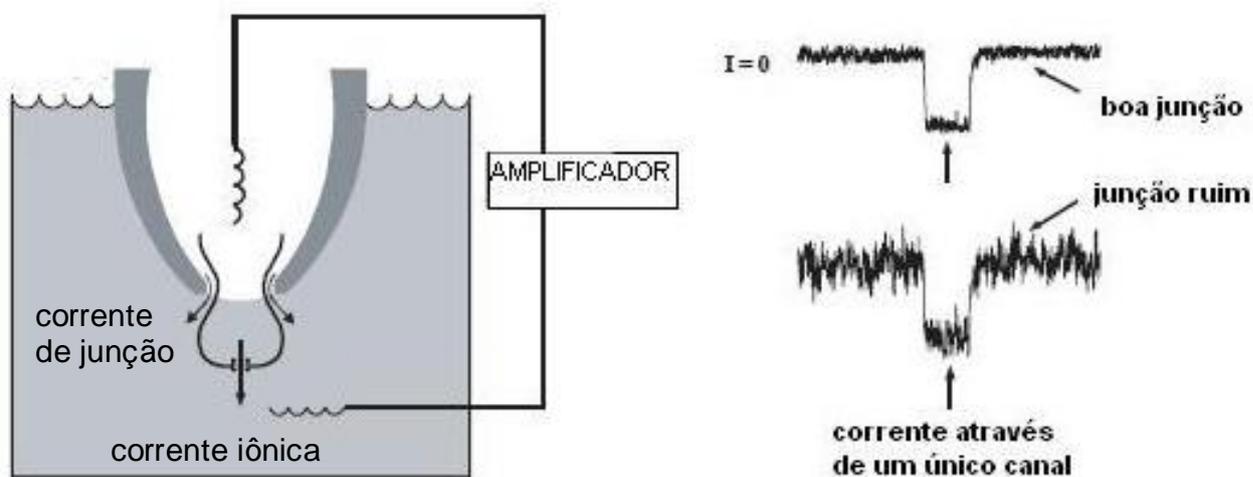
Baseado no método de *voltage clamp*, a técnica de *patch clamp* utiliza o controle experimental do potencial de membrana para caracterizar a dependência da voltagem dos canais iônicos, e permite a obtenção de registros eletrofisiológicos intracelulares sem a necessidade de se penetrar a célula. Por conseguinte, a aplicação desta técnica difere fundamentalmente dos outros métodos anteriormente empregados no estudo de potenciais de ação por exigir o uso de um aparato experimental especial.

A micropipeta de vidro deve possuir a ponta polida com cerca de 1 a 5 μm de diâmetro, e deve apresentar resistência relativamente baixa (idealmente cerca de 10 $\text{M}\Omega$). Essa micropipeta é pressionada contra a membrana neuronal e então uma leve sucção é aplicada de modo a causar a aderência firme (*tight seal*) entre a pipeta e a membrana. Caso essa aderência seja estabelecida adequadamente, a membrana em contato com a micropipeta irá formar uma junção de alta resistência (aproximadamente 50 $\text{G}\Omega$, razão pela qual essa junção é dita *gigaseal*). Essa configuração é denominada *cell-attached recording* (“método de medição aderida à célula”).

Além da micropipeta própria para a técnica, faz-se necessário também o uso de um amplificador específico, capaz de mensurar os baixos valores de corrente que

fluem por um único canal iônico. A amplitude da corrente medida está relacionada à condutância do canal iônico, e a duração da corrente depende do tempo em que o canal permanece aberto para a passagem dos íons. A Figura 16 demonstra a aplicação da técnica, e os resultados obtidos de acordo com a qualidade da aderência estabelecida entre a membrana e a micropipeta.

Figura 16 – Esquema de um arranjo experimental para a técnica *patch clamp* (à esq.). A corrente de junção representa a corrente de fuga que flui através da micropipeta, mas não flui através da membrana. Essa fuga causa um aumento no ruído eletrônico sobre a corrente medida. O sinal captado está representado à direita.

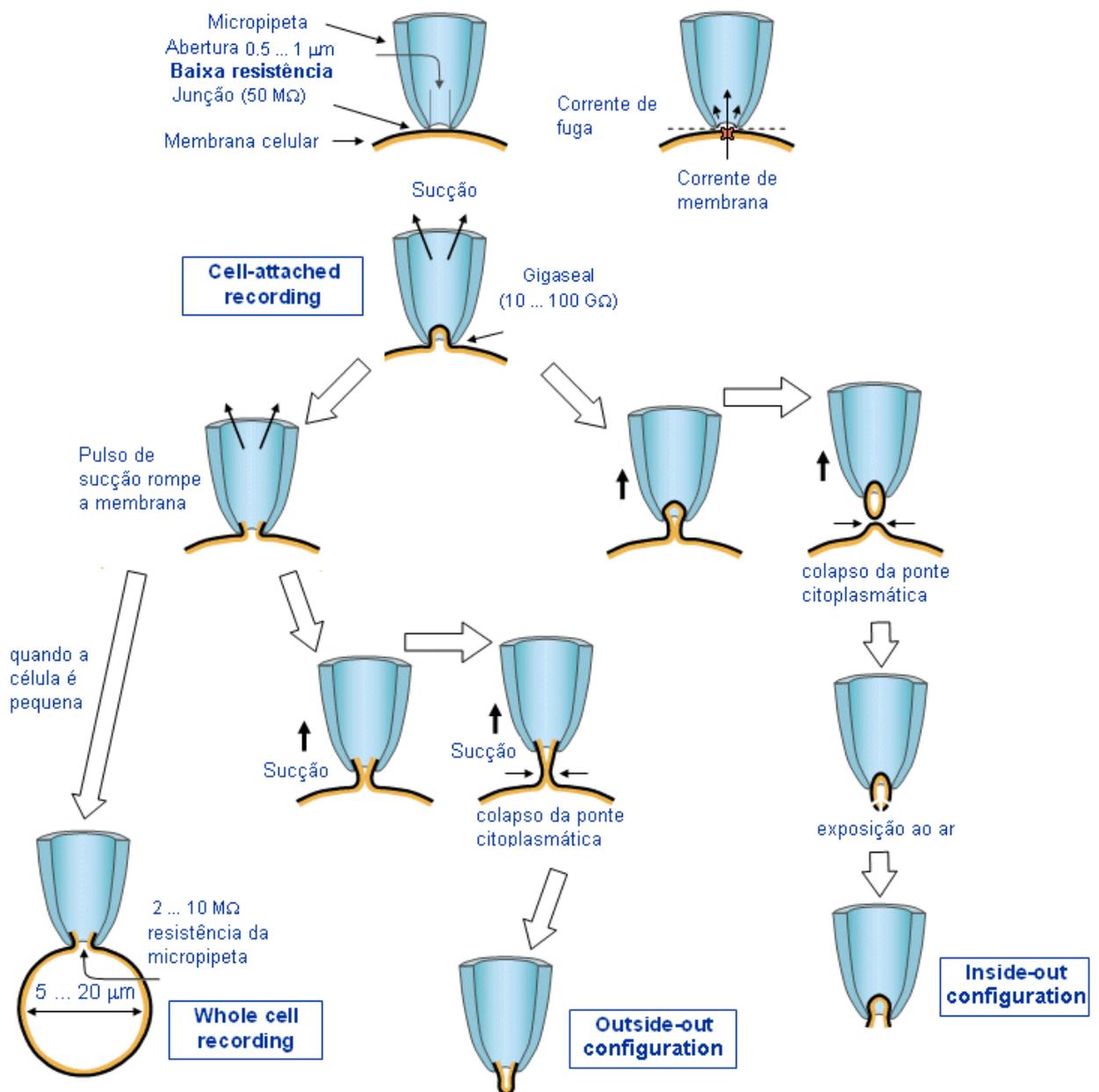


Fonte: adaptado de MDS Analytical Technologies (2008).

A partir da configuração experimental básica (*cell-attached recording*), outras três formas de medição são possíveis com o método de *patch clamp*, conforme ilustrado na Figura 17 a seguir. No modo *inside-out configuration* (“configuração de membrana com interior para fora”), após a micropipeta estar firmemente aderida à membrana, esta é rompida com a retração da micropipeta. Assim, o interior celular é exposto, o que permite o estudo da influência de moléculas intracelulares na função do canal iônico. No modo *whole-cell recording* (“método de medição da célula inteira”), a aplicação de uma sucção forte causa o rompimento da membrana neuronal, de modo que a parte interna da micropipeta se torna uma continuação do interior celular. Conseqüentemente, as medidas realizadas indicam o potencial e a corrente de toda a célula. No modo *outside-out configuration* (“configuração de medição de membrana com o exterior para fora”), após a membrana celular ser rompida pelo pulso de sucção, a micropipeta é retraída, e os pedaços da membrana

que ainda estavam aderidos à face interna da micropipeta colapsam formando uma pequena vesícula. O resultado é que essa vesícula continua aderida à micropipeta, e a face externa da membrana passa a estar conectada ao interior da micropipeta. Isso permite que o exterior da membrana celular seja exposto a diferentes soluções, possibilitando portanto a investigação do comportamento de canais iônicos ativados por receptores químicos extracelulares (SAKMAN e NEHER, 19884; PURVES et al, 2012; MALMIVUO, 2012).

Figura 17 – Diferentes configurações experimentais da técnica *patch clamp*.

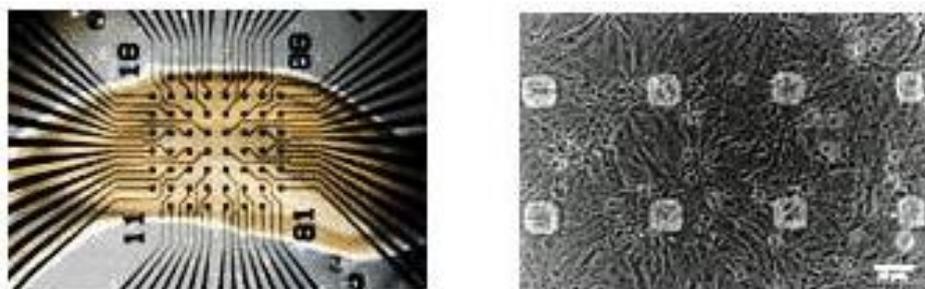


Fonte: adaptado de Malmivuo (2012).

2.4.4 Matriz multieletrodo (MEA)

Matrizes multieletrodo ou arranjos de múltiplos eletrodos (MEAs) são dispositivos utilizados para estimular e registrar *in vitro* a atividade elétrica de células e fatias de tecidos excitáveis, e consistem em microchips que apresentam configurações de microeletrodos em diversos arranjos e geometrias. O emprego desses dispositivos para a investigação em eletrofisiologia iniciou na década de 1970 (THOMAS et al, 1972; GROSS et al, 1977), a partir do estudo de culturas celulares, e no final da década de 1980 (WHEELER e NOVAK, 1986), com o uso de fatias de cérebros animais. Essas aplicações estão demonstradas na Figura 18.

Figura 18 – Aplicação da MEA para estimulação de fatia cerebral e de cultura celular. Fatia de hipocampo de rato (à esq.) e cultura de células cardíacas de rato (à dir.), sobre MEAs com diferentes configurações de microeletrodos.



Fonte: adaptado de Qwane Biosciences (2011).

As MEAs representam um “refinamento do conceito de interface bioeletrônica” (BONIFAZI e FROMHERZ, 2002²; FROMHERZ, 2003³ apud RIBEIRO, 2006, p. 50). Uma interface bioeletrônica pode ser descrita como “um sistema onde um pedaço de tecido nervoso, geralmente mantido vivo em cultura celular, é conectado a um circuito elétrico, na tentativa de estabelecer um intercâmbio bidirecional de informação” (ibidem). A condição ideal para a utilização de uma MEA diz respeito ao posicionamento da célula, que deve estar localizada sobre um eletrodo ou entre dois eletrodos. Logo, o substrato do sensor é um fator importante a ser considerado

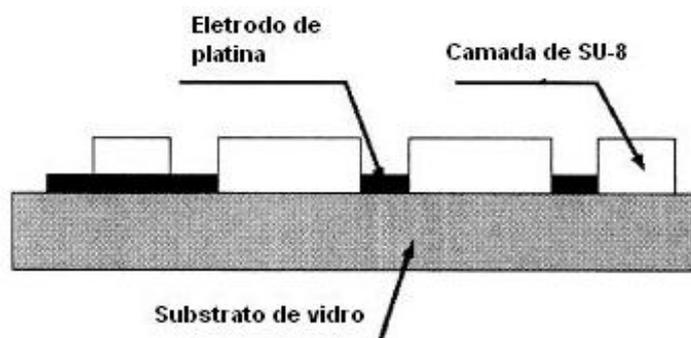
² BONIFAZI, P.; FROMHERZ, P. Silicon chip for electronic communication between nerve cells by non-invasive interface and analog-digital processing. **Advanced Materials**, v. 14, n. 17, p. 1190-1193, set. 2002.

³ FROMHERZ, P. Neuroelectronic interfacing: semiconductor chips with ion channels, nerve cells, and brain. **Nanoelectronics and Information Technology**, Berlin, p. 781-810, 2003.

durante a fabricação do dispositivo, e deve ser produzido de maneira a promover a aderência celular (RIBEIRO, 2006).

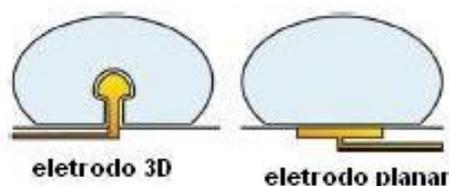
Assim, as MEAs constituem dispositivos de alta tecnologia, que são fabricados em ambiente de sala limpa através de técnicas padrão de fotolitografia, corrosão química úmida (*wet chemical etching*) e deposição de filmes finos metálicos (usualmente de platina ou de ouro) sobre um substrato de vidro ou silicone. A camada metálica é usualmente protegida da corrosão por uma camada passivadora. Os espaços abertos na camada passivadora e que deixam o metal à mostra constituem os microeletrodos (HEUSCHKEL et al, 2002). A Figura 19 mostra o esquema de um microchip fabricado pela empresa Qwane Biosciences, feito a partir da deposição de platina sobre um substrato de vidro. A camada passivadora é constituída de epóxi SU-8 com 5 μ m de espessura. Os microeletrodos podem ser fabricados em configuração planar ou 3D, conforme representado na Figura 20.

Figura 19 – Corte esquemático do microchip de uma MEA fabricado pela empresa Qwane Biosciences.



Fonte: adaptado de Heuschkel et al (2002).

Figura 20 – Esquema de células sobre MEAs com microeletrodos em configuração 3D (à esq.) e planar (à dir.).



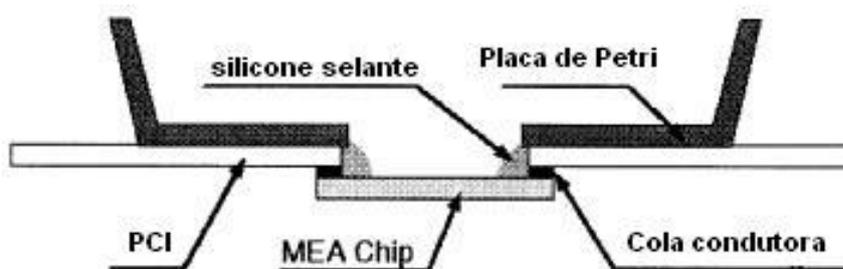
Fonte: adaptado de Hai et al (2010).

Na configuração planar, a célula permanece sobre o microeletrodo, e a resposta eletrofisiológica é captada de maneira extracelular. Na configuração 3D, pontas de vidro com cerca de 60 μ m de altura são fixadas sobre o substrato de vidro,

e então cobertas com microeletrodos de platina ou de ouro. Quando a célula é depositada sobre o microeletrodo 3D, ela fagocita a ponta, de maneira a formar uma junção de alta resistência. Essa configuração permite o registro de sinais intracelulares, ainda que o eletrodo seja extracelular, com a mesma razão sinal-ruído obtida pelas técnicas tradicionais para registro intracelular (HAI et al, 2010).

Para viabilizar a cultura celular sobre o microchip, uma câmara de registro é acoplada ao dispositivo. A câmara de registro é formada pela parte inferior de uma placa de Petri, colada sobre a placa de circuito impresso (PCI) e vedada com silicone. A aplicação de uma cola condutora garante a conexão elétrica entre o microchip e a câmara de registro, conforme demonstrado na Figura 21.

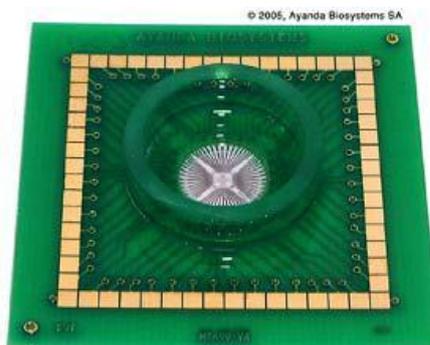
Figura 21 – Esquema da câmara de registro sobre a MEA.



Fonte: adaptado de Heuschkel et al (2002).

Finalmente, os microchips são colados sob placas de circuitos impressos que permitem a conexão com sistemas de aquisição de dados. Um exemplo é o dispositivo apresentado na Figura 22.

Figura 22 – Exemplo de uma matriz multieletrodo fabricada pela empresa Qwane Biosciences. A configuração final do dispositivo é uma placa com dimensões de 5 cm x 5 cm.



Fonte: Qwane Biosciences (2011).

As principais vantagens do uso de um dispositivo MEA em relação às técnicas tradicionais de registro eletrofisiológico são o fato de permitir o registro simultâneo da atividade de vários neurônios e de não exigir o posicionamento fino de microeletrodos sobre o tecido através de micromanipuladores, como no caso das técnicas de estimulação por *sharp electrode* e *patch clamp*. Além disso, com a MEA há a possibilidade de a cultura celular ser realizada diretamente sobre o microcircuito do dispositivo, o que fornece tempo necessário às células para aderirem firmemente às superfícies dos microeletrodos, sem que seja causado nenhum dano à membrana celular (HEUSCHKEL et al, 2002).

Contudo, as desvantagens de se cultivar células ou tecidos diretamente sobre a câmara de registro são uma possível perda do arranjo sináptico neuronal, a modificação do tecido, a diminuição da razão sinal-ruído em relação às técnicas convencionais de registro extracelular e o tempo e os custos necessários para preparar e manter a cultura, estando o processo sujeito à formação de conexões aberrantes, contaminações e outros problemas. Apesar de a junção necessária entre o microeletrodo e as células de uma fatia de tecido poder ser dificultada devido à presença de uma camada de células mortas na superfície da fatia, resultante do próprio procedimento de corte, essa dificuldade pode ser superada com uso de dispositivos MEA 3D, pois a ponta de eletrodo é capaz de atingir as camadas de células mais profundas da fatia de tecido (HAI et al, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Nanoestruturas e Nanoscopia (NANOPUC) do Laboratório de Materiais e Nanociências (LMN), localizado no Parque Científico e Tecnológico da PUCRS (TECNOPUC) e no Grupo de Pesquisa sobre Epilepsia Experimental do Laboratório de Neurociências (NeuroLab), localizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPB) do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, entre o período de abril a junho de 2012.

3.1 Procedimento experimental

O desenvolvimento deste trabalho foi dividido em quatro etapas:

- 1) Caracterização dos sensores através da obtenção de imagens por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura;
- 2) Construção de uma interface elétrica entre o sensor e o sistema de aquisição de dados;
- 3) Cultura celular;
- 4) Teste preliminar de medida elétrica *in vitro* com o sensor.

Os procedimentos realizados e os materiais utilizados em cada etapa estão detalhados a seguir.

3.1.1 Caracterização dos sensores

Os 15 sensores disponíveis para a realização deste trabalho foram inicialmente catalogados. Após a catalogação, a caracterização dos sensores foi realizada através da obtenção de imagens por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. As imagens foram obtidas no Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS.

As imagens por microscopia óptica foram obtidas por uma câmera de vídeo digital marca Motic modelo Moticam 2500 acoplada a um estereomicroscópio marca Olympus modelo SZ 51, com ampliações entre 30 e 40 vezes.

As imagens por microscopia eletrônica de varredura foram obtidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca PHILIPS modelo XL30 com resolução de 2 mm a 2 μ m, faixa de aumentos de 10 a 200.000 vezes e tensão

de aceleração de 20 kV. Para a realização das imagens, o sensor foi previamente metalizado pela deposição de uma camada de ouro sobre a MEA.

O MEV possui três detectores acoplados, sendo um para detecção de elétrons secundários (SE), um para detecção de elétrons retroespalhados (BSE) e outro para realização de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). A caracterização do sensor foi realizada através de análises qualitativas por EDS e obtenção de imagens nos modos SE e BSE.

3.1.2 Interfaceamento entre o sensor e o sistema de aquisição de dados

A segunda etapa consistiu na construção da interface entre o sensor e o sistema de aquisição de dados, de maneira a estabelecer as conexões eletrônicas necessárias para que a MEA pudesse ser usada tanto para estimular as células em cultura quanto para captar a resposta eletrofisiológica recebida.

Para tanto, soldou-se um cabo IDE 40 vias marca LU CHIANG modelo 2651 E72332 UNICAB ao sensor, de maneira que cada via do cabo IDE correspondesse a um contato da MEA. O cabo IDE 40 vias foi então acoplado a uma *protoboard* e conectado através de uma chave *dip switch* a quatro cabos de áudio-frequência de alta definição 0,50 mm² com terminais BNC da marca MULT CABO®. Estes cabos foram conectados diretamente ao sistema de aquisição de dados.

3.1.3 Cultura celular

A cultura celular utilizada neste trabalho foi a cultura de células-tronco mesenquimais humanas (*human mesenchymal stem cell* – hMSC) derivadas de medula-óssea e que foram submetidas a um protocolo de neurodiferenciação. Células-tronco mesenquimais podem ser obtidas de humanos de maneira relativamente simples, e depois de separadas podem manter-se e expandir-se *in vitro* quando cultivadas adequadamente (MARINOWIC, 2011).

As células-tronco de medula óssea foram obtidas de um paciente no Hospital São Lucas da PUCRS após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta foi realizada através de punção da medula óssea utilizando agulha de mielograma e aspiração com seringa de 20 mL contendo 5000 U de

heparina (Liquemine). Os processos realizados para separação e cultura da fração mononuclear das células obtidas são apresentados a seguir, conforme descrito por Marinowic (2011, p. 30):

Para a separação da fração mononuclear, os materiais coletados foram diluídos em meio de cultura RPMI 1640 (1:1) (Gibco). Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade gerado por centrifugação sobre Histopaque na densidade de 1,077g/L (Sigma-Aldrich) a 400g durante 30 minutos a 25°C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul de tripan 0,4%.

A fração mononuclear foi colocada em cultura em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100U/mL de estreptomicina e 100µg/mL de gentamicina, com densidade de 10^7 células por frasco. A cultura foi mantida em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂ por seis dias.

Como resultado dessa cultura obteve-se células aderentes mesenquimais. A cultura foi então tratada com 8 mL de tripsina 0,25% por 5 minutos para que as células aderentes se desprendessem do fundo da garrafa de cultura. O conteúdo foi coletado e centrifugado a 400 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado. Realizou-se a contagem da nova suspensão em câmara de Neubauer e a densidade celular do cultivo foi novamente reajustada para 10^7 células em frascos de 75 mm² (esta etapa foi caracterizada como fase I do experimento). Após, aplicou-se o protocolo de neurodiferenciação:

O método de neurodiferenciação utilizado foi adaptado a partir daquele descrito por Song *et al.* 2008 (59). As células foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,001% de β-mercaptoetanol (Gibco), 10% de soro fetal bovino, 100 U.I./mL de penicilina, 100U.I./mL de estreptomicina e 100µg/mL de gentamicina. As células foram cultivadas por um período de três dias a 37°C com 5% CO₂. O término desse período caracteriza a fase II. A seguir, as culturas foram novamente tratadas com tripsina/EDTA 0,25% e as células foram então cultivadas em meio DMEM/F12 (Gibco), 10% soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e gentamicina nas mesmas concentrações por um período de três dias, estabelecendo assim ao término desse período a fase III. As culturas foram novamente tratadas com tripsina/EDTA 0,25% e as células foram cultivadas em placas de seis poços em meio Neurobasal Medium N5 (Gibco) suplementado com 20ng/mL de fator neurotrófico derivado de cérebro (*Brain Derived Neurotropic Factor* - BDNF) (Sigma-Aldrich), 20ng/mL de fator estimulador de colônia de granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor* - GCSF) (Bergamo), soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e gentamicina. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições por um período de sete dias, estabelecendo a fase final do experimento (fase IV) (MARINOWIC, 2011, p. 32).

Após o período de neurodiferenciação, as células foram consideradas prontas para realização do teste com a MEA.

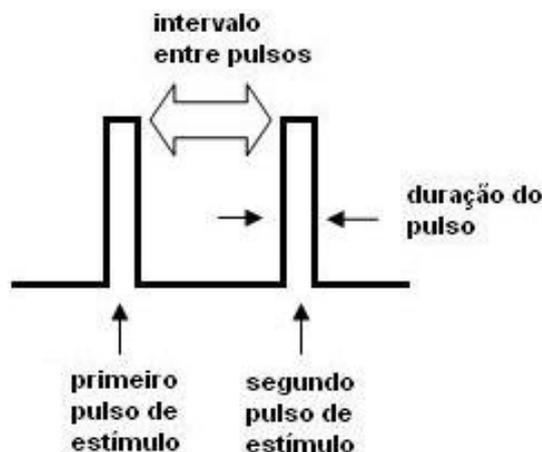
3.1.4 Teste preliminar para registro eletrofisiológico

Para que as células pudessem ser depositadas em solução de cultura sobre o sensor, acoplou-se uma placa de Petri para cultura celular marca MatTek® (*glass bottom culture dish, coverslip nº 0, espessura 0,085 – 0,13 mm*) à superfície da MEA, colando-a com o adesivo de dois componentes PÓXIPOL®. A lamínula de vidro presente sobre a base da placa de Petri foi removida antes da colagem para que a cultura celular pudesse entrar em contato com o microcircuito da MEA.

O conjunto formado pelo sensor com a placa de Petri e o cabo IDE 40 vias foi exposto à luz ultravioleta (UV) por 30 minutos para controle germicida. Em seguida, as células neurodiferenciadas foram transferidas para a placa de Petri sobre o sensor e permaneceram em repouso por aproximadamente 15 horas a fim de viabilizar a aderência celular ao substrato de vidro da MEA. Após o período de aderência, a cultura sobre a MEA foi observada com o uso de um microscópio óptico invertido marca ZEISS modelo Axiovert 25 HBO 50 W, com aumento de 10 vezes e contraste de fase Ph 1, a fim de se determinar visualmente quais microeletrodos estavam mais próximos a células, e portanto seriam utilizados para aplicação de estímulo. O registro da resposta eletrofisiológica foi feito através do microeletrodo sobre o qual a célula estimulada estava depositada.

Em seguida à escolha dos microeletrodos para estímulo e registro, a MEA foi conectada ao sistema de aquisição de dados e disposta sobre uma mesa antivibracional (usada para eliminar a trepidação do ambiente) envolta por uma gaiola de Faraday, que isola o sistema do ruído produzido pelos equipamentos eletrônicos do ambiente. A mesa antivibracional e a gaiola de Faraday são da marca Technical Manufacturing Corporation (TMC). A estimulação da cultura celular foi feita através da aplicação de pulsos pareados, conforme esquematizado na Figura 23.

Figura 23 – Esquema do paradigma de estimulação por aplicação de pulsos pareados.

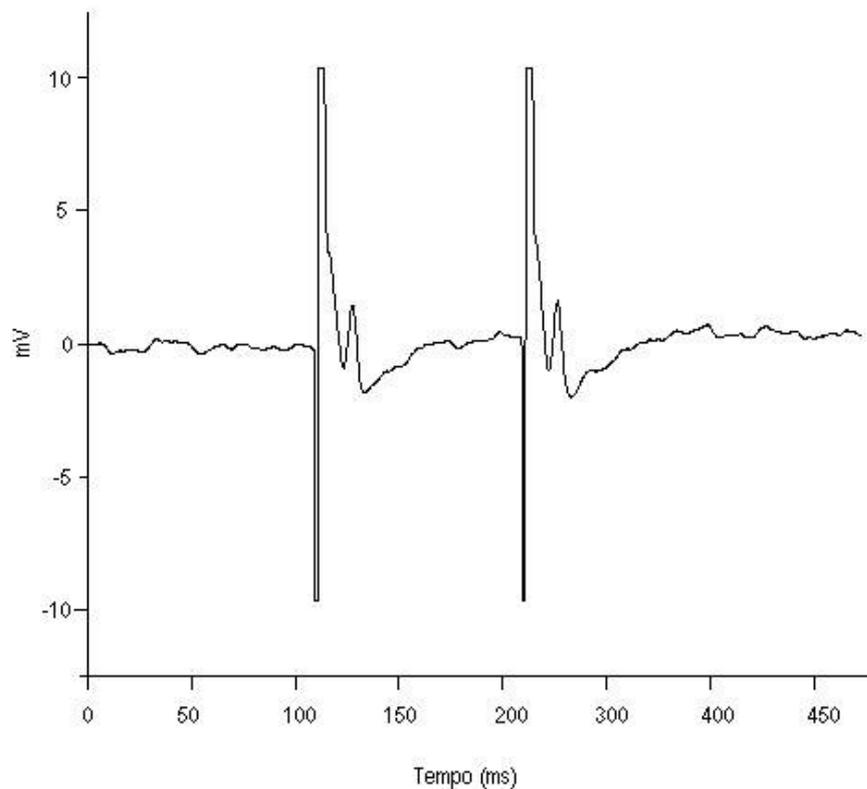


Fonte: o autor(2012)

De acordo com Salamoni (2012, p. 51), “a estimulação com pulsos pareados constitui-se num paradigma neurofisiológico amplamente utilizado para avaliar modificações extremamente rápidas na eficiência sináptica”. A partir da estimulação por pulsos pareados, pode-se registrar o potencial sináptico pós-excitatório (EPSP, do inglês *excitatory postsynaptic potencial*). O EPSP difere fundamentalmente de um potencial de ação por representar uma resposta sublimiar da membrana neuronal que decai rapidamente no tempo. Um exemplo de sinal proveniente do registro do primeiro e do segundo EPSP obtidos através da estimulação por pulsos pareados em uma população de neurônios (registro de campo) está demonstrado na Figura 24 a seguir.

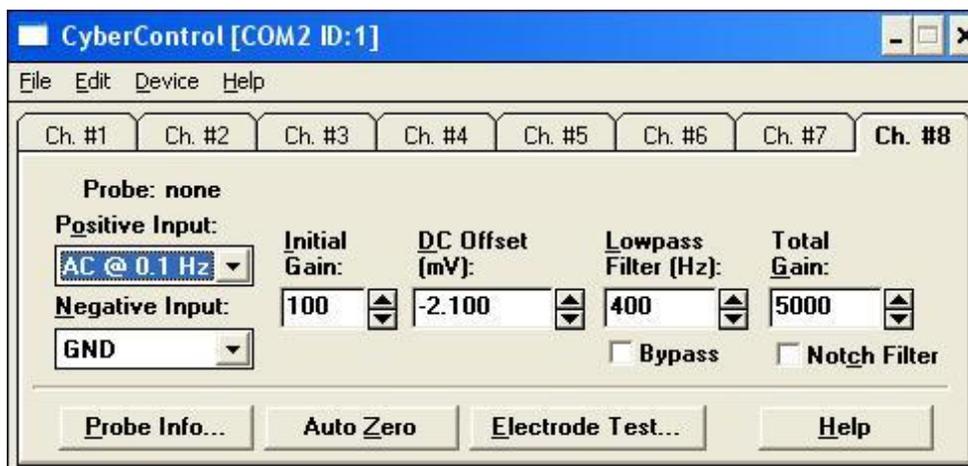
Para a realização do teste preliminar com a MEA, os pulsos pareados foram aplicados a uma frequência de 0,1 Hz e intensidade de corrente de 80 μ A, cada um com 0,2 ms de duração a intervalos variados de 10, 20, 40, 100 e 120 ms entre os pulsos. Para o registro do sinal, este foi amplificado 5000 vezes, e em seguida submetido a um filtro passa-baixas de 400 Hz e ajuste de *offset* de aproximadamente -2 mV (usado para equalizar a linha de base), conforme demonstrado na Figura 25, que representa a interface de controle de parâmetros do software CyberAmp (MOLECULAR DEVICES, 2012).

Figura 24 – Registro de campo mostrando o primeiro e o segundo potencial pós-sináptico excitatório (EPSP) obtidos através do paradigma de estimulação por pulsos pareados.



Fonte: Salamoni (2012).

Figura 25 – Interface do programa CyberAmp para ajuste de parâmetros de estimulação.



Fonte: o autor (2012).

3.2 Aparato experimental

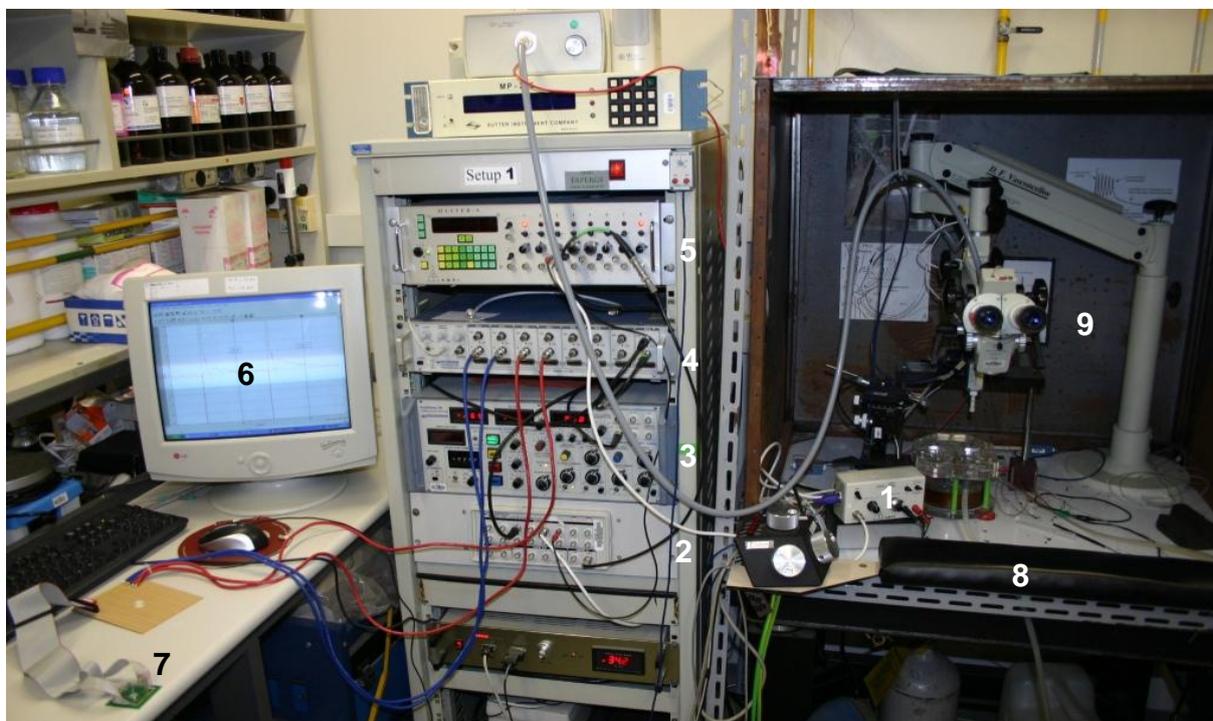
Os sensores utilizados neste trabalho são matrizes multieletrodo modelo MEA60 200 Pt fabricadas pela empresa Qwane Biosciences SA ©. Esta empresa é *spin-off* do Centro de MicroNano Tecnologia (CMI) da École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), sendo os sensores fabricados no Laboratório de Microsistemas 4 (LMIS4) vinculado à universidade.

O sensor MEA60 200 Pt consiste em um microcircuito impresso sobre um substrato de vidro (15 mm x 15 mm x 0,7 mm), no qual microeletrodos de platina são dispostos em um arranjo de matriz 8 x 8 sem os eletrodos dos cantos, totalizando 60 eletrodos, dos quais 52 são utilizados para estimulação e registro e oito são utilizados como eletrodos de referência (terra). A geometria de cada eletrodo de estimulação e registro é planar e circular com 40 μm de diâmetro e espaçamento de 200 μm entre cada eletrodo (distância de centro a centro). A impedância nominal desses eletrodos a 1 kHz varia na faixa de 600 a 800 k Ω , e o ruído eletrônico é de aproximadamente 25 a 30 μA (QWANE BIOSCIENCES, 2011).

Os registros eletrofisiológicos dos potenciais de campo foram realizados com os seguintes equipamentos, conforme ilustrado na Figura 26. A numeração apresentada indica: (1) fixador de corrente Iso-Flex A.M.P.I.; (2) Digidata 1200B (Molecular Devices, LLC), responsável pela aquisição de dados e conversão do sinal analógico em digital; (3) amplificador AxoClamp 2B (Molecular Devices, LLC); (4) condicionador de sinais programável CyberAmp 380 (Molecular Devices, LLC); (5) estimulador programável Master 8 (A.M.P. Instruments), utilizado para a estimulação elétrica através de rotinas pré-programadas, conforme a finalidade do protocolo de estudo; (6) microcomputador equipado com os softwares AxoScope 9 (Molecular Devices, LLC), para a análise em tempo real, na tela do computador, do sinal capturado, e Clampfit 9.2 (Molecular Devices, LLC), para interpretação *offline* dos traçados; (7) interface elétrica entre a MEA e o sistema de aquisição de dados (antes de o sensor ser colocado sobre a mesa antivibracional para estimulação da cultura celular); (8) mesa antivibracional e (9) gaiola de Faraday.

Os demais instrumentos utilizados foram especificados durante a descrição dos procedimentos experimentais.

Figura 26 – Fotografia mostrando arranjo experimental dos aparatos utilizados e sistema de aquisição de dados, indicados pelos números: (1) fixador de corrente; (2) conversor analógico-digital; (3) amplificador; (4) condicionador de sinais; (5) estimulador programável; (6) microcomputador; (7) sensor conectado ao sistema de aquisição de dados; (8) mesa antivibracional e (9) gaiola de Faraday.



Fonte: o autor (2012).

3.3 Análise dos dados preliminares

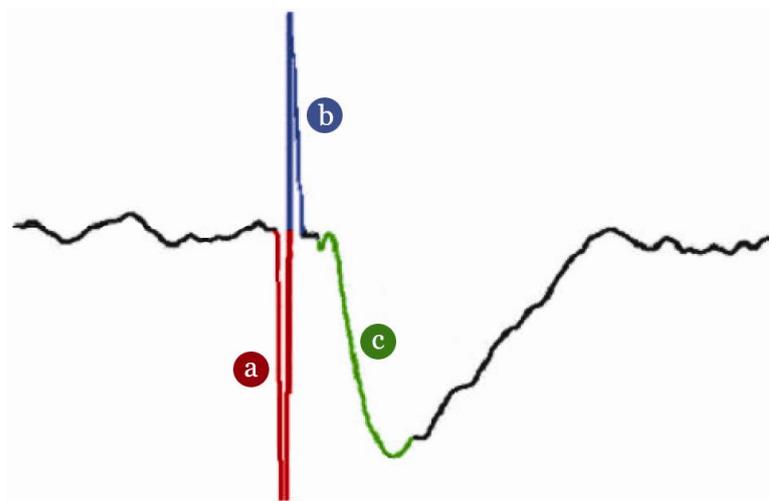
A análise dos registros obtidos durante o teste preliminar de utilização da MEA consistiu na avaliação qualitativa dos sinais registrados através da discriminação e identificação visual de potenciais sinápticos pós-excitatórios (EPSPs). A análise foi realizada a partir da visualização em tela dos registros conforme apresentados pelo software Clampfit 9.2 (MOLECULAR DEVICES, 2012).

Os EPSPs são representados por uma curva de deflexão característica do braço descendente do sinal registrado. Essa curva está demonstrada e especificada na

Figura 27 a seguir. A região identificada pela letra “a” representa o pulso negativo gerado pela aplicação artificial do impulso elétrico; a região identificada pela letra “b” representa a resposta passiva gerada pelo componente capacitivo da

membrana celular; e a região identificada pela letra “c” representa a curva característica de um EPSP, causada pela resposta ativa da membrana celular.

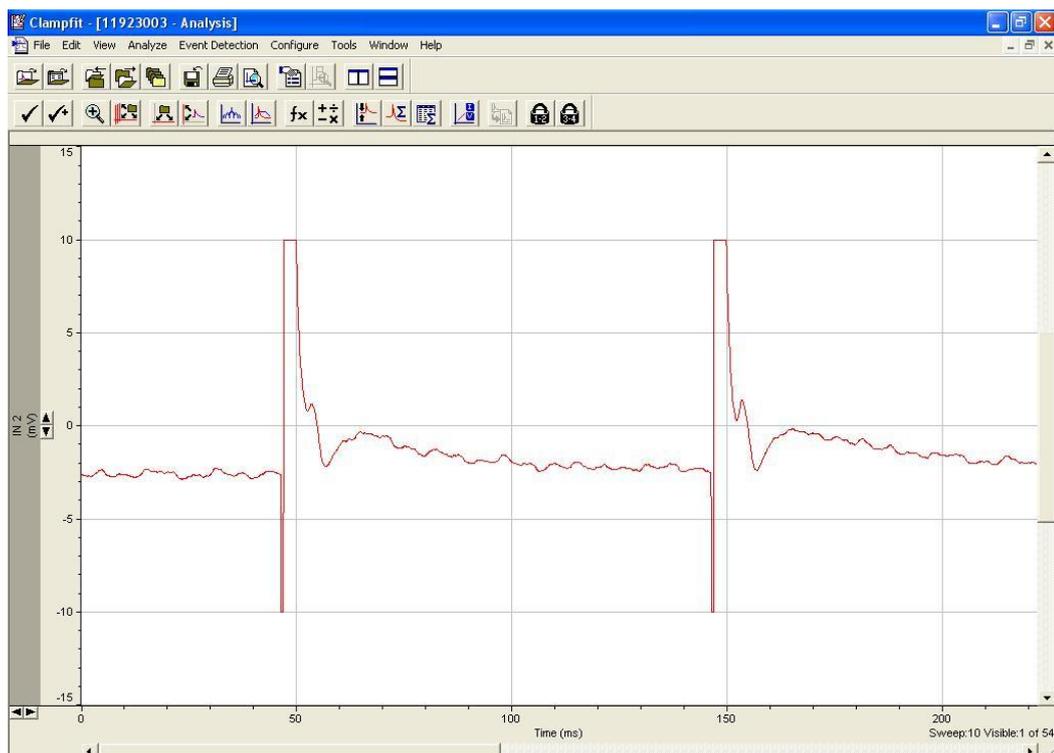
Figura 27 – Esquema mostrando as partes do sinal obtido em um registro de campo. As letras indicam: (a) pulso de aplicação do estímulo; (b) resposta celular passiva causada pelo componente capacitivo da membrana; e (c) curva de deflexão característica de um EPSP, causada pela resposta ativa da membrana.



Fonte: o autor (2012).

A Figura 28 apresenta a interface do software Clampfit 9.2, mostrando a visualização de um dos registros obtidos. O gráfico apresenta o potencial de membrana (IN2) em função do tempo.

Figura 28 – Interface do software Clampfit 9.2 exibindo registro obtido pela estimulação da cultura celular sobre a MEA por aplicação de pulsos pareados.



Fonte: o autor (2012).

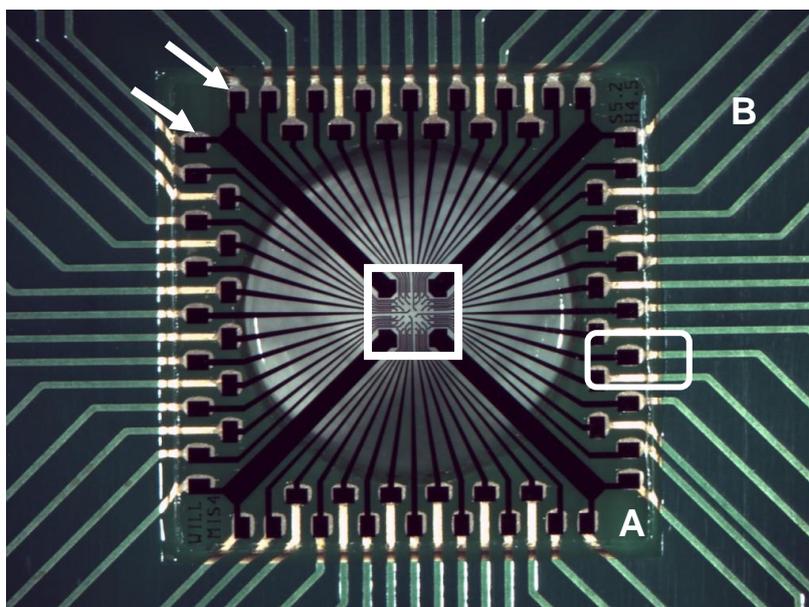
4 RESULTADOS

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

4.1 Caracterização dos sensores

A imagem mostrada na Figura 29 apresenta a estrutura do microcircuito da MEA, na qual é possível identificar o substrato de vidro (indicado na figura pela letra A) colado sob a placa de circuito impresso (indicado pela letra B). A imagem mostra a parte inferior do dispositivo, de maneira que é possível observar a conexão entre os 60 sensores do microcircuito e a placa de circuito impresso (região delimitada na imagem pelo retângulo lateral). Observa-se que os oito eletrodos terra se combinam em pares (indicados pelas setas) de maneira a formar quatro eletrodos de referência na região central do microcircuito (região delimitada pelo quadrado central).

Figura 29 – Visão geral do microcircuito da MEA. A letra A indica o substrato de vidro e a letra B indica a placa de circuito impresso (PCI). A região delimitada pelo retângulo indica a conexão entre o microeletro e a PCI; a região delimitada pelo quadrado mostra a parte central do microcircuito. As setas indicam um dos quatro pares de eletrodos terra.

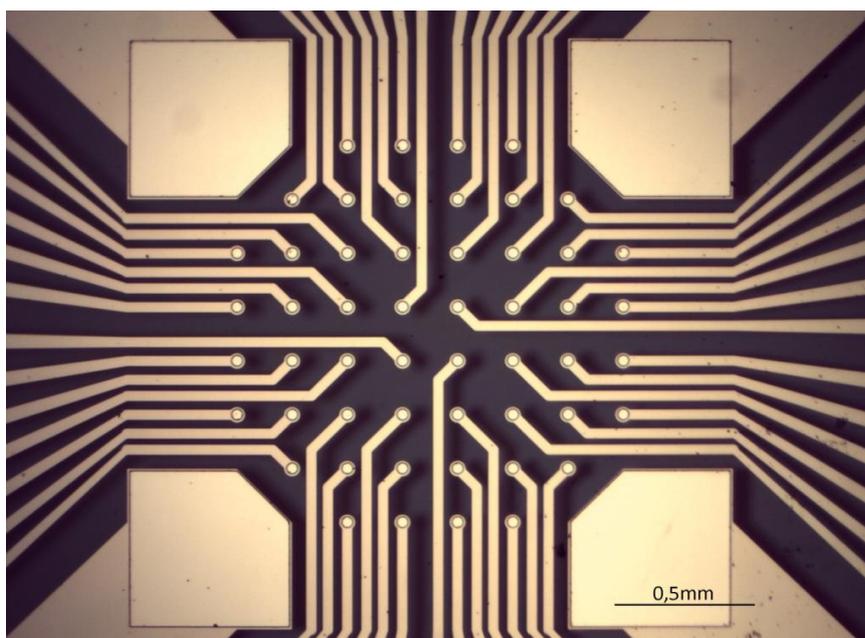


Fonte: o autor (2012).

A região central delimitada pelo quadrado na Figura 29 é mostrada ampliada na Figura 30, porém obtida a partir do lado superior da MEA (lado sobre o qual é

depositada a cultura celular). A imagem a seguir permite identificar o arranjo dos 56 microeletrodos que formam a parte central do microcircuito, dispostos de maneira simétrica sobre a MEA. Os eletrodos menores (circulares) são os eletrodos de estimulação e registro. Os eletrodos maiores (dos cantos) são os eletrodos terra.

Figura 30 – Arranjo dos microeletrodos da MEA mostrado por microscopia óptica.



Fonte: o autor (2012).

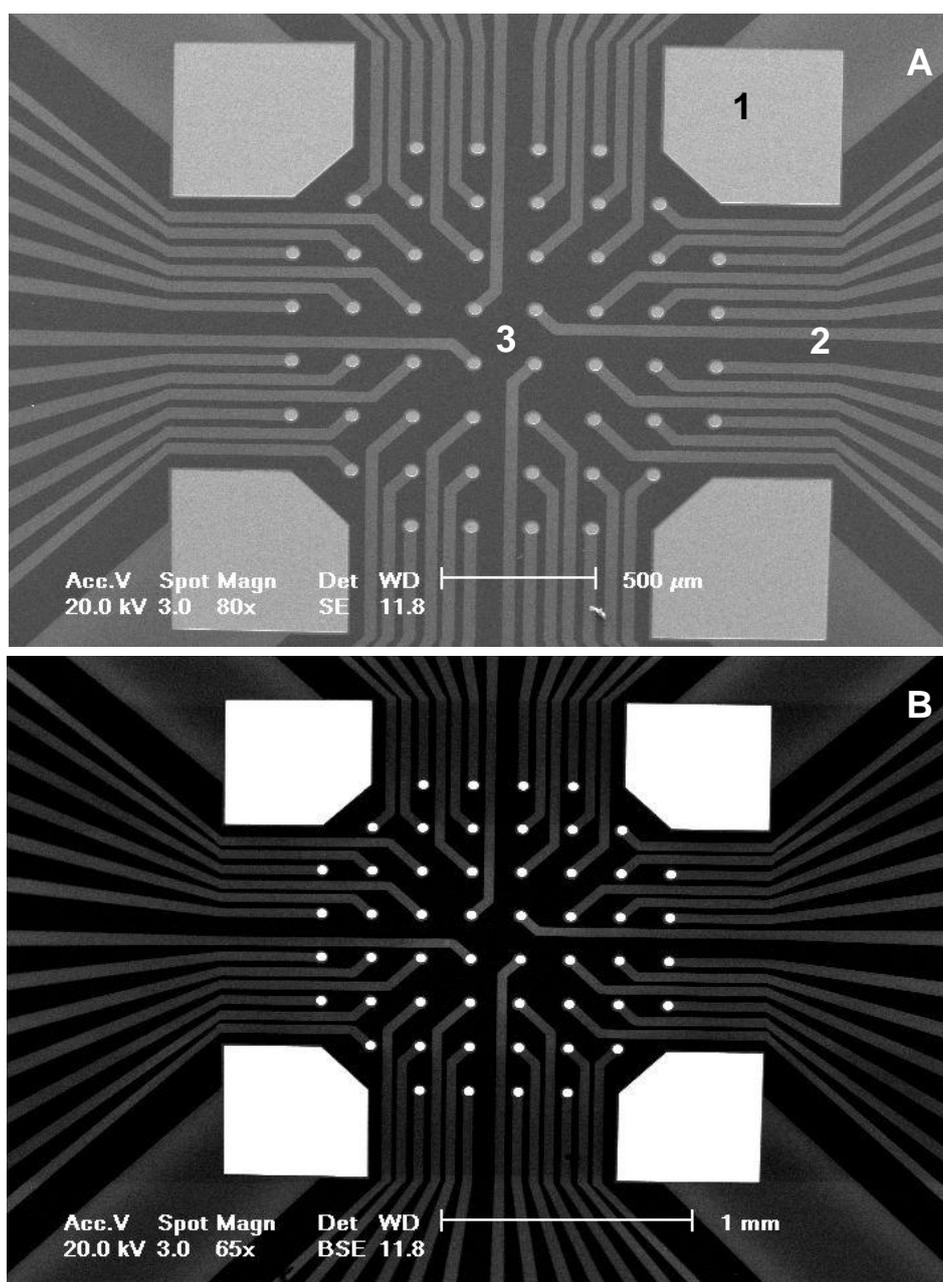
As imagens obtidas por microscopia óptica mostraram que todos os sensores analisados apresentam estrutura semelhante e regular, sem presença de falhas ou anormalidades. Desta maneira, optou-se por realizar as imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de apenas um dos sensores disponíveis.

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

As imagens mostradas na Figura 31 a seguir apresentam a mesma perspectiva geral do arranjo dos microeletrodos da MEA obtida na imagem por microscopia óptica, porém a partir de imagens obtidas por microscopia por varredura eletrônica no modo SE (imagem A) e no modo BSE (imagem B). A imagem por BSE permite inferir que os microeletrodos e as trilhas do microcircuito são formadas por

elementos com maior peso atômico em relação ao substrato de vidro, formado por elementos com pesos atômicos mais baixos.

Figura 31 – Arranjo dos microeletrodos da MEA mostrado por microscopia eletrônica de varredura obtida nos modos SE (imagem A) e BSE (imagem B). O número 1 indica um microeletrodo, o número 2 indica uma trilha do microcircuito e o número 3 indica o substrato de vidro.

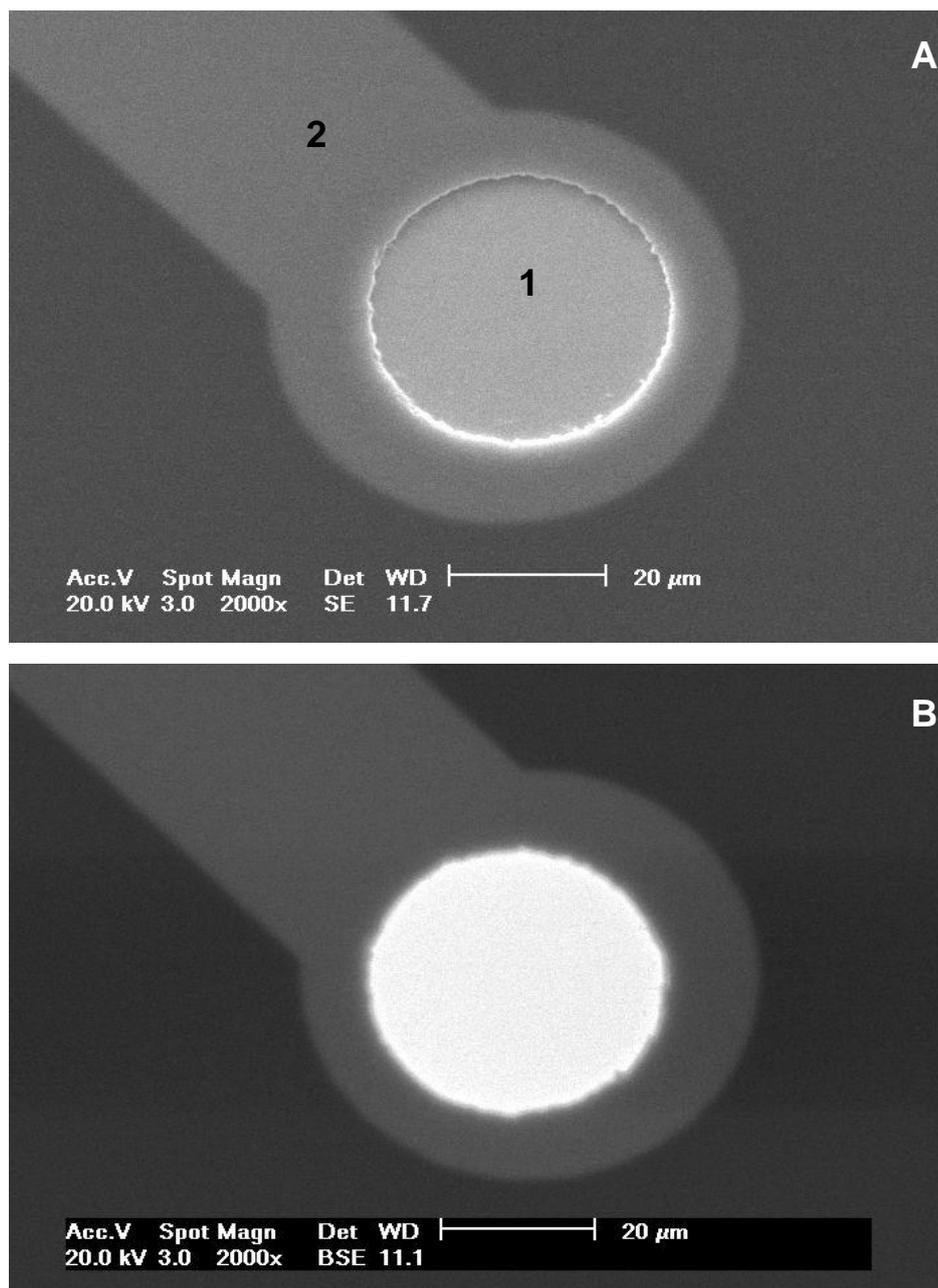


Fonte: o autor (2012).

As imagens obtidas nos modos SE (imagem A) e BSE (imagem B) mostradas na próxima figura (Figura 32) permitem observar de maneira mais detalhada um dos microeletrodos de estimulação e registro. A imagem A

evidencia a geometria planar e circular do microeletrodo, enquanto a imagem B evidencia o contraste entre o microeletrodo (indicado pelo número 1) e a trilha do microcircuito (indicada pelo número 2).

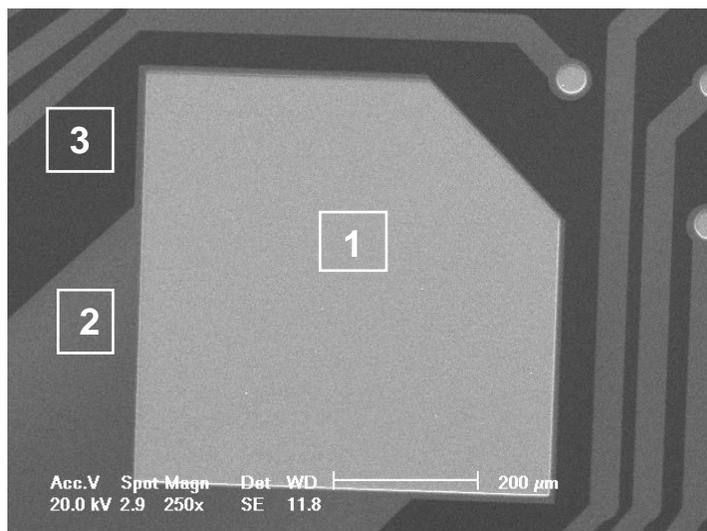
Figura 32 – Imagens de um microeletrodo de estimulação e registro obtidas por MEV nos modos SE (imagem A) e BSE (imagem B). O número 1 indica o microeletrodo e o número 2 indica a trilha do microcircuito.



Fonte: o autor (2012).

A identificação qualitativa dos elementos químicos presentes no sensor foi feita por EDS. As regiões da MEA às quais se aplicou EDS, conforme ilustrado na Figura 33, foram: (1) microeletrodo; (2) trilha do microcircuito; e (3) substrato.

Figura 33 – Detalhe de um microeletrodo terra mostrado por MEV no modo SE. As marcações na imagem indicam as regiões da MEA nas quais se aplicou identificação de composição química por EDS: (1) microeletrodo; (2) trilha do microcircuito e (3) substrato.



Fonte: o autor (2012).

Os resultados obtidos (conforme mostrado nas Figuras 34 e 35) indicaram que o elemento químico predominante no microeletrodo é a platina; a trilha do microcircuito é composta basicamente por ouro; e o substrato é formado predominantemente por silício. A presença de ouro na composição do substrato é possivelmente referente à metalização do sensor.

Figura 34 – Identificação por EDS da composição química do substrato do sensor. O resultado indica predominância de silício (Si) e menores quantidades de carbono (C) e oxigênio (O). A presença de ouro (Au) é causada pela metalização do sensor. O gráfico representa o número de contagens (eixo y) por energia (eixo x) da ordem de kilovolts (kV).

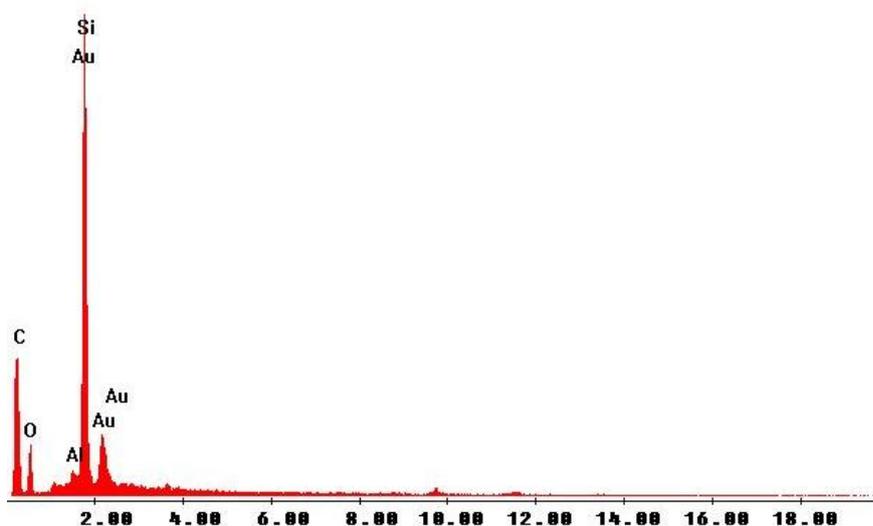
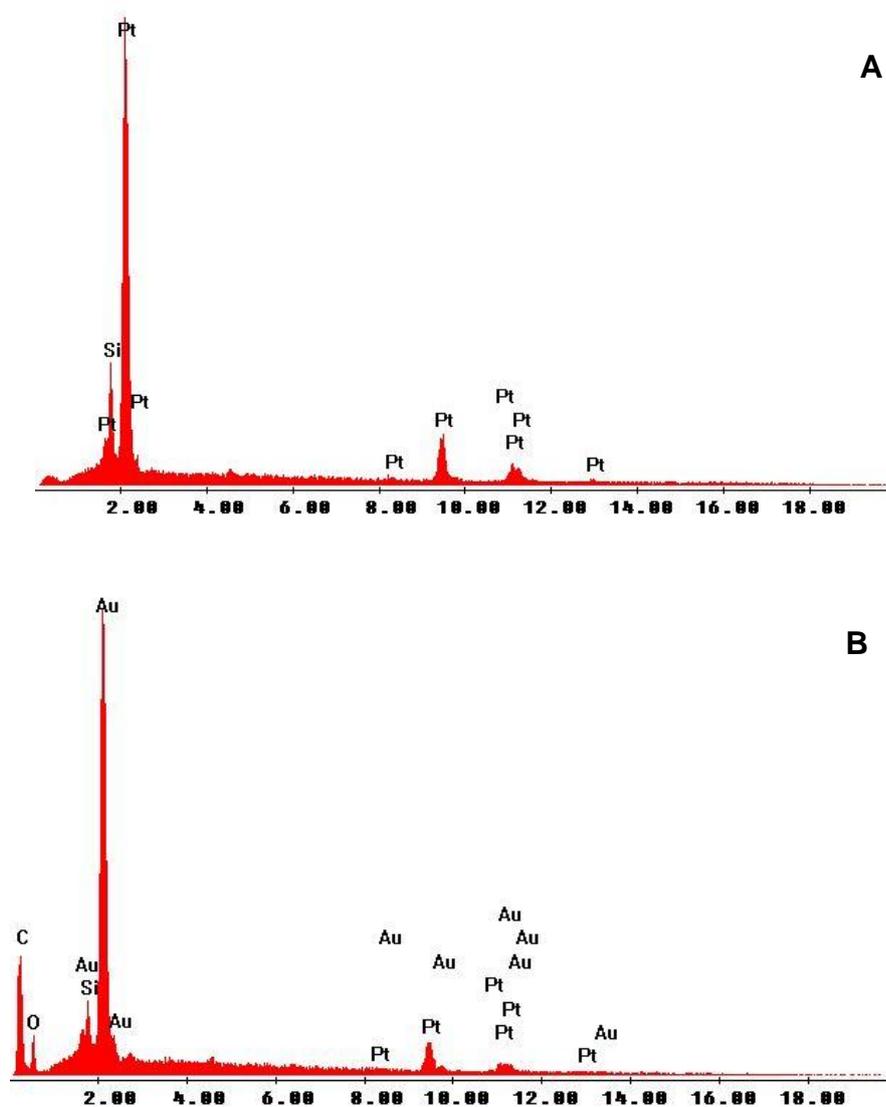


Figura 35 - Identificação por EDS da composição química do microeletrodo (imagem A) e da trilha do microcircuito do sensor (imagem B). O resultado indica predominância de platina (Pt) no microeletrodo e predominância de ouro (Au) na trilha, com menores quantidades de carbono (C) e oxigênio (O). Os gráficos representam o número de contagens (eixo y) por energia (eixo x) da ordem de kilovolts (kV).

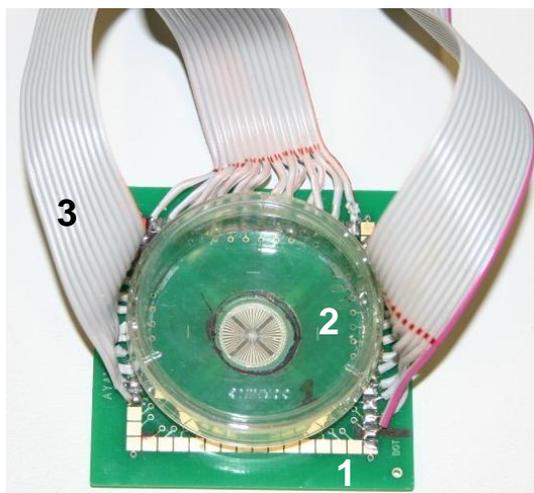
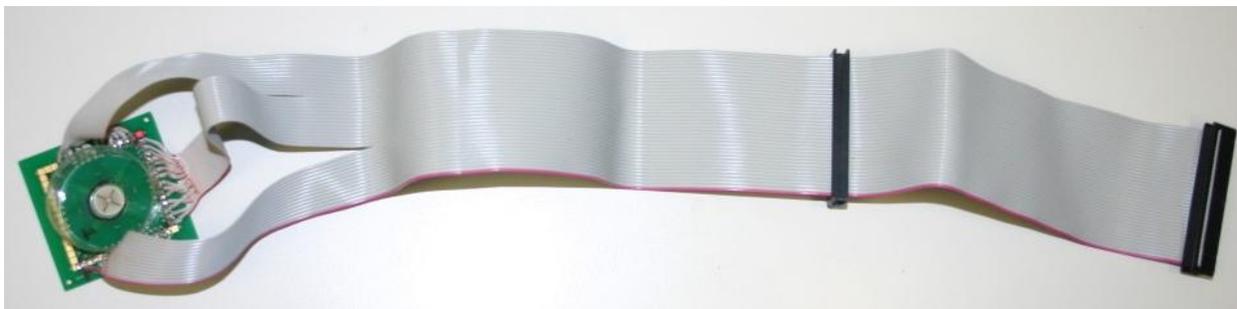


Fonte: o autor (2012).

4.2 Interfaceamento entre o sensor e o sistema de aquisição de dados

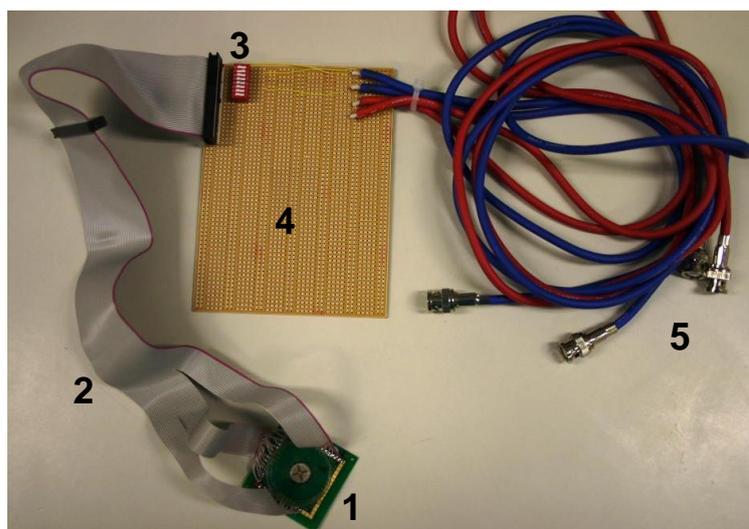
A configuração final do conjunto formado pelo sensor, a placa de Petri e o cabo IDE 40 vias é mostrada na Figura 36 a seguir (imagem A). A interface total construída para conectar o sensor ao sistema de aquisição de dados é mostrada na Figura 37.

Figura 36 – Configuração experimental construída para utilização do sensor, mostrando a MEA (1), a placa de Petri (2) e o cabo IDE 40 vias (3).



Fonte: o autor (2012).

Figura 37 – Interface entre o sensor e o sistema de aquisição de dados. A numeração indica: (1) sensor; (2) cabo IDE 40 vias; (3) chave *dip switch*; (4) *protoboard*; (5) cabos com terminais BCN.



Fonte: o autor (2012).

Apesar de 40 microeletrodos terem sido conectados através do cabo IDE à interface eletrônica com o sistema de aquisição de dados (conforme é possível

observar na imagem B da Figura 36), apenas oito puderam ser efetivamente utilizados, devido à limitação do número de contatos da chave *dip switch*.

4.3 Cultura celular

Foram realizadas tentativas de neurodiferenciação das células coletadas, contudo apenas uma delas foi completada com sucesso. Desta maneira, a realização do teste estimulação da cultura celular sobre a MEA foi possível somente em caráter preliminar.

4.4 Teste preliminar para registro eletrofisiológico

A partir da avaliação visual dos registros obtidos, constatou-se que a deflagração de potencias de campo excitatórios (EPSPs) variou de acordo com o intervalo de tempo entre a aplicação dos pulsos pareados. Em geral, nos intervalos de 10 e 20 ms, somente o segundo pulso aplicado causou a geração de um EPSP, porém de baixa intensidade; no intervalo de 40 ms, os registros mostraram que houve ou a geração de EPSPs em ambos os pulsos ou em nenhum deles; nos intervalos de 100 e 120 ms a deflagração de EPSPs foi evidente.

A Figura 38 e a Figura 39 apresentam registros obtidos com intervalo de tempo de 10 e 20 ms, respectivamente, nos quais é possível perceber a aplicação dos pulsos pareados e a subsequente resposta capacitiva da membrana seguida da resposta ativa. É possível observar a curva de deflexão característica de EPSP (indicada pela seta) somente após a aplicação do segundo pulso.

Figura 38 – Registro obtido após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de 10ms entre si. É possível constatar a deflagração de EPSP (indicado pela seta) após o segundo estímulo.

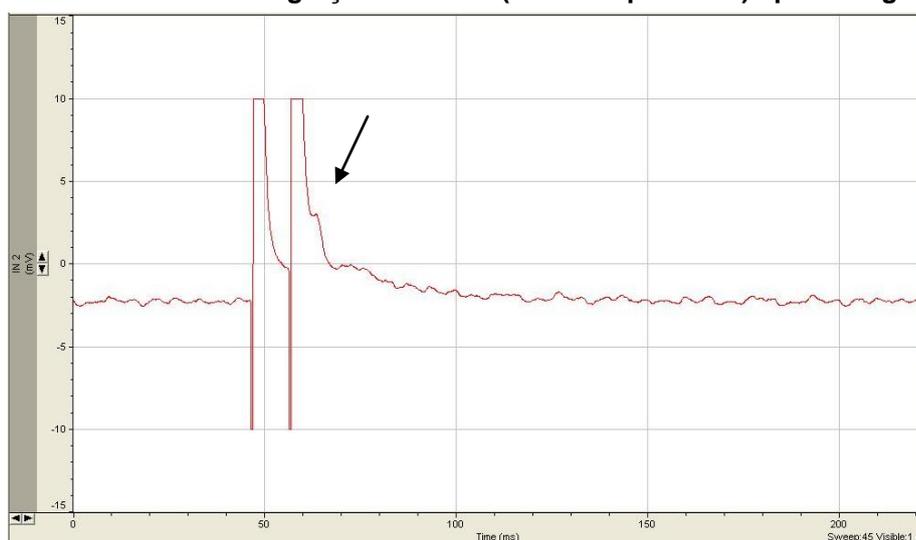
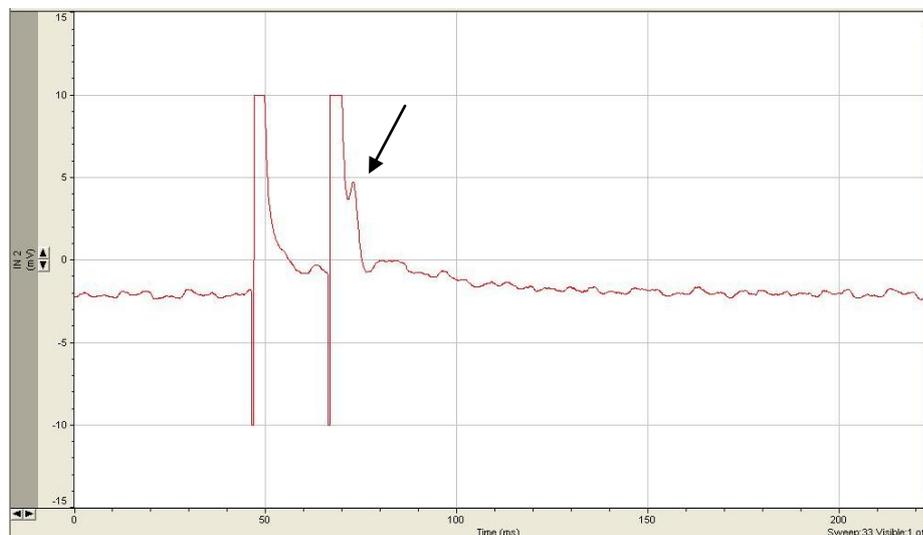


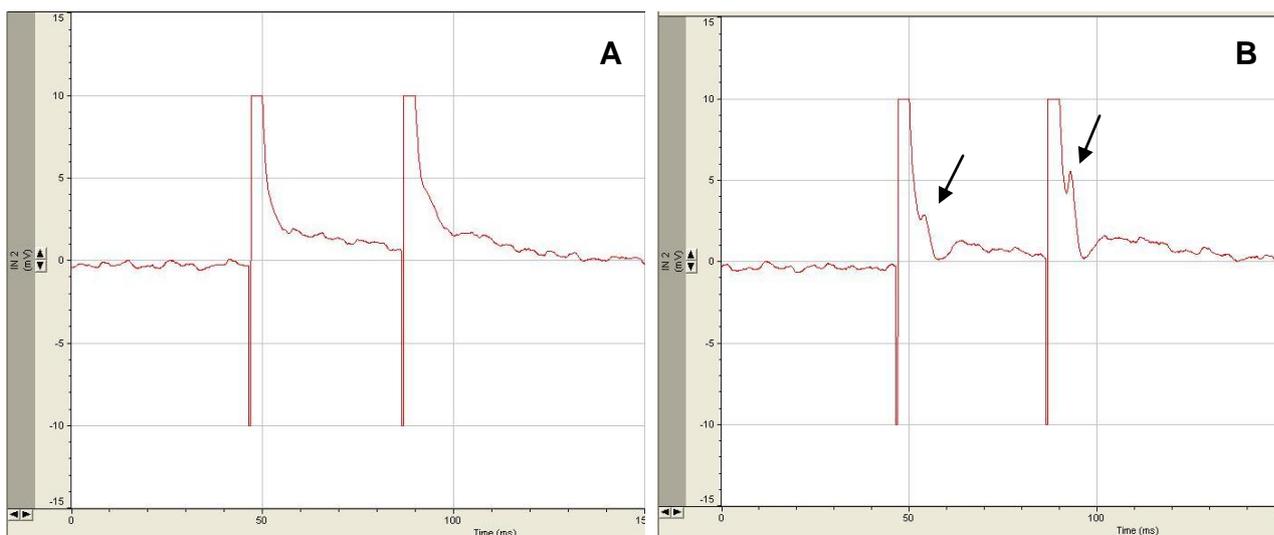
Figura 39 - Registro obtido após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de tempo de 20ms entre si. É possível constatar a deflagração de EPSP (indicado pela seta) após o segundo estímulo.



Fonte: o autor (2012).

A Figura 40 apresenta dois registros obtidos com intervalo de 40 ms entre os pulsos pareados. O gráfico indicado pela letra A mostra que não houve resposta ativa da membrana celular à aplicação dos estímulos, enquanto o gráfico B mostra a geração de EPSPs (indicados pelas setas) após a aplicação dos pulsos pareados.

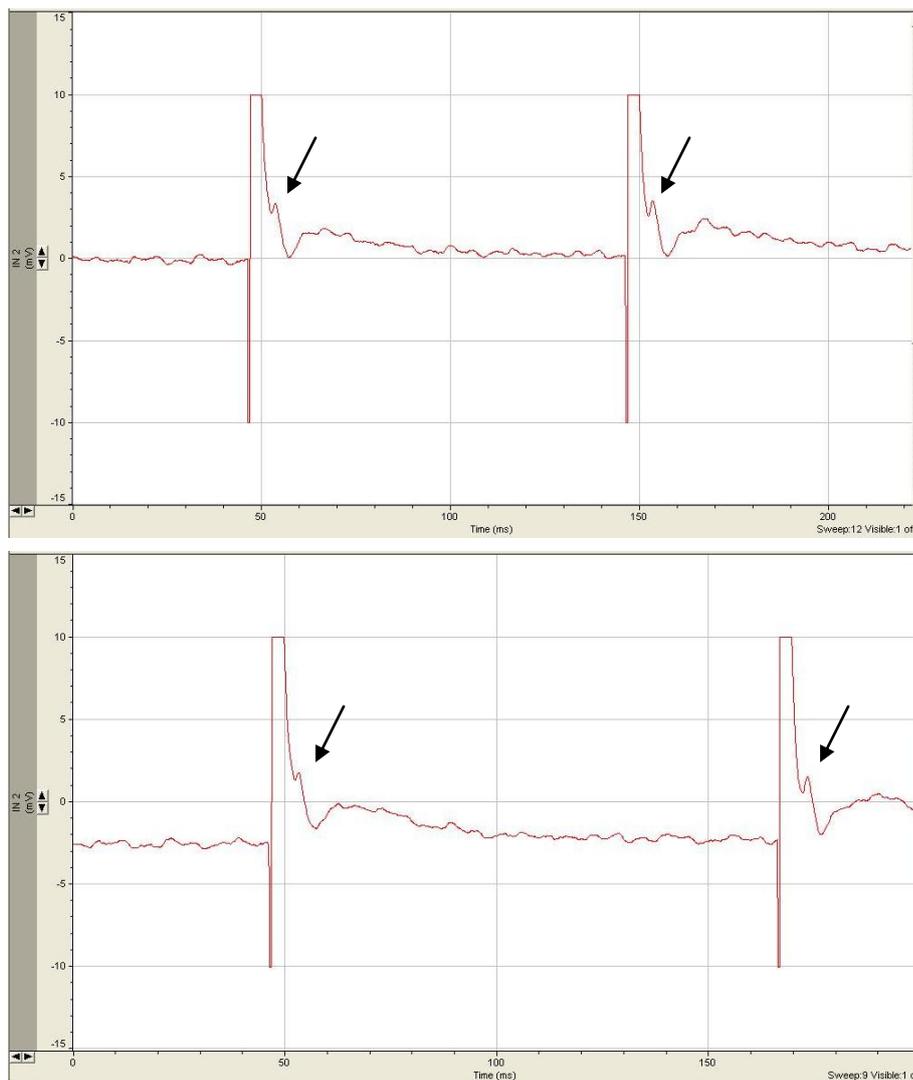
Figura 40 – Registros obtidos após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de tempo de 40ms entre si. A imagem “A” mostra a ausência de resposta ativa da membrana celular; por outro lado, a imagem “B” mostra a deflagração de EPSPs (indicados pelas setas).



Fonte: o autor (2012).

A Figura 41 apresenta registros obtidos com intervalos de tempo de 100 ms (imagem A) e 120 ms (imagem B) entre a aplicação dos pulsos pareados, nos quais a geração de EPSPs (indicados pelas setas) ficou evidente.

Figura 41 - Registros obtidos após a aplicação de pulsos pareados com intervalo de tempo de 100ms (imagem A) e 120ms (imagem B) entre si. A deflagração de EPSPs (indicados pelas setas) ficou evidente.



Fonte: o autor (2012).

5 CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu na caracterização e na realização do teste de um sensor (matriz multieletrodo - MEA) utilizado para estimular eletricamente e registrar a resposta eletrofisiológica de células mesenquimais neurodiferenciadas *in vitro*. Essas ações foram realizadas como etapa preliminar à execução de um projeto de pesquisa cujo objetivo principal é desenvolver e testar MEAs customizadas para a investigação *in vitro* da epilepsia em fatias cerebrais humanas.

Para tanto, apresentou-se inicialmente o embasamento teórico necessário à compreensão dos mecanismos biológicos responsáveis pela geração e transmissão de impulsos elétricos no tecido nervoso. Em seguida, os principais métodos utilizados atualmente para a estimulação de células e registro de sinais eletrofisiológicos *in vitro* foram descritos, a fim de ser possível estabelecer uma comparação entre o uso dessas técnicas e a MEA, que representa um dispositivo tecnológico inovador em meio aos estudos de eletrofisiologia.

A caracterização do sensor utilizado permitiu conhecer a microestrutura da MEA e confirmar as especificações do fabricante. O interfaceamento eletrônico construído entre a MEA e o sistema de aquisição de dados mostrou eficiente e suficiente para a realização do teste preliminar, contudo este deve ser melhorado de maneira a permitir o uso de todos os microeletrodos de estimulação e registro.

A obtenção de registros eletrofisiológicos a partir da cultura celular foi prejudicada devido ao surgimento de dificuldades relativas à neurodiferenciação das células coletadas, de maneira que apenas um teste de estimulação da cultura celular sobre a MEA pode ser realizado. Entretanto, os registros obtidos a partir do teste preliminar mostraram resultados promissores, permitindo a identificação de respostas eletrofisiológicas. O protocolo de estimulação aplicado com intervalos de tempo variados permitiu identificar que as células neurodiferenciadas respondem melhor à aplicação de pulsos pareados quando estes são aplicados com intervalos de tempo de 40, 100 ou 120 ms entre si. A utilização de intervalos de 10 e 20 ms se mostrou ineficiente à obtenção de resposta celular ativa.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

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

- Caracterização elétrica da MEA através da realização de espectroscopia por impedância eletroquímica, visto que a impedância é uma característica de dispositivos eletrônicos que interfere diretamente na medida de parâmetros eletrofisiológicos. Esta técnica permite a análise dos processos eletroquímicos que ocorrem na interface entre o eletrodo e a solução eletrolítica na qual se encontra a cultura celular ou a fatia de tecido;
- Construção de um interfaceamento eletrônico entre o sensor e o sistema de aquisição de dados que permita o uso simultâneo de todos os microeletrodos de estimulação e registro;
- Realização sistemática de testes de estimulação de células neurodiferenciadas e de neurônios em cultura sobre a MEA, de maneira a ser possível a análise estatística dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (EPSPs) registrados. Os parâmetros a serem avaliados são a amplitude e a inclinação (*slope*) da curva de deflexão característica do EPSP.
- Construção de uma microcâmara de perfusão a ser acoplada ao sensor, de maneira a apresentar a mesma funcionalidade das câmaras de perfusão utilizadas para estimulação e obtenção de registros eletrofisiológicos a partir de fatias de cérebro (*brain slices*). Essas câmaras permitem a manutenção da fatia de tecido viva por até seis horas mediante o controle de temperatura e o fluxo constante de “carbogênio” (mistura de 95% de gás oxigênio com 5% de gás carbônico) sobre a fatia.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, Thiago Albuquerque de; MIRANDA, José Garcia Vivas Miranda; CAVALCANTE, Silvia Larisse do Patrocínio. A dinâmica de condução nervosa via modelo de FitzHugh-Nagumo. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, vol. 32, n. 1, 2010.
- BARR, Roger C. Basic Electrophysiology. In: BRONZINO, Joseph D. (Ed.) **The Biomedical Engineering Handbook**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- BASHIR, Z. I.; VIGNES, M. Electrophysiological recording in brain slices. In: LYNCH, M. A.; O'MARA, S. M. (Ed.). **Neuroscience LABFAX**. London: Academic Press, 1997. 291p.
- BEAR, Mark F., CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 896 p.
- BRETSCHNEIDER, Frank; WEILLE, Jan R. **Introduction to electrophysiological methods and instrumentation**. Amsterdam: Elsevier, 2006. 251 p.
- DAMASK, A. C. **Medical Physics**. Vol. I: Physiological Physics, External Probes. New York: Academic Press, 1978. 374 p.
- EBME. Disponível em: <<http://www.ebme.co.uk/arts/aps/index.htm>>. Acesso em: 18 mai 2012.
- ENGEL, Jerome et al. **Epilepsy: global issues for the practicing neurologist**. World Federation of Neurology Series of Seminars in Clinical Neurology. New York: Demos Medical Publishing, 2005. 140 p.
- GARCIA, Eduardo A. C. **Biofísica**. São Paulo: Sarvier, 2002. 387 p.
- GREENBERG, David A.; AMINOFF, Michael S.; SIMON, Roger P. **Neurologia clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 378 p.
- GRINGS, William Washburn. Bioelectricity. In: _____ (Ed.). **Laboratory instrumentation in psychology**. Palo Alto: National Press, 1954.
- GROSS, G.W. et al. A new fixed-array multi-electrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. **Neuroscience Letters**, vol. 6, p. 101-105, 1977.
- HAI, A.; SHAPPIR, J.; SPIRA, M. E. In-cell recordings by extracellular microelectrodes. **Nature Methods**, vol. 7, n. 3, p. 200-202, mar 2010.
- HEUSCHKEL, M. O.; RAGGENBASS, M.; BERTRAND, D. A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slice. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 114, p. 135-148, 2002.
- HOBBIE, Russel k.; ROTH, Bradley J. 2006. **Intermediate Physics for Medicine and Biology**. 4a. ed. New York: Springer, 2006. 616 p.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. **Journal of Physiology**, vol.117, p. 500-544, 1952.

HOWSTUFFWORKS INTERNATIONAL, INC. **Como funciona o cérebro**. Como tudo funciona. Disponível em: <<http://saude.hsw.uol.com.br/cerebro1.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2012.

HUGUENARD, John; MCCORMICK, David A. **Electrophysiology of the neuron**: an interactive tutorial. Disponível em: <<http://eotn.stanford.edu/ELECTROPHYSIOLOGY%20OF%20THE%20NEURON.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

HUMPHREY, Donald R.; SCHMIDT, Edward M. Extracellular single-unit recording methods. Neurophysiological techniques. **Neuromethods**, vol. 15, p. 1-64, 1991.

KRUEGER-BECK, Eddy et al. Potencial de ação: do estímulo à adaptação neural. **Fisioterapia em Movimento**, vol. 24, n. 3, 2011.

MALMIVUO, Jaakko. **Bioelectromagnetism Portal**. Disponível em: <<http://www.bem.fi>>. Acesso em: 16 jun. 2012.

MARINOWIC, Daniel Rodrigo. **Avaliação da indiferenciação celular e indução de neurodiferenciação em co-cultivo de fibroblastos NIH 3T3 com células mononucleares do sangue de cordão umbilical**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde - Área de concentração em Neurociências) - Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MDS ANALYTICAL TECHNOLOGIES. **The Axon Guide**: a guide to electrophysiology and biophysics laboratory techniques. California: MDS Analytical Technologies, 2008. 262 p.

MICHELI-TZANAKOU, E. Nervous system. In: BRONZINO, Joseph D. (Ed.) **The Biomedical Engineering Handbook**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

MILLAR, J. Intracellular and extracellular recording with microelectrodes. In: LYNCH, M. A.; O'MARA, S. M. (Ed.). **Neuroscience LABFAX**. London: Academic Press, 1997. 291p.

MOLECULAR DEVICES. Disponível em: <<http://www.moleculardevices.com/>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

NEUMAN, Michael R. Biopotential electrodes. In: BRONZINO, Joseph D. (Ed.) **The Biomedical Engineering Handbook**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

PURVES, Dale et al. **Neurociências**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 912 p.
QWANE BIOSCIENCES. Disponível em: < <http://www.qwane.com> >. Acesso em: 30 mar. 2012.

REILLY, J. Patrick; GEDDES, L. A.; POLK, C. Bioelectricity. In: DORF, Richard C. (Ed.). **The Electrical Engineering Handbook**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 1997. 113 p.

RIBEIRO, Jaqueline Alves. **Modelos de predição linear para a análise de sinais eletroencefalográficos (EEG) e de matrizes multieletrodo (MEA)**. 2006. 174 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Annual Review of Physiology**, vol. 46, p. 455-472, 1984.

SALAMONI, Denise Simone. **Estudo sobre o efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea no modelo de epilepsia genética no camundongo EL**. 2012. 104 f. Dissertação (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde - Área de concentração em Neurociências) - Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SORIANO, D. C.; RICARDO, R. A.; BASSANI, J. W. M. **Resolvendo o modelo de Hodgkin-Huxley**: uma proposta didática. In: XX CEBEB 2006, pp. 29-32, 2006.

THOMAS, C. A. et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. **Experimental Cell Research**, vol. 74, p. 61-66, 1972.

VARGHESE, Anthony. Membrane Models. In: BRONZINO, Joseph D. (Ed.). **The Biomedical Engineering Handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2000. 192 p.

WHEELER, B.C; NOVAK, J.L. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, vol. 33, p. 1204-1212, 1986.

WIKIPÉDIA. Disponível em: <<http://www.wikipedia.com>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

WOOD, J. D. Electrical and synaptic behavior of enteric neurons. **Comprehensive Physiology**, Supplement 16: Handbook of Physiology, The Gastrointestinal System, Motility and Circulation, p. 465-517, 2011. Primeira edição em 1989.

WORLD HEALTH ORGANISATION. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 05 mai. 2012.