



Exacta

ISSN: 1678-5428

exacta@uninove.br

Universidade Nove de Julho

Brasil

Moreira Marques, Suélen; Guilherme Guzo, Mauro; de Camargos Lopes, Ricardo; Branco Oliveira, Ariadne de Almeida; Murta Junior, Luiz Otávio; Destro Filho, João Batista

Análise da evolução de culturas neurais

Exacta, vol. 10, núm. 1, enero-junio, 2012, pp. 122-136

Universidade Nove de Julho

São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81023342013>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Análise da evolução de culturas neurais

Analysis of neural-cell culture development

Suélen Moreira Marques

Mestranda em Engenharia Elétrica – Universidade Federal de
Uberlândia/Faculdade de Engenharia Elétrica.
Uberlândia, MG – Brasil.
sueletrica@gmail.com

Mauro Guilherme Guzo

Graduado em Física Média – Universidade de São Paulo,
Departamento de Física e Matemática.
Ribeirão Preto, SP – Brasil.
mguzo@hotmail.com

Ricardo de Camargos Lopes

Graduando em Engenharia Biomédica – Universidade Federal
de Uberlândia/Faculdade de Engenharia Elétrica.
Uberlândia, MG – Brasil.
r_camargos@hotmail.com

Ariadne de Almeida Branco Oliveira

Graduanda em Ciências Biológicas – Universidade Federal de
Uberlândia/Instituto de Biologia.
Uberlândia, MG – Brasil.
ariadnewhite@ymail.com

Luiz Otávio Murta Junior

Doutor em Física – Universidade de São Paulo/Departamento
de Física e Matemática.
Ribeirão Preto, SP – Brasil.
murta@usp.br

João Batista Destro Filho

Doutor em Engenharia Elétrica – Universidade Federal de
Uberlândia/Faculdade de Engenharia Elétrica.
Uberlândia, MG – Brasil.
jbdestrof@yahoo.com

Resumo

Neste artigo, analisa-se a atividade elétrica de um experimento gravado durante a maturação de culturas dissociadas, retiradas do hipocampo de embriões de ratos Wistar, baseado em dispositivos denominados Matrizes Multieletrodo (MEA). As análises ocorrem desde a deposição da cultura no dispositivo até sua morte, de 0 a 88 dias *in vitro* (DIV). A análise clássica de *spikes* foi aplicada a três diferentes culturas, mostrando a evolução de seus *spikes* e *bursts*. Uma atenção particular é dedicada para a última etapa associada à morte celular, já que um inesperado crescimento da amplitude da atividade elétrica é observado neste trabalho.

Palavras-chave: Conexão funcional. Cultura neural dissociada. Matriz multieletrodo. Processamento de sinais biológicos.

Abstract

This paper analyses the electrical activity recorded in an experiment involving the maturation of dissociated embryonic hippocampal cultures, using Multielectrode Array (MEA) devices, starting from the moment of the culture's placement in the device until its death, a period of 0 to 88 days *in vitro* (DIV). Classical "spike" analysis is applied to three different cultures, showing the progression of "spikes" and "bursts". Particular attention is devoted to the last step associated with cellular death, as an unexpected rise in electrical activity amplitude is observed.

Key words: Biological signal processing. Dissociated neural culture. Functional connectivity. Multielectrode array.

1 Introdução

Existem, na literatura, vários estudos relacionados aos dispositivos nanotecnológicos comercialmente disponíveis que acessam seletivamente potenciais de ação de tecidos de neurônios e cardiomiócitos, por exemplo, denominados de Matrizes Multieletrodo (*Multielectrode Array* – MEA), conforme Rutten (2002). Elas são empregadas em estudos da informação biológica neural (RIEKE, 1997), em farmacologia (CHIAPPALONE, 2003) e em neuroimplantes (LITT, 2003). Neste último caso, o autor Taketani (2006) afirma que a viabilidade de implementação de implantes neurais está intimamente ligada ao desenvolvimento de conhecimento sobre detalhes importantes associados com os dispositivos MEA. Alguns fatores, como a incompatibilidade biológica ou a dificuldade de adesão do tecido ao dispositivo, podem promover uma evolução para a resposta imunológica grave, prejudicando, assim, os pacientes.

Vários artigos na literatura são dedicados ao estudo do processo de conexão funcional entre as células e os microeletrodos, esforço que também permite a compreensão da formação de redes neuronais biológicas (MARQUES, 2009; CHIAPPALONE, 2006; KAMIOKA, 1996; VAN PELT, 2004). Esses estudos são baseados na análise da atividade espontânea gravada pelas MEAs. Os principais fenômenos observados na atividade podem ser agrupados em quatro etapas bem definidas na literatura: 1) 1-7 dias *in vitro* (DIV) – pequena quantidade de *spikes* aleatórios, presença de sinapses imaturas e ausência de *bursts*; 2) 08-14 DIVs – pequena quantidade de *bursts* de longa duração (até um segundo), com conexões de rede ainda consideradas imaturas; 3) 15-28 DIVs – grande quantidade de *bursts* de pequena duração, atingindo valores mínimos de 30 ms, com padrões periódicos repetitivos, revelando sincronismo da atividade observada e 4) 29-35 DIVs – grande

quantidade de *spikes* aleatórios, porém com atividade altamente sincronizada entre os canais (eletrodos), revelando que o padrão de conectividade sináptica atingiu a maturidade.

O papel da atividade neuronal espontânea no processo de crescimento celular está relacionado às características de estabilidade e plasticidade dos padrões de atividade. Por outro lado, a apoptose (morte celular normal, fisiológica ou programada) é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas, sendo estas últimas observadas em condições de estresse, como no caso de deficiência de fatores neurotróficos e exposição a neurotoxinas, incluindo altas concentrações de glutamato. Já o processo de morte celular por necrose é induzido por uma abrupta perturbação ambiental das condições fisiológicas celulares, envolvendo ruptura da estrutura da membrana celular, rápido influxo de íon Ca^{2+} e água e, subsequentemente lise e dissolução da célula (SIMONIAN, 1996).

O estresse oxidativo refere-se às consequências citológicas de uma incompatibilidade entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), provenientes do metabolismo celular, e a capacidade da célula para se defender delas (SIMONIAN, 1996). Esse desequilíbrio gera um acúmulo de moléculas oxidadas (ROS) que podem levar a alterações funcionais de lipídeos, proteínas e DNA, o que resulta na perda progressiva da fluidez da membrana, redução do potencial e aumento da permeabilidade a íons (Ca^{2+}), ocasionando disfunção e morte celular, seja por apoptose ou necrose.

Mecanismos intracelulares podem mediar o estresse oxidativo na degeneração neuronal, como menciona Simonian (1996). Destacam-se entre esses mecanismos: as vias de óxido nítrico (NO-), que, sob condições oxidantes, podem reduzir a neurotransmissão excitatória; as vias de ácido araquidônico (AA), que geram aumento da concentração de cálcio, podendo prevenir contra

a degeneração neuronal, promovendo o metabolismo e a ativação de proteases (que são enzimas importantes na quebra de proteínas modificadas oxidativamente); e a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, que são uma das principais fontes de ROS intracelulares.

Diante dos efeitos do estresse oxidativo na morte celular, as alterações referentes ao aumento da permeabilidade ao íon Ca^{2+} e suas concentrações intracelulares se apresentaram em destaque para o estudo aqui apresentado, levando a possíveis questionamentos: o aumento do fluxo desse íon poderia provocar crescimento da atividade elétrica? Seria essa uma sinalização prévia da morte celular?

Em artigo anterior (MARQUES, 2009), os autores deste trabalho de pesquisa analisaram a dinâmica neural apenas em termos de alguns parâmetros quantitativos extraídos da análise clássica da atividade elétrica.

A seguir, por meio de experimentos próprios, as etapas de evolução celular serão apresentadas, discutidas e caracterizadas quantitativamente, levando-se em conta a evolução temporal da atividade elétrica ao longo das diversas regiões geométricas da MEA e, portanto, da cultura de células, como também principalmente as etapas finais de morte celular.

2 Metodologia

Graças a uma cooperação técnica existente entre os pesquisadores da Universidade de Gênova (Itália) e os da Universidade Federal de Uberlândia (Brasil), os pesquisadores brasileiros fizeram registros da atividade elétrica de culturas neuronais dissociadas retiradas do córtex de embriões de ratas Wistar, no 18º dia de gestação, incluindo também o preparo dessas culturas. Os procedimentos biológicos e o protocolo de medidas elétricas uti-

lizados pelos pesquisadores brasileiros seguiram as diretrizes apresentadas pela autora Chiappalone (2006) e são mostrados a seguir.

Para o preparo da cultura, não foi utilizado nenhum meio condicionado de glia (GCM) ou substâncias antimitóticas para impedir o crescimento desse tipo de células. Ao todo, três culturas foram monitoradas periodicamente, utilizando matrizes multieletrodo (MEA60) planares de 60 canais, com 30 μm de diâmetro cada eletrodo e com distância de 200 μm entre os eletrodos, distribuídos em uma matriz 8x8, com as extremidades excluídas.

As culturas foram denominadas de experimentos 364, 365 e 366, para os quais se adquiriu a atividade elétrica espontânea, sendo a primeira gravada do DIV08 ao DIV88, a segunda do DIV08 ao DIV67 e a última, do DIV08 ao DIV64. Cada seção de gravação em um DIV durou 20 minutos, divididos em quatro fases subsequentes de cinco minutos cada, totalizando 19 horas de gravação da atividade elétrica das três culturas e um total de 56 experimentos processados.

Cada registro seguiu o mesmo procedimento: as culturas crescidas sobre as MEAs eram retiradas da estufa de CO_2 na qual eram mantidas e colocadas sobre um amplificador, cuja temperatura era controlada, podendo variar de 37,1 °C a 37,4 °C. As medidas eram iniciadas, decorridos 20 minutos dessa colocação, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente. A frequência de aquisição dos sinais para esses experimentos foi 10 kHz.

A Figura 1 apresenta um sinal em um microeletrodo, composto por *spikes* que são variações extremamente rápidas de tensão elétrica, podendo ser interpretadas como o resultado da ativação de grupos de células situados exatamente sobre um microeletrodo (TAKETANI, 2006). Um conjunto de *spikes* é uma sequência de impulsos nervosos ou potenciais extracelulares,

produzidos por um ou mais neurônios, localizados possivelmente distantes de um microeletrodo, sendo o mesmo conjunto de spikes observado por um período de tempo relativamente longo. Já um *burst* é uma sequência de *spikes* que são separados entre si por tempos muito reduzidos, tipicamente menores que 100 ms.

O processamento dos dados foi realizado utilizando-se a plataforma *SpikeManager* (VATO, 2004), desenvolvida pela Universidade de Gênova. O *software* foi atualizado, adicionando-se a ele funções responsáveis pelo agrupamento dos dados, pela geração de mapas de atividade da taxa média de disparos de *spikes* (*Mean Firing Rate – MFR*), da taxa média de *bursts* (*Mean Burst Rate – MBR*), entre outras.

Por meio do *SpikeManager*, os sinais foram processados e vários quantificadores foram obtidos, tais como gráficos de atividade elétrica nor-

mal e espontânea, gráficos de *raster plot*, valores médios de intervalo entre *spikes* e *bursts* por experimento em cada DIV, figuras que mostram o intervalo entre *spikes* e *bursts* por região, assim como o seu desvio-padrão e, por fim, as estatísticas dos dados processados. Tais quantificadores serão explicados na próxima seção.

A taxa média de disparos de *spikes* foi calculada considerando-se um valor mínimo de disparos de 0,1 *spikes* por segundo; e uma janela de artefato, de 4 ms. A detecção de *bursts* foi realizada com um número mínimo de *spikes* dentro de cada *burst* igual a cinco; um valor máximo de intervalo entre *spikes* dentro de cada *burst*, de 100 ms; um valor limiar para taxa de *bursts*, de 0,4 *bursts* por minuto e uma janela de artefato, de 4 ms. Tais parâmetros foram ajustados de acordo com procedimento análogo àquele empregado pela autora (CHIAPPALONE, 2003).

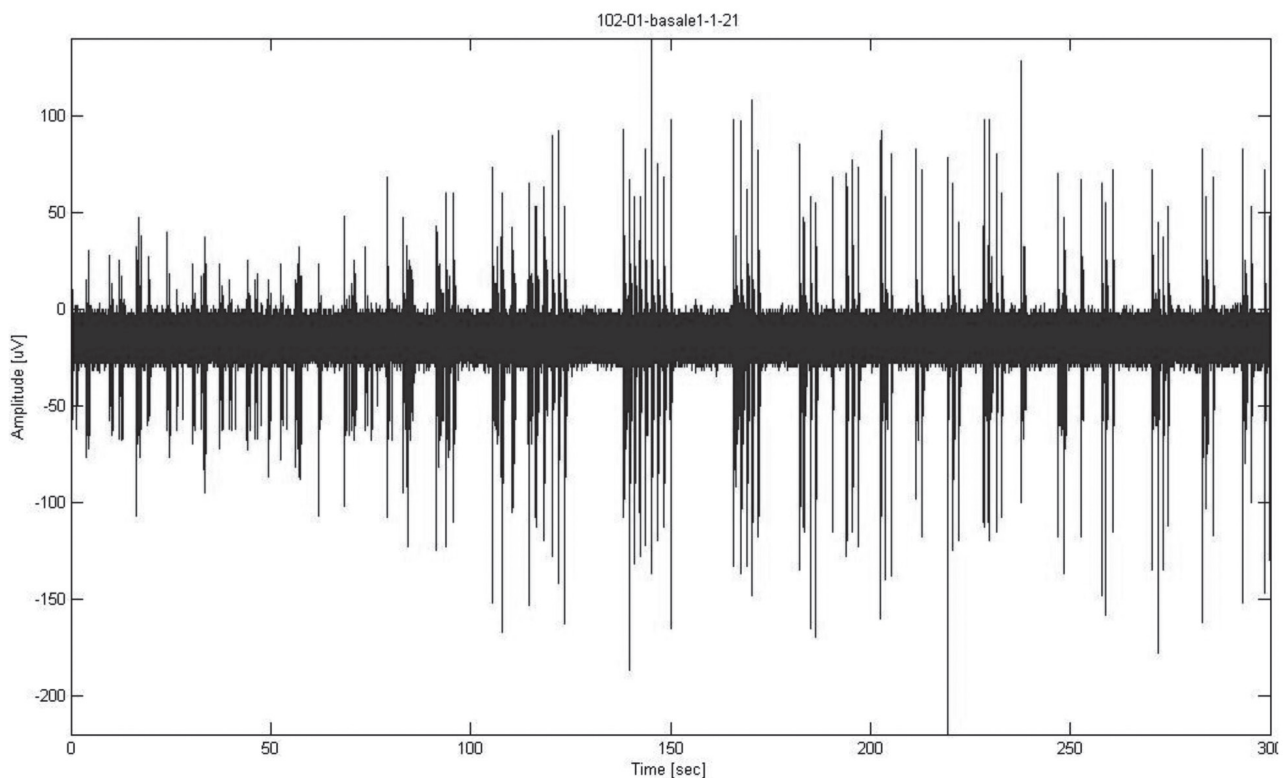


Figura 1: Atividade elétrica típica de um eletrodo de matriz multieletrodo. Escala vertical: amplitude (µV). Escala horizontal: tempo (s)

litar uma rápida visualização geral do estado de ativação elétrica do tecido analisado, considerando os 60 microeletrodos ao mesmo tempo, e não informações detalhadas de cada microeletrodo, o que explica a organização da Figura 3, em que vários gráficos são colocados em sequência. Nos primeiros dias *in vitro* (DIV11), percebe-se uma quantidade de *spikes* bem reduzida e distribuída temporalmente, ou seja, existem poucos *spikes* aleatórios. No 36º dia *in vitro*, a atividade elétrica é intensa, porém sincronizada, ou seja, surgem padrões de atividade elétrica, tais como o disparo simultâneo de *spikes* em mais de um canal. Observa-se também, analisando os gráficos de *Raster Plot* em DIVs 78 e 88, que a quantidade de *spikes* diminui consideravelmente e tende a

ocorrer segundo o padrão inicial de disparos no sentido inverso.

Os gráficos apresentados na Figura 4 mostram os valores de ISI (*Inter Spike Interval* – intervalo entre *spikes*) calculados a partir do vetor de trem de *spikes* fornecidos pelo *software SpikeManager*. O eixo y de cada gráfico mostra o intervalo entre *spikes* em milissegundos; e o eixo x, o dia *in vitro*. Para cada DIV, tem-se uma média dos valores de ISI dos 60 canais da MEA. As variações mostradas em cada DIV representadas pelas barras verticais acima dos valores de ISI representam o desvio-padrão do ISI para o respectivo DIV.

Observa-se, para todas as culturas da Figura 4, que inicialmente existem poucos *spikes*, revelando um intervalo entre eles muito grande, em torno

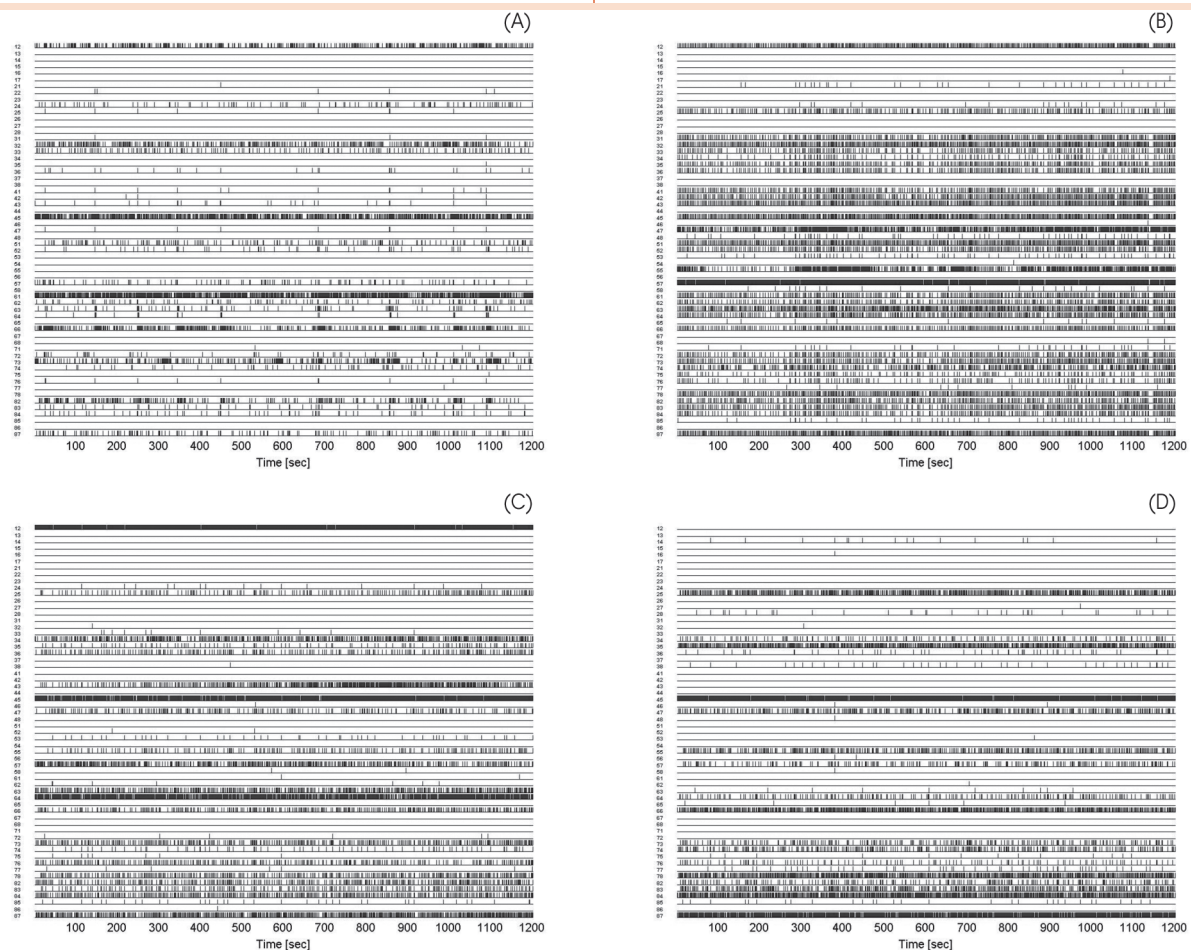


Figura 3: Gráficos de *Raster Plot* do experimento 364: (A) DIV11, (B) DIV36, (C) DIV78 e (D) DIV88

de 85 milissegundos (do DIV08 ao DIV18). Além disso, nesse estágio inicial, há um maior desvio-padrão, indicando diferentes comportamentos nos canais com atividade elétrica. Observa-se também pela Figura 4 que do DIV22 ao DIV71 há uma redução do intervalo entre *spikes* e o desvio-padrão apresentado é pequeno, indicando comportamentos semelhantes nos diversos canais.

Por fim, concentrando a análise nos estágios finais representados pelos DIVs de 74 a 81 da Figura 4 (A), ocorre um aumento do ISI, revelando a presença de poucos *spikes* e o desvio-padrão continua pequeno, indicando a morte celular da cultura. Particular atenção deve ser prestada ao aumento repentino da quantidade de *spikes* nos DIVs 85-88, que antecede a morte celular. De fato, medidas tomadas no 91º DIV evidenciaram atividade elétrica global praticamente nula.

Analogamente ao que foi apresentada na Figura 4, a Figura 5 mostra valores médios de intervalos entre *bursts* (IBI) de cada experimento em

cada DIV. Para cada DIV, tem-se uma média dos valores de IBI dos 60 canais da MEA. As variações mostradas em cada DIV representadas pelas barras verticais acima dos valores de IBI representam o desvio-padrão do IBI para o respectivo DIV.

Observa-se inicialmente que o intervalo entre *bursts* nos três experimentos é muito grande, ou seja, não existem *bursts* nos estágios iniciais de crescimento das culturas. No 15º DIV, é possível visualizar um IBI de 25 segundos para os três experimentos. Após esse período, o intervalo entre *bursts* diminui consideravelmente, variando em torno de 10 segundos para todos os experimentos. A Figura 5(A) mostra um aumento do IBI nos DIVs 67 e 71, mas esse valor volta a diminuir nos estágios finais de morte celular (DIVs 74 a 88 do experimento 364 – Figura 5(A)). Ou seja, subitamente em DIV67 há uma sensível redução na quantidade de *bursts*, seguida imediatamente por um aumento repentino em DIV 74-78, o que pode ser considerado como uma verdadeira “explosão elétrica”.

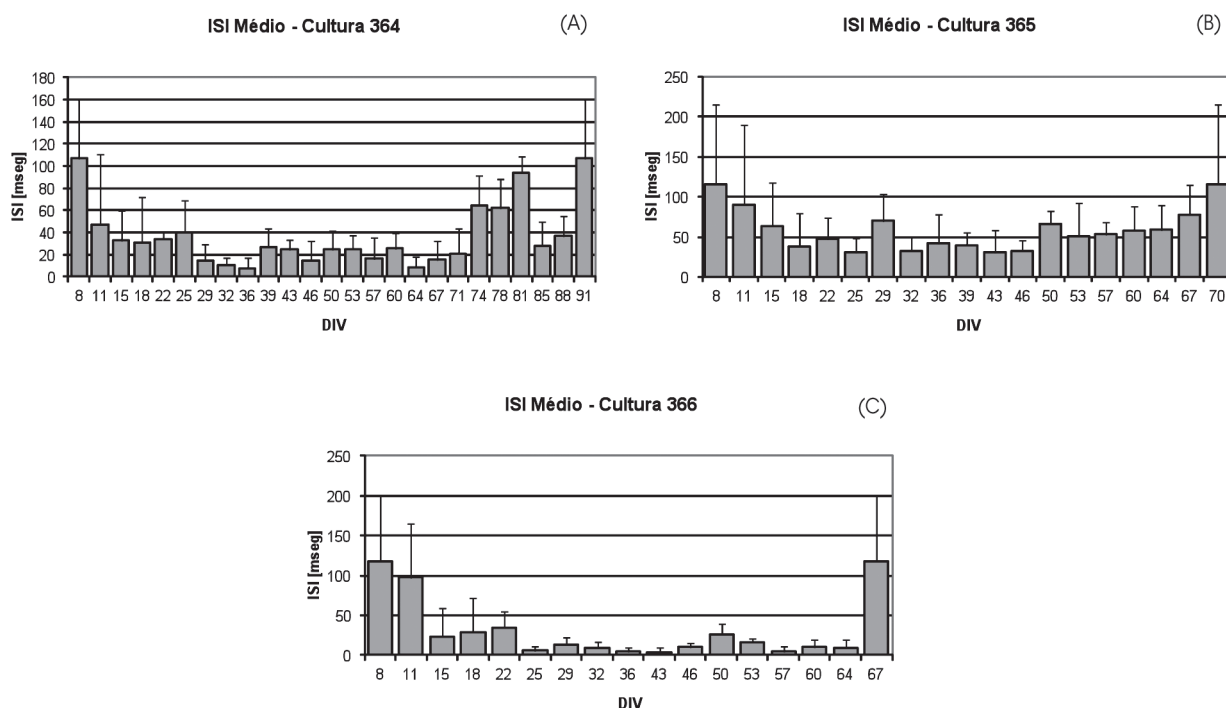


Figura 4: Intervalo entre spikes (ISI) médio para cada cultura ao longo do tempo. (A) Cultura 364 (DIV08-91). (B) Cultura 365 (DIV08-70). (C) Cultura 366 (DIV08-67)

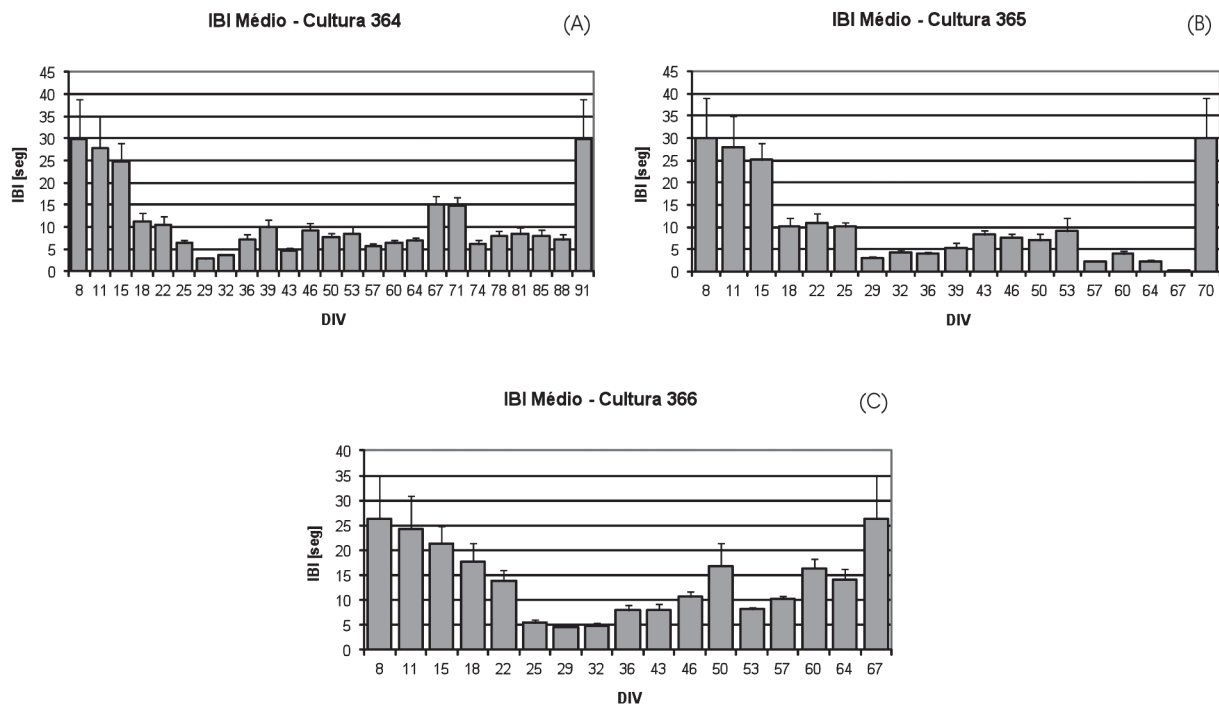


Figura 5: Intervalo entre *bursts* (IBI) médio para cada cultura ao longo do tempo. (A) Cultura 364 (DIV08-91). (B) Cultura 365 (DIV08-70). (C) Cultura 366 (DIV08-67)

Calcularam-se também os valores médios de intervalo entre *spikes* por canal em cada DIV por experimento, obtendo-se uma figura similar à Figura 6 para cada experimento e para cada DIV. Neste artigo, mostra-se o comportamento do experimento 364 nos DIVs 11, 36, 78 e 88, a fim de ilustrar as diferenças ao longo da maturação da cultura, incluindo a morte celular.

Na Figura 6, são apresentados, portanto, os valores médios de intervalo entre *spikes* (ISI) por canal, todos para o experimento 364. Cada quadrado mostrado representa a localização espacial de um eletrodo da MEA, supondo-se visão superior do dispositivo. Assim, na Figura 6, tem-se informação mais detalhada acerca do comportamento médio da atividade elétrica, em termos do ISI, para cada eletrodo, ao longo do tempo. Além disso, deve-se notar que nesta mesma figura os eixos x e y correspondem à localização espacial dos microeletrodos e, portanto, a informação central está concentrada na magnitude do

ISI médio, ou seja, na cor de cada quadrado. Ao analisar as Figuras 6(A-D), percebem-se cores diferentes para determinados eletrodos. Do lado direito de cada figura, é possível visualizar uma escala de cores, desde 0 (zero), que é representado pela cor escura, até 500 que é representado pela cor clara. Assim, cada cor das Figuras 6 a 9 representará um respectivo valor de acordo com a escala de cores posicionada no lado direito de cada figura.

Observa-se na Figura 6(A), em 11 dias *in vitro* (DIV), que a cultura possui a maioria dos canais com o intervalo entre *spikes* grande, indicando que a maior parte dos canais possuem poucos *spikes*, sendo eles distantes entre si. No DIV 36 (Figura 6(B)), mostra-se que, para a grande maioria dos canais, o intervalo entre *spikes* diminui, indicando que a cultura já atingiu a maturação e, consequentemente, apresenta mais *spikes* com um intervalo menor entre eles. As Figuras 6(C) e 6(D) – DIVs 78 e 88 – mostram um aumento do inter-

valo entre *spikes*, evidenciando que a quantidade de *spikes* diminuiu e o intervalo entre eles aumentou. Em particular, para a Figura 6(D), antecedente à morte celular completa da cultura, existem ainda muitos canais ativos, sendo a inatividade daqueles representados pelo tom claro revelador do seguinte fato: o silêncio elétrico completo, característico da morte global da cultura, acontece gradativamente no conjunto de células.

Na Figura 7, observa-se o desvio-padrão do intervalo entre *spikes* desses mesmos dados. Nessa figura, verifica-se que o desvio-padrão é maior nos estágios iniciais da cultura (DIV11), e nos finais (DIV78 e 88). Quando a cultura atinge a maturação (DIV36), o valor do desvio-padrão é pequeno

na maioria dos canais, evidenciando o sincronismo e o comportamento similar da cultura em todos os canais da MEA, em termos dos *spikes*.

Analogamente ao que foi mostrado para o ISI, será mostrado para o IBI (Intervalo entre *bursts*). A Figura 8 apresenta os valores médios do intervalo entre *bursts* por canal para o experimento 364. Assim sendo, na Figura 8, tem-se informação mais detalhada acerca do comportamento médio da atividade elétrica, em termos do IBI, para cada eletrodo, que pode ser associado a certo quadrado da figura, ao longo do tempo. Além disso, deve-se notar que nessa mesma figura os eixos x e y correspondem à localização espacial dos microeletrodos e, portanto, a informação central

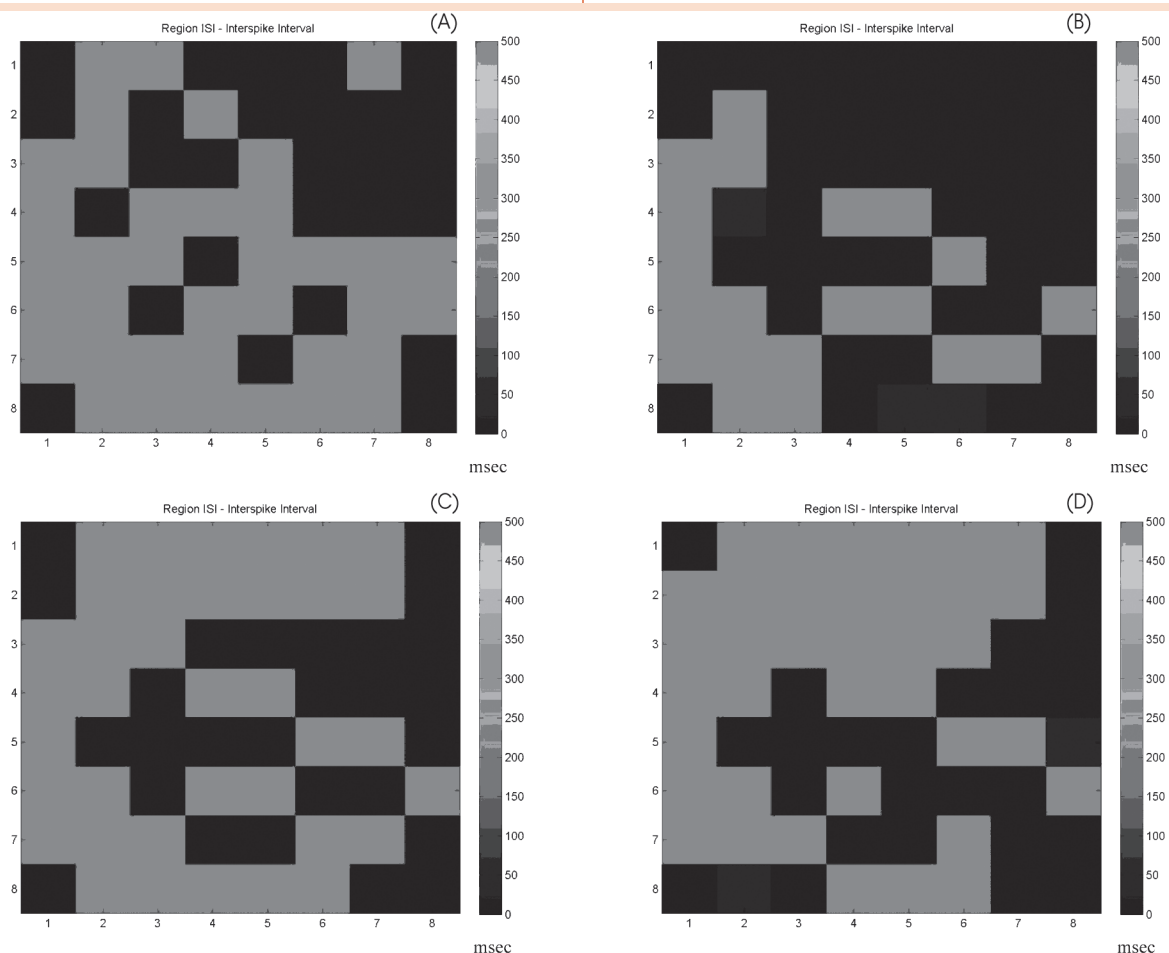


Figura 6: Intervalo entre *spikes* por região para o experimento 364: (A) DIV 11, (B) DIV 36, (C) DIV 78, (D) DIV 88

está concentrada na magnitude do IBI médio, ou seja, na cor de cada quadrado. Note-se que, tanto nos estágios iniciais (DIV11) quanto nos estágios finais (DIVs 78 e 88), a cultura apresenta poucos *bursts*, já que o intervalo entre eles é grande, na ordem de 100 segundos. Apenas no DIV36, o intervalo entre os *bursts* apresenta valores menores, indicando que eles estão em maior quantidade e, consequentemente, em menor intervalo, distribuídos ao longo de toda a superfície da cultura. Em particular, para a Figura 8(D), véspera da morte celular, embora inexistam *bursts*, na grande maioria dos canais, ocorrem alguns poucos com intensa duração.

De maneira análoga à Figura 7, a Figura 9 apresenta o desvio-padrão do intervalo entre *bursts* para o experimento 364. Em todos os DIVs, observa-se que o desvio-padrão é expressivo em alguns canais, mostrando que para a ocorrência de *bursts*, as culturas possuem uma maior diversidade no comportamento dos canais.

Apresentam-se, por fim, as estatísticas dos experimentos processados, conforme Tabela 1. É possível realizar uma comparação no que se refere aos *spikes* e aos *bursts* do experimento 364, DIVs 11, 36, 78 e 88, e dos experimentos 365 e 366, DIVs 11, 36, 50 e 64. Analisando primeiramente a quantidade total de *spikes* dos três experimentos nos DIVs abordados acima, observa-se no DIV11

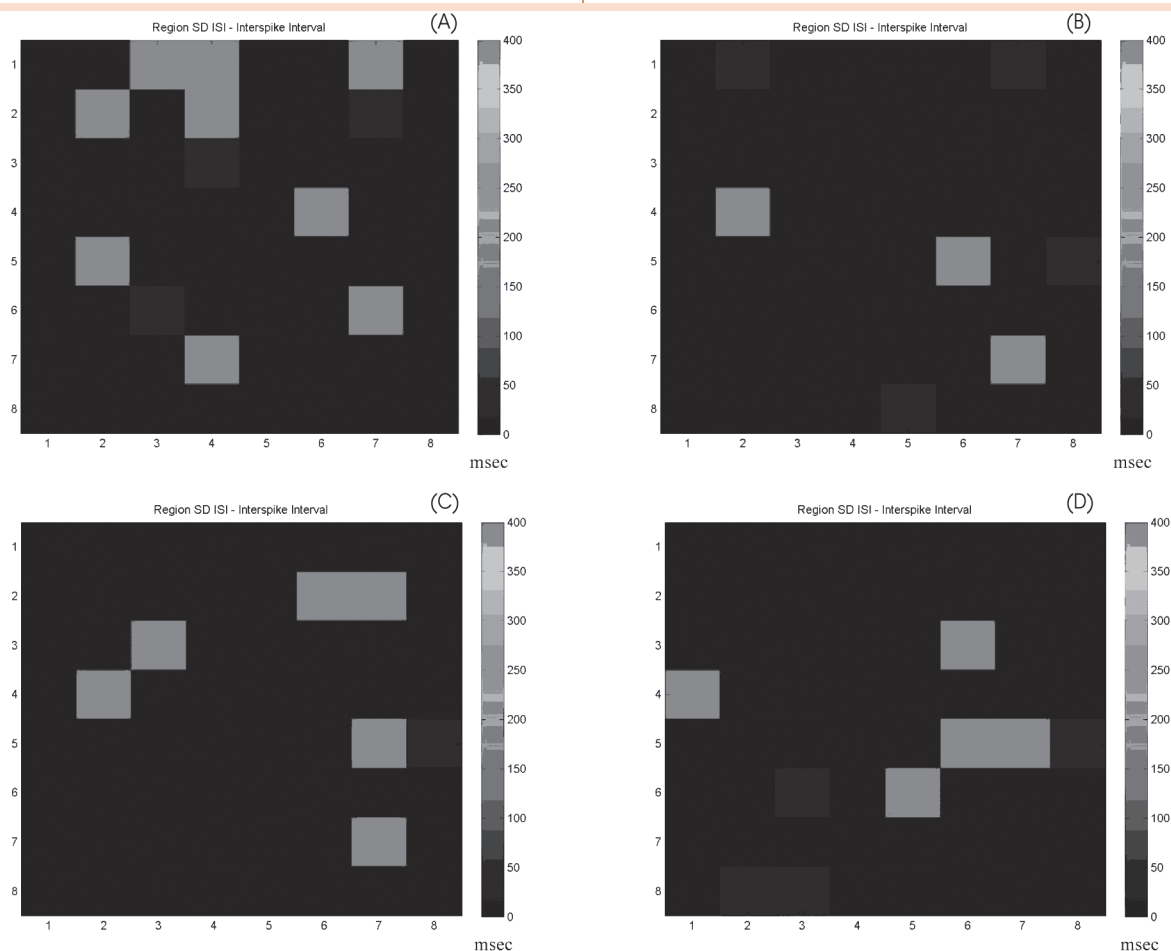


Figura 7: Desvio-padrão do intervalo entre *spikes* por região para o experimento 364: (A) DIV11, (B) DIV36, (C) DIV78, (D) DIV88

que existem poucos deles em relação aos demais DIVs em todos os experimentos. No 36º dia *in vitro* a quantidade de *spikes* atinge o maior valor e volta a diminuir nos demais DIVs. Já a quantidade de *spikes* aleatórios varia em cada experimento. No 364, esse valor é praticamente constante, de 11% a 12% de todos os encontrados. No 365, por sua vez, existem poucos *spikes* aleatórios no DIV11, e esse valor tende a aumentar até o DIV50. No DIV64, o valor cai para 3% do total de *spikes* encontrados. Por fim, no experimento 366 existem pouquíssimos *spikes* aleatórios no DIV11; e esse valor aumenta ao longo do tempo, chegando a praticamente 20% do total de *spikes* no DIV64.

Em relação à quantidade total de *bursts*, percebe-se que no DIV11 existem poucos nos três experimentos. No DIV36, essa quantidade aumenta expressivamente, atingindo o máximo em relação aos demais DIVs. Em geral, os *bursts* com maior duração, dada em milissegundos, foram encontrados no DIV36 do experimento 364 e 365. É importante observar que, nesse experimento e nesse DIV, o desvio-padrão da duração média de *bursts* foi o maior encontrado.

Em particular, analisando-se os últimos estágios de vida das culturas, correspondentes de 67 DIV até 91 DIV, no contexto específico da cultura 364, a sequência de fenômenos poderia ser resumida como se segue, em três etapas:

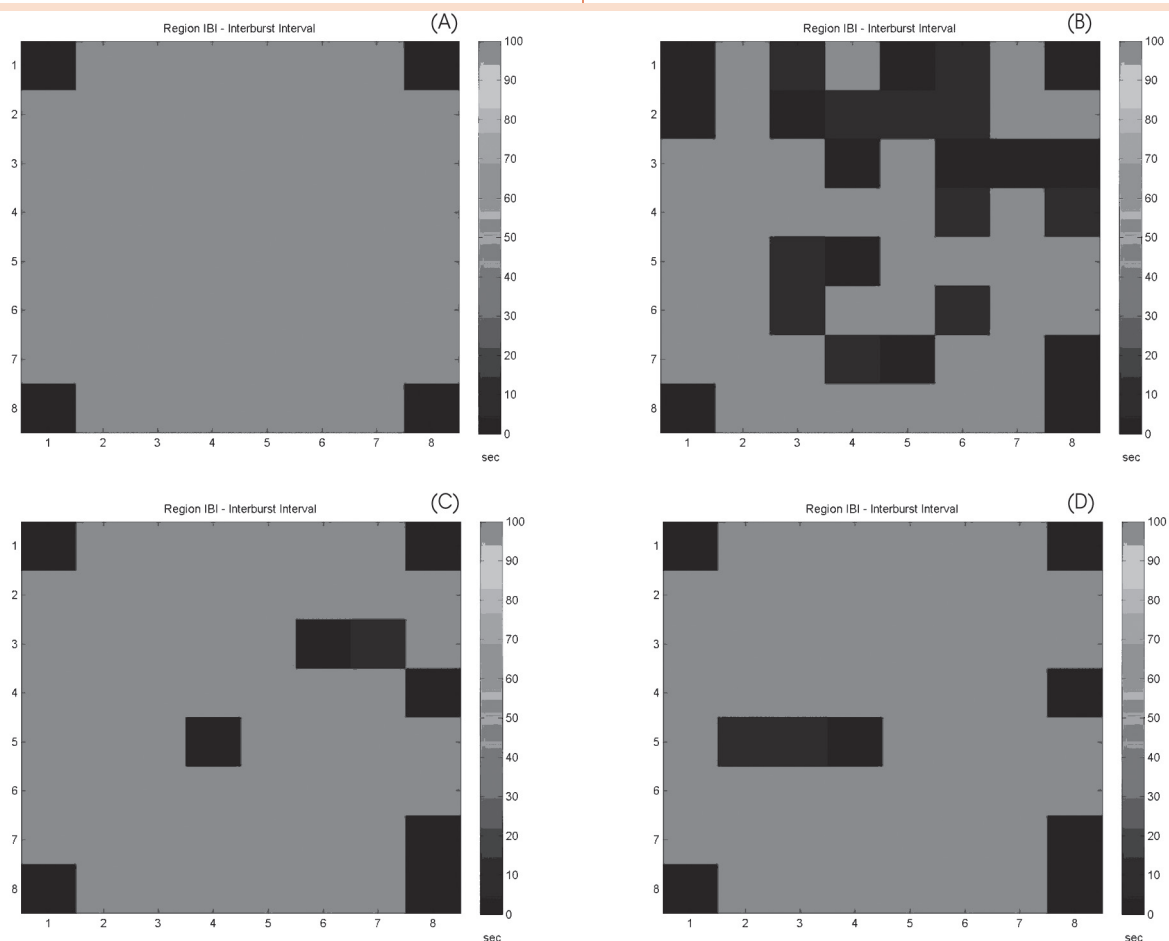


Figura 8: Intervalo entre *bursts* por região para o experimento 364: (A) DIV11, (B) DIV36, (C) DIV78, (D) DIV88

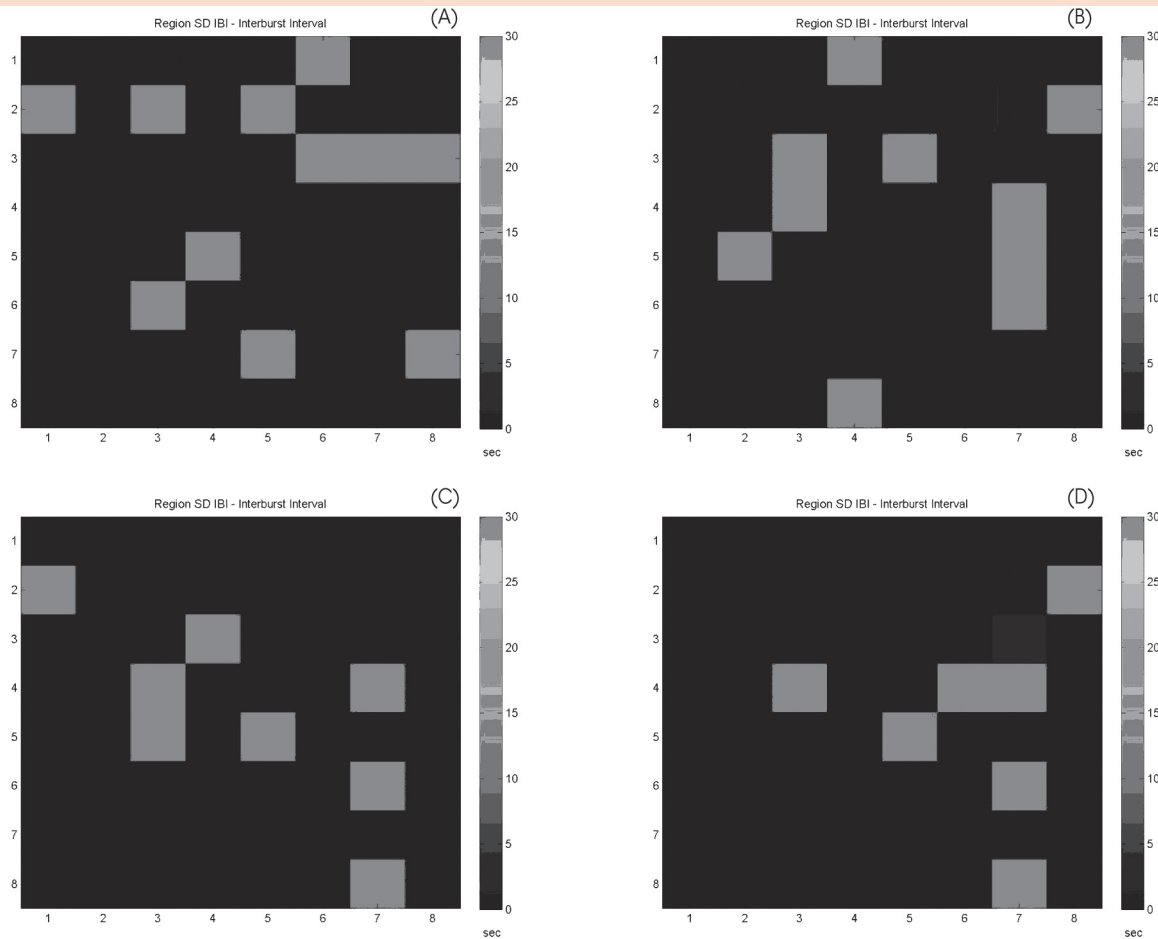


Figura 9: Desvio-padrão do intervalo entre *bursts* por região para o experimento 364: (A) DIV11, (B) DIV36, (C) DIV78, (D) DIV88

- Fase 1: uma repentina diminuição de todos esses eventos. No caso dos *spikes* (Figura 4(A)), essa mudança se inicia em DIV74, atingindo um mínimo de *spikes* em DIV81. Já para os *bursts* (Figura 5(A)), essa quebra começa mais cedo, em DIV67. Tanto num caso quanto no outro, o desvio-padrão aumenta consideravelmente, o que implica desorganização da atividade elétrica como um todo. Com certeza, esses eventos sinalizam o fim da maturidade da cultura e o início da morte celular.
- Fase 2: em seguida, acontece uma inesperada elevação da ocorrência de *spikes* e *bursts*.

Novamente, esse evento é sinalizado mais antecipadamente pelos *bursts*, que em 74 DIV, (Figura 5(A)), apresentam valores de IBI tão baixos quanto aqueles observados durante a etapa inicial (veja Figura 5(A), DIVs 8-29). Em termos dos *spikes*, isso ocorre mais tardiamente, ou seja, conforme Figura 4(A), somente a partir de DIV85, quando o valor médio de ISI atinge também valores tão baixos quanto aqueles observados durante a etapa inicial (veja Figura 4(A), DIVs 15-29). Ao mesmo tempo, comparando-se os desvios-padrão das grandezas IBI e ISI relativamente à Fase 1 descrita no parágrafo anterior, esses parecem diminuir. Em síntese, a Fase 2 pode

Tabela 1: Estatísticas dos experimentos 364, 365 e 366

Experimento		364				365				366			
DIV		11	36	78	88	11	36	50	64	11	36	50	64
Spike	Total	7184	100922	45555	44581	1566	179336	47282	5491	2386	119049	71688	88977
	randômicos (%)	10,45	11,97	12,80	12,18	2,20	8,31	11,16	3,13	1,57	18,54	18,18	19,72
Burst	Total	160	5444	2098	2162	51	8100	3384	463	23	8590	3801	5521
	Duração média	33,22	65,96	37,65	28,63	8,61	62,51	40,79	3,77	2,53	74,34	76,90	93,84
	SD Duração média	3,61	2,75	2,16	1,68	0,73	1,61	1,82	0,26	0,17	2,04	4,45	4,92

ser caracterizada por uma verdadeira “explosão elétrica” sincronizada, com níveis de atividade comparáveis àquele nível do início de vida da cultura.

- Fase 3: morte celular propriamente dita, constatada no DIV91 pelo silêncio elétrico total de todos os canais, em que quase não existem nem *spikes*, nem *spikes* randômicos e nem *bursts*. Isso pode ser constatado pelos elevadíssimos valores atingidos por ISI e IBI, respectivamente nas Figuras 4(A) e 5(A).

Avaliando as três fases da morte celular apresentadas acima, deseja-se entender a origem da “explosão elétrica” constatada na Fase 2, o que é possível conforme descrição apresentada nos parágrafos 3 a 5 da sessão Introdução. Talvez em consequência do processo de apoptose, as alterações referentes ao aumento da permeabilidade ao íon Ca^{2+} e suas concentrações intracelulares poderiam induzir aumento da atividade elétrica, o que poderia explicar o fenômeno constatado nos experimentos.

Outro fato muito importante a ser destacado durante a morte celular envolve a análise das Figuras 6 a 9. Em particular, as Figuras 6(D) e 8(D), antecedentes ao final do processo, por caracterizarem o DIV88 durante a “explosão elétrica”, mostram claramente que, apesar do fenô-

meno em curso, ainda assim muitos neurônios apresentam intensa atividade de *spike* (Figura 6(D)), especialmente aqueles em conexão funcional com os microeletrodos situados no lado direito e com os localizados no centro da MEA; enquanto que os neurônios em conexão com alguns poucos microeletrodos situados no centro do dispositivo demonstram gerar intensa atividade de *burst* (Figura 8(D)). Assim, pode-se concluir que o silêncio elétrico total do DIV91 é atingido gradativamente ao longo do tempo, estabelecendo-se progressivamente nas diversas regiões topológicas da cultura. É interessante ainda notar que os microeletrodos situados no centro da MEA parecem ser responsáveis pela “explosão elétrica”, tanto em termos de *spikes* como em termos de *bursts*. Não foi possível encontrar uma explicação fisiológica para essa constatação.

4 Conclusões

Ao analisar o comportamento médio dos experimentos 364, 365 e 366, pode-se perceber que inicialmente (DIV8-DIV29) existem poucos *spikes*, com um intervalo de tempo grande entre eles (tipicamente da ordem de 100 ms), ocorrendo de forma desordenada e aleatória, o que se traduz por elevado desvio-padrão do ISI. Existem também poucos *bursts* de curta duração (em média

20 ms) e o intervalo entre eles também é muito elevado (podendo atingir amplitudes da ordem de 30 segundos), assim como o desvio-padrão do IBI.

Nos estágios intermediários (maturidade, DIV32-DIV64), a quantidade de *spikes* e *bursts* cresce expressivamente e, portanto, o intervalo tanto entre *spikes* como entre *bursts* é menor (respectivamente 10 ms e 5 s). Nessa etapa, a duração dos *bursts* tende a ser máxima, podendo assumir valores na ordem de 60 ms. Ocorre uma verdadeira sincronização entre os diversos sinais, o que leva a desvios-padrão de IBI, de ISI e de duração de *bursts* muito baixos, e a uma quantidade razoável (20%) de *spikes* randômicos.

Por fim, nos estágios finais (DIV67-DIV91), a cultura tende à morte celular, *spikes* e *bursts* gradativamente cessam, inclusive os *spikes* randômicos, sendo o intervalo entre eles cada vez maior, e a duração dos *bursts*, cada vez menor (mínimo de 20 ms). Assim sendo, comparando-se tais resultados experimentais à síntese do conhecimento já estabelecido pela literatura, apresentada no segundo parágrafo da Introdução, pode-se constatar que os resultados relatados estão coerentes com o estado-da-arte.

Os resultados obtidos por meio da análise quantitativa da atividade elétrica nos estágios finais de vida das culturas sugerem especulações sobre a existência de etapas no processo de morte celular, partindo-se de uma situação de desorganização dos padrões de disparo, seguida de uma inesperada hiperatividade, e finalizando-se com o silêncio elétrico. Destaca-se aqui uma grande semelhança entre o padrão de atividade elétrica encontrada no estágio inicial de vida da cultura (DIV8-DIV29) e durante as fases 2 e 3 da morte celular (DIV71-DIV91), quando ocorre a “explosão elétrica” seguida pela morte propriamente dita, porém de forma inversa, pois tal atividade a princípio se intensifica a partir de DIV74, para depois se esvanecer totalmente em DIV91.

Cogita-se que tal hiperatividade seja explicada pelo rápido efluxo de cálcio ligado à apoptose, item de pesquisa que merece aprofundamento em trabalhos futuros.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, respectivamente financiando o projeto associado ao processo TEC- APQ-02143-10 e à bolsa de iniciação científica; bem como à Universidade de Gênova, Itália, na pessoa do Prof. Sergio Martinoia, por disponibilizar todo o aparato biológico e experimental que possibilitou a realização deste trabalho.

Referências

- CHIAPPALONE, M. et al. Networks of neural coupled to microelectrode arrays: a neural sensory system for pharmacological applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, p. 627-634, 2003.
- CHIAPPALONE, M. et al. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during *in vitro* development. *Brain Research*, v. 1093, p. 41-53, 2006.
- KAMIOKA, H. et al. Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neuroscience Letters*, v. 206, p. 109-112, 1996.
- LITT, B. et al. Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy. In: INTERNATIONAL IEEE EMBS CONFERENCE ON NEURAL ENGINEERING, 1st., 2003, Capri Island. *Proceedings...*, Capri Island, Italy: IEE Conference Publications, 2003. p. 485-492.
- MARQUES, S. M. et al. Análise da evolução da atividade elétrica espontânea ao longo da maturação de culturas neurais e correlações fisiológicas. *Horizonte Científico*, v. 3, n. 2, 2009.
- RIEKE, F. et al. *Spikes: exploring the neural code*. New York: The MIT Press, 1997. 234 p.



RUTTEN, W. L. C. Selective electrical interfaces with the nervous system. *Ann. Rev. of Biomedical Engineering*, v. 4, p. 407-452, 2002.

SIMONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Reviews*, v. 36, p. 83-106, 1996.

TAKETANI, M.; BAUDRY, M. E. *Advances in network electrophysiology: using multi-electrode arrays*. United States: Springer-Verlag, 2006.

VAN PELT, J. et al. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, v. 51, p. 2.051-2.062, 2004.

VATO, A. et al. Spike manager: a new tool for spontaneous and evoked neuronal networks activity characterization. *Neurocomputing*, v. 58-60, p. 1.153-1.161, 2004.

Recebido em 27 dez. 2011 / aprovado em 18 abr. 2012

Para referenciar este texto

MARQUES, S. M. et al. Análise da evolução de culturas neurais. *Exacta*, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 122-136, 2012.