

Amplificação de Sinais de Matriz de Microeletrodos usando Ressonância Estocástica

Marco A. Barreto¹, Francisco Fambrini^{1,2}, José H. Saito^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação - FACCAMP
Campo Limpo Paulista-SP, Brasil

² Universidade Federal de São Carlos - UFSCar
São Carlos-SP, Brasil

marco.barreto@fatec.sp.gov.br, ffambrini@gmail.com, saito@dc.ufscar

Abstract. *Microelectrode Array (MEA) is a device used for in-vitro neuron culture and their electrophysiological signal recording. The analysis of these signals is used for the neuronal network dynamic researches, pharmacological drug tests, between other applications. The electric signals captured by MEA are of low amplitude and require special amplifier systems. In this paper, an amplification system for MEA signals is described, using the Stochastic Resonance (SR) phenomenon, which make beneficial use of noise, to detect and amplify small microelectrode signals. A prototype of one channel of this system was simulated successfully.*

Keywords – *stochastic resonance, MEA, microelectrode array, noise, neuronal signals, amplification.*

Resumo. *Matriz de Microeletrodos (microelectode array, MEA) é um dispositivo usado para cultura de neurônios in-vitro e registro de sinais eletrofisiológicos. A análise desses sinais é útil para o estudo da dinâmica de redes neuronais, teste de drogas farmacológicas, entre outra aplicações. Os sinais elétricos capturados pela MEA são de baixa amplitude e requer sistemas de amplificação especiais. Neste artigo, é descrito um sistema de amplificação para MEA, com o uso do fenômeno de Ressonância Estocástica (RE), que faz uso benéfico do ruído, para detectar e amplificar sinais de microeletrodos de pequena amplitude. Um protótipo de um canal desse sistema foi simulado e testado com sucesso.*

Palavras chaves - *ressonância estocástica, MEA, matriz de microeletrodos, ruído, sinais neuronais, amplificação.*

1. Informações Gerais

Matriz de Microeletrodos (Microelectrode Array, MEA) foi desenvolvida por Thomas (1972), com a mesma tecnologia dos circuitos integrados. É um dispositivo muito importante para a captação e registro de sinais de neurônios cultivados *in-vitro*, num reservatório em forma de anel, similar à placa de Petri, construído sobre os

microeletrodos. A cultura pode ser em fatias de tecidos neuronais, ou de neurônios dissociados, e os sinais elétricos registrados podem ser resultantes de atividades espontâneas dos neurônios, ou atividades evocadas por estimulação elétrica ou química. Quando se usa neurônios dissociados de embriões de ratos Wistar, as células se espalham aleatoriamente sobre o reservatório, e após sete dias de cultura, iniciam a ativação espontânea de sinais neurológicos, conhecidos como potenciais de ação, ou *spikes*. É recomendado que se realize os experimentos de registro, no período de 18 a 42 dias-in-vitro (DIV), após os neurônios se tornarem adultos, com grande probabilidade de obter *spikes* com estimulação. Na Figura 1 é mostrada uma MEA com 60 canais de microeletrodos, fabricado pela Multi-Channel Systems - MCS (2015) que é denotado de MEA padrão. A dimensão do microeletrodo circular pode ser escolhido pelo usuário, ao adquirir o dispositivo, e pode variar entre 10, 20 e 30 μm ; e a distância entre os microeletrodos, pode variar entre 100, 200 e 500 μm . Os 60 microeletrodos são distribuídos numa superfície plana, num arranjo 8x8, sem microeletrodos nos vértices.

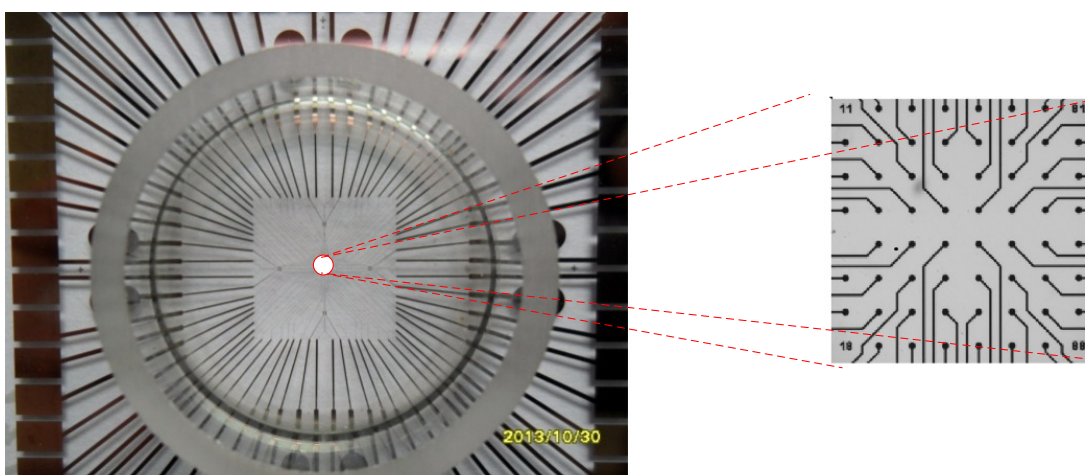


Figura 1. MEA padrão: à esquerda, é mostrada uma MEA com o anel (placa de Petri) onde se cultiva as células; e à direita, detalhe ampliado da pequena região central onde fica a matriz de microeletrodos.

Ao lado esquerdo da Figura 1, mostra-se uma fotografia, com os 60 microeletrodos na região central (circundada em vermelho), e os terminais (*pads*) nas bordas que contornam a MEA. No lado direito, pode-se ver detalhes da região central com o arranjo de microeletrodos. Um microeletrodo, em forma circular, coberto por nitrito de titânio (TiN), conecta-se ao respectivo terminal por meio de condutor impresso na superfície da MEA. Os sinais elétricos registrados pelos múltiplos canais devem ser amplificados, filtrados, digitalizados e transmitidos ao computador.

Os sinais de entrada tem amplitude muito baixa, e os amplificadores operacionais (AO) convencionais exibem não-linearidade para tais sinais, devido ao nível de ruído intrínseco serem próximos à amplitude média dos sinais de entrada.

Este artigo descreve uma metodologia inovadora de capturar sinais de entrada de baixa amplitude, misturando um ruído branco de ótima amplitude, com os sinais de

entrada providos dos eletrodos da MEA, fazendo uso benéfico do ruído, metodologia conhecida como Ressonância Estocástica.

As seguintes seções descrevem a teoria de Ressonância Estocástica (Seção 2), a proposta do projeto do amplificador (Seção 3), os resultados de simulação e experimentais (Seção 4), e conclusões (Seção 5).

2. Ressonância Estocástica

Ressonância estocástica (RE) foi primeiro descrito por Benzi (1981) para explicar a mudança climática, entre estágios interglaciais e glaciais, com alterações de temperatura de longo-termo, por meio de uma cooperação entre as forças periódicas externas à terra, como as variações orbitais e mecanismo estocástico interno, tais como fenômenos oceânicos, atmosféricos, e erupções vulcânicas. Desde então, o fenômeno de ressonância estocástica tem sido identificado em inúmeros sistemas, quando o ruído e a não-linearidade competem para determinar um ganho na resposta do sistema. RE ocorre, usualmente, em sistemas bi-estáveis, quando um sinal periódico de pequena amplitude (por exemplo, um sinal senoidal) é misturado com um sinal estocástico, o ruído. A resposta do sistema é composta por uma combinação dos dois sinais que competem e cooperam para fazer mudança entre os dois estados estáveis. Quando o sinal periódico é pequeno relativamente ao nível limiar do sistema, o ruído é necessário para que o estado do sistema se altere. Nesse caso, se o ruído é de baixa amplitude, ocorre uma resposta muito baixa, principalmente aleatória, sem periodicidade significativa na resposta do sistema. Quando o ruído é muito intenso, ocorre uma grande quantidade de interrupções no período, e a resposta do sistema não mostra uma periodicidade notável. Surpreendentemente, entre essas duas condições, existe um nível ideal de ruído, que cooperativamente compete com o sinal periódico, para a obtenção de exatamente uma interrupção num período, Gammaitoni (1998).

Na Figura 2(a) ilustra-se um sistema de dois poços de potenciais, representado pela eq. (1):

$$V(x) = x^4 + x^2 \quad (1)$$

onde a coordenada horizontal corresponde à variável x , e a coordenada vertical, ao potencial $V(x)$. Os dois poços representam estados estáveis, na ausência do ruído. Na presença do ruído, os dois poços variam os seus potenciais, conforme as quatro situações do diagrama, percorridas circularmente, no sentido horário, por exemplo: a) inicialmente, no diagrama do topo, os dois poços estão com os mesmos níveis de potencial; b) em seguida no diagrama da direita, o potencial do poço esquerdo eleva o nível, fazendo com que as partículas passem para o poço da direita; c) no diagrama inferior, os dois potenciais se igualam novamente; e d) no diagrama da esquerda, o poço da direita eleva o nível de potencial, permitindo com que as partículas passem para o poço da esquerda. Na Figura 2(b), vemos um diagrama de função no tempo, onde a posição das partículas nos poços se alteram, na presença do ruído. O tempo é representado na coordenada horizontal e a variação da posição das partículas na coordenada vertical.

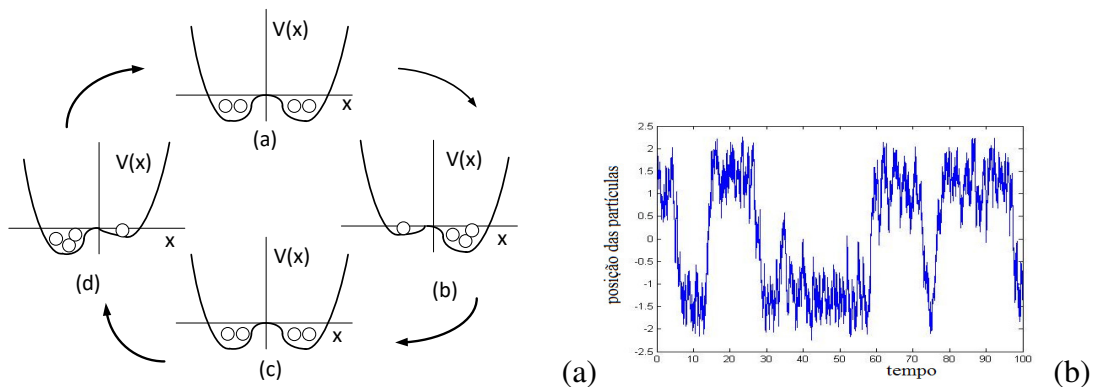


Figura 2. (a) Poços de potenciais, ilustrando o fenômeno de Ressonância Estocástica de um sistema bi-estável; (b) diagrama de tempo de posição das partículas nos poços de potenciais, na presença de ruído. Baseada em Gammaitoni (1998).

Uma ilustração do fenômeno RE em amplificação de sinais é mostrado na Figura 3, MacDonnell (2002). Quando um sinal periódico de entrada tem uma amplitude abaixo do nível de limiar do amplificador, resulta em saída zero. Adicionando ruído ao sinal de entrada (figura 3a), a amplitude do sinal resultante se torna suficiente para ser amplificada e a saída mostra valores não zeros em rajadas, na mesma frequência do sinal de entrada (figura 3b).

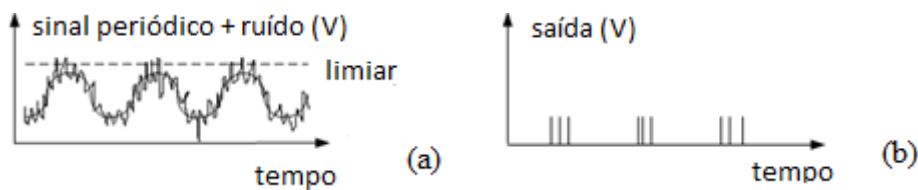


Figura 3. Fenômeno RE em amplificação de sinais elétricos, McDonnell (2002): a) sinal periódico com ruído na entrada, (b) saída do amplificador.

3. Projeto de Amplificador com Ressonância Estocástica

Nesta seção é descrita uma proposta de circuito eletrônico para amplificação e detecção de sinais capturados pelos microeletrodos da MEA, aplicando o fenômeno RE, composto por: (a) um pré-amplificador para sinais capturados pelo microeletrodo da MEA, com ajuste de ganho; (b) gerador de ruído térmico; (d) misturador de sinais e estágio de saída.

3.1. Pré-amplificador de ganho ajustável

O sinal capturado pelo microeletrodo da MEA é aplicado a um *buffer* que usa um circuito integrado LM358. Esse amplificador de ganho unitário, representa uma alta impedância de entrada (da ordem de 10 M) e baixa impedância de saída (da ordem de 100Ω), provendo a isolação entre o sinal da MEA e o resto do circuito, bem como, evitando a propagação descontrolada do ruído gerado em direção à MEA. Após o *buffer*, o sinal é aplicado a um outro estágio de LM358, em configuração de amplificador não-inversor, com ganho ajustável usando um *trimpot* VR1, com valor máximo de 100K. O ganho de voltagem desse estágio pode ser ajustado entre 1 e 101 vezes. O circuito está mostrado na Figura 4.

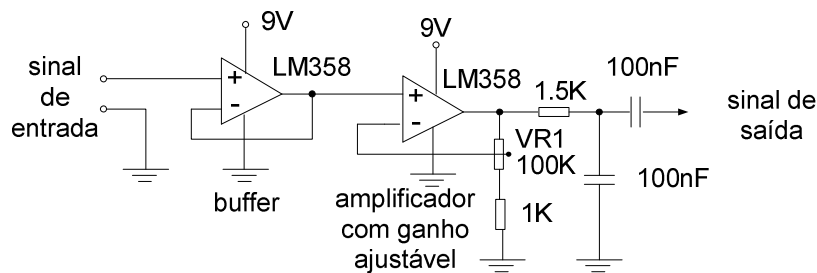


Figura 4. Diagrama de circuito pré-amplificador com ganho ajustável.

3.2. Gerador de ruído térmico

O circuito gerador de ruído (Figura 5) inicia-se com o conjunto de transistores BC548BP, sendo um deles, o de coletor em aberto, o gerador de ruído térmico de baixa amplitude (ruído branco). Esse ruído térmico é amplificado por dois circuitos de transistors BF240 subsequentes. O sinal de ruído amplificado de saída é obtido através do resistor de 35k. Neste circuito, existe uma chave que pode opcionalmente desconectar o circuito gerador de ruído térmico, para propósito de teste. O ruído de saída é então conectado à entrada do circuito seguinte.

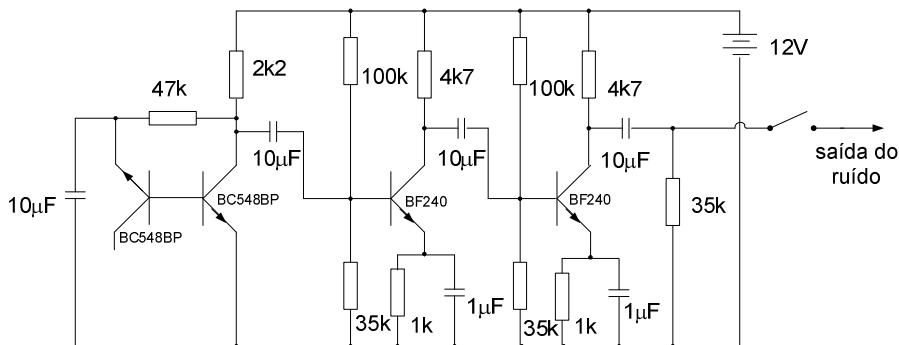


Figura 5. Diagrama de circuito gerador de ruído térmico.

O ganho de cada amplificador é dado pela relação entre o resistor de coletor (4k7) e o resistor de emissor (1k), ou seja da ordem de 4,7. Porém, a reatância do capacitor em paralelo com o resistor de emissor (dada por $1/2\pi f C$, onde f é a frequência e C , a capacitância), deve ser considerada. Como o ruído branco tem componentes em praticamente todas as frequências, fica difícil saber exatamente qual é o ganho desta etapa, mas as frequências maiores serão amplificadas mais vezes, devido justamente à reatância do capacitor de emissor.

3.3. Estágio misturador e de saída

O estágio misturador (Figura 6) é composto de três transistores NPN de uso geral, BC547, em configuração emissor comum. O primeiro transistor recebe o sinal de entrada pré-amplificado, cuja amplitude é controlada pelo *trimpot* VR2. O Segundo transistor recebe o sinal de ruído branco, com sua amplitude controlada pelo *trimpot* VR3. Ambos os transistores tem ganho unitário, definido pela relação dos resistores de coletor e emissor (12K e 15K). Os coletores desses dois transistores são conectados ao mesmo ponto de um terceiro transistor BC547, em configuração coletor comum, com o

seu coletor conectado diretamente à voltagem de +9V. Isso certifica uma distribuição equilibrada de sinal e ruído, e uma boa separação elétrica desses sinais. A impedância de saída do estágio de mistura é definida pelo resistor conectado ao emissor desse terceiro transistor (15K). O sinal elétrico misturado é apresentado ao circuito de saída.

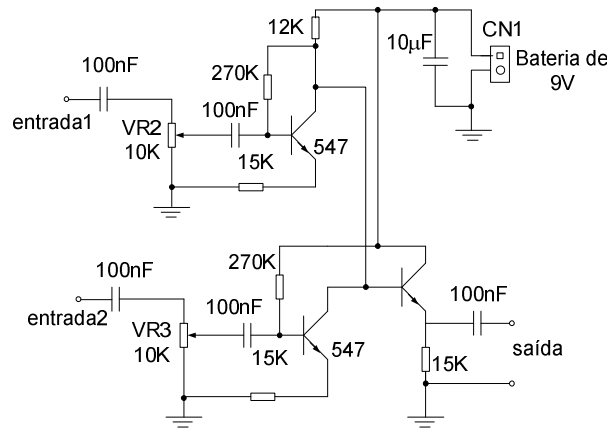


Figura 6. Diagrama de circuito misturador e de saída.

4. Resultados de simulação e experimentos

Na Figura 7 é mostrada uma curva que caracteriza o fenômeno RE, onde na coordenada horizontal temos a variação do nível de ruído, e na coordenada vertical, o desempenho, medido em razão sinal-ruído. É possível verificar que numa determinada faixa de nível de ruído o desempenho é maior, devido a ocorrência do fenômeno RE, McDonnell (2009).

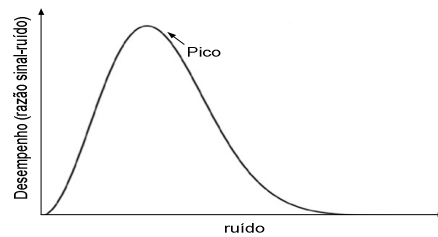


Figura 7. Curva característica do fenômeno de ressonância estocástica, baseado em McDonnell (2009).

Para a obtenção da razão sinal-ruído (RSR) para séries discretas de tempo, calcula-se a potência do sinal e do ruído, usando a equação (2):

$$\text{Potência} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2 \quad (2)$$

onde x_i é o valor no tempo i e N é o número total de elementos da série. Em seguida, divide-se a potência do sinal pela potência do ruído, para a obtenção de RSR.

Com a finalidade de constatar a existência do fenômeno de ressonância estocástica num sistema de amplificação de um sinal eletrofisiológico acrescentado ao ruído aleatório, e também, para obter o nível de ruído mais apropriado para a verificação do referido fenômeno, foi desenvolvido um simulador do circuito proposto, em Matlab. Ao aplicar uma sequência de sinais de 1s de duração, registrado por um microeletrodo

numa cultura de neurônios hipocampais de rato Wistar, Figura 8(a), foi obtida uma curva de razão sinal-ruído conforme Figura 8(b). Nota-se na região da curva próxima a 150 mV de ruído, um melhor nível de razão sinal-ruído.

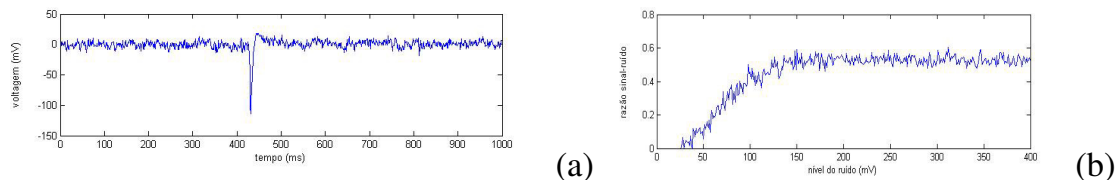


Figura 8. (a) Diagrama de tempo de um sinal eletrofisiológico registrado por um microeletrodo da MEA, numa cultura *in-vitro* de rato Wistar; (b) razão sinal-ruído obtido para um simulador do circuito amplificador projetado, aplicando o sinal eletrofisiológico (a).

No mesmo simulador do circuito proposto, ao aplicar uma sequência valores de um sinal periódico senoidal num tempo de 1s, Figura 9(a), foi obtida uma curva de razão sinal-ruído conforme Figura 9(b). O nível de ruído onde se nota um melhor nível de razão sinal-ruído é em torno de 80 mV.

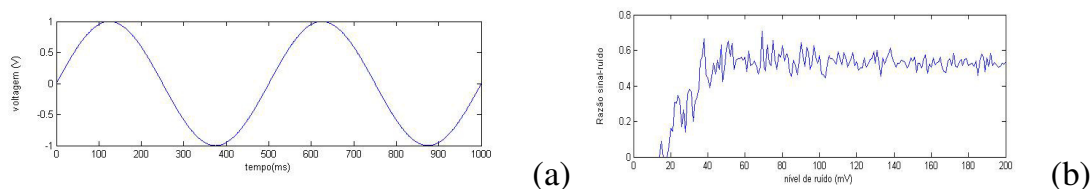


Figura 9. (a) Diagrama de tempo de um sinal periódico senoidal; (b) razão sinal-ruído.

Os experimentos foram desenvolvidos no protótipo de um canal do circuito proposto. Para proceder os experimentos, foi utilizado um sistema gerador de sinais desenvolvido por Fambrini (2014), denotado Simulador de MEA (SimMEA), que simula fisicamente o dispositivo MEA, gerando sinais apropriados nos terminais da MEA, quando se usa um soquete apropriado, Figura 10(a). Na Figura 10(b) é mostrada uma fotografia do protótipo de sistema amplificador implementado.

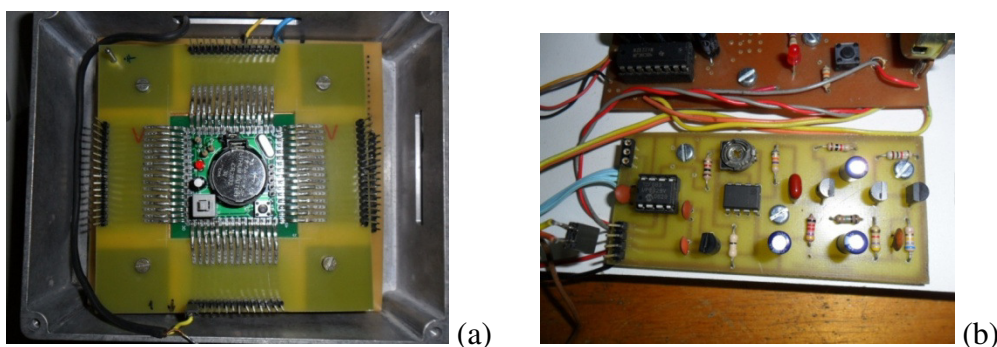


Figura 10. Fotos: (a) de um simulador de MEA, SimMEA, montado sobre um soquete de MEA padrão; (b) protótipo do sistema amplificador implementado.

Na Figura 11(a) mostra-se o ruído térmico gerado pelo circuito gerador, capturado por um osciloscópio; e a Figura 11(b) mostra o sinal capturado na saída do circuito amplificador com ressonância estocástica, para um sinal senoidal de entrada.

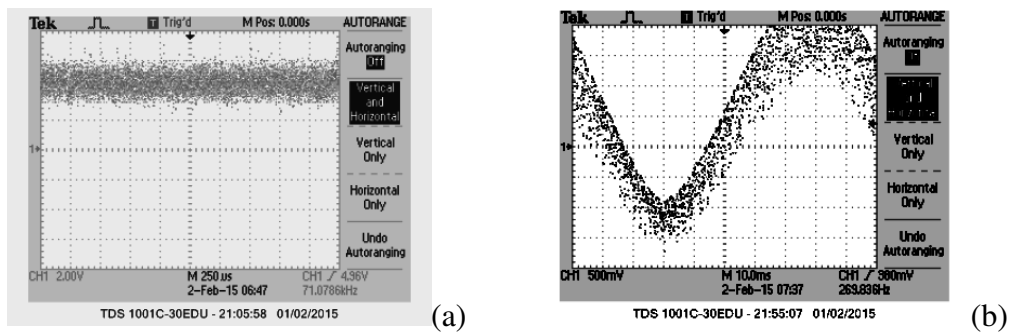


Figura 11. (a) Ruído térmico gerado pelo circuito de geração de ruído desenvolvido; (b) Sinal obtido na saída do circuito amplificador com ressonância estocástica.

5. Conclusões

Foi descrito o projeto de um sistema de amplificação com ressonância estocástica, onde o sinal de ruído térmico é adicionado ao sinal de baixa amplitude. O amplificador descrito é proposto para a amplificação e registro dos sinais de microeletrodos de MEAs, numa tentativa de amplificar sinais de amplitude muito baixa, menor que $100 \mu\text{V}$, perto dos ruídos intrínsecos dos amplificadores operacionais envolvidos, onde a linearidade da resposta não se aplica. A simulação e os experimentos descritos mostram que o circuito de ressonância estocástica proposto é capaz de capturar sinais de baixa amplitude.

Referências

- Benzi, R.(1981)"The mechanism of stochastic resonance", *Journal of Physics A: Mathematical and General*, vol. 14, num.11.
- Fambrini, R. (2014) "Projeto e Construção de um Sistema de Amplificação de Sinais Registrados e Estimulação de Neurônios cultivados in vitro em Matrizes de Microeletrodos", *Dissertação de Mestrado, FACCAMP, C. Limpo Paulista, Brasil.*
- Gammaitoni, L., Hanggi, P., Jung, P., Marchesoni, F. (1998) "Stochastic Resonance", *Rev. Mod. Phys.* Vol.70, num.225.
- McDonnell, M.S., Abbott, S., Pearce, C.E.M. (2002) "A characterization of suprathreshold stochastic resonance in an array of comparators by correlation coefficient", *Fluctuation and Noise Letters*, vol.2, num.3, pp.213-228.
- McDonnell, M.D., Abbott, D. (2009) "What is stochastic resonance? Definitions, Misconceptions, Debates, and its Relevance to Biology", *PLOS Computational Biology*, vol.5, num.5, pp.1-9.
- MCS (2015) "Innovations in Electrophysiology, *Multi Channel Systems*". <http://www.multichannelsystems.com>.
- Thomas, C.A., Springer, P.A., Loeb, G.W., Berwald-Netter, Y., Okun, L.M. (1972) "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells", *Experimental Cell Research*, vol. 74, pp. 61–66.