

Projeto e implementação de um protótipo de amplificador de sinais eletrofisiológicos em culturas *in-vitro* de neurônios

Francisco Fambrini¹, Marco A. Roberto¹, 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

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

Abstract. *MEA (Micro-Electrode Array) is a very useful device for extracellular signal recording of in-vitro cultured neurons or network of neurons. It can be used for the research of the neuronal network dynamics, recording with the microelectrodes the spontaneous activity signals of the network of neurons, and the evoked physiological signals in response to chemical or electrical stimulations. This paper describes the design of a low noise first stage of the MEA signal amplifier, denoted headstage amplifier. The design, simulation and construction of a prototype of the headstage amplifier, and a pass-band filter, are described.*

Resumo. *Matriz de Microeletrodos (Micro-Electrode Array, MEA) é um dispositivo usado para registro de sinais extracelulares de neurônios, em fatias de tecidos, ou dissociados e cultivados in-vitro. Analisando esses sinais que podem ser espontâneos ou evocados por estimulações, químicas ou elétricas, pode ser pesquisado o comportamento dos neurônios. Este trabalho descreve o projeto do primeiro estágio desse sistema de amplificação, denominado pré-amplificador, ou headstage. É descrito o projeto, simulação e construção do protótipo do pré-amplificador, junto com o filtro de passa-banda.*

1. Introdução

Uma Matriz de Microeletrodos (Microelectrode Array, MEA) para cultura in-vitro de neurônios, é um dispositivo em substrato de vidro, com os sensores circulares, na sua região central, no fundo de uma câmara semelhante a uma Placa de Petri, interligados até os conectores na borda do substrato, por trilhas condutoras e isoladas da cultura [1]. Os sinais eletrofisiológicos obtidos são extracelulares e as culturas dissociadas podem ser mantidas vivas, para medições, por várias semanas. As culturas podem ser estimuladas quimicamente ou eletricamente antes das medidas eletrofisiológicas serem realizadas. Os resultados de medidas espontâneas ou estimuladas podem ser usados para o estudo do comportamento dinâmico de células neuronais, da comunicação entre as células, e para estudos de fármacos, analisando o efeito nos sinais eletrofisiológicos, quando são realizadas as estimulações das células cultivadas por drogas. Os resultados de medidas espontâneas ou estimuladas podem ser usados para o estudo do comportamento dinâmico de células neuronais, da comunicação entre as células, e para

estudos de fármacos, analisando o efeito nos sinais eletrofisiológicos, quando são realizadas as estimulações das células cultivadas por drogas.

Recentemente, diversos trabalhos tem sido desenvolvidos sobre MEA, como o trabalho de Jimbo e colaboradores, que estudaram a dinâmica de culturas corticais de alta densidade e descobriram que um único estímulo pode produzir uma sequência de pulsos em curto intervalo de tempo (bursts) em todos os microeletrodos [2]. Num outro estudo do Laboratório de Meister, foi descoberto que grupos de até 7 células ganglionares disparam sincronamente e tais grupos representam mais de 50% de todos os registros de pulsos (spikes) da retina [3]. A referência [4] apresenta uma revisão das MEAs e usos em culturas de células. Existem atualmente, vários sistemas comerciais de MEAs, sendo o principal fabricante a Multi Channel Systems (MCS) de Reutlingen, Alemanha [5], que disponibiliza o sistema completo MEA60 de amplificação e aquisição de dados, usando uma MEA conhecida como MEA Padrão, de 60 microeletrodos. A MEA Padrão tem uma área de registro escolhida de 700x700 µm até 5x5 mm; distância entre os microeletrodos, que pode ser escolhida dentre 100, 200 e 500 µm; e diâmetro dos microeletrodos escolhido dentre 10, 20 e 30 µm. Os microeletrodos de Nitrito de Titânio (TiN) tem uma impedância no intervalo entre 20 a 400 kΩ, dependendo do seu diâmetro, e tem uma vida média de utilização de um ano [6]. As trilhas que conectam os sensores circulares dos microeletrodos até a borda do substrato de vidro da MEA Padrão podem ser de Óxido de Índio-Estanho (Indium Tin Oxide, ITO), ou Titânio, e são isoladas eletricamente usando Nitrito de Silício.

Em seguida constam o projeto do sistema de amplificação (Seção 2), simulação e resultados (Seção 3), e conclusões (Seção 4).

2. Projeto do sistema de amplificação

Como os sinais de neurônios capturados pelos microeletrodos da MEA tem magnitude de microvolts, eles devem ser amplificados por um fator de 1000 (30 dB), usando mais de um estágio. O primeiro estágio do amplificador, o pré-amplificador, conhecido como *headstage*, é o estágio mais importante, que deve apresentar a melhor razão sinal-ruído possível [7]. O ruído possui causas extrínsecas, tais como interferências eletromagnéticas, e causas intrínsecas, tais como ruídos térmicos produzidos por movimentos de cargas elétricas, que podem ser estimados pela relação de Johnson-Nyquist.

A seleção de três estágios do amplificador de instrumentação, em vez do amplificador não-inversor é uma melhor escolha, devido ao baixo nível de ruído, por subtrair o sinal de modo comum. Para o amplificador de instrumentação, o ganho de voltagem contínua, DC, fora da região de saturação é dado pela equação (1),

$$V_{out} = \left(1 + \frac{2R_3}{R_g}\right)(V_1 - V_2) \quad (1)$$

onde V_{out} é a tensão elétrica de saída do amplificador não-saturado, em função da diferença das voltagens de entrada V_1 (input1) e V_2 (input 2). Fazendo $R_3 = R_g$, por exemplo, o ganho se torna igual a 3. A voltagem de modo comum, que surge em relação à terra, tem a mesma intensidade adicionada a V_1 e V_2 , e se cancela na subtração, o que torna o amplificador de instrumentação mais eficiente[8]. Na Figura 1 é ilustrado o diagrama do circuito eletrônico implementado.

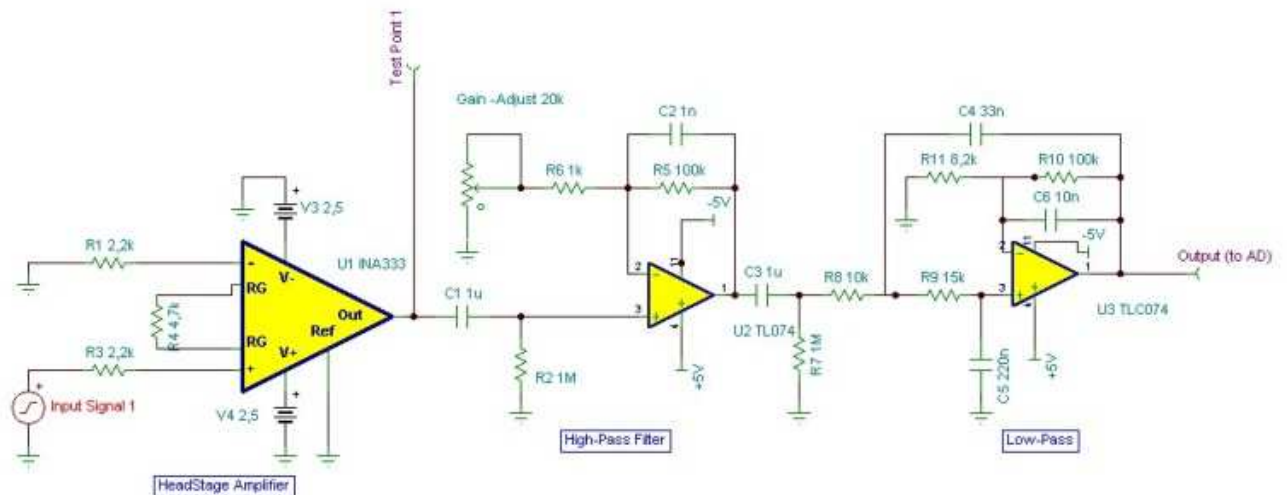


Figura 1. Diagrama esquemático de um canal do amplificador implementado.

3. Simulação e Resultados

O diagrama de circuito foi projetado usando o circuito amplificador *INA 333*®, *Texas Instruments*, para o pré-amplificador, com ganho G calculado pela equação (2):

$$G = 1 + \frac{100K\Omega}{R_g} \quad (2)$$

e um filtro passa-alta, Butterworth de segunda ordem, com frequência de corte calculada para 0.16 Hz, associado com um filtro de passa-baixa, Butterworth de terceira ordem, com frequência de corte de 10KHz. O circuito pré-amplificador foi inicialmente simulado usando o simulador *TINA*® *TI-V9 Texas Spice Simulator*. A densidade de ruído do protótipo projetado foi medido variando o ganho de voltagem de 1 a 1000, com o ajuste de um resistor R_g , e a frequência de 1 a 10 KHz, sem filtragem.

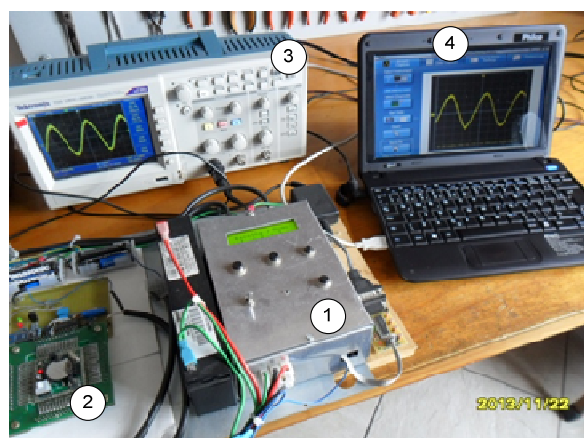


Figura 2. Aparato para a medição do protótipo de pré-amplificador: (1) pré-amplificador, (2) gerador de sinais, cujo sinal é reduzido ao nível de voltagem de um microeletrodo da MEA, (3) osciloscópio e (4) computador.

Na Figura 2 é mostrado o aparato de medição do protótipo de pré-amplificador com os seguintes elementos: (1) pré-amplificador, (2) gerador de sinais, cujo sinal é reduzido ao nível de voltagem do microeletrodo da MEA, (3) osciloscópio e (4) computador. Na

Figura 3, é apresentado o gráfico de ruído pico-a-pico na saída do pré-amplificador, variando o ganho de tensão elétrica, para uma entrada de sinal dente-de-serra a 100 Hz.

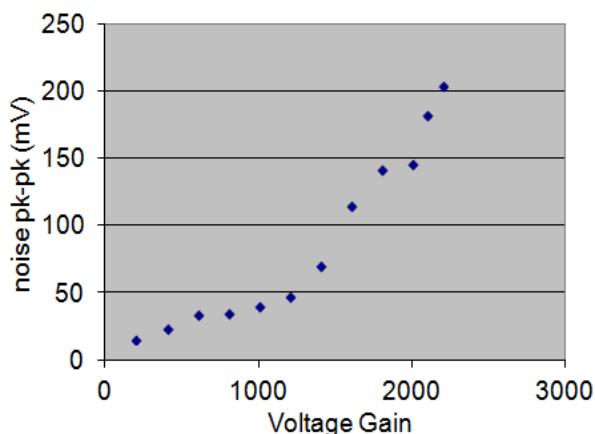


Figura 3. Gráfico que relaciona o nível de ruído em função do ganho para o amplificador.

4. Conclusões

O sistema se mostrou factível inclusive tendo sido testado com culturas de células biológicas na Universidade Federal de Uberlândia, em fevereiro de 2014. Os níveis de ruído (fixando-se o ganho em 1000) mostraram-se compatíveis com a aplicação, fornecendo aos pesquisadores um equipamento utilizável para testes de laboratório.

6. Referências

- [1] C. Klisch, A. Inyushkin, J. Mordel, D. Karnas, P. Pévet, H. Meissl,(2009) "Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro", *Eur. Journal of Neuroscience*, vol. 30, pp. 65–75.
- [2] Y.Jimbo, A.Kawana, P. Parodi, V. Torre.(2003) "The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats", *Biological Cybernetics*, vol. 83, pp. 1-20, 2000.
- [3] M.J.Schnitzer, M. Meister (2003) "Multineural firing patterns in the signal from eye to brain", *Neuron*, vol. 37, pp. 499-511.
- [4] G. W. Gross (2011), "Multielectrode arrays", *Scholarpedia*, vol. 6.
- [5] M. C. Systems (2012), "Innovations in Electrophysiology, *Multi Channel Systems*". Available on www.multichannelsystems.com, acessado em dezembro de 2012.
- [6] W. Rutten, J. M. Mouveroux, J. Buitenweg, Heida, Ruardij, Marani, E. Lakke (2001),"Neuro-electronic interfacing with cultured multi electrode arrays toward a cultured probe"; *Proc. IEEE* 89, pp. 1013–1029.
- [7] D.A.Wagenaar, S.M.Potter (2004)."A versatile all-channel stimulator for electrode arrays, with real-time control", *J. Neural Eng.* 1, 39–44.
- [8] A. F. Gruiter (1988), "Amplificadores Operacionais, Fundamentos e Aplicações", McGraw-Hill Ed..