

ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA ESPONTÂNEA AO LONGO DA MATURAÇÃO DE CULTURAS NEURAIS E CORRELAÇÕES FISIOLÓGICAS

SUÉLEN MOREIRA MARQUES^{1a}, MAURO GUILHERME GUZO^{2b}, AMANDA FERREIRA NEVES^{3a}, MAURÍLIA MARTINS DE OLIVEIRA^{4c}, DHAINNER ROCHA MACEDO^{5d}, JOÃO BATISTA DESTRO-FILHO⁶, LUIZ OTÁVIO MURTA JR.⁷

RESUMO: A conexão funcional entre os neuritos de uma cultura neuronal dissociada do hipocampo de embriões de ratos e os microeletrodos de Matrizes Multieletrodo (MEAs) é estudado para um conjunto de dados composto por observações tomadas em três diferentes culturas, considerando os seguintes dias *in vitro* (DIV): 08, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36 e 39. A análise da atividade elétrica dos 60 canais foi realizada em termos da detecção de *spikes* e de conjuntos de *spikes* (*bursts*), que permitem estimar diversos quantificadores estatísticos. A discussão da evolução temporal de tais quantificadores, associada a elementos provenientes da literatura, possibilitam discutir aspectos fisiológicos relevantes associados ao fenômeno estudado. Desta forma, quatro etapas são caracterizadas e discutidas, sintetizando o conhecimento atual acerca do processo de conexão com base em resultados experimentais, os quais são bastante próximos àqueles relatados pela literatura no contexto de preparos biológicos baseados no hipocampo de embriões de ratos.

PALAVRAS-CHAVE: cultura neural dissociada, matriz multieletrodo, conexão funcional, processamento de sinais biológicos.

¹ Graduação em Engenharia Elétrica - UFU, Campus Santa Mônica, Uberlândia - MG, <sueletrica@gmail.com>

² Graduação em Física Médica - USP, Ribeirão Preto - SP, <mguzo@hotmail.com>

³ Graduação em Ciências Biológicas - UFU, Campus Umuarama, Uberlândia - MG, <amanda.nvs@gmail.com>

⁴ Graduação em Biomedicina - UFU, Campus Umuarama, Uberlândia - MG, <mauriliaoliveira@yahoo.com.br>

⁵ Graduação em Enga Biomédica - UFU, Campus Santa Mônica, Uberlândia - MG, <dhainner1@yahoo.com.br>

⁶ Docente da Faculdade de Engenharia Elétrica - UFU, Bloco 1E, Uberlândia - MG, <jbdestro@ufu.br>

⁷ Docente da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP, SP, <murta@ffclrp.usp.br>

^a Bolsistas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

^b Bolsista pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (PRP-USP)

^c Bolsista pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

^d Bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

ANALYSIS OF SPONTANEOUS ELECTRICAL ACTIVITY EVOLUTION THROUGHOUT THE MATURATION OF NEURONAL CULTURES AND PHYSIOLOGICAL CORRELATIONS

SUÉLEN MOREIRA MARQUES^{1a}, MAURO GUILHERME GUZO^{2b}, AMANDA FERREIRA NEVES^{3a}, MAURÍLIA MARTINS DE OLIVEIRA^{4c}, DHAINNER ROCHA MACEDO^{5d}, JOÃO BATISTA DESTRO-FILHO⁶, LUIZ OTÁVIO MURTA JR.⁷

ABSTRACT: The process of functional-connection development, involving the neurites of an hippocampal-based and dissociated neuronal culture of rat embryos, as well as the microelectrodes of a Multielectrode Array (MEA) device, was studied. Our dataset is composed of recordings taken on three different cultures in the following Days In-Vitro (DIV): 08, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36 e 39. *Spike* and *burst* detection on all the sixty channels were performed to enable electrical activity analysis, in terms of several different quantities. The temporal evolution of such quantities and the previous literature findings make possible to discuss several relevant physiological issues tied to the phenomenon under analysis. As a consequence, four steps of the maturation process are highlighted and discussed, providing a summary of the current knowledge on this process, based on experimental data. Our results are very close to those reported in the literature, supposing the context of hippocampal tissues of rat embryos.

KEYWORDS: dissociated neuronal culture, Multielectrode Array (MEA), functional connection, biological signal processing.

1. Introdução e Justificativa

As matrizes multieletrodo (MEAs) (RUTTEN, 2002) consistem em dispositivos nanotecnológicos comercialmente disponíveis, sendo usadas para acessar seletivamente potenciais de ação de tecidos, como por exemplo neurônios e cardiomiócitos. Elas são atualmente empregadas não apenas para estudos da informação biológica neural (RIKE,1997), como também para aplicações em farmacologia (CHIAPPALONE,2003) e neuroimplantes. Estes últimos objetivam substituir partes lesionadas do hipocampo (WAGENAAR,2007) ou minimizar crises epiléticas (LITT,2003). No último caso, a atuação da MEA é extremamente relevante, pois 25% dos portadores de epilepsia não respondem a medicamentos anticonvulsivantes, que constituem a terapia mais comum; e, dentre os pacientes que recebem medicação, estima-se que 50% apresentem efeitos colaterais (URL1). Assim sendo, a grande quantidade de portadores de epilepsia, cujo tratamento é atualmente sem sucesso ou que sofrem de efeitos colaterais nocivos oriundos da medicação, exige a busca de novas soluções, motivando portanto as pesquisas realizadas com a MEA (COCKERELL, 1998).

Existem diversas limitações e desafios técnicos que impedem a aplicação clínica dos neuroimplantes, cuja implementação física está intimamente ligada ao desenvolvimento do conhecimento acerca de detalhes importantes associados aos dispositivos MEA (TAKETANI,2006). Dentre estes desafios, pode-se citar o processo de conexão funcional e morfológica entre os neurônios e os eletrodos da MEA, o qual não é muito bem conhecido (SPORNS,2004). Após a deposição do tecido sobre o circuito, em geral se espera de 10 a 15 dias para constatar aproximações físicas que resultam numa atividade neural espontânea de grande amplitude. Muitas vezes, porém, a prática laboratorial revela que tais aproximações podem não ocorrer, levando a uma cultura inativa, mas por qual motivo? Do ponto de vista prático, a ausência de conexão pode ser explicada ou por incompatibilidade biológica ou dificuldade de adesão do tecido ao dispositivo. Tais fatos podem se revelar bastante inconvenientes no momento da utilização do neuroimplante, pois a incompatibilidade pode evoluir para reação imunológica severa, incluindo potenciais perigos ao paciente; e a não-adesão pode perturbar o funcionamento do dispositivo, devido à baixa amplitude dos sinais.

Tendo em vista os problemas relatados no último parágrafo, diversos artigos da literatura se dedicam ao estudo do processo de conexão funcional entre as células e os microeletrodos, o que possibilita também a compreensão acerca da formação de redes neurais biológicas (CHIAPPALONE,2006;

CHIAPPALONE,2007; KAMIOKA,1996; TATENO,2002; VAN PELT, 2004; VAN PELT, 2005). Esses artigos se valem da análise da atividade espontânea, registrada através de MEAs. A Tabela 1 logo abaixo resume as principais características dos estudos que podem ser considerados mais importantes.

Tabela 1 – Síntese das principais características dos estudos da literatura dedicados à análise da maturação de culturas neurais, baseados em registros de atividade elétrica espontânea

Artigo	Tipo De Cultura (Animal)	Detalhes No Preparo Da Cultura	Quantidade De Culturas Medidas (Qc) e Tempo de Registro por Experimento (T) [horas]	Quantidade De Dias In Vitro Medidos (Qd) : Quais Dias Foram Medidos	Quantidade Total De Experimentos (Qt) Avaliados $Qt = Qc * Qd * T$ [horas]	Tipo De MEA Utilizado	Detalhes do Processamento de Sinais
(KAMIOKA,1996)	Cortex de embriões de 17 dias, ratas (espécie não especificada)	X	Não especificados	Qd = 45 Não especificou quais dias foram medidos	Qt = 45	Não especificado	Não especificado
(TATENO,2002)	Cortex de embriões de 18 dias, ratas Wistar	X	Qc = 44; T = 7 (em média)	Qd = 63: DIV 3 – DIV 65	Qt = 19404	MEA planar, 64 canais; distância entre eletrodos: 180 mm	Focalizada em <i>bursts</i>
(VAN PELT, 2004)	Dissociada, cortex de embriões de 18 dias, ratas Wistar	Cultivados em 2 ml de meio condicionado de glia (GCM)	Qc = 5; T = 1	Qd = 49: todos os dias	Qt = 245	Placas MEA, 60 canais, diâmetro dos eletrodos 20 μ m	Fa = 22.2 kHz

(VAN PELT, 2005)	Dissociada, cortex de embriões de 18 dias, ratas Wistar	Cultivados em 2 ml de meio condicionado de glia (GCM)	Qc = 5 ; T = 1	Qd = 49 : DIV 1 – DIV 49	Qt = 245	MEA Hexagonal, diâmetro dos eletrodos 10 μ m	Considera “bursts da rede”
(CHIAPPALONE,2006)	Dissociada, cortex de embriões de 18 dias, ratas Sprague-Dawley	Não usou substancias antimitoticas para impedir crescimento de glia	Qc = 10; T = 20 min	Qd = 5: DIV 7, 14, 21, 28, 35.	Qt = 17	MEA planar, 60 canais; distância entre eletrodos: 200 mm; diâmetro 10 mm	X

Observações:

(a) Siglas – Fa = Frquencia de Amostragem [kHz].

(b) A quantidade de culturas medidas se refere apenas ao total de culturas EFETIVAMENTE monitorado ao longo do máximo período de duração do estudo.

(c) Espaços da Tabela marcados com o símbolo “X” indicam ausência de informação na respectiva literatura.

Com base nos resultados obtidos pelos artigos associados à Tabela 1, o texto a seguir e a Tabela 2 sintetizam os principais fenômenos observados e respectivas interpretações fisiológicas.

Etapa 1: Dia *InVitro* (DIV) 1 – DIV7 (Primeira Semana *InVitro* - SIV)

Caracterizada por uma pequena quantidade de *spikes* aleatórios, presentes em quase todos os canais; a microscopia eletrônica revela tipos imaturos de sinapses e densidade sináptica muito baixa. Isto explica a quase inexistência de *bursts*, como uma consequência do padrão da densidade sináptica, predominando

conexões próximas, do tipo junção *gap* (CHIAPPALONE,2006). Desta forma, os neurônios podem ser considerados isolados (VAN PELT, 2005).

Etapa 2: DIV8 – DIV14 (2ª. SIV)

Caracterizada por uma pequena quantidade de *bursts* de longa duração (podendo atingir até um segundo de duração segundo (VAN PELT, 2004), presentes inicialmente em alguns canais e, à medida que o tempo passa, expandindo-se para quase todos os microeletrodos. O aumento expressivo da sinaptogênese química leva o estabelecimento de uma grande quantidade de conexões distantes,

processo este mediado provavelmente pelas vias glutamatérgicas e/ou pelos receptores AMPA, tal que a taxa média de disparos atinge o valor de 1.4 *spikes/s* em DIV14 (CHIAPPALONE, 2006). Para este último dia, ocorre um pico na quantidade de *spikes* presentes em um *burst*, e tempo médio de duração dos *bursts* alcança seu máximo (CHIAPPALONE, 2006). O mecanismo de inibição sináptica está pouco desenvolvido, sendo que a rede de conexões pode ainda ser considerada imatura (VAN PELT, 2004).

Etapa 3: DIV15 – DIV28 (3^a-4^a SIV)

Caracterizada por uma grande quantidade de *bursts*, de curta duração (atingindo valores mínimos de até 30 ms, segundo (VAN PELT, 2004; VAN PELT, 2005), com padrões repetitivos periódicos, presente em quase todos os canais, revelando um grande sincronismo e uma grande variabilidade no processo de geração dos *bursts*. Há um expressivo crescimento das conexões sinápticas próximas e decréscimo das conexões distantes, confirmado por microscopia eletrônica. Durante DIV15 – DIV20, (TATENO, 2002) apresenta evidências experimentais da forte atuação de de receptores antagonistas do tipo receptor GABA sobre as células. Além disso, (KAMIOKA, 1996) sugere que o influxo

de íon cálcio associado aos intensos *bursts*, durante esta etapa, pode disparar mecanismos de sinalização celular responsáveis pelo desenvolvimento de sinapses. Observa-se a completa maturação das conexões excitatórias, fato este provavelmente causado pela ação do receptor NMDA, tal que a taxa média de disparos atinge o valor de 2.2 *spikes/s* em DIV21, observando-se também o pico da taxa média de *bursts* (CHIAPPALONE, 2006; KAMIOKA, 1996). A partir do DIV 22 (4^a. SIV), inicia-se a redução das sinapses nos dendritos, levando ao equilíbrio entre excitação e inibição, acarretando diminuição no tempo médio entre *bursts* (VAN PELT, 2004).

Etapa 4: DIV29 – DIV35 (5^a. SIV)

Caracterizada por uma grande quantidade de *spikes* aleatórios porém altamente sincronizados (KAMIOKA, 1996), presentes em quase todos os canais, consequência do declínio transitório no número de sinapses. Tal comportamento da densidade sináptica é confirmado por microscopia eletrônica. As taxas médias de disparos atingem os valores de 1.7 *spikes/s* e 1.3 *spikes/s* em, respectivamente, DIV28 e DIV35; ao passo que o padrão de *bursts* da rede é bastante estável, sem grandes alterações, revelando que o padrão de conectividade sináptica atingiu a maturidade,

estabilização. Assim sendo, a cultura estaria mais propícia a apresentar formas rudimentares de “aprendizado ou de memória”, ou ainda ser influenciada por estímulos externos “sensoriais” (CHIAPPALONE, 2006; VAN PELT, 2005). Além disso, particularmente para o 30º. DIV, observou-se que o histograma de intervalo entre *bursts* assume um formato próximo a uma distribuição de Poisson (TATENO, 2002), sendo que a duração média destes é da ordem de 300 milissegundos (KAMIOKA, 1996).

As quatro etapas acima discutidas devem ser confrontadas com o artigo (MOODY, 2005), que discute o papel da atividade neural espontânea, assunto principal do presente artigo, e base experimental de todos os trabalhos acima discutidos. No processo de crescimento celular, os neurônios exibem características de estabilidade e plasticidade nos seus padrões de atividade: a primeira por terem a capacidade de manter sua atividade espontânea constante e a segunda por conseguirem fazer uma transição bem sucedida dos estados de atividade espontânea (etapas 1 e 2 supra-citadas, em que tanto *spikes* como *bursts* são aleatórios) para aqueles de disparos padronizados (etapas 3 e 4 supra-citadas, em que tanto *spikes* como *bursts* são sincronizados). Durante a transição (etapa

3), ocorre igualmente o desenvolvimento dos canais iônicos voltagem-dependente, os quais também possuem papel fundamental no processo de crescimento das células; isso tudo em contraste com as junções *gap* desenvolvidas durante a etapa 1.

Ainda com base em (MOODY, 2005), a atividade elétrica dos neurônios durante seu processo de crescimento regula a expressão de uma grande diversidade de canais Ca^{2+} -, voltagem- e ligando-dependentes. A regulação dos canais iônicos voltagem-dependente por atividades elétricas das células pode inclusive controlar a distribuição espacial desses canais. Por outro lado, o surgimento desses canais, em nervos em desenvolvimento e músculos, ajuda a regular a transição entre os estados imaturo (etapas 1,2) e maduro (etapa 4) das células, seja compensando a atividade elétrica excessiva durante o processo (vide etapa 3), ou monitorando o momento exato de eliminar a atividade espontânea, para uma transição bem sucedida. Deve-se ressaltar que tais comentários são bastante coerentes com aqueles apresentados em (KAMIOKA, 1996).

Tabela 2 – Síntese dos principais fenômenos e interpretações ligadas às diversas etapas do processo de maturação de culturas neurais, com base em (CHIAPPALONE,2006; KAMIOKA,1996; TATENO,2002; VAN PELT, 2004; VAN PELT, 2005; MOODY,2005)

Etapa, respectiva denominação e duração	<i>Spikes</i>	<i>Bursts</i>	Padrão de conexão sináptica (microscopia eletrônica)	Canais Iônicos e/ou eventos associados, Neurotransmissores.	Conectividade	Atividade espontânea
DIV1 – DIV7 (Primeira SIV)	Poucos e aleatórios, em quase todos os canais	Praticamente inexistentes.	Baixa densidade, imatura, próximas.	Junções <i>gap</i>	Neurônios isolados	Presente (<i>spikes</i> aleatórios)
DIV8 – DIV14 (2ª. SIV)	DIV14: taxa média de disparo 1.4 <i>spikes/s</i>	Pequena quantidade, longa duração (pico), ao final. presentes em quase todos os canais e com máxima quantidade de <i>spikes</i>	Alta densidade, imatura, distantes.	Mediação por vias glutamatérgicas e/ou pelos receptores AMPA; inibição pouco desenvolvida.	Neurônios em tentativa de conexão	Presente (<i>bursts</i> aleatórios)
DIV15 – DIV28 (3ª-4ª SIV)	Pico MFR = 2.2 <i>spikes/s</i> (DIV21)	Grande quantidade, pequena duração (30 ms), elevado sincronismo, em todos os canais. Pico da taxa média de <i>bursts</i> em DIV 21.	Expressivo crescimento das conexões próximas e decréscimo das distantes. Aproximando-se da maturidade.	Conexões excitatórias maduras, mediadas por NMDA; atuação do GABA e dos canais de cálcio para o desenvolvimento de sinapses (DIV15-DIV22). Surgimento do mecanismo de inibição, que progressivamente equilibra a excitação (DIV 22). Canais voltagem-dependentes.	Rede neural estabelecida	Atividade em processo de estruturação (<i>bursts</i> sincronizados)
DIV29 – DIV35 (5ª. SIV)	Grande quantidade, aleatórios, sincronizados, em todos os canais. MFR = 1.7 <i>spikes/s</i> para DIV 28.	Padrão estável. DIV30: histograma IBI próximo a Poisson; IBI = 300 ms.	Declínio das sinapses, maduras.		Estabilização da rede neural: cultura propícia a “aprendizado /memória” ou a estímulos externos	Atividade estruturada (<i>spikes</i> sincronizados)

Observações sobre a tabela 2:

- (a) MFR = taxa média de *spikes*
- (b) MBR = taxa média de *bursts*
- (c) IBI = intervalo entre *bursts*

Em síntese, o processo de maturação de redes biológicas *in vitro* é caracterizados por duas fases principais (CHIAPPALONE, 2006):

(F1) Modulação e formação na conectividade sináptica (DIV1 – DIV14): desenvolvimento inicial.

(F2) Maturação da conectividade sináptica (DIV22 – DIV33): desenvolvimento tardio.

Observa-se ainda uma interessante correlação entre quantidade de sinapses e duração/sincronismo de *bursts*. Quando há uma densidade elevada de conexões, os *bursts* apresentam duração prolongada, sendo bastante sincronizados; e vice-versa (VAN PELT, 2005). De fato, (KAMIOKA, 1996) sugere que o influxo de íon cálcio associado aos *bursts*, pode levar à intensificação das conexões e da complexidade da rede biológica, em conformidade com a lei de Hebb (RUTTEN, 2002; VAN PELT, 2004): quando as membranas pré- e pós-sinápticas são ativadas simultaneamente, a sinapse é reforçada e estabilizada. Além disso, (CHIAPPALONE, 2007) demonstra experimentalmente como o padrão de sincronismo entre *bursts* ou de *spikes* é altamente elevado para culturas maduras, podendo ser alterado por estimulações externas. Em síntese, grandes flutuações nas taxas de disparo ou de *bursts* podem

realmente ocorrer durante o tempo de crescimento neurítico (VAN PELT, 2004), podendo ser associadas a outros eventos morfológicos e/ou fisiológicos, conforme discutido logo acima.

A seguir, através de experimentos próprios, as quatro etapas serão discutidas e caracterizadas estatisticamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Caracterizar a rede neural é, atualmente, um desafio para os pesquisadores. Com esse intuito, utilizaram-se culturas de neurônios preparadas em laboratório na Universidade de Gênova (Itália). Monitoraram-se três culturas periodicamente que foram medidas utilizando matrizes multieletrodo (MEAs) planares, dispositivos micrométricos responsáveis por captar a atividade elétrica de uma determinada cultura que está sendo observada.

A MEA utilizada foi a MEA60 (*Multi Channel Systems*) que contém 60 micro eletrodos de 30 micrômetros de diâmetro cada e 200 micrômetros de espaçamento entre eles. Esses eletrodos são distribuídos em uma matriz 8x8, com os cantos excluídos.

Nomearam-se três culturas de atividade elétrica normal e espontânea, 364, 365 e 366, para as quais se obtiveram dados a 08, 11, 15, 18, 22, 25, 29 e 36 dias *in vitro* (DIVs). Além disso, apenas as culturas 364 e 366 foram medidas a 32 DIVs, enquanto que somente as culturas 364 e 365 foram medidas a 39 DIVs. Para a cultura 364 totalizaram-se dez medidas em 39 dias enquanto que para as culturas 365 e 366 foram gravadas 9 medidas cada. De maneira geral, contribuindo para o estudo sobre o comportamento eletrofisiológico das culturas, utilizaram-se 28 experimentos.

A Tabela 3 logo abaixo apresenta as condições dos experimentos realizados, a ser comparada com a Tabela 1. Nota-se que as culturas deste experimento são morfologicamente próximas àquelas dos outros trabalhos da literatura, porém com uma baixa quantidade total de experimentos avaliados. A MEA utilizada também é planar, porém com eletrodos de grande diâmetro.

Cada registro seguiu o mesmo procedimento: as MEAs povoadas com as culturas eram retiradas da estufa de CO₂ na qual eram mantidas e colocadas sobre

Tabela 3 – Síntese das principais características dos experimentos realizados

Tipo De Cultura (Animal)	Detalhes No Preparo Da Cultura	Quantidade De Culturas Medidas (Qc) e Tempo de Registro por Experimento (T) [horas]	Quantidade De Dias In Vitro Medidos (Qd) : Quais Dias Foram Medidos	Quantidade Total De Experimentos (Qt) Avaliados $Qt = Qc * Qd * T$ [horas]	Tipo De MEA Utilizado
Dissociada, cortex de embriões de 18 dias, ratas Wistar.	Não usou substâncias antimitóticas para impedir crescimento de glia, nem meio condicionado de glia (GCM).	Qc = 3; T = 20 min	Qd = 10: DIV 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39.	Qt = 10	MEA planar, 60 canais; distância entre eletrodos: 200 µm; diâmetro 30 µm

um amplificador, cuja temperatura era controlada, podendo variar de 37,1 a 37,4 °C. As medidas eram iniciadas após 20

minutos, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente. Em cada experimento coletaram-se 20 minutos de amostra do sinal da MEA,

divididos em quatro fases de 5 minutos cada, sendo as medidas subsequentes.

É importante salientar que todas as MEAs utilizadas possuíam referimento interno, sendo este o eletrodo 15. Em todas as MEAs que foram coletados sinais, o eletrodo 15 não possui registro de atividade neural, apenas o sinal de fundo, que corresponde aos ruídos que influenciam no sinal (térmicos, elétricos, entre outros). Por este motivo, para toda e qualquer análise dos sinais, sempre deve ser excluída a atividade observada no eletrodo 15. A frequência de aquisição dos sinais para estes experimentos foi de 10 kHz.

A Figura 1 apresenta um sinal em um microeletrodo, composto por *spikes*, que são variações extremamente rápidas de tensão elétrica. Um conjunto de *spikes* é uma sequência de impulsos nervosos ou potenciais de ação, produzidos por um ou mais neurônios, sendo o mesmo 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.

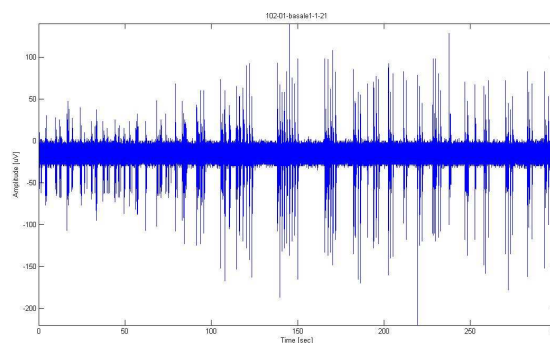


Figura 1 – Atividade elétrica típica de um eletrodo da matriz multieletrodo. Escala vertical: amplitude [μV]. Escala horizontal: tempo [ms].

O processamento dos dados foi realizado utilizando um software desenvolvido em Matlab® pelo NBT-DIBE (*Neuroengineering and Bio-nanoTechnology Group* – NBT, *Department of Biophysical and Electronic Engineering* – DIBE) da Universidade de Gênova, denominado *SpikeManager* (VATO et al., 2004). 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* (MFR – *Mean Firing Rate*), da taxa média de *bursts* (MBR – *Mean Burst Rate*), entre outras funções. Para 08 dias *in vitro* processaram-se os experimentos 364, 365 e 366. Posteriormente, realizou-se uma média desses três experimentos obtendo resultados globais para esse dia, o que foi repetido para 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36 e 39 DIVs.

Como já citado, desenvolveu-se um programa responsável por agrupar essas quatro fases em um único arquivo de 20 minutos. Isso foi necessário, pois, ao analisar as fases separadamente, poderia ocorrer o início de um *burst* no final de uma fase e o final do mesmo *burst* no início da fase seguinte. Caso isso ocorresse, o software utilizado para processar os dados entenderia que existem dois *bursts* separados, o que não corresponde à realidade. Nesse sentido, o agrupamento foi feito para que diminuísse possíveis erros que poderiam ser gerados entre o final de uma fase e a fase seguinte.

A partir do *SpikeManager* os sinais foram processados e vários quantificadores foram obtidos. Destacam-se neste trabalho: gráficos de *Raster Plot*, histogramas de intervalos entre *spikes* (ISI – *Inter Spike Interval*), histogramas de intervalos entre *bursts* (IBI – *Inter Burst Interval*), as taxas médias de disparo de *spike* (MFR – *Mean Firing Rate*) e de ocorrência de *bursts* (MBR – *Mean Bursting Rate*) para cada DIV, além de outras estatísticas observadas a partir desses valores. Tais quantificadores serão explicados na próxima seção.

Alguns parâmetros foram utilizados no processamento dos dados. O valor do limiar estabelecido para detecção de picos foi calculado como sendo 8 vezes o desvio padrão de uma janela do sinal

dimensionada de modo a não conter picos. (CHIAPPALONE, 2003). A frequência de amostragem foi ajustada a 10000 amostras por segundo. A detecção de picos é baseada uma janela de 2 milissegundos que desliza ao longo do sinal. Foi também usado um valor de limiar de artefato de 800 μV e uma distância mínima de artefato de 0,5 segundos.

A taxa média de disparos de *spikes* foi calculada considerando um valor mínimo de disparos de 0,1 *spikes* por segundo e uma janela de artefato de 4 ms. Para o cálculo dos histogramas ISI considerou-se um *bin* (tamanho da janela) de 2 ms. A detecção de *bursts* foi realizada com um número mínimo de *spikes* dentro de cada *burst* igual a 5, 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. Já para os histogramas de IBI utilizou-se um bin de 1 segundo. Tais parâmetros foram ajustados de acordo com Chiappalone (2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a exposição dos quantificadores na seção anterior, mostra-se então, o resultado do processamento dos dados de todas as culturas. Vale ressaltar que quase todos os gráficos e

valores mostrados a seguir são médias considerando as três culturas sob análise, e todos os 60 canais ao mesmo tempo. Apenas os gráficos de *Raster Plot*, conforme Fig. 2, não são médios, são específicos da cultura 365.

3.1 RASTER PLOT

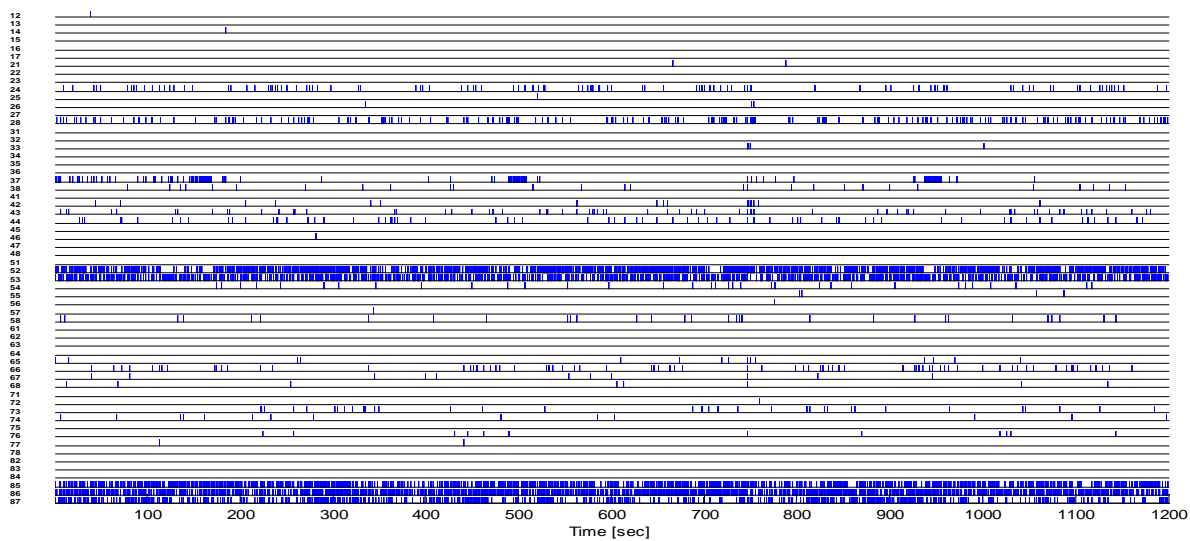
Os gráficos de *Raster Plot* mostram o comportamento do sinal de cada eletrodo ao longo do tempo, em relação ao disparo de *spikes*. Na Fig. 2 cada número na vertical (eixo y) representa os eletrodos ou canais da cultura, e na horizontal (eixo x) tem-se o tempo. Para cada eletrodo pode ser vista a quantidade de *spikes* detectados durante os 20 minutos (ou 1200 segundos) de experimento.

Para 08 DIVs, percebe-se que

existe uma pequena quantidade de *spikes*, sendo estes bem distribuídos temporalmente. A partir de 18 dias *in vitro*, observa-se que essa quantidade aumenta, sendo que padrões de atividade começam a ser visualizados, tais como o disparo simultâneo de *spikes* em mais de um canal, ou seja, a atividade elétrica das culturas começa a ser sincronizada. Notar também que os gráficos de *Raster Plot* para DIV32 – DIV39 são praticamente os mesmos, observando-se um grande sincronismo entre todos os canais.

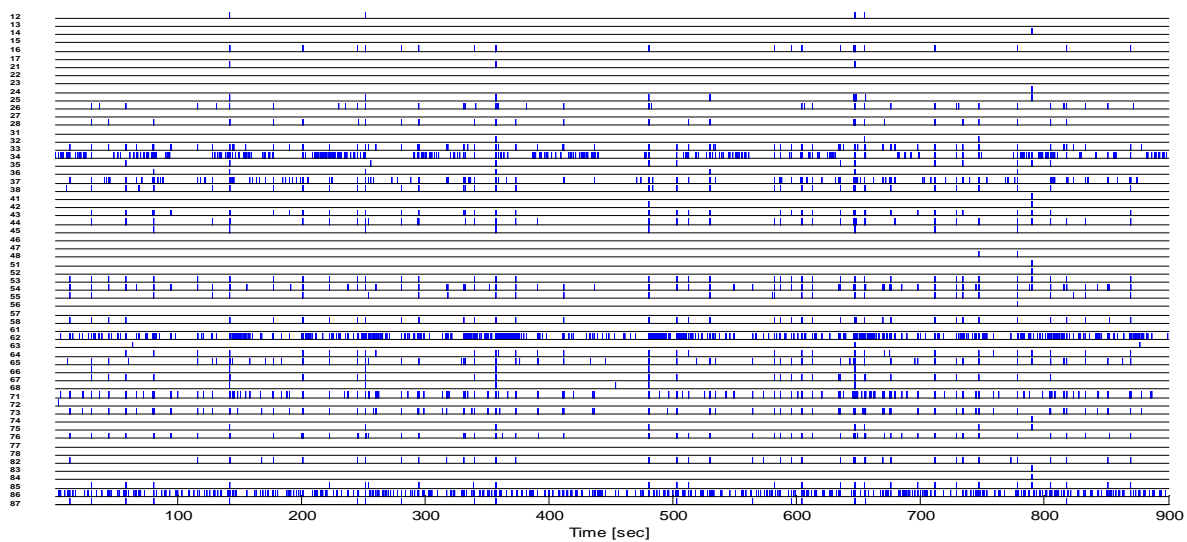
DIV08

A



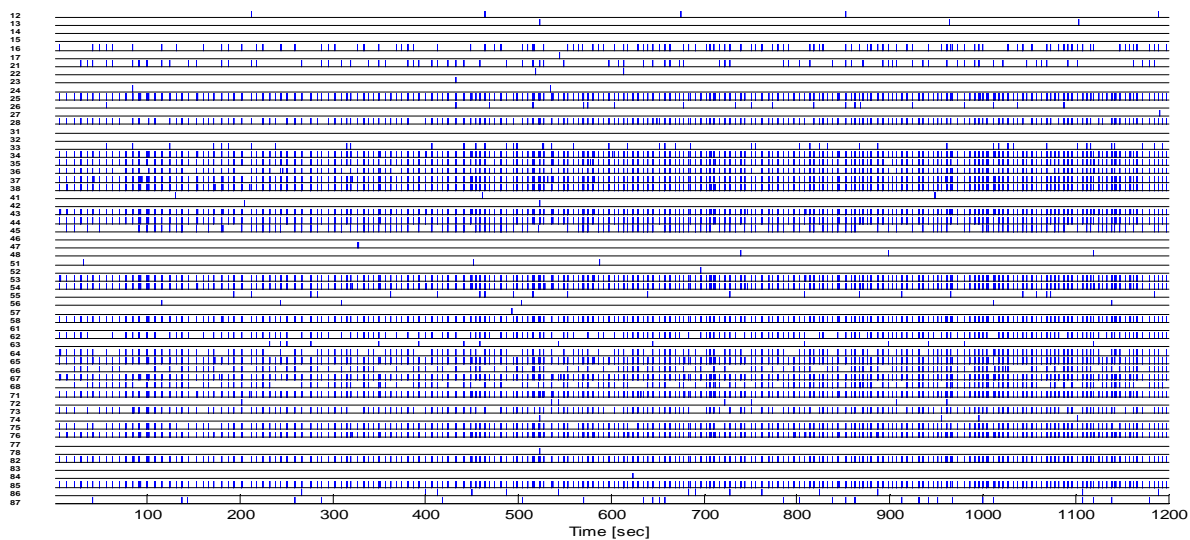
DIV18

B



DIV29

C



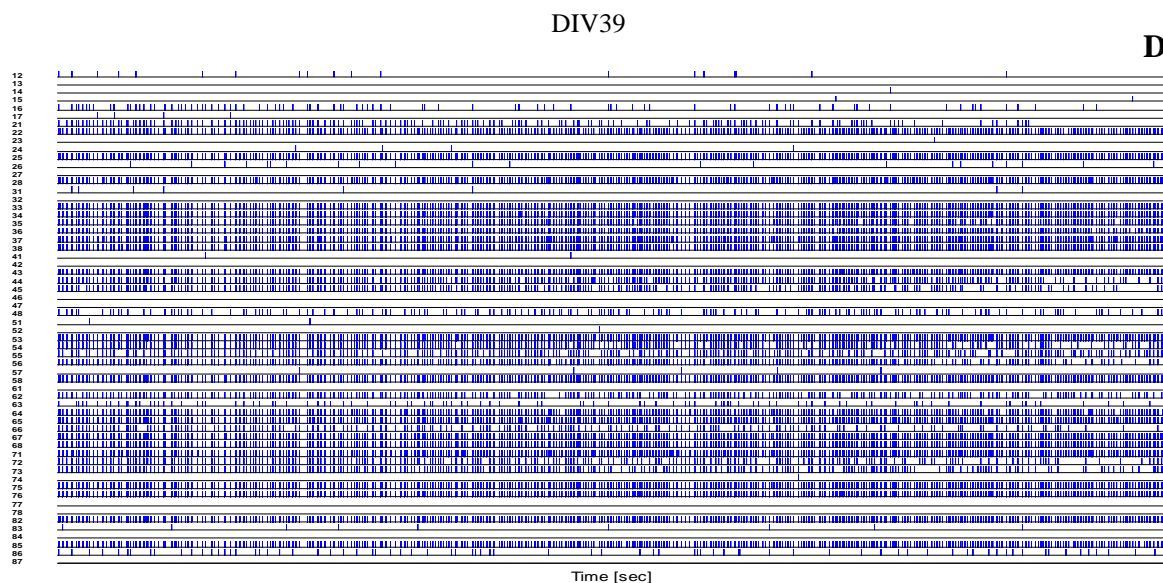


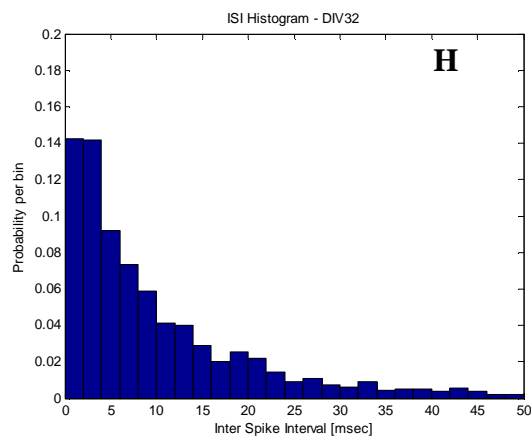
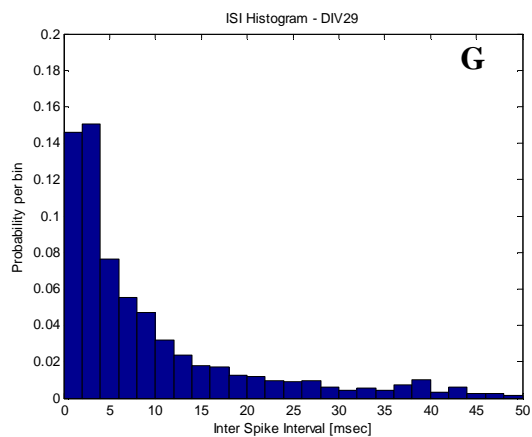
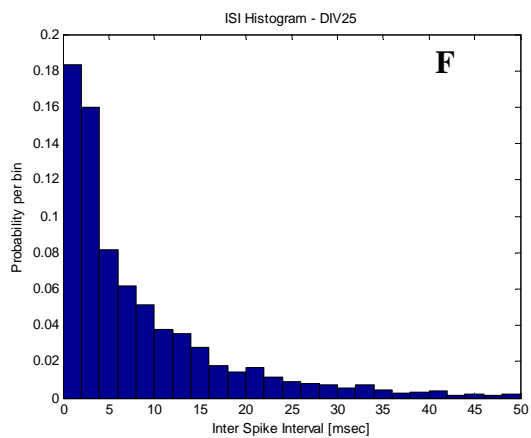
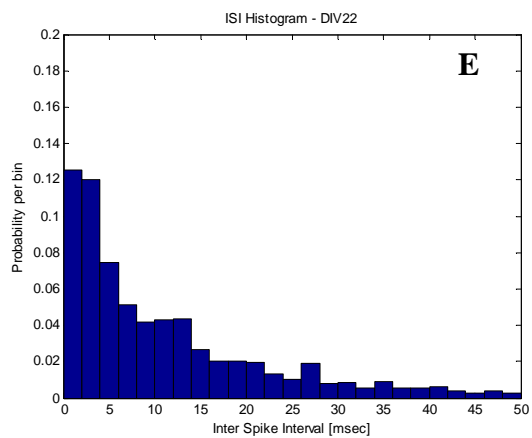
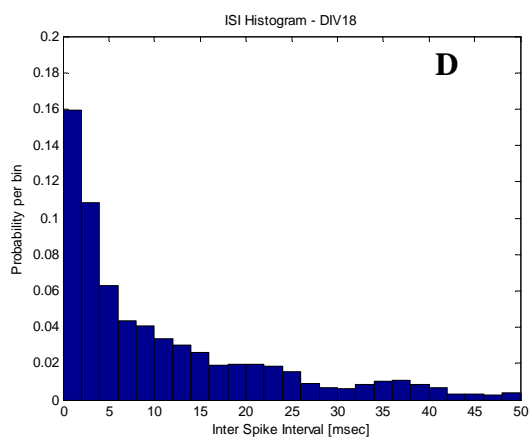
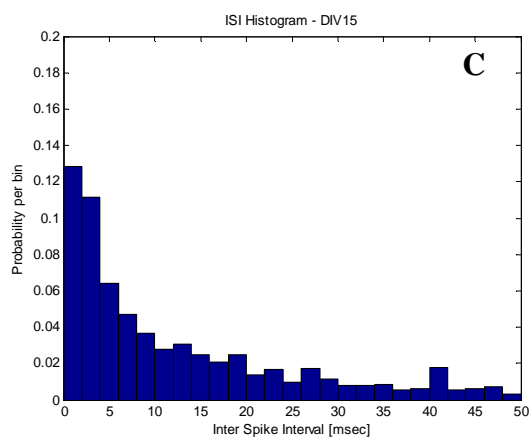
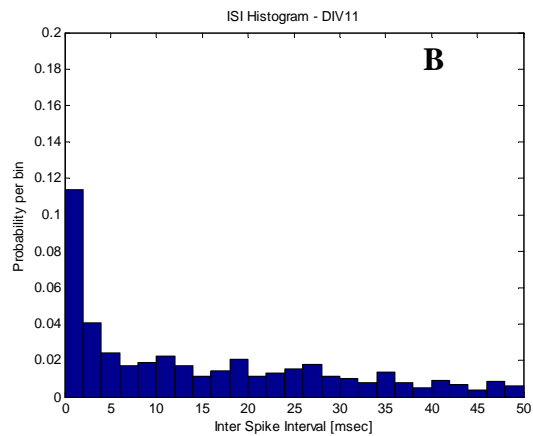
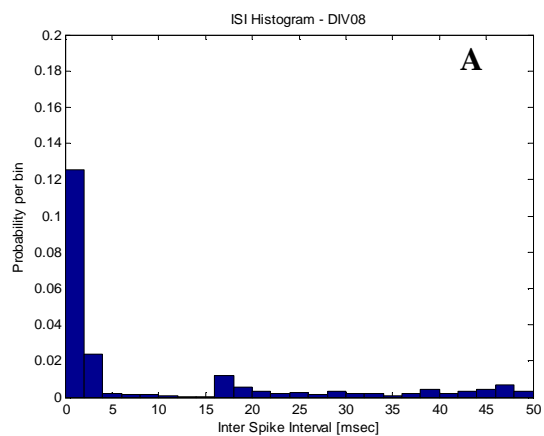
Figura 2 – Gráficos de *Raster Plot* da cultura 365 para (a) 08 DIV, (b) 18 DIV, (c) 29 DIV e (d) 39 DIV. Escala vertical: amplitude da atividade elétrica [μV] para todos os 60 canais, cada qual associado a uma linha na figura. Escala horizontal: tempo [s].

3.2 HISTOGRAMAS DE INTERVALOS ENTRE SPIKES (ISI)

Os histogramas de ISI (*Inter Spike Interval*) estimam a probabilidade de um determinado intervalo entre *spikes* ocorrer em certo tempo. Os histogramas ISI por DIVs são representados pela Fig. 3, com intervalo de 0 a 50 ms, que corresponde a uma faixa em que a atividade de *spikes* é melhor observada.

Observa-se, analisando essa figura, que nos primeiros dias *in vitro* a cultura apresenta uma concentração do intervalo entre *spikes* de 0 a 2 ms, ou seja, a probabilidade do intervalo entre *spikes*

ocorrer entre 0 e 2 milissegundos é de aproximadamente 12%, enquanto que ela é muito baixa para os demais intervalos (16 a 18 milissegundos é de menos de 2%). Já para os outros DIVs, os histogramas decrescem quase que exponencialmente com o tempo. Sendo assim, no começo das medidas é possível visualizar poucos *spikes* com um pequeno intervalo entre eles, o que indica que ainda não se estabeleceram padrões de atividade elétrica. Esta se dá em neurônios isolados de forma rápida. Ao passar do tempo, a quantidade de *spikes* aumenta tendendo a uma padronização dos disparos, devida principalmente à maior conectividade da rede.



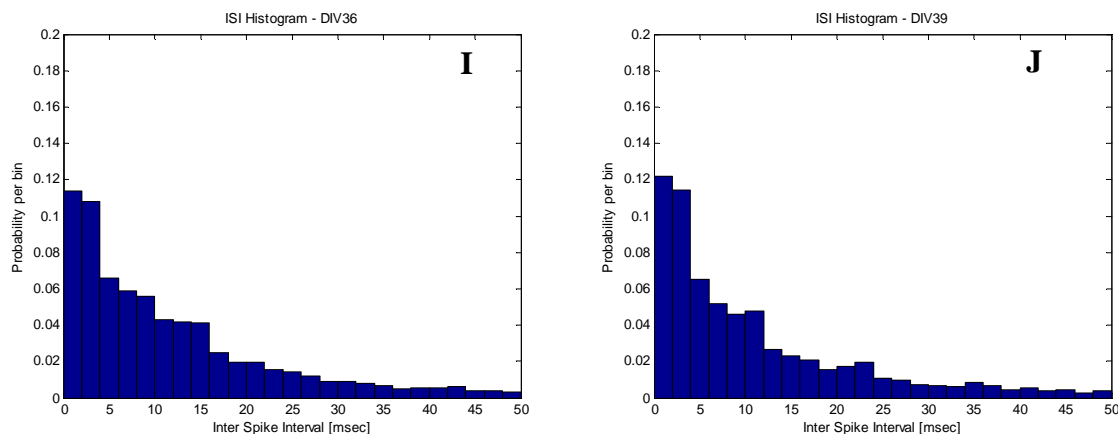


Figura 3 - Histogramas ISI por dia *in vitro*, sendo (a) 08 DIV, (b) 11 DIV, (c) 15 DIV, (d) 18 DIV, (e) 22 DIV, (f) 25 DIV, (g) 29 DIV, (h) 32 DIV, (i) 36 DIV e (j) 39 DIV. Escala vertical: probabilidade estimada; escala horizontal: ISI [ms].

3.3 HISTOGRAMAS DE INTERVALOS ENTRE *BURSTS* (IBI)

Os histogramas de IBI (*Inter Burst Interval*), analogamente aos histogramas ISI, mostram a probabilidade do intervalo entre *bursts* ocorrer também em um determinado tempo. A Fig. 4 exhibe os histogramas IBI para cada DIV, nos quais o intervalo entre *bursts* foi tomado de 0 a 20 segundos, devido à maior densidade de IBIs nessa faixa.

Pode-se observar que para 08 dias *in vitro* o intervalo entre *bursts* é mais característico de 0 a 3 segundos. A probabilidade do intervalo entre *bursts* ocorrer entre 1 e 2 segundos é de aproximadamente 20%. Observa-se também que até 29 dias *in vitro* os histogramas IBI possuem intervalos entre *bursts* bem distribuídos entre 0 e 20 segundos com probabilidade de pequena

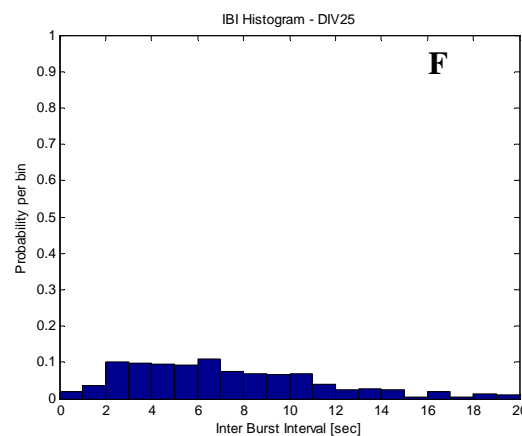
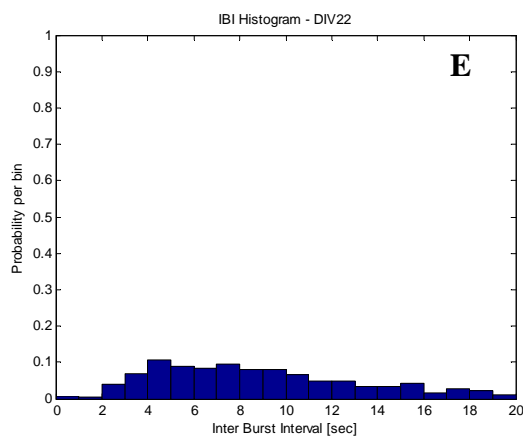
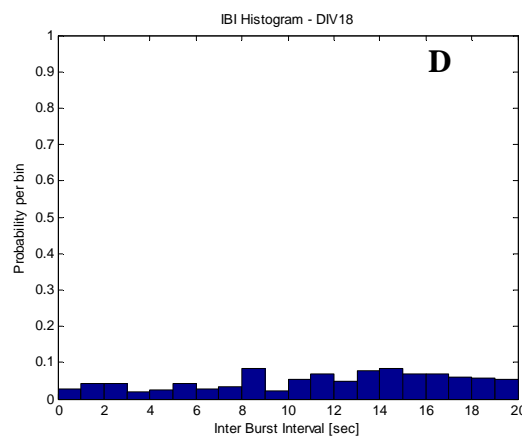
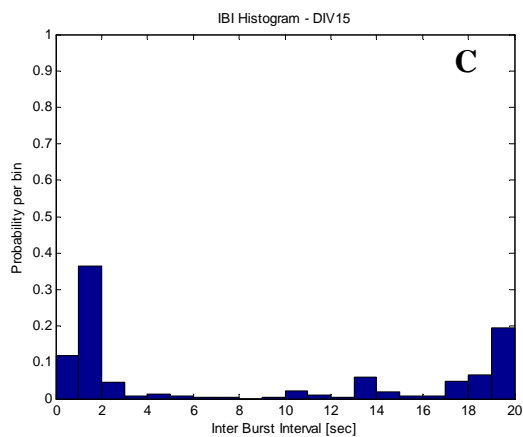
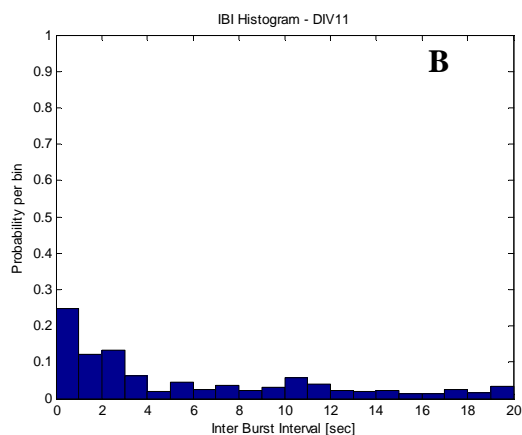
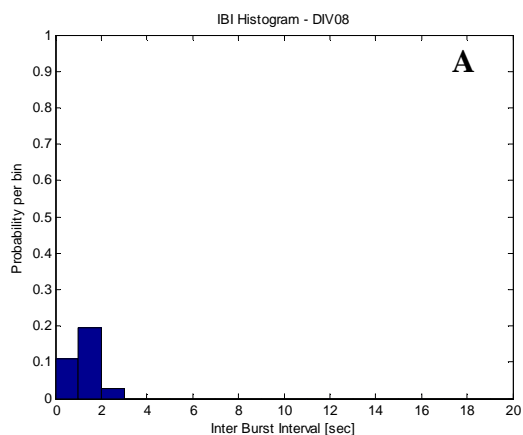
ocorrência para cada faixa de valores. Já para 29, 32, 36 e 39 DIV, observa-se que a maior probabilidade da ocorrência de intervalos entre *bursts* gira em torno de 2 a 4 segundos, ou seja, há uma concentração de valores do intervalo entre *bursts*. Além disso, para DIV 29-39, os histogramas são praticamente idênticos, aproximando-se de uma distribuição de Poisson. Enfim, os histogramas DIV18-25 se aproximam de uma distribuição uniforme, revelando a presença de *bursts* de diversas durações.

Conclui-se que para 08 DIVs existem conjuntos de *spikes* e *bursts* com intervalos menores, por isso a distribuição dos dados na Fig. 4 (a) se concentra no início. Já para 15 DIVs, existe uma concentração maior de *bursts* com intervalo pequeno e uma concentração maior também de *bursts* com intervalo grande, o que explica os dois picos nos

extremos da Fig. 4 (c). A Fig. 4 (d) mostra um intervalo entre *bursts* mais distribuído, ou seja, pode variar entre valores grandes e pequenos.

Tem-se, então, que no início existem neurônios disparando potenciais de ação isoladamente. Ao passar do tempo, por volta de 18 DIV, os neurônios

criam uma conexão entre eles, o que explica a forma distribuída do intervalo entre *bursts*. Já a partir do dia 29, os neurônios tendem a estabilizar suas atividades elétricas, fazendo com que a maior parte do tempo o intervalo entre *bursts* fique entre 2 e 4 segundos.



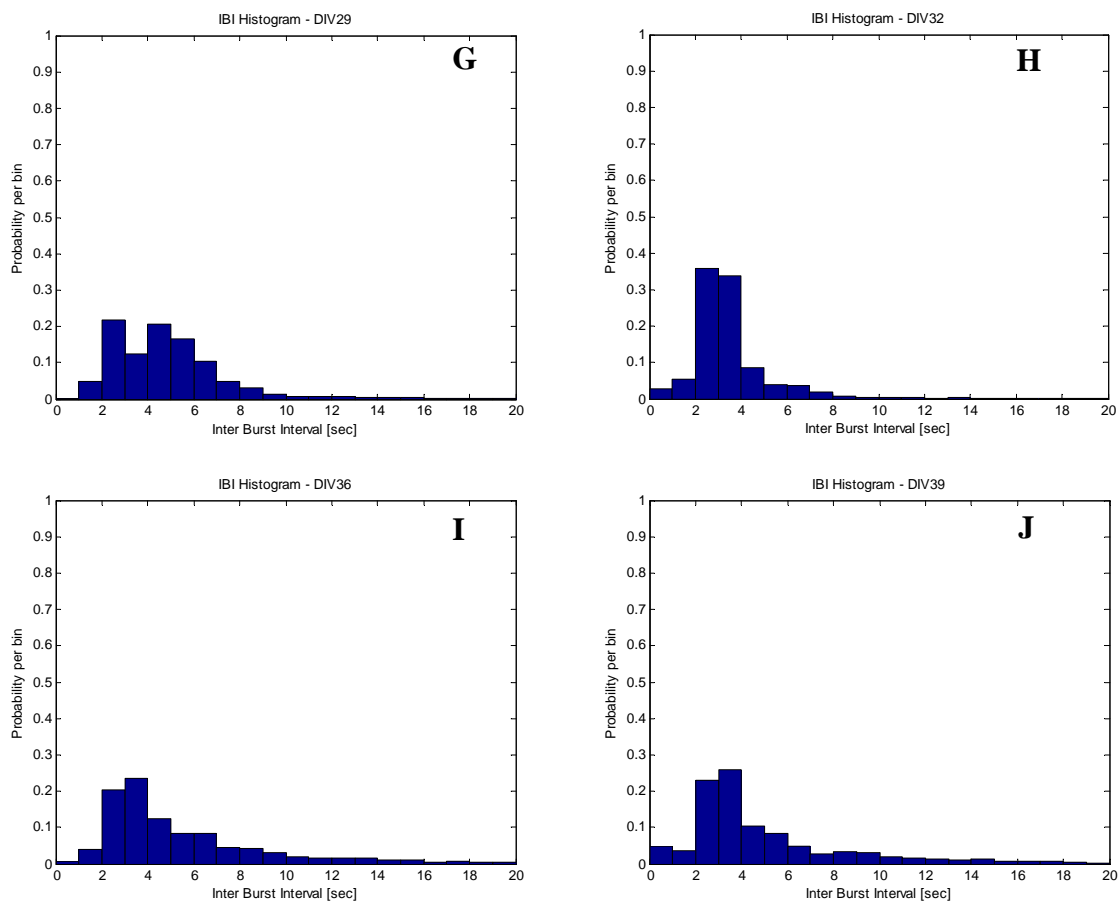


Figura 4 - Histogramas IBI por dia *in vitro*, sendo (a) 08 DIV, (b) 11 DIV, (c) 15 DIV, (d) 18 DIV, (e) 22 DIV, (f) 25 DIV, (g) 29 DIV, (h) 32 DIV, (i) 36 DIV e (j) 39 DIV. Escala vertical: probabilidade estimada; escala horizontal: IBI [s].

3.4 MFR GLOBAL

O MFR global mostra uma média da frequência de disparos de *spikes* nos 60 eletrodos ao longo do tempo para cada DIV. Observa-se na Fig. 5 que nos primeiros dias *in vitro* a cultura possui uma frequência de disparos de *spikes* muito pequena, ou seja, a cultura está se adaptando ao meio e começando a criar conexões entre os neurônios. Ao longo do tempo, os neurônios começam a disparar potenciais de ação e em 29 dias *in vitro*, as

culturas geram uma quantidade de 2,66 *spikes* por segundo, atingindo uma atividade elétrica máxima. Após 29 DIVs, as culturas voltam a diminuir a frequência de *spikes*.

Conclui-se que a 08 e 11 DIVs os neurônios trabalham isoladamente com poucos *spikes* e um intervalo muito pequeno entre eles. Entre os dias 15 e 25, eles começam a se conectar, ou seja, se estabelecimento as sinapses. A partir do dia 29, os neurônios atingem um padrão de comunicação uniforme e com uma frequência de disparos mais alta. A

evolução pode ser bem vista pela Fig. 5, já que os neurônios emitem potenciais de ação espontaneamente até desenvolver os canais iônicos e padronizam os disparos estabilizando-os ao atingir o processo de maturação.

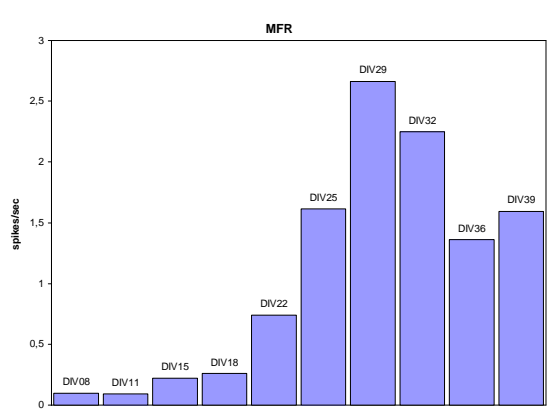


Figura 5 - MFR global para todos os DIVs. Escala vertical: MFR [quantidade de *spikes/s*]; escala horizontal: tempo [DIV].

3.5 MBR GLOBAL

Similarmente ao MFR global, o MBR global representa uma média da taxa de ocorrência de *bursts* por minuto para os 60 canais, ou seja, mostra a frequência de *bursts* por minuto para cada dia *in vitro*.

Na Fig. 6, tem-se uma visão geral do comportamento das culturas para os valores de MBR global. Nas fases iniciais da cultura, a quantidade de *bursts* por minuto é mínima, já que não existe ainda uma sistemática de disparos de potenciais de ação, ou seja, da ocorrência de *spikes*. À medida que o tempo passa, os valores de frequência de *bursts* aumentam até atingir o máximo em 32 dias *in vitro* com

aproximadamente 10 *bursts* por minuto. Após esse dia, essa quantidade diminui como pode ser visto na Fig. 6. Além disso, pode-se perceber pela Fig. 4 (h) que existe um menor intervalo entre *bursts* a 32 DIV com relação aos DIVs anteriores, o que justifica a maior quantidade de *bursts* ocorridos por minuto nesse dia.

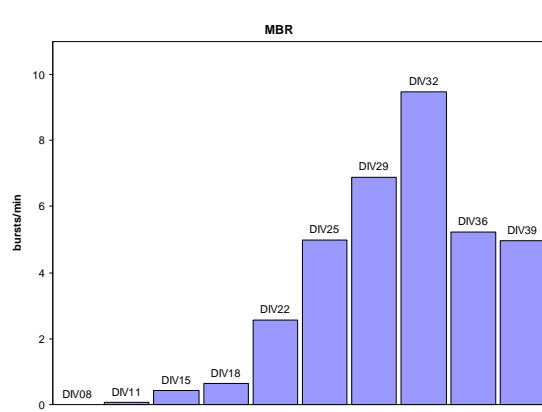


Figura 6 - MBR global para todos os DIVs. Escala vertical: MBR [quantidade de *bursts/min*]; escala horizontal: tempo [DIV].

3.6 OUTROS RESULTADOS ESTATÍSTICOS

Continuando as análises, obtiveram-se valores estatísticos médios de todas as culturas em cada dia *in vitro*, destacando-se a quantidade de *spikes* e *bursts* ao total, a quantidade média de *spikes* dentro de um *burst*, o desvio padrão do número médio de *spikes* por *burst*, a duração média de *bursts* em milissegundos, o desvio padrão da duração média dos *bursts*, como também a porcentagem de *spikes* randômicos, conforme indicado na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores estatísticos para todas as culturas em cada DIVs: quantidade de *spikes* e *bursts* ao total, quantidade média de *spikes* dentro de um *burst*, desvio padrão do número médio de *spikes* por *burst*, duração média de *bursts* em milissegundos, desvio padrão da duração média de *bursts* e porcentagem de *spikes* randômicos

	Total Médio de <i>Spikes</i>	Total Médio de <i>Bursts</i>	Número de <i>Spikes</i> por <i>Burst</i>	Desvio Padrão de <i>Spikes</i> por <i>Bursts</i>	Duração Média de <i>Bursts</i> [ms]	Desvio Padrão da Duração Média de <i>Bursts</i>	<i>Spikes</i> Randômicos [%]
DIV08	143,333	5,000	0,061	0,012	3,253	0,750	0,341
DIV11	4037,000	95,333	1,011	0,117	14,905	1,488	4,693
DIV15	15532,667	513,333	7,466	0,687	70,201	5,653	8,364
DIV18	17659,333	741,667	5,270	0,514	44,825	3,462	10,988
DIV22	53365,667	3088,000	7,118	0,414	52,810	2,562	11,074
DIV25	142653,000	6986,667	10,351	0,277	62,689	1,833	8,901
DIV29	191314,667	8309,333	10,105	0,233	63,129	1,710	6,127
DIV32	161330,000	11420,500	7,359	0,099	56,878	1,368	10,973
DIV36	91007,667	5733,667	6,537	0,247	58,743	2,129	15,182
DIV39	114555,000	5969,500	7,657	0,357	64,425	2,761	12,970

Geraram-se gráficos evolutivos das estatísticas contidas na Tabela 4. O primeiro desses gráficos é o do número total de *spikes* (Fig. 7). Observa-se que existe uma similaridade entre esse gráfico e aquele de MFR mostrado na Fig. 5. Inicialmente existem poucos *spikes* e esse valor aumenta até atingir o máximo de aproximadamente 191000 para o dia 29. Após esse dia o valor diminui e volta a aumentar em 39 dias *in vitro*. Observa-se, comparando a Fig. 5 com a Fig. 7, que

quando a frequência de disparos de *spikes* é grande, conseqüentemente o número de *spikes* também será elevado.

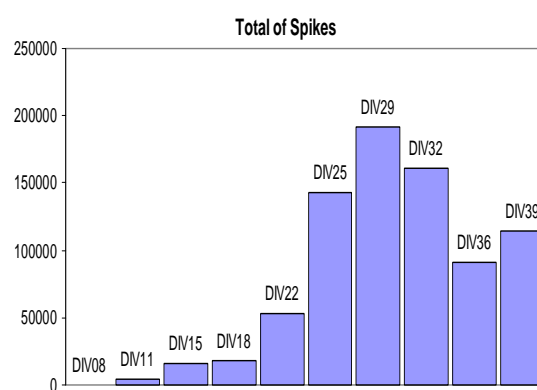


Figura 7 – Evolução do total de *spikes* para todas as culturas ao longo do tempo. Escala vertical:

quantidade total de *spikes*; escala horizontal:
tempo [DIV].

O gráfico do número total de *bursts* para todas as culturas a cada dia *in vitro* está representado na Fig. 8. Observa-se que para 32 DIVs, por exemplo, existem aproximadamente 11500 *bursts* em média nas culturas processadas. A partir desse gráfico e considerando o gráfico de MBR global (Fig. 6), observa-se uma equivalência entre eles, já que se a frequência de *bursts* é grande, conseqüentemente devem existir mais *bursts* ao total. Sendo assim, na Fig. 6, a quantidade de *bursts* por minuto é maior a 32 dias *in vitro* e na Fig. 8 existem mais *bursts* para o mesmo dia em questão, provando o que foi relatado.

Além do número total de *bursts*, gerou-se outro gráfico da quantidade de *spikes* em um *burst*, que pode ser visto pela Fig. 9. Observa-se que para os primeiros DIV, a quantidade de *spikes* por *burst* é pequena. Para 15, 22, 32 e 39 DIVs, existem aproximadamente 8 *spikes* em um *burst*, enquanto que para 25 e 29 dias *in vitro* esse valor é máximo, em torno de 10. Além disso, pela Fig. 8, sabe-se que em 32 DIVs há um maior número de *bursts* nas culturas e, conseqüentemente, se há mais *bursts*, a quantidade de *spikes* dentro de um *burst*

deve ser menor, já que não existem tantos *spikes* no dia em questão (Fig. 7).

Na Fig. 10 é possível visualizar a duração média de *bursts* para cada dia *in vitro*. Inicialmente, onde existem poucos *bursts*, a duração deles é pequena (08 e 11 DIVs). Em 15 dias *in vitro*, os *bursts* atingem a maior duração, de aproximadamente 70 milissegundos, enquanto que em 18 DIV há uma diminuição considerável para 44 ms. Após esse período a duração média dos *bursts* se torna praticamente constante, com poucas variações. Alguns estudos (VAN PELT et al., 2004) mostram que quando a cultura atinge um padrão de disparos, a duração média dos *bursts* tende a diminuir e isso pode ser visto, para as culturas analisadas, a partir do 18° DIV, já que são valores menores do que os do 15° dia *in vitro*.

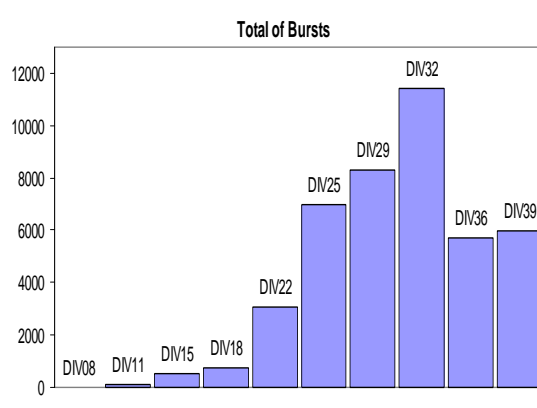


Figura 8 – Evolução do total de *bursts* para todas as culturas. . Escala vertical: quantidade total de *bursts*; escala horizontal: tempo [DIV].

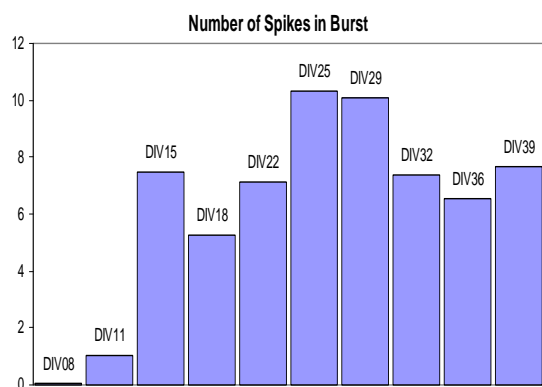


Figura 9 - Evolução do total de *spikes* dentro de um *burst* para todas as culturas. Escala vertical: total de *spikes* dentro de um *burst*; escala horizontal: tempo [DIV].

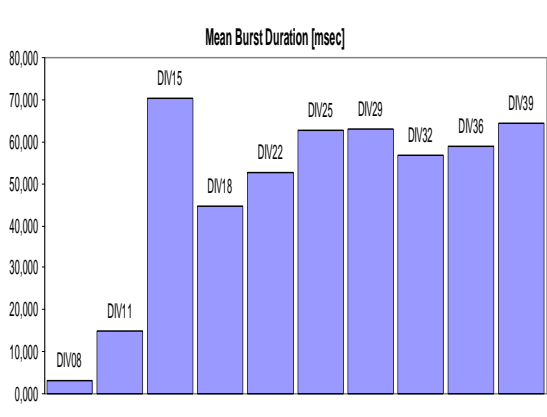


Figura 10 – Duração média de *bursts* para todas as culturas (eixo vertical [ms]); em cada DIV (eixo horizontal).

Por fim, gerou-se a Fig. 11, que apresenta a porcentagem de *spikes* randômicos, ou seja, *spikes* que não constituem *bursts*, para todas as culturas em cada DIV. De 08 a 18 dias *in vitro* a quantidade de *spikes* randômicos aumenta ao longo do tempo. Em 25 e 29 DIVs há uma diminuição dessa porcentagem. Esse fato pode ser explicado observando a Fig. 9, já que se existem muitos *spikes* por *burst* nesses dias, conseqüentemente a

quantidade de *spikes* randômicos desses experimentos deve ser menor. Além disso, pela Fig. 9, em 18 e 22 DIVs existem poucos *spikes* em um *burst*, relativamente aos intervalos vizinho, e pela Fig. 11, nesses mesmos dias existem muitos *spikes* randômicos. Já em 32 e 36 DIVs há um novo aumento dessa porcentagem, sendo que em 36 dias *in vitro* aproximadamente 15% dos *spikes* detectados nas culturas processadas são randômicos.

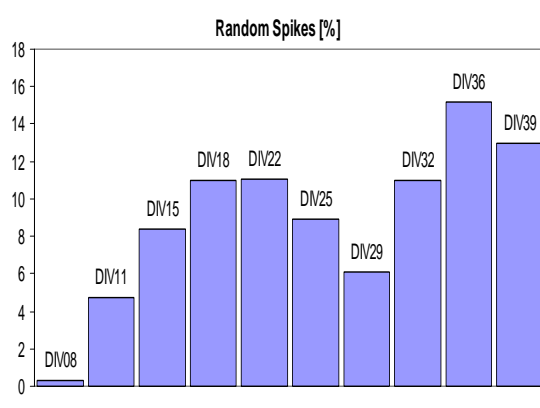


Figura 11 - Porcentagem de *spikes* randômicos (eixo vertical) para todas as culturas em cada DIV (eixo horizontal).

A Tabela 5 propicia uma comparação detalhada entre os principais resultados quantitativos da literatura (CHIAPPALONE,2006) com aqueles relatados ao longo desta seção. Os valores finais escritos nesta tabela correspondem à média realizada ao longo de todos os dias de registro, considerando as quatro culturas ao mesmo tempo. Existe uma clara correspondência dos resultados durante a primeira e quinta semanas

(eixo horizontal).

Tabela 5 Síntese dos resultados obtidos através dos experimentos deste artigo, comparativamente à literatura.

		<i>SPIKES</i>	<i>BURSTS</i>	
		MFR [<i>spikes/s</i>] – vide Fig. 5	IBI [s] – vide Fig. 4	MBR [<i>bursts/min</i>] – vide Fig. 6
1ª. SIV (DIV1 – DIV7)	Resultados do artigo	0.12	1	0
	Literatura (CHIAPPALONE,2006)	0.1	0	0
2ª. SIV (DIV8 – DIV14)	Resultados do artigo	0.19	1.2	0.1
	Literatura (CHIAPPALONE,2006)	1.4	45	1.8
3ª-4ª. SIV (DIV15 – DIV28)	Resultados do artigo	1.6	12	3.2
	Literatura (CHIAPPALONE,2006)	2.2	30	4
5ª. SIV (DIV29 – DIV35)	Resultados do artigo	2	3.2	7
	Literatura (CHIAPPALONE,2006)	1.3	30	3

in vitro (SIV), porém isto pouco acontece nas etapas intermediárias.

4. CONCLUSÕES

A partir de todo o processamento dos sinais captados pelas MEAs das culturas selecionadas, pode-se concluir que nos primeiros DIVs, entre 08 e 18, os neurônios trabalham isoladamente, gerando potenciais de ação bastante distribuídos, o que caracteriza culturas imaturas, ou seja, não existe ainda conexão entre os neurônios. Após 18 dias *in vitro*, os neurônios começam a se interconectar criando sinapses entre si e

disparando potenciais de ação excitatórios. Observa-se neste período que os neuritos (axônios e dendritos) crescem mais de 10 μm em 3 semanas, enquanto que o diâmetro da célula passa de 5 μm para 15 μm durante as mesmas três semanas. As sinapses excitatórias tendem a ocorrer até que os canais iônicos voltagem-dependente atinjam um estado de maturação (KAMIOKA,1996). A partir desta etapa, começam ocorrer potenciais de ação inibitórios que tenderão a anular os efeitos daqueles excitatórios. Por isso, as conexões sinápticas funcionais diminuem, já que os potenciais de ação ficam abaixo do limiar de detecção de picos, ou seja, os *spikes* não são

detectados. Por conseguinte, a atividade elétrica espontânea do grupo de neurônios tende a diminuir fazendo com que comecem a ocorrer disparos padronizados.

Os resultados acima discutidos devem ser confrontados com os resultados anteriores da literatura, sintetizados na Seção 1, o que foi destacado na Tabela 5. Cumpre destacar que as principais diferenças entre os dados analisados por este artigo (Tabela 3) e aqueles outros da literatura (Tabela 1) correspondem ao uso de microeletrodos de elevado diâmetro, gerando medidas mais grosseiras no contexto deste artigo; à quantidade de horas de registro, bem como detalhes fundamentais do prepara biológico, como o uso de fator de crescimento associado à atividade glial, não empregado para nossos dados.

De uma forma geral, os resultados apresentados na Seção 3 são bastante coerentes com aqueles sintetizados pela Tabela 4, principalmente para a primeira e a quinta semanas *in vitro*. Todavia, no DIV39, as culturas utilizadas por este trabalho parecem ainda não ter alcançado a etapa 4, tendo em vista a grande quantidade de *bursts* e pouquíssimos *spikes*. Ou seja, as diversas etapas de maturação ocorrem de forma um pouco mais lenta nos experimentos analisados. Isso de certa forma pode ser explicado

pelo fato da preparação das culturas não ter envolvido nenhum procedimento especial, tal como a adição de meio condicionado de glia (GCM), utilizado pela grande maioria dos artigos da literatura (VAN PELT,2004; VAN PELT, 2005; CHIAPPALONE, 2006), que certamente apressa a maturação sináptica

De qualquer forma, destacam-se as seguintes equivalências.

(a) A Fig. 5 e a segunda coluna da esquerda da Tabela 2 apresentam resultados muito próximos.

(b) Os histogramas IBI para DIV 32-DIV39 (Fig. 4) são equivalentes a processos de Poisson; enquanto que os respectivos *Raster Plots* (Fig. 2) podem ser considerados sincronizados. Estes resultados são respectivamente muito próximos ao histograma IBI para DIV 30 de (TATENO,2002); e ao *Raster Plot* após 30DIV de (KAMIOKA,1996) .

As perspectivas deste trabalho envolvem aumentar a quantidade de culturas e experimentos, de forma a se obter condições laboratoriais mais próximas `aquelas da literatura. Além disso, é necessário aprofundar a fisiologia de culturas para uma melhor compreensão dos fenômenos estudados, incorporando

técnicas de imagem às medidas de atividade elétrica.

5. AGRADECIMENTOS

À Universidade de Gênova, Itália, pela disponibilidade do aparato biológico e experimental que possibilitou a realização deste trabalho. Ao estudante Danilo R Campos, que efetuou as medidas. Aos diversos financiadores deste trabalho: Fapemig, CNPq, UFU e USP. A Profa Celina Lotufo (ICBIM/UFU) pelo apoio técnico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIAPPALONE, M.. *Acquisition and Processing of Electrophysiological Signals: a New Perspective towards Brain-Machine Interface*. Italy (Tesi di Dottorato) – University of Genova, 2003. 232 p.

CHIAPPALONE, M; VATO, A.; TEDESCO, M. B.; MARCOLI, M.; DAVIDE, F.; MARTIONIA, S.. *Networks of neural coupled to microelectrode arrays: a neural sensory system for pharmacological applications*. Biosensors and Bioelectronics. v. 18, p. 627-634, May 2003.

CHIAPPALONE, M; BOVE, M, VATO, A.; TEDESCO, M. B, MARTIONIA, S..

Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. Brain Research , vol. 1093, Issue 1, pp. 41-53, June 2006.

CHIAPPALONE, M; VATO, A.; BERDONDINI, L.; KOUDELKA-HEP, M.; MARTIONIA, S.. *Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons*. International Journal of Neural Systems, vol. 17, no. 2, pp. 87 - 103, 2007.

COCKERELL, O.C.; SANDER, J.W.A.S. *O Custo Econômico da Epilepsia*. In: COSTA, J.C. da et al. (ed). Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. São Paulo: Lemos-Editorial, 1998. p. 21-30.

KAMIOKA, H. et al. *Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures*. Neuroscience Letters, 206: pp. 109-112, 1996.

LITT, M.D'ALESSANDRO B. et al. *Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy*. Proc. 1st Int. IEEE EMBS Conf. on Neural Engineering, Capri Island, Italy, 2003, p. 485-492.

MOODY, W.J.; BOSMA, M.M. *Ion Channel Development, Spontaneous Activity, and Activity-Dependent Development in Nerve and Muscle Cells*. *Physiological Reviews*, n. 85, p. 883–941, 2005.

RIKE, F. et al. *Spikes: exploring the neural code*. N.Y.: The MIT Press, 1997, 234 p.

RUTTEN, W. *Selective electrical interfaces with the nervous system*. *Ann Rev Biomed Engineering* 2002, 4: 407 – 452.

SPORNS, O.; CHIALVO, D. R.; et al. *Organization, development and function of complex brain networks*. *TRENDS in Cognitive Sciences*, v.8, n.9, p.418-425. Sep. 2004.

TAKETANI, M., BAUDRY, M (Editors). *Advances in Network Electrophysiology: Using Multi-Electrode Arrays*. Berlin: Springer, 1st edition; 2006, 478 p.

TATENO, T.; KAWANA, A. e JIMBO, Y. *Analytical characterization of spontaneous firing in networks of developing rat cultured cortical neurons*. *Physical Review E*, 65(5): pp. 051924(1-16), 2002.

URL1: ILAE - INTERNATIONAL League Against Epilepsy– *Global Campaign: What is Epilepsy?* Disponível em: <<http://www.ilae-epilepsy.org/programs/whatis.cfm>>. Acessado em 21/08/2009.

VAN PELT, J.; WOLTERS, P.S.; CORNER, M.A.; RUTTEN, W.L.; RAMAKERS, G.J. *Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks*. *IEEE Trans Biomed Eng*, v. 51, n. 11, p. 2051- 2062, November 2004.

VAN PELT, J. et al. *Dynamics and plasticity in developing neuronal networks in vitro*. *Progress in Brain Research*, 147: pp. 171-188, 2005.

VATO, A.; BONZANO, L.; CHIAPPALONE M. et al. *Spike manager: a new tool for spontaneous and evoked neuronal networks activity characterization*. Elsevier B. V. pp: 1153-1161.200

WAGENAAR, D.A.; PINE, J.; et al. *Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays*. *J. Neurosci. Methods*, v.4, p.1-19. Mar. 2007.