

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

FÁBIO FARIA DIAS

**Crescimento neuronal controlado por campos
elétricos de CA em chip**

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

FÁBIO FARIA DIAS

**Crescimento neuronal controlado por campos elétricos de
CA em chip**

Projeto de Diplomação realizado no Laboratoire des technologies de la Microélectronique, Grenoble - França, e apresentado ao Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à École d'ingénieurs en Physique Électronique et Matériaux da Université Grenoble Alpes, como requisito parcial para a Dupla Graduação em Engenharia Elétrica e Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Thibault Honegger

Coorientador: Dr. Antoine Legrain

Porto Alegre

2018

FÁBIO FARIA DIAS

Crescimento neuronal controlado por campos elétricos de CA em chip

Projeto de Diplomação realizado no Laboratoire des technologies de la Microélectronique, Grenoble - França, e apresentado ao Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à École d'ingénieurs en Physique Électronique et Matériaux da Université Grenoble Alpes, como requisito parcial para a Dupla Graduação em Engenharia Elétrica e Engenharia Biomédica

Prof. Dr. Ály Ferreira Flores Filho
Chefe do Departamento de Engenharia
Elétrica (DELET) - UFRGS

Aprovado em 06 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Giovani Bulla
UFRGS

Agradecimentos

Aos meus familiares, que sempre foram meu porto seguro e me apoiaram em todos os caminhos que já trilhei. Registro aqui meu grande obrigado e minha imensa gratidão.

Um enorme obrigado a Antoine Legrain por toda sua ajuda, paciência e verdadeiro interesse em compartilhar seu conhecimento durante esses seis meses de estágio. Seria impossível percorrer os objetivos desse projeto sem seus conselhos e sua orientação. Além disso, agradeço aos meus colegas do LTM e GIN que ofereceram mais assistência do que jamais pude esperar, Pavel Fikar que compartilhou seus projetos eletrônicos, simulações e técnicas de correção de erros. Meu sincero agradecimento a Eric Delamandeleine (SiNaPS) que gentilmente ofereceu seu tempo, conselhos e ambiente de trabalho para que eu pudesse desenvolver meus projetos de eletrônica.

Ponto também meus agradecimentos aos meus amigos, que participaram dessa caminhada nas mais diversas formas possíveis.

Resumo

Traumas causados por acidentes cerebrais podem induzir degradação e perda do tecido cerebral. A falta de tratamentos para esse tipo de complicação serve como motivação para o desenvolvimento de diferentes pesquisas com foco em formação induzida de sinapses. O presente projeto explora como dispositivos fabricados com canais em escala microscópica podem usar campos elétricos alternados para guiar neurites em determinadas direções e promover conexões entre populações de neurônios. Nosso aparato microfluidico aplica campos AC sobre axônios presentes no topo de lâminas de vidro. As amostras foram projetadas para acoplar eletrodos interdigitados constituídos de óxido de índio e estanho sobre a superfície da lâmina. Esses eletrodos, que são responsáveis pelo estímulo elétrico, são então cobertos por microcanais fabricados em PDMS. Uma análise elétrica dos dispositivos foi realizada com o intuito de verificar se os eletrodos são capazes de fornecer a tensão e a frequência necessária para a realização dos experimentos. Para isso, os aparatos foram submetidos a medidas de impedância e fase para sinais variantes no domínio frequencial. A caracterização elétrica foi feita para conjuntos de eletrodos com diferentes dimensões. Além disso, a influência de meios de cultura iônicos na condutividade das amostras também foi investigada. O uso de meio Neurobasal acarretou em significativa diminuição na impedância do sistema quando comparados às amostras contendo meio aquoso. Para frequências entre 100 kHz e 2 MHz, os dispositivos preenchidos com meio de cultura celular mostraram impedâncias entre $[10^3 - 10^4]\Omega$. Isso significa que amostras podem ser conectadas a geradores de função de baixa impedância de saída tendo uma máxima perda de tensão de 50000 ppm. Alguns estudos mostraram bons resultados em crescimento axonal guiado através de aplicações de estímulos elétricos sinusoidais entre 2 e 3 Vp-p sob frequências de 100 kHz. Devido a esse resultado, um gerador de sinais foi projetado e fabricado para entregar estímulos de até 10 Vp-p em frequências entre 0 - 2 MHz. O gerador de sinais mostrou performance limitada com presença de 1 Vp-p de ruído no circuito negativo de alimentação (-5V). Capacitores de desacoplamento foram adicionados nas proximidades do amplificador operacional. Em paralelo ao projeto do gerador de sinais, experimentos eletrocínéticos foram realizados. Micro esferas de silicone provaram a capacidade dos eletrodos interdigitados em guiar partículas. A influência da amplitude do sinal e de sua frequência foram constatadas nesse experimento, porém investigações mais profundas são necessárias para estabelecer uma conclusão sobre os fenômenos por trás dos efeitos vistos. O crescimento orientado dos axônios neuronais foi observado após serem estimulados (experimento realizado em células do hipocampo). Pesquisas mais aprofundadas são necessárias para indicar as razões de tal crescimento.

Palavras-chave: Neurônios, microfluidos, campos elétricos, eletrodos, ITO, hipocampo

Abstract

Traumatic cerebral accidents can lead to degradation and loss of brain tissues. The lack of treatment for such complications motivates diversified studies for induced synapse formation. This project investigates how a microfluidics device can use alternating electric fields to guide neurites through certain directions and promote connections between neuronal populations. Our microfluidic experimental setup applies AC fields to axons of neurons present at the top of glass slides. The samples were designed to have interdigitated electrodes made of indium tin oxide (ITO) deposited in a glass slide. These electrodes, responsible for the electrical stimulation, are covered by PDMS molded micro channels. An electrical analysis of our chips was performed to verify if it can deliver the correct voltage amplitude to the electrodes. To do so, the samples were submitted to tests of impedance and phase answer over frequency variations. This characterization was done for chips with different electrodes width and gap sizes. Also, during these experiments, the influence of ionic medium in conductivity was analyzed. Neurobasal medium has shown to induce significant decrease in the impedance of the chips when compared to water filled samples. At the frequencies of [100 kHz - 2 MHz], chips filled with cell culture medium shown impedance values of $[10^3 - 10^4]\Omega$. It means that the devices can be connected to signal generators of low output impedance with maximum voltage drop of 50000 ppm. Some studies have shown good guided axonal growth results through the use of sinusoidal stimulus of amplitudes between 2 and 3 Vp-p at 100 kHz. Following this result, a dedicated portable signal generator was designed and fabricated to deliver 10Vp-p and 0 - 2 MHz of stimulus. The generator showed limited performance with a 1 Vpp ripple in the -5V loop of the power supply. Decoupling capacitors close to the operational amplifier were added to attenuate this oscillation. In the meantime, electrokinetic experiments were carried out. Silicon beads proved that the electrode arrays are able to guide particles. The influence of signal amplitude and frequency were observed on this experiment, but further investigation is necessary to establish a precise conclusion about the phenomenon behind the observed effects. Hippocampal neurons had their axons stimulated and guided axonal growth was observed, the causes for this behavior also need to be investigated.

Keywords: neurons, microfluidics, electrical fields, electrodes, ITO, hippocampus

Abstract

Les accidents cérébraux traumatiques peuvent induire des dégradations et pertes de tissus cérébraux. La manque de traitement pour ces complications a motivée différentes recherches centrées sur la formation synaptique induite. Ce projet explore les mécanismes guidant la croissance des neurites via des champs électriques alternatif dans une puce microfluidique, induisent la formation de connections entre des populations de neurones. Notre dispositif expérimental applique un champs AC aux axones présent sur une lamelle de verre. Les puces ont été conçues pour accueillir des électrodes inter digitées fabriquées avec indium tin-oxyde (ITO) gravés sur la surface du verre. Ces électrodes - responsables de la stimulation électrique -, sont recouvertes par la micro chambres imprimées en PDMS. Une analyse électrique a été conduite pour vérifier si le dispositif peut délivrer les tensions désirées aux électrodes. Pour cela, les puces ont été soumises à des tests d'impédances et de phase pour différentes fréquences. Cette caractérisation a été faite pour des électrodes de différentes largeurs et différent espacements. Pendant ces expériences, l'influence du milieu sur la conductivité a aussi été étudiée. Le milieu de culture Neurobasal a montré un décroissement significatif de l'impédance des puces, comparées à celles en milieu aqueux. Les dispositifs remplie de milieu de culture cellulaire ont indiqué des impédances dans un intervalle de $[10^3 - 10^4]\Omega$ pour fréquences entre $[100 \text{ kHz} - 2 \text{ MHz}]$. Cela indique la possibilité de connecter un générateur de signaux de basse impédance en sortie sans drastiquement affecter la tension de stimulation (50000 ppm de chute de tension maximale). Certaines études ont prouvé une bonne capacité de guidance axonale à travers des signaux sinusoïdaux de fréquences proches à 100 kHz et amplitudes entre 2 et 3 V. Grace à ces résultats, un générateur de signaux portable a été conçue et fabriqué délivrant un stimulus entre 0-10 Vp-p et 0 - 2 MHz. Le générateur a montré des performances limitées avec une oscillation de 1Vpp au niveau de l'alimentation de l'amplificateur opérationnel. En parallèle, des expériences électrocinétiques ont été réalisées. Des tests réalisés avec des micro billes de silicone ont prouvé la capacité des puces multi-électrodes à guider des particules. L'influence de l'amplitude et de la fréquence du signal a été aussi observé mais des recherches plus approfondies sur ce phénomène seraient nécessaire pour établir une conclusion définitive. Des croissance orienté d'axones de neurones de l'hippocampe ont été observé après stimulés. Les raisons d'une telle croissance nécessiterait cependant des recherches plus approfondies.

Keywords: neurones, microfluidique, champs électriques, électrodes, ITO, hippocampe

Lista de Figuras

Figura 1 – <i>"Evolução temporal de uma região de infarto da artéria cerebral média. Imagens com ponderações longitudinais T1 (linha superior) e transversais T2 (linha inferior) obtidas 2, 5, 14, 42 e 75 dias após o nascimento". Podemos observar a evolução da assimetria entre as porções dos hemisférios esquerdo e direito no membro anterior da capsula média (indicado pelas setas).</i>	15
Figura 2 – <i>Estrutura morfológica básica de um neurônio definida em quatro regiões: (1) o corpo celular, (2) dendritos, (3) axônio e (4) terminais pré-sinápticos</i>	18
Figura 3 – <i>"Visualização do cone de crescimento de uma Aplysia com marcadores de tubulina e actina. Pode-se observar uma grande concentração de actina (roxo) onde se encontram o lamelípodia e o filopodia, enquanto a tubulina e microtúbulos (azul) estão concentrados na parte central (Imagem reproduzida com permissão por Paul Forscher e Dylan Burnette)"</i>	19
Figura 4 – <i>Via de sinalização do NGF. Processo de ativação via receptores membranais TrkA e p75(NTR). Observe que as duas cadeias possuem influência no crescimento e diferenciação de neurites.</i>	20
Figura 5 – <i>Formula fragmentada do PDMS (sendo n o número de repetições do monômero).</i>	22
Figura 6 – <i>(a) Processo de fabricação do dispositivo microfluídico (b) Processo de ativação da superfície PDMS através do plasma de O₂</i>	23
Figura 7 – <i>Cultura de células do hipocampo utilizando dispositivos microfluídicos após 3 dias de cultura (3 DIV). Neurônios são inseridos através da câmara periférica. Axônios tem crescimento preferencial em direção à câmara central.</i>	25
Figura 8 – <i>Crescimento de neurites, após 4 DIV, em canal de 3 μm de espessura preenchido com colágeno. Os neurônios foram estimulados por campos de corrente alternada de 150 kHz e 3 Vpp. Pode-se notar que crescimento preferencial das neurites para fora da zona dos eletrodos (a) e confinamento dos axônios entre os eletrodos (b).</i>	27
Figura 9 – <i>Momento dipolar induzindo na partícula devido à aplicação de um campo elétrico.</i>	28

Figura 10 – Linhas de campo elétrico calculadas para casos distintos com mudanças na natureza do campo (uniforme - (a) e (b) - ou não uniforme - (c) e (d)) e na natureza da partícula (mais - (a) e (c) - ou menos - (b) e (d) - polarizável que o meio). As setas demonstram a direção da força e o conseqüente fluxo das partículas para cada caso (existência de F_{DEP} sob presença de campo não-uniforme).	28
Figura 11 – Representação gráfica de dois eletrodos planos paralelos depositados sobre uma superfície isolante agindo sobre uma partícula esférica. . . .	29
Figura 12 – Representação gráfica de forças atrativas e repulsivas de F_{DEP} sobre uma partícula. Pode-se observar a dependência entre o sentido de F_{DEP} e K	30
Figura 13 – Representação gráfica do arranjo de eletrodos interdigitados sobre o substrato de vidro.	31
Figura 14 – Simulação gráfica contendo a direção e o sentido (a) e a magnitude (b) do campo vetorial gerado por ∇E_{rms}^2 . Observa-se aumento da amplitude para posições próximas da interface entre eletrodo e substrato, bem como convergência de vetores em tais localidades, sugerindo possibilidade de confinamento preferencial.	32
Figura 15 – (a) Esquema da concentração de cargas induzidas entre o eletrodo carregado e o eletrólito (imagem superior) e seu respectivo decaimento potencial em função da distância (imagem inferior). (b) Esquema de formação da camada de Stern (imagem superior) e o seu respectivo decaimento potencial (inferior).	33
Figura 16 – (a) Esquema geral da eletrosmose sobre eletrodos planares paralelos. Pode-se observar a presença de componentes tangenciais de força agindo sobre os íons da camada dupla sobre os eletrodos. (b) Fluxo dos fluídos gerado pela ação de forças eletrosmóticas sobre os íons da camada dupla.	34
Figura 17 – (a) Razão modelada entre as forças EHD e DEP agindo sobre a seção transversal do cone de crescimento. Pode-se observar que as curvas cuja razão é menor que 1 estão localizadas abaixo do gráfico demarcado em preto. (b) Para esse modelo a influência de F_{DEP} e F_{EHD} é simulada internamente sobre uma seção transversal elipsoidal do axônio conectada a uma seção 10 vezes maior do cone de crescimento. F_{EHD} está agindo sob fluídos puros e são consideradas como a soma de efeitos eletrosmóticos e eletrotérmicos. Simulação realizada por (HONEGGER et al., 2013)	35

Figura 18 – Seção transversal do projeto de um chip microfluídico utilizado no projeto. Duas câmaras de cultura (extremidades) são utilizadas para inserção das células com o intuito de formar após estímulo na câmara central (Guiding chamber). Pode-se também verificar a presença do conjunto de eletrodos, responsáveis pela aplicação do campo elétrico alternado, na câmara central.	37
Figura 19 – Esboço dos eletrodos. Cada barra possui 10 μm de largura. Diversos espaçamentos (p : 15, 20, 30, 60 μm) entre os eletrodos foram considerados. A área de 1 x 1 cm^2 é responsável pelo contato elétrico com o gerador de estímulos.	38
Figura 20 – Processo de fabricação do conjunto de eletrodos utilizando fotolitografia. Lâminas de vidro com uma camada de 150 nm de ITO na superfície são submetidas a um processo de gravura utilizando feixes de argônio.	39
Figura 21 – Lâmina de vidro com eletrodos de ITO fabricados através de processos de litografia.	40
Figura 22 – Placa de circuito elétrico de contato (esquerda) e suporte para as amostras (direita).	40
Figura 23 – Modelo elétrico de dois eletrodos separados com meio de cultura iônico preenchendo a lacuna.	41
Figura 24 – Efeito da condutividade do meio no consumo de energia.	42
Figura 25 – Magnitude da impedância elétrica (Z), diagrama de fase (Phase) de uma amostra contendo água. O gráfico de impedância está exibido utilizando escala logarítmica. As especificações dos eletrodos são: espaçamento = 30 μm e comprimento = 500 μm . (a) $V_{rms} = 0,1 \text{ V}$ (b) $V_{rms} = 3 \text{ V}$	43
Figura 26 – Impedância elétrica (Z), diagrama de fase (Phase) de uma amostra contendo meio de cultura celular. O gráfico de impedância está exibido utilizando escala logarítmica. As especificações dos eletrodos são: espaçamento = 30 μm e comprimento = 500 μm . (a) $V_{rms} = 0,1 \text{ V}$ (b) $V_{rms} = 3 \text{ V}$	44
Figura 27 – Medida de impedância de amostras com diferentes geometrias de eletrodos.	45
Figura 28 – Diagrama de blocos do circuito.	48
Figura 29 – Diagrama de blocos do circuito. A tensão de corrente contínua de 15 V na saída do conversor LDO5 é rebaixado para 1.8 V, 3.3 V, -5 V e +5 V.	49
Figura 30 – Diagrama de bloco funcional do AD9954.	50
Figura 31 – Círculo de fases digital. A variável M representa o tamanho do salto dado a cada pulso de clock incrementado. O número de pontos representa a quantidade de valores possíveis de frequência.	51

Figura 32 – Princípio da síntese do sinal sinusoidal utilizando o princípio de acumulação de fase. O acumulador de fase incrementa seu valor a cada pulso de clock. A cada valor de fase é atribuído uma valor de amplitude de acordo com a função a ser gerada, que é então convertido em sinal analógico pelo DAC.	52
Figura 33 – Algoritmo de envio de dados bit a bit. O bit menos significativo de cada byte é enviado para o pino SDIO após cada pulso de clock SCLK. Após cada ciclo o valor binário armazenado na variável data é deslocado um bit para a direita.	53
Figura 34 – Ciclo de instrução de comunicação serial do chip AD9954. O primeiro byte enviado corresponde ao endereço de memória do registrador a ser alterado. O segundo byte (data) corresponde ao valor binário que se deseja transferir.	53
Figura 35 – Circuito de saída de sinal analógico.	54
Figura 36 – Circuito de saída de sinal analógico com referencia ao terra	54
Figura 37 – Bloco de amplificação do circuito.	55
Figura 38 – Gerador de sinais.	56
Figura 39 – (a) Oscilação na linha de -5 V da alimentação simétrica do circuito amplificador. (b) Deslocamento harmônico do sinal de -5 V para 18 MHz. (c) Sinal de entrada do amplificador operacional em 100 kHz - 1 Vpp. (d) Sinal de entrada do amplificador operacional em 2 MHz - 480 mVpp.	57
Figura 40 – Sinal de saída de 10 Vpp a uma frequência de 500 kHz (esquerda) e sinal de saída de 6,24 Vpp com frequência de 1 MHz (direita)	58
Figura 41 – Comportamento das microsferas sendo estimuladas sob sinais sinusoidais a 100kHz e 400 kHz.	60
Figura 42 – Imagem TIRF de filamentos de microtúbulos. Microtúbulos sob estímulo de corrente alternada podem ser observados. Frequência = 100 kHz.	61
Figura 43 – Comportamento de microtúbulos sob estímulos de 10 Vp e 1 MHz de frequência.	62
Figura 44 – Campos de corrente alternada aplicados sobre células neuronais do hipocampo. Tensão aplicada = 2 Vp e frequência = 100 kHz.	63

Lista de Abreviaturas e Siglas

AVC	<i>Acidente Vascular Cerebral</i>
CA	<i>Corrente Alternada</i>
CEA	<i>Comissariado francês de energia atômica e energias alternativas</i>
CC	<i>Corrente Contínua</i>
DAC	<i>Conversor digital analógico</i>
DBS	<i>Estimulação cerebral profunda</i>
DDS	<i>Sintetizador digital direto</i>
DEP	<i>Dieletoforese</i>
EHD	<i>Eletrosmose</i>
DIV	<i>Dias em cultura (Days in vitro)</i>
EMT	<i>Estimulação Magnética Transcraniana</i>
ETCC	<i>Laboratório das Tecnologias da Microeletrônica</i>
ITO	<i>Óxido de estanho e índio</i>
GIN	<i>Instituto de Neurociências de Grenoble</i>
LTM	<i>Estimulação Transcraniana por Corrente-contínua</i>
LED	<i>Diodo emissor de luz</i>
MCU	<i>Microcontrolador</i>
PCB	<i>Placa de circuito impresso</i>
PDL	<i>Poli-D-Lisina</i>
PDMS	<i>Dimetil-polissiloxano</i>
RC	<i>Resistivo - capacitivo</i>
RMS	<i>Valor eficaz</i>
SNR	<i>Razão sinal-ruído</i>
TIRF	<i>Fluorescência Total da reflexão interna</i>
Trk	<i>Tirosinaquinase</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Células Nervosas	17
2.1.1	Estrutura Básica	17
2.1.2	Cone de crescimento	17
2.2	Sistemas Microfluídicos	21
2.2.1	Fabricação de dispositivos PDMS	21
2.3	Células e meio de cultura	23
2.4	Estimulação elétrica de neurônios	25
2.5	Eletrocinética: foco em dieletroforese e eletrosmose	27
2.5.1	Dieletroforese (DEP)	27
2.5.2	Eletrosmose	31
2.5.3	Comparação entre as forças: F_{DEP} e F_{EHD}	35
3	CARACTERIZAÇÃO ELÉTRICA DOS CHIPS	37
3.1	Projeto dos chips e dos eletrodos	37
3.1.1	Fabricação dos eletrodos	39
3.2	Condutividade do meio de cultura: simulação numérica	41
3.2.1	Medida de impedância do arranjo de eletrodos	42
3.3	Implicações para o projeto do gerador de sinais	45
4	GERADOR DE FUNÇÕES DE CORRENTE ALTERNADA	47
4.1	Fonte de alimentação	48
4.2	Sintetizador digital direto (DDS)	49
4.2.1	Algoritmo de comunicação com o DDS	51
4.2.2	Circuito de saída de sinal do DDS	53
4.3	Amplificador Operacional	54
4.4	Montagem e teste da placa de circuito impresso (PCB)	55
5	EXPERIMENTOS ELETROCINÉTICOS	59
5.1	Microesferas	59
5.2	Microtúbulos	60
5.3	Neurônios	62
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
Referencias	68
ANEXO A – ESQUEMÁTICO DA FONTE DE ALIMENTAÇÃO . .	69
ANEXO B – ESQUEMÁTICO DO GERADOR DE FUNÇÕES E DETECTOR DE TENSÃO EFICAZ	70
ANEXO C – SIMULAÇÃO DE UM PAR DE ELETRODOS 1 . . .	71
ANEXO D – SIMULAÇÃO DE UM PAR DE ELETRODOS 2 . . .	72
ANEXO E – PROTOCOLO DE CULTURA CELULAR	73

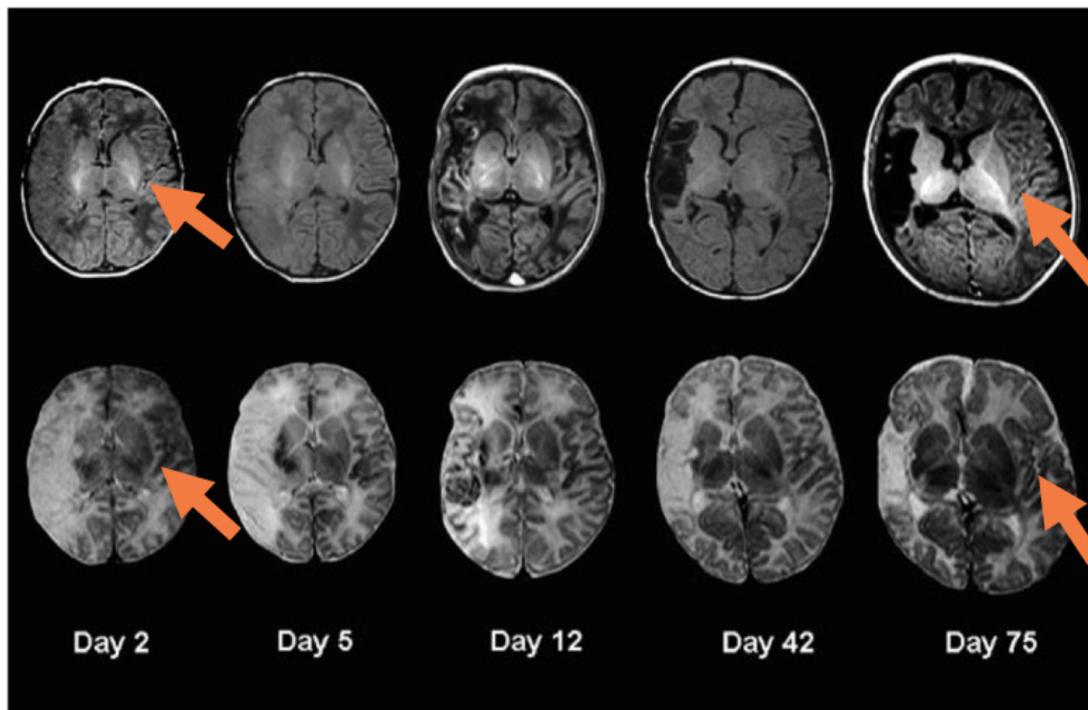
1 Introdução

Atualmente, inexistem métodos terapêuticos que permitem a substituição ou até mesmo a recriação de conexões entre populações neuronais. Disfunções genéticas como as doenças de Alzheimer e Parkinson (LANG; LOZANO, 1998; BARNHAM; MASTERS; BUSH, 2004) não possuem cura e os tratamentos propostos estão restritos a métodos paliativos. Alguns exemplos de tratamentos que mostraram bons resultados no bloqueio dos sintomas de ambas as doenças são: Estimulação Cerebral Profunda (DBS) (PERLMUTTER; MINK, 2006), Estimulação Magnética Transcraniana (EMT) e Estimulação Transcraniana por Corrente-contínua (ETCC) (RAJAPAKSE; KIRTON, 2013).

Complicações como epilepsia, acidente vascular cerebral (AVC) ou até mesmo choques mecânicos podem induzir perda de tecidos neurais e causar sintomas como paralisia, perda de memória ou reduções das capacidades cognitivas da pessoa afetada. AVCs acontecem quando o fluxo sanguíneo é interrompido em uma determinada parte do cérebro ou quando há uma complicação hemorrágica na área afetada. Esse tipo de acidente provoca danos aos tecidos cerebrais causando morte de neurônios e interrompendo a ligação sináptica entre populações. Na Figura 1 podemos observar a evolução temporal de um dano causado ao cérebro devido a um AVC na artéria cerebral média (DUDINK et al., 2009). Os danos causados por acidentes vasculares cerebrais não possuem cura, sendo a terceira maior causa de morte nos Estados Unidos e a quarta no Reino Unido, afetando em média 6 milhões de pessoas por ano no mundo inteiro.

A criação de novas abordagens de reconstrução das redes neurais cerebrais perdidas devido a um dos fatores anteriormente citados pode significar o surgimento de novas terapias para doenças que, atualmente, não possuem cura. Na maioria dos casos, torna-se árdua a tarefa de prosseguir com experimentos *in vivo* devido a diversos problemas éticos e também devido à invasividade exigida por alguns métodos. Dessa forma, com o objetivo de acelerar tais estudos, muitos pesquisadores vêm dispositivos microfluidicos como uma boa alternativa para simular meios biológicos básicos e assim obter resultados mais imediatos. Algumas técnicas de indução de conexões neuronais *in vitro* têm sido exaustivamente investigadas. Fatores neurotróficos (FARGALI et al., 2012), raios luminosos (EHRLICHER et al., 2002) e estimulação elétrica (HONEGGER et al., 2013) são alguns exemplos de métodos que têm mostrado bom potencial de reagrupamento de populações de neurônios. Essas abordagens ainda estão sendo testadas e existe uma grande quantidade de experimentos a serem feitos para que haja total compreensão dos fenômenos e validação dos métodos.

Figura 1 – "Evolução temporal de uma região de infarto da artéria cerebral média. Imagens com ponderações longitudinais T1 (linha superior) e transversais T2 (linha inferior) obtidas 2, 5, 14, 42 e 75 dias após o nascimento". Podemos observar a evolução da assimetria entre as porções dos hemisférios esquerdo e direito no membro anterior da capsula média (indicado pelas setas).



Fonte – (DUDINK et al., 2009)

Com a ausência de soluções para tais complicações, um projeto interdisciplinar financiado pela Federação da Pesquisa Médica (Fédération de la Recherche Médicale, França) teve início em 2017. Seu objetivo é desenvolver um dispositivo implantável capaz de combinar métodos de estimulação neuronal através de luz e campos elétricos com a finalidade de estimular a formação de redes neurais *in vivo*, recriando assim tecidos neuronais e conexões perdidas após um acidente vascular cerebral. Nomeado "Braindage", tal estimulador neuronal irá incorporar um conjunto de eletrodos e LEDs (diodo emissor de luz). O equipamento será posicionado no limite entre tecidos saudáveis e lesões oriundas do AVC com o intuito de recriar as conexões sinápticas. O projeto foi desenvolvido em uma parceria entre o Laboratório das Tecnologias da Microeletrônica (Laboratoire des Technologies de la Microelectronique LTM, Grenoble - França), Instituto de Neurociências de Grenoble (Grenoble Institut des Neurosciences, GIN) e o Instituto de Eletrônica de Montpellier. O grupo localizado no LTM está desenvolvendo um método de indução de formação de circuitos neurais orientados através de campos de corrente alternada (projeto de pós-doutorado de Antoine Legrain). A abordagem usada para o desenvolvimento de

tal equipamento é a seguinte: estudo dos efeitos dos estímulos elétricos *in vitro*, uso da tecnologia para fabricar dispositivos implantáveis confeccionados a partir de derivados da seda e realização ensaios *in vivo*.

O presente trabalho está situado na primeira parte do projeto e possui três objetivos principais. O primeiro é medir as características elétricas do dispositivo projetado (eletrodos depositados em lâminas de vidro) para diversas frequências e amplitudes do estímulo oscilatório de entrada (campos elétricos de corrente alternada). Esse dispositivo será utilizado para cultivar e estimular células vivas do hipocampo de ratos de laboratório. O projeto e confecção das amostras de vidro foram realizadas por Antoine. O segundo objetivo é realizar o projeto de um gerador de funções portátil, capaz de entregar estímulos sinusoidais compatíveis adequados levando em consideração as características elétricas dos chips. E, finalmente, participar de experimentos de laboratório realizados por Antoine e outros parceiros, localizados no GIN e nas dependências do CEA, com o intuito de identificar os mecanismos que regem o crescimento de neurites e a formação de sinapses

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Células Nervosas

2.1.1 Estrutura Básica

O sistema nervoso está dividido em duas classes principais de células: os neurônios e as células da glia (também conhecidas como neuroglia ou glia) (KANDEL, 2013). A glia oferece suporte mecânico e imunológico às células nervosas. O neurônio é considerado como a unidade básica do cérebro e é o responsável pelo transporte do sinal. Cada neurônio faz parte de um circuito específico responsável por uma ou mais funções comportamentais. Morfológicamente, os neurônios possuem quatro regiões principais: (1) corpo celular (ou soma), (2) dendritos, (3) axônio e (4) terminais pré-sinápticos (ver Figura 2). Cada região do neurônio possui um papel distinto. As funções metabólicas são controladas no soma. Os dendritos são responsáveis por receber os sinais oriundos de células adjacentes (potencial de ação) que se propagam ao longo da extensão dos axônios. Perto do seu terminal, encontram-se ramificações que entram em contato com outros neurônios através de estruturas denominadas *sinapses*. Essas ramificações são denominadas terminais pré-sinápticos e sua função reside na propagação do sinal oriundo da célula transmissora (célula pré-sináptica) para a célula receptora (célula pós-sináptica).

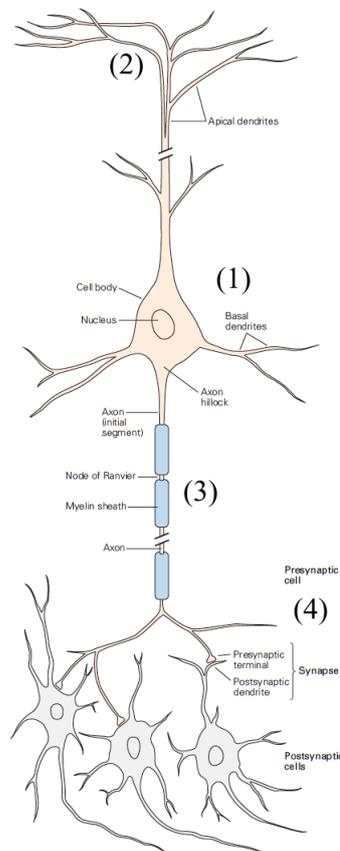
Todos neurônios possuem o mesmo mecanismo de sinalização. Receptores sensoriais identificam um estímulo externo, produzem um gradiente local que ativa o potencial de ação da circuito em questão. O potencial de ação é propagado através dos neurônios a partir dos dendritos em direção aos axônios até o alcançar o fim do circuito.

A forma como os neurônios estão conectados determina o propósito geral anatômico do sistema. Eles podem carregar informação em direção ao (para dentro do) sistema nervoso central bem como para fora do mesmo (neurônios aferentes e eferentes, respectivamente). Além disso, eles podem ter função local, participando na comunicação entre sistemas (circuito de neurônios centrais, ou interneurônios) (PURVES et al., 2001).

2.1.2 Cone de crescimento

No ano de 1909, Ramon y Cajal (CAJAL, 1909) observou uma pequena terminação axonal capaz de guiar seu crescimento através de determinadas direções até encontrar terminação pós-sináptica. Nomeada devido a sua principal função, o cone de crescimento passa a ser extensivamente estudado.

Figura 2 – Estrutura morfológica básica de um neurônio definida em quatro regiões: (1) o corpo celular, (2) dendritos, (3) axônio e (4) terminais pré-sinápticos

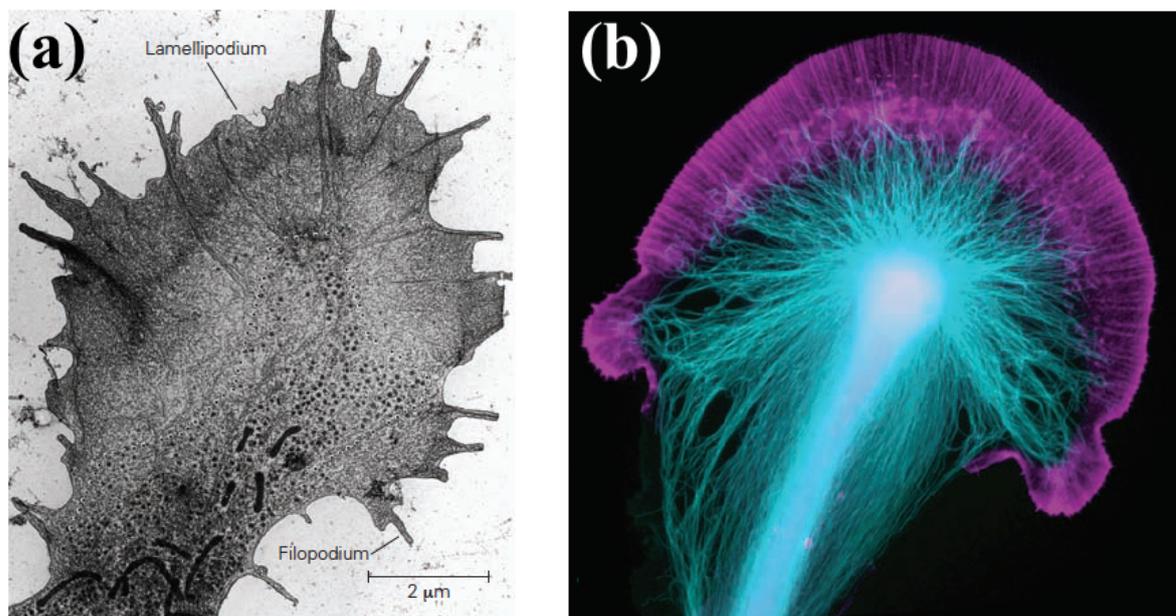


Fonte – (KANDEL, 2013)

O cone de crescimento apresenta formato de ameba quando *in vivo* e possui uma alta mobilidade. Suas terminações agem como transdutores sensoriais que respondem a estímulos presentes no meio em que estão contidos (KANDEL, 2013; CAJAL, 1909; OMOTADE; POLLITT; ZHENG, 2017). Devido à unicidade do axônio e a seu papel particular no comportamento do neurônio, os estudos normalmente são voltados aos cones de crescimento axonais. Estruturalmente, eles apresentam duas regiões de fácil identificação: periférica e central (OMOTADE; POLLITT; ZHENG, 2017). Podemos observar ambas as regiões na Figura 3 (b). A parte periférica, abundante em actina, possui dois tipos de protrusões membranasas que auxiliam o cone de crescimento em sua locomoção. Essas regiões são denominadas lamellipodia e filopodia, sendo a primeira responsável pelo deslocamento e a segunda pela amostragem do meio extracelular (OMOTADE; POLLITT; ZHENG, 2017). A região central, rica em organelas celulares (como as mitocôndrias), está conectada ao eixo axonal. Essa divisão é enriquecida com um denso arranjo de microtubulos

oriundos do axônio, que auxiliam na movimentação do cone de crescimento e no transporte de organelas celulares (OMOTADE; POLLITT; ZHENG, 2017).

Figura 3 – "Visualização do cone de crescimento de uma *Aplysia* com marcadores de tubulina e actina. Pode-se observar uma grande concentração de actina (roxo) onde se encontram o lamellipodia e o filopodia, enquanto a tubulina e microtúbulos (azul) estão concentrados na parte central (Imagem reproduzida com permissão por Paul Forscher e Dylan Burnette)"

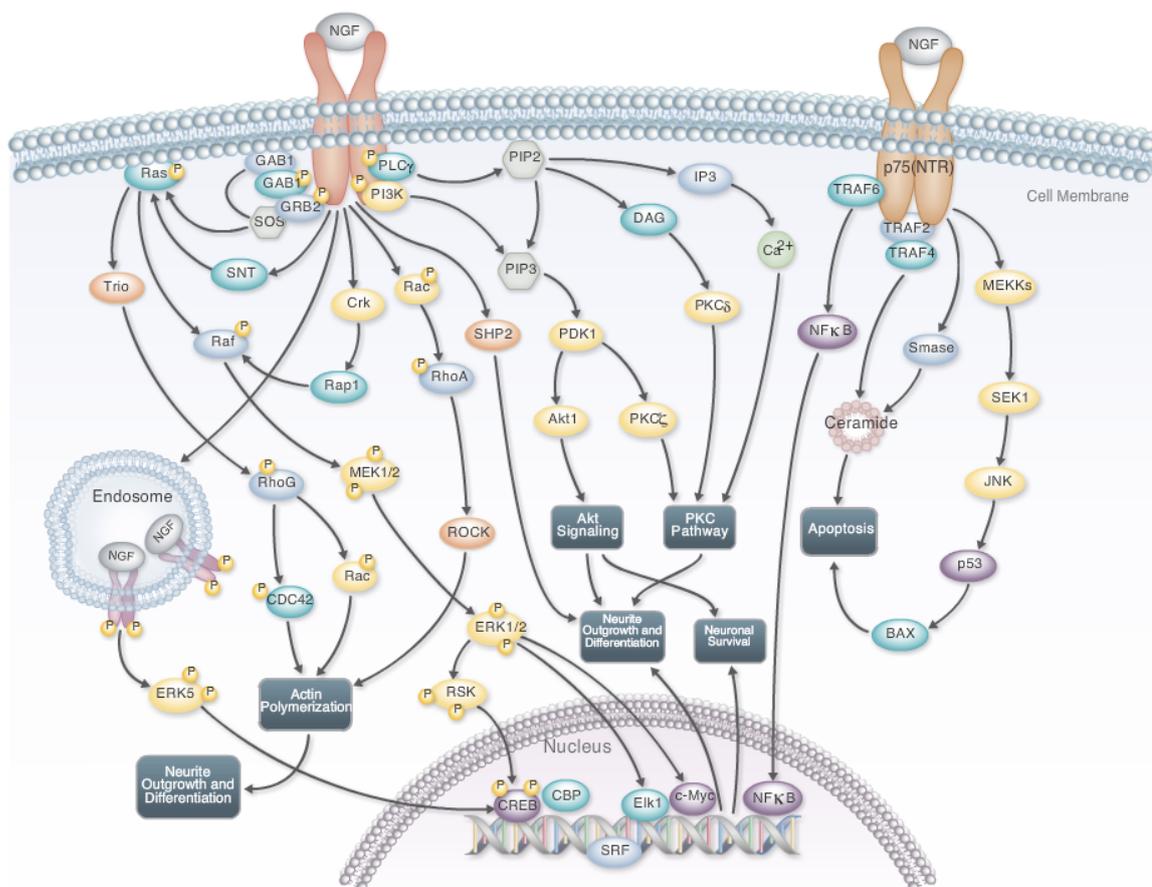


Fonte – (KANDEL, 2013)

É importante observar que a formação das sinapses não é aleatória e requer que o cone de crescimento siga sinais do meio (positivos ou negativos) através da amostragem do filopodia até que esse reconheça seu alvo final (OMOTADE; POLLITT; ZHENG, 2017; KILPATRICK,). Tais sinais são partículas denominados neurotrofinas que são liberadas pelas células adjacentes (neurônios ou glia (FIELDS, 2010)) e pelas células pós-sinápticas. NGF (fator de crescimento nervoso) e BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) (FARGALI et al., 2012) são dois exemplos de neurotrofinas. A atividade dos fatores neurotróficos é regulada por duas classes de receptores, a família das tirosinaquinases (Trk) e a família p75NTR (superfamília de receptores TNF). Muitos caminhos de sinalização estão sendo estudados com o objetivo de melhor compreender e parametrizar a função de cada fator no crescimento axonal. Na Figura 4 pode-se observar a via de sinalização dos receptores p75NTR e TrkA ativados por moléculas de NGF). Muitos estudos sugerem que a polimerização da actina e dos microtúbulos são fatores importantes para o crescimento orientado dos axônios (KANDEL, 2013; OMOTADE; POLLITT; ZHENG,

2017; ABCAM,). Mudanças estruturais nos filamentos de actina e microtúbulos dentro do cone de crescimento levam a sua alta mobilidade e a migração das células.

Figura 4 – Via de sinalização do NGF. Processo de ativação via receptores membranares *TrkA* e *p75(NTR)*. Observe que as duas cadeias possuem influência no crescimento e diferenciação de neurites.



Fonte – (ABCAM,)

Muito já é compreendido e documentado sobre os processos internos de crescimento celular (OMOTADE; POLLITT; ZHENG, 2017), porém vários aspectos necessitam ser investigados. Os processos de (des)polimerização ainda não são completamente compreendidos e são necessários mais estudos para seu total entendimento. Além disso, o controle desses mecanismos usando estímulos externos (EHRLICHER et al., 2002; ASOKAN et al., 2003) pode ser útil para recriar as conexões perdidas e reestabelecer circuitos neuronais danificados.

2.2 Sistemas Microfluídicos

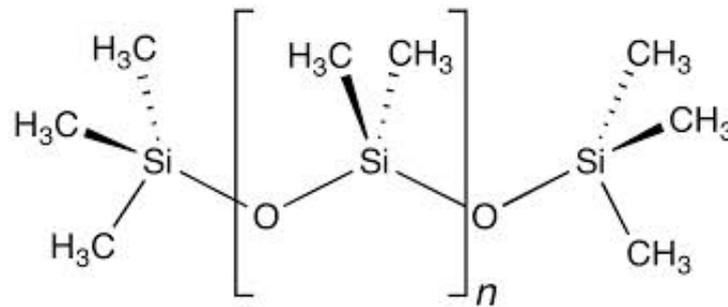
A microfluídica é o estudo e uso do comportamento de fluidos quando confinados em canais de escala entre 10^{-9} e 10^{-12} litros. Os sistemas microfluídicos foram primeiramente projetados para miniaturizar análises químicas e bioquímicas, permitindo o uso de volumes diminutos de reagentes nas amostras (WHITESIDES, 2006; PARK et al., 2006). O uso de tais técnicas permite detecções em altas resoluções assim como processos de análise portáteis e integrados (LI et al., 2017). Além disso, o uso de polímeros pode ser empregado na fabricação dos dispositivos, o que torna possível a realização de experimentos sob algumas condições biológicas básicas (baixa toxicidade, alta permeabilidade para dióxigênio e dióxido de carbono). Todas as vantagens dessas técnicas levam a uma redução no custo dos experimentos combinado com resultados rápidos e de boa qualidade (WHITESIDES, 2006; PARK et al., 2006). Um importante uso para microfluídica reside em estudos de culturas celulares. Através desses métodos podem ser realizadas análises moleculares, de organelas ou até mesmo de populações celulares inteiras com alta resolução. Células cultivadas nos dispositivos podem ser submetidas a diferentes estímulos de força, concentrações de partículas e separações físicas.

Métodos convencionais *in vitro* de cultura celular que utilizam placas de petri não são adequados para o estudo de circuitos neurais pois muitos experimentos precisam de um ambiente controlado de crescimento ou orientação. Ademais, diferentes processos moleculares e celulares acontecem em partes específicas da célula, tornando algumas doenças ou lesões neurodegenerativas difíceis de serem estudadas sem uma plataforma de análise especificamente modelada para a tarefa (PARK et al., 2006; SIDDIQUE; THAKOR, 2014). Esse projeto trabalha com orientação axonal com o objetivo de estimular a formação de circuitos neurais entre os neurônios. Usando dispositivos microfluídicos, pode-se criar câmaras seletivas para os axônios, o que permite sua estimulação sem afetar o soma. Também, os chips permitem microscopia de alta resolução, são compatíveis com química imunológica, são robustos com fabricação livre de vazamento e compatíveis com cultura de células a longo prazo (PARK et al., 2006).

Chips microfluídicos podem ser fabricados utilizando materiais como polímeros termoplásticos, poliestireno, policarbonato, dimetil polissiloxano (PDMS), etc., (ELVEFLOW,). PDMS é o material mais utilizado devido a sua transparência, bio-compatibilidade, fácil e rápida fabricação. O polímero possui estrutura monomérica mostrada na Figura 5.

2.2.1 Fabricação de dispositivos PDMS

Dispositivos PDMS são preparados com uma razão de 10:1 entre polímero e catalizador. Essa combinação necessita ser livre de bolhas para não introduzir defeitos no produto final, estado que pode ser garantido pelo dissecador à vácuo (PARK et al., 2006). A

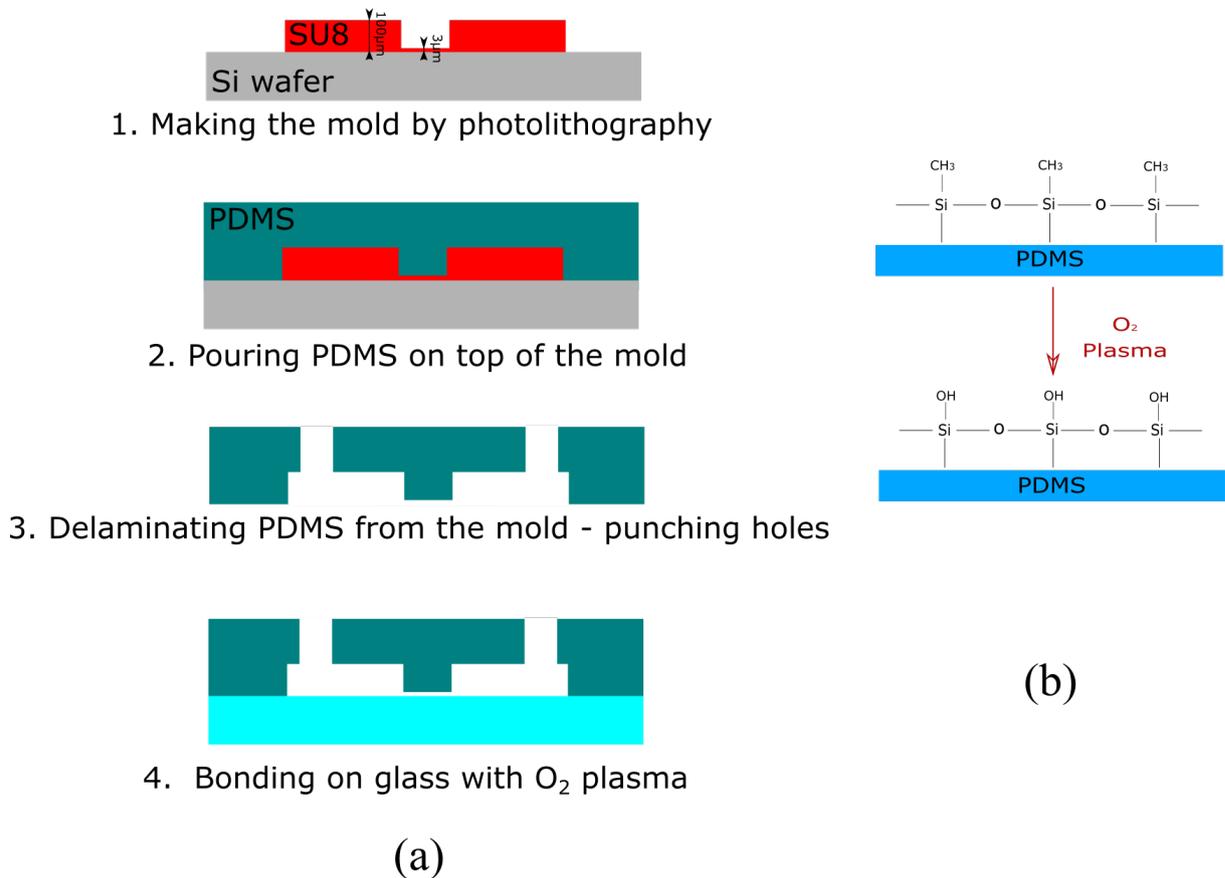
Figura 5 – *Formula fragmentada do PDMS (sendo n o número de repetições do monômero).*

Fonte – (ELVEFLOW,)

mistura é então colocada em um molde fabricado por foto-resistores que são normalmente empregados em estruturas de alta relação de aspecto (SU8) contendo o formato negativo do dispositivo PDMS final (Figura 6). O processo de cura é então iniciado em um forno dedicado durante 1h a 80 °C. Esse processo torna o PDMS mecanicamente resistente, o que também o torna possível de ser removido do molde. Após a cura do material, as entradas do sistema podem ser inseridas (através de pequenos orifícios) no bloco PDMS utilizando métodos manuais. Nesse momento, as amostras estão preparadas para serem ligadas às lâminas de vidro. Para ligação permanente, ambos PDMS e lâmina devem ser expostos a plasma de O₂ (Figura 6) (PARK et al., 2006; FIKAR, 2016). A exposição muda a superfície de ambos os materiais possibilitando a formação de fortes ligações covalentes do tipo S - O - S. A exposição ao plasma induz momentâneas superfícies hidrofílicas nos materiais (reação de redução com o oxigênio), o que é uma importante propriedade no momento de introduzir o meio de cultura ou ao menos preencher os canais com água antes que eles se tornem hidrofóbicos. Essa configuração dos chips permite confinar as estruturas celulares através de canais de 3 μm de altura que se conectam a câmaras de 100 μm onde as células são inseridas (Figura 6 (a)).

Figura 6 – (a) Processo de fabricação do dispositivo microfluídico (b) Processo de ativação da superfície PDMS através do plasma de O_2

Fabrication of microfluidics chips (cross-section)



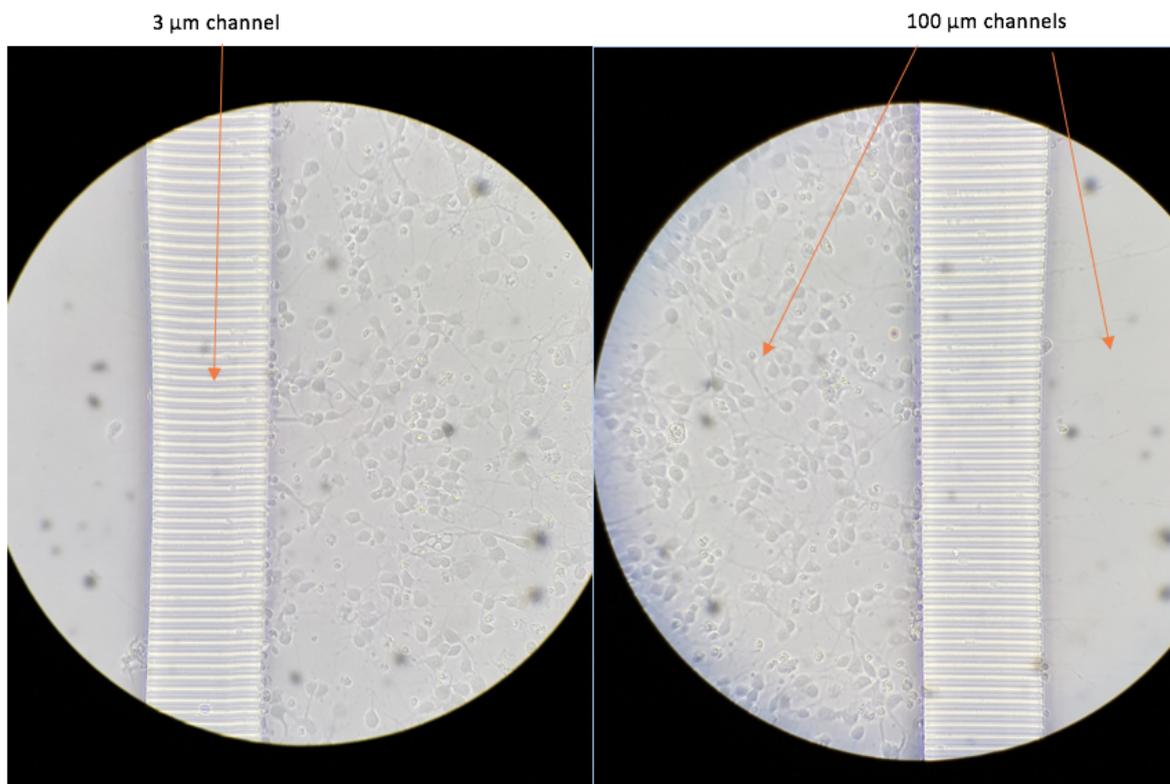
2.3 Células e meio de cultura

O uso de tecnologia microfluídica auxilia na realização de experimentos próximos às condições fisiológicas *in vivo*. A mesma abordagem pode ser aplicada ao se escolher o tipo de células a serem cultivadas, ou seja, o quanto mais próximas das condições *in vivo* as células se encontram, melhor. Muitas linhas de células podem ser empregadas nesses experimentos, porém algumas possuem certas desvantagens que tornam seu cultivo uma árdua tarefa. Por exemplo, células do sistema nervoso central não possuem axônios e dendritos bem definidos, bem como não formam sinapses. Dependendo do experimento, isso pode ser um problema. Entre uma grande variedade de células que poderiam ser interessantes para esse estudo, células do hipocampo foram utilizadas devido a sua simples estrutura morfológica quando comparadas a outras células (KAECH; BANKER, 2007). Quando em cultura, esses neurônios apresentam um axônio bem desenvolvido, uma quantidade numerosa de

dendritos e realizam longas e funcionais conexões sinápticas. Além disso, a cultura dessas células já foi estudada extensivamente e é bem documentada (KAECH; BANKER, 2007).

Para realizar os experimentos, a extração das células através de cirurgia foi realizada em embriões de ratos em seu estado tardio (E19) devido a diferenciação das células. Também, a cultura celular nesse estágio demonstra fácil dissociação, ausência de neurônios granulares do giro dentados e baixa quantidade de células gliais (maior fonte de contaminação em culturas neuronais) (KAECH; BANKER, 2007). Antes da inserção dos neurônios, deve-se cobrir o interior dos canais com Poli-D-Lisina (PDL) e Laminina para auxiliar na adesão e migração das células. O protocolo completo e detalhado está descrito no anexo D. A semeadura é então realizada através das aberturas presentes no dispositivo microfluídico. Células do hipocampo de ratos embriões são cultivadas em um meio que fornece as condições necessárias para sua sobrevivência a longo termo. Esse meio é fabricado utilizando uma solução de Glutamina-Penicilina-Streptomicina (fonte de energia celular e inibidor bacterial), suplemento B27 50X (usado para sobrevivência celular sem necessidade de alimentação pelos astrócitos), Neurobasal (mantém neurônios vivos, fornece alimento). Na Figura 7 pode-se observar uma imagem das células do hipocampo cultivadas em um dispositivo microfluídico. A Figura da direita mostra os limites entre os dois canais microfluídicos, tal barreira física é capaz de separar axônios e dendritos do corpo celular.

Figura 7 – Cultura de células do hipocampo utilizando dispositivos microfluídicos após 3 dias de cultura (3 DIV). Neurônios são inseridos através da câmara periférica. Axônios tem crescimento preferencial em direção à câmara central.



2.4 Estimulação elétrica de neurônios

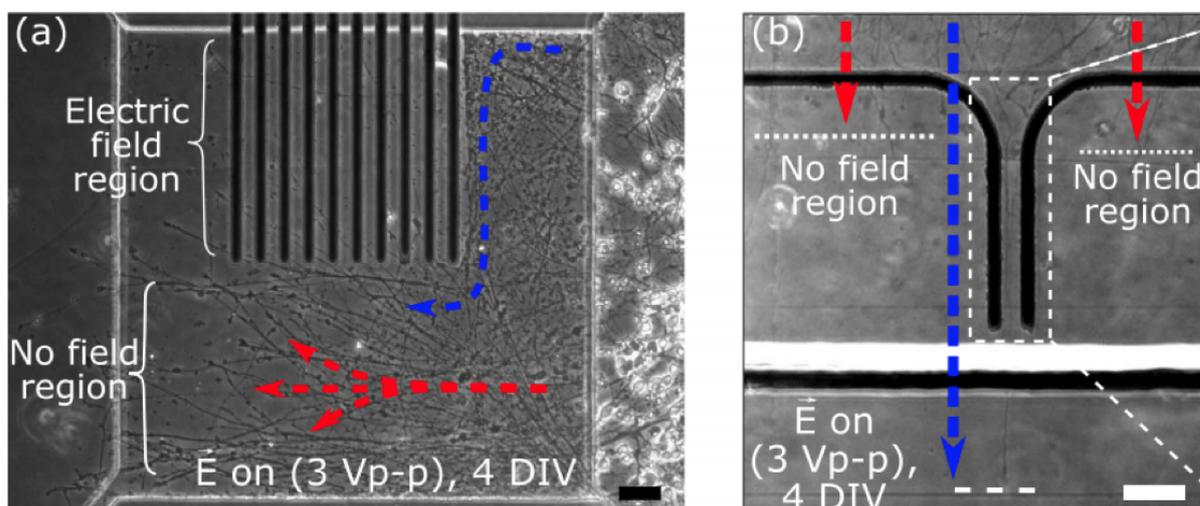
Controle de partículas e fluídos usando manipulação eletrocinética tem sido mostrada como um importante e efetivo método em sistemas *lab-on-a-chip* (laboratório em um chip), (HONEGGER et al., 2013). Diferentes fatores podem ser atribuídos à popularização da abordagem de estimulação elétrica, alguns exemplos são: redução de falhas mecânicas, projetos de baixo custo, parâmetros de estimulação que podem ser alterados com facilidade e possibilidade de separação seletiva, alinhamento e orientação de partículas (HONEGGER et al., 2013; ARIZA et al., 2010; ASBURY; DIERCKS; ENGH, 2002; ZHAO; YANG, 2012). Outras abordagens de estimulação celular *in vitro* também mostraram bons resultados e poderão expandir fronteiras em campos ainda inexplorados. Atualmente, organelas celulares podem ser separadas (FIKAR, 2016) sem haver perda de função, filamentos de microtúbulos podem ter polimerização e alinhamento orientado (UPPALAPATI et al., 2008), bem como uma população neuronal pode ter crescimento axonal guiado (HONEGGER et al., 2013). Cada efeito depende da natureza do estímulo, do meio e da sua geometria. Restringindo aos propósitos desse trabalho e levando em consideração a natureza do estímulo, existem duas formas principais de direcionar os

experimentos: estimular as células com campos elétricos de corrente contínua (CC) ou de corrente alternada (CA).

Existe uma gama de estudos qualificando e caracterizando o uso de campos de corrente contínua em ordem de guiar partículas neuronais e algumas de suas extensões para determinadas direções (ARIZA et al., 2010; MORGAN; GREEN, 2003). Um bom exemplo é o movimento induzido de íons de cálcio dentro de neurônios. Moléculas de cálcio provaram ser importantes nas funções de deslocamento realizadas pelo cone de crescimento. Elas agem como sinalizadores secundários de muitas vias de sinalização, bem como possuem influência na polimerização da actina. Tensão contínua induz forças constantes sobre os íons (como o cálcio), causando deposição de partículas dependendo da direção e força dos campos. Quando os axônios alcançam posições próximas aos eletrodos desempenhando as funções de ânodo e cátodo, existe atração ou repulsão preferencial das extensões em relação aos eletrodos devido a essa deposição. Utilizar essa técnica de orientação de partículas pode ser útil, porém existem algumas falhas. Como dito anteriormente, polarização de corrente contínua possui um efeito direto poderoso sobre partículas carregadas (induzidas ou intrínsecas), causando deposição. Isso provoca um desequilíbrio no sistema, o que gera a presença de fluxo osmótico e eletrólise do meio (possivelmente causando danos aos eletrodos). Ademais, esse desbalanço pode levar ao surgimento de bolhas e efeitos de eletroforese nos íons da solução tampão, o que provavelmente envenenará as organelas celulares (UPPALAPATI et al., 2008). Estudos mostraram viabilidade negativa em culturas de células tratadas com campos de corrente contínua, i.e. maior índice de morte celular se comparado a populações estimuladas com campos de corrente alternada (ARIZA et al., 2010).

Em contrapartida, campos elétricos CA são capazes de agir em partículas cuja polaridade difere do meio em que estão inseridas (UPPALAPATI et al., 2008) ao mesmo tempo em que evitam os pontos negativos dos estímulos de corrente contínua. Os efeitos de tal técnica foram observados e registrados em manipulações de macromoléculas como o DNA, microtúbulos, filamentos de actina ou até mesmo populações de neurites (Figura 8) (ASOKAN et al., 2003; ASBURY; DIERCKS; ENGH, 2002; UPPALAPATI et al., 2008; HEUVEL et al., 2007). Parâmetros como frequência, amplitude do sinal e fase podem agir sobre partículas predeterminadas de diferentes maneiras. Esse método mostrou bons resultados em experimentos realizados com filamentos de actina e microtúbulos (ASOKAN et al., 2003; KIM et al., 2015; MORIN; TARHAN; FUJITA, 2006) os quais são os principais componentes no citoesqueleto no interior do cone de crescimento (ver 2.1 - Cone de Crescimento) e desempenham um fator importante na mobilidade celular. Investigar e parametrizar seus mecanismos de polimerização enquanto neurônios são estimulados pode ser útil para compreender a via de sinalização do crescimento axonal.

Figura 8 – Crescimento de neurites, após 4 DIV, em canal de $3\ \mu\text{m}$ de espessura preenchido com colágeno. Os neurônios foram estimulados por campos de corrente alternada de 150 kHz e 3 Vpp. Pode-se notar que crescimento preferencial das neurites para fora da zona dos eletrodos (a) e confinamento dos axônios entre os eletrodos (b).



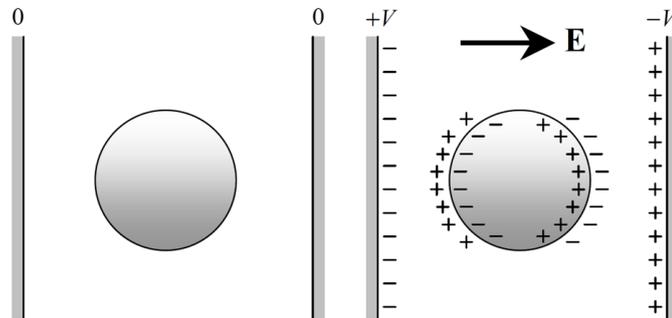
2.5 Eletrocinética: foco em dielectroforese e eletrosmose

Existem diversas forças eletrocinéticas CA agindo sobre um amostra quando o campo é aplicado: fluxo eletrosmótico, efeitos gravitacionais, agitação térmica das partículas (movimento Browniano), efeitos eletroforético e dielectroforético, etc. Como demonstrado no artigo "*Electrokinetic confinement of axonal growth for dynamically configurable neural networks*" (HONEGGER et al., 2013), um sistema microfluídico similar possui duas forças principais agindo sobre as partículas: dielectroforese (F_{DEP}) e forças eletro-hidrodinâmicas (F_{EHD}). Nesse estudo, F_{EHD} é considerado como a soma entre um extenso número de variadas forças hidrodinâmicas presentes na amostra. Eletrosmose possui um importante papel em F_{EHD} e as consequências desse efeito nos chips utilizados podem ser interessantes para os propósitos do projeto.

2.5.1 Dielectroforese (DEP)

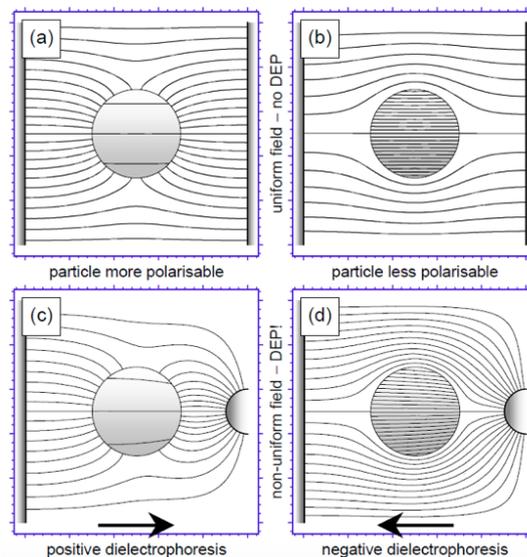
Partículas dielétricas possuem rápida indução de momentos dipolares quando estão na presença de um campo elétrico (Figura 9). Campos não uniformes são capazes de gerar uma força dielectroforética (DEP) resultante. A magnitude e direção dessa força depende da polarização da partícula em relação ao meio em que ela está contida (MORGAN; GREEN, 2003). DEP positiva é obtida quando a partícula suspensa possui uma maior polarizabilidade que o meio, enquanto DEP negativa é observada quando a partícula é menos polarizável (Figura 10 (c) e (d), respectivamente).

Figura 9 – *Momento dipolar induzindo na partícula devido à aplicação de um campo elétrico.*



Fonte – (MORGAN; GREEN, 2003)

Figura 10 – *Linhas de campo elétrico calculadas para casos distintos com mudanças na natureza do campo (uniforme - (a) e (b) - ou não uniforme - (c) e (d)) e na natureza da partícula (mais - (a) e (c) - ou menos - (b) e (d) - polarizável que o meio). As setas demonstram a direção da força e o conseqüente fluxo das partículas para cada caso (existência de F_{DEP} sob presença de campo não-uniforme).*

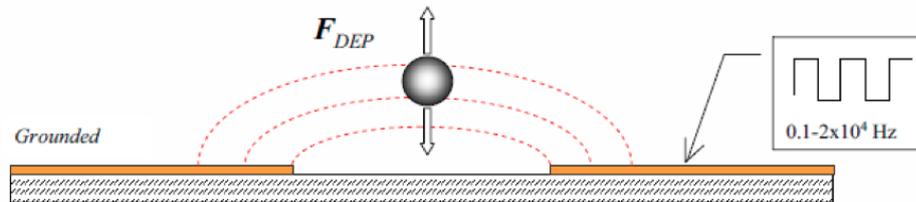


Fonte – (MORGAN; GREEN, 2003)

Eletrodos agem como transdutores em técnicas de DEP. O projeto do formato, tamanho e material depende das aplicações finais, meio e das condições bioquímicas em que estão inseridos. Como o trabalho é desenvolvido dentro de uma amostra microfluídica, uma forma eficiente de alcançar os efeitos proporcionados por DEP dentro das micro-câmaras é utilizando eletrodos depositados na superfície de vidro.

Existem múltiplos esboços de projeto para os eletrodos, cada um servindo a um diferente propósito. São alguns exemplos: aprisionamento, separação, orientação de células e partículas. Uma forma de obter o fenômeno de orientação celular para estimular o crescimento axonal é através de longos arranjos de eletrodos interdigitados (HONEGGER et al., 2013). Para melhor compreender as equações que governam o efeito de DEP obtidos por tais arranjos, pode-se reduzir o sistema ao caso de dois eletrodos planos paralelos (Figura 11) agindo sobre uma partícula esférica como é descrito matematicamente a seguir (demonstração completa encontrada em (MORGAN; GREEN, 2003; WU, 2008)).

Figura 11 – Representação gráfica de dois eletrodos planos paralelos depositados sobre uma superfície isolante agindo sobre uma partícula esférica.



Fonte – (WU, 2008)

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_1 Re |\underline{K}(w)| R^3 \nabla E_{rms}^2 \quad (2.1)$$

Sendo:

- R^3 o volume da partícula
- E_{rms} a média quadrática do campo elétrico do sistema
- $Re |\underline{K}(w)|$ a parte real da função K de Clausius - Mossotti

$$Re |\underline{K}(w)| = \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 - 2\epsilon_1} + \frac{3(\epsilon_1\sigma_2 - \epsilon_2\sigma_1)}{\tau_{MW}(\sigma_2 + 2\sigma_1)^2(1 + \omega^2\tau_{MW}^2)} \quad (2.2)$$

Sendo

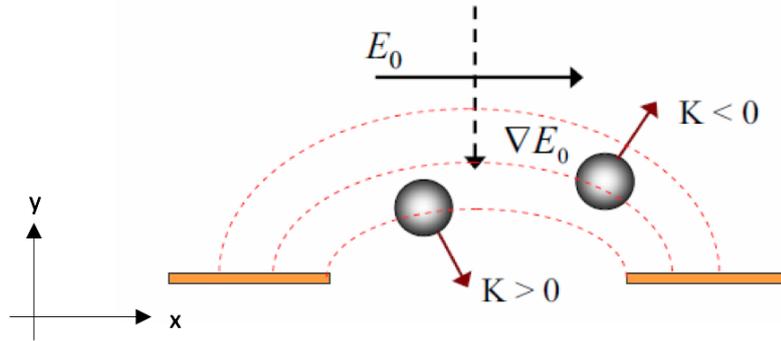
- ϵ_1 a permissividade elétrica do meio.
- ϵ_2 a permissividade elétrica da partícula.
- σ_1 a condutividade elétrica do meio.
- σ_2 a condutividade elétrica da partícula.

- ω a frequência angular do campo elétrico de corrente alternada (CA) aplicado.
- τ_{MW} o tempo de acomodação da Maxwell-Wagner para uma carga.

$$\tau_{MW} = \frac{\epsilon_2 + \epsilon_1}{\sigma_2 - 2\sigma_1} \quad (2.3)$$

É importante observar que o termo gradiente do campo elétrico está elevado ao quadrado, fazendo com que a força F_{DEP} aplicada esteja sempre no mesmo sentido, i. e., não há alteração do sentido da força resultante conforme o ciclo sinusoidal de estimulação. Dessa forma, o sentido da força está ligado ao valor da parte real da função de Clausius-Massotti. Dieletroforese positiva é obtida quando $Re |\underline{K}(w)| > 0$, o que significa que há uma força atrativa entre a partícula e o ponto de máxima intensidade do campo elétrico (WU, 2008). A situação oposta acontece quando $Re |\underline{K}(w)| < 0$, nesse caso as partículas são repelidas do ponto de intensidade máxima do campo (ver Figura 12).

Figura 12 – Representação gráfica de forças atrativas e repulsivas de F_{DEP} sobre uma partícula. Pode-se observar a dependência entre o sentido de F_{DEP} e K .



Fonte – (WU, 2008)

Expandindo o modelo para o caso do arranjo interdigitado de eletrodos, pode-se obter uma aproximação para a equação governante do fator $\nabla |E|^2$. Tomando apenas o primeiro termo da série de Fourier, tem-se:

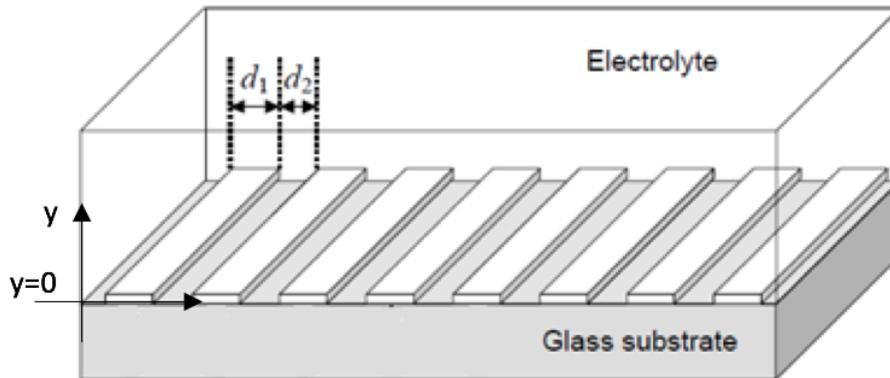
$$\nabla(E_x^2 + E_y^2) = -\frac{64 V_o^2}{\pi d_2 d} \cos^2\left(\frac{\pi d_1}{4d}\right) e^{-\frac{\pi y}{d}} \hat{y} \quad (2.4)$$

Onde:

- d_1 é o espaçamento entre os eletrodos.
- d_2 é a largura dos eletrodos

- $d = \frac{(d_1+d_2)}{2}$ (ver Figura 13)

Figura 13 – Representação gráfica do arranjo de eletrodos interdigitados sobre o substrato de vidro.



Fonte – (MORGAN; GREEN, 2003)

Para os casos onde $d_1 = d_2 = d$, a equação 2.4 se reduz à expressão abaixo.

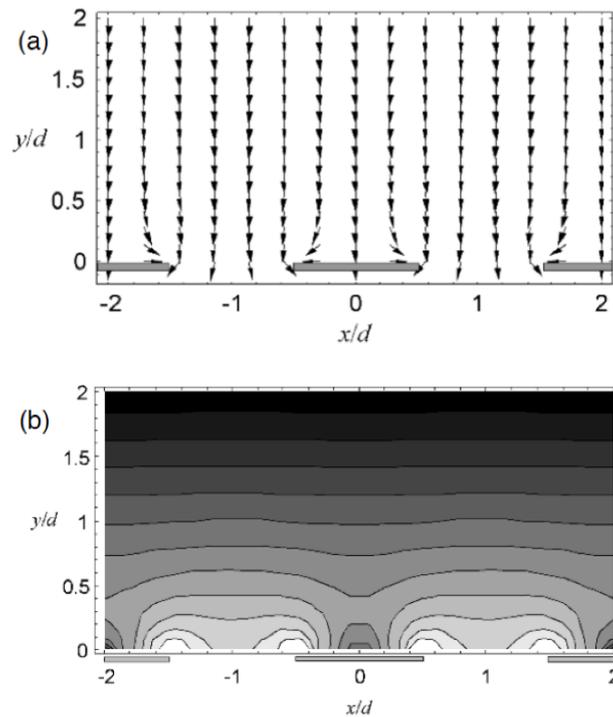
$$\nabla(E_x^2 + E_y^2) = \frac{32 V_o^2}{\pi d^3} e^{-\frac{\pi y}{d}} \quad (2.5)$$

Ambas as equações 2.4 e 2.5 não estão definidas para casos em que $y < d$ (em ambos os casos as equações não possuem solução analítica). As próximas figuras mostram os resultados de uma simulação numérica para o termo ∇E_{rms}^2 (proporcional as forças DEP). Esse fator possui a mesma direção e sentido dos campos de força DEP dados pela equação 2.1. A Figura 14 (a) mostra as direções dos vetores de força simulados e o gráfico de contornos da Figura 14(b) mostra as magnitudes dessas forças em escala logarítmica. Ambos os gráficos mostram um decrescimento na intensidade da força com o aumento da distância em y , bem como um aumento das forças nas fronteiras entre o substrato e os eletrodos, sugerindo confinamento DEP. Isso mostra a possibilidade de obter deposição preferencial dos axônios ou outras partículas nas interfaces eletrodo - gap. Apesar dos gráficos mostrarem uma visão geral sobre o comportamento da DEP, simulações futuras sob as condições dos experimentos utilizados nesse estudo podem se provar interessante para a continuidade do projeto.

2.5.2 Eletrosmose

Quando uma superfície carregada é inserida em um eletrólito, os íons presentes no meio sofrem a ação das forças de atração ou repulsão das partículas (MORGAN; GREEN, 2003). As cargas atraídas (contra-íons) tendem a se aproximar da superfície dos eletrodos

Figura 14 – Simulação gráfica contendo a direção e o sentido (a) e a magnitude (b) do campo vetorial gerado por ∇E_{rms}^2 . Observa-se aumento da amplitude para posições próximas da interface entre eletrodo e substrato, bem como convergência de vetores em tais localidades, sugerindo possibilidade de confinamento preferencial.

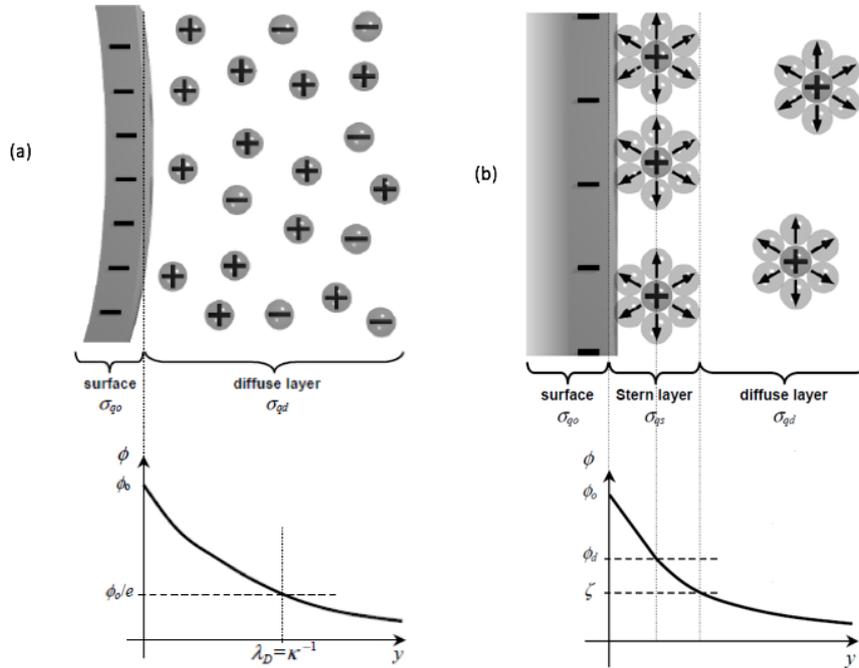


Fonte – (MORGAN; GREEN, 2003)

aumentando a concentração e formando uma larga camada chamada camada de difusão. A região difusa possui decaimento exponencial do potencial elétrico gerado pelo eletrodo carregado (Figura 15.(a)). Muito próximo da superfície, uma fina camada de contra-íons forma fortes ligações com a superfície dos eletrodos. Essa região (normalmente denominada camada de Stern) possui largura na ordem de um ou dois íons e é presumido decaimento linear do potencial através de sua extensão (Figura 15.(b)). Lembrando que a formação de camadas induzidas não altera o balanço total de cargas do volume.

A região de Stern pode ser subdividida em duas camadas: interna e externa (MORGAN; GREEN, 2003). A camada interna (ou plano interno de Helmholtz) está em contato direto com a superfície e é composta por íons não-hidratados absorvidos. Essa fina região aumenta o seu potencial ao longo de sua extensão, uma vez que possui a mesma polaridade de carga do eletrodo. A camada externa possui íons ligantes hidratados de carga oposta e um plano de deslizamento onde os fluídos se movem em relação a superfície. Os resultados mostram que, ao adicionar uma força tangencial agindo sobre o sistema, os íons da posição externa da região de Stern se movem em uma razão de 0.96 para a

Figura 15 – (a) Esquema da concentração de cargas induzidas entre o eletrodo carregado e o eletrólito (imagem superior) e seu respectivo decaimento potencial em função da distância (imagem inferior). (b) Esquema de formação da camada de Stern (imagem superior) e o seu respectivo decaimento potencial (inferior).



Fonte – (MORGAN; GREEN, 2003)

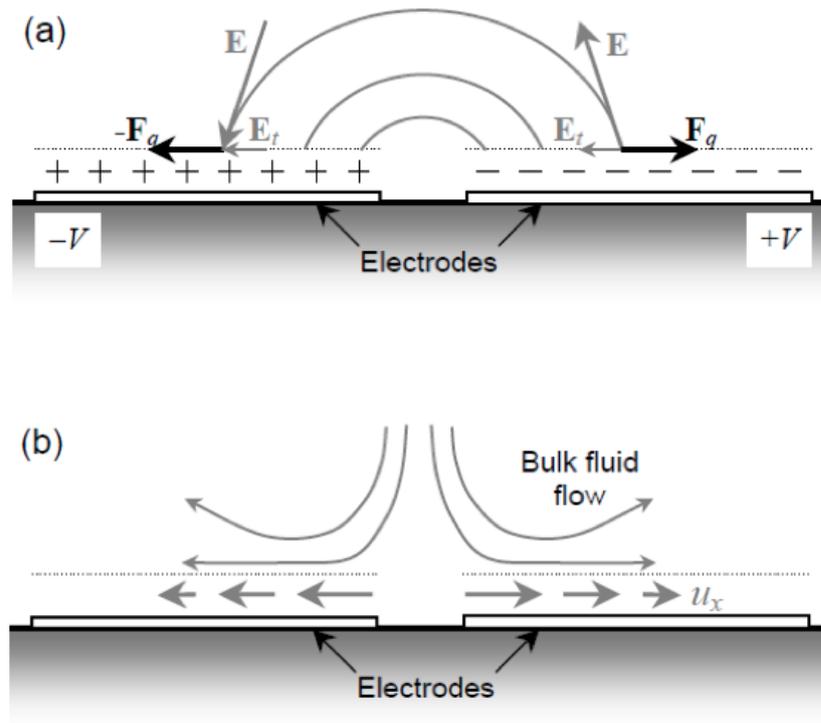
mobilidade do volume, o que mostra uma viscosidade próxima entre ambas as camadas (região externa de Stern e camada difusa). Esse plano pode também ser denominado plano de deslizamento.

A aplicação de um campo elétrico assimétrico nos eletrodos pode levar a presença de componentes tangenciais de força na superfície. Essas forças induzem movimento das cargas da camada dupla, o que provoca um movimento geral dos fluídos com componentes de máxima intensidade no plano de deslizamento. Esse movimento é denominado **eletrosmose** (MORGAN; GREEN, 2003).

Um campo elétrico alternado aplicado sobre o sistema de eletrodos paralelos mostra componentes tangenciais nos eletrodos (Figura 16). Esse campo tangencial leva a presença de eletrosmose. A velocidade das partículas em sistemas similares pode ser modelada pelas equações a seguir (HONEGGER et al., 2013).

$$\langle u_x \rangle = \frac{1}{8} \frac{\epsilon_m \phi_0^2 \Omega^2}{\sigma_m r (1 + \Omega^2)^2} \quad (2.6)$$

Figura 16 – (a) Esquema geral da eletrosmose sobre eletrodos planos paralelos. Pode-se observar a presença de componentes tangenciais de força agindo sobre os íons da camada dupla sobre os eletrodos. (b) Fluxo dos fluídos gerado pela ação de forças eletrosmóticas sobre os íons da camada dupla.



Fonte – (MORGAN; GREEN, 2003)

Com

$$\Omega = \frac{\pi}{2} \frac{r}{\lambda_d} \frac{\epsilon_m}{\sigma_m} \omega \quad (2.7)$$

Sendo

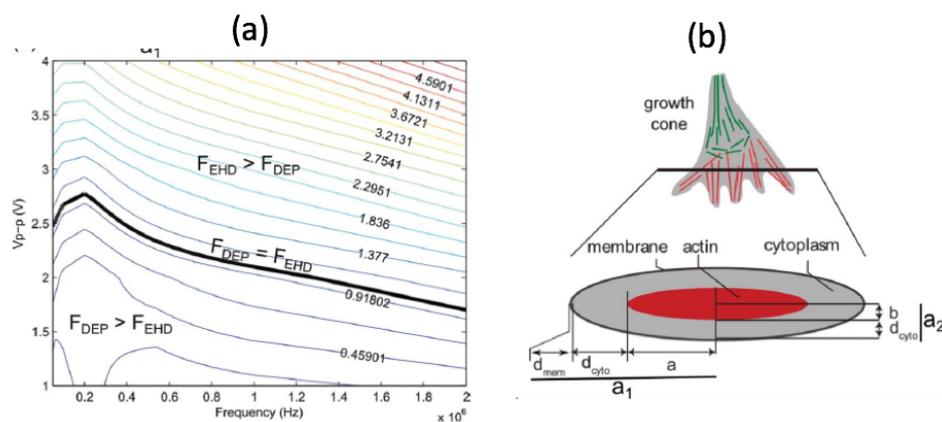
- Ω a frequência adimensional
- ϵ_m a permissividade do meio
- σ_m a condutividade do meio
- ϕ_o o potencial aplicado nos eletrodos
- r a coordenada polar da posição onde a força é aplicada
- λ_d o comprimento de Debye na interface entre eletrólito e eletrodo.
- ω a frequência do sinal

A equação mostra que a velocidade eletrosmotica é inversamente dependente da frequência quadrática e proporcional ao quadrado da tensão. Pode-se converter a componente da velocidade da partícula em força ao multiplicar o termo pelo fator de fricção. Tal constante é dependente de diversos parâmetros da partícula, como tamanho, formato e superfície (MORGAN; GREEN, 2003).

2.5.3 Comparação entre as forças: F_{DEP} e F_{EHD}

No estudo realizado por (HONEGGER et al., 2013) foram executadas simulações que levam em consideração F_{DEP} e F_{EHD} . Nesse estudo, as forças estão agindo sobre a seção transversal da interface entre o axônio e o cone de crescimento. Os resultados são esboçados na Figura 17.

Figura 17 – (a) Razão modelada entre as forças EHD e DEP agindo sobre a seção transversal do cone de crescimento. Pode-se observar que as curvas cuja razão é menor que 1 estão localizadas abaixo do gráfico demarcado em preto. (b) Para esse modelo a influência de F_{DEP} e F_{EHD} é simulada internamente sobre uma seção transversal elipsoidal do axônio conectada a uma seção 10 vezes maior do cone de crescimento. F_{EHD} está agindo sob fluídos puros e são consideradas como a soma de efeitos eletrosmoticos e eletrotérmicos. Simulação realizada por (HONEGGER et al., 2013)



Fonte – (HONEGGER et al., 2013)

Baixas tensões aplicadas sobre o meio levam a menores dissipações causadas por efeito Joule. Isso torna o fluxo térmico mais fraco e reduz a importância dessas componentes na amostra microfluídica. Apesar de não ser facilmente obtido nesses experimentos devido a dificuldade de compreender todos os mecanismos por trás da estimulação de campos alternados no crescimento axonal, condições em que a influência de F_{DEP} se superpõe a outras componentes de força serão preferenciadas nesse estudo. Devido a natureza do fenômeno e a sua capacidade de orientação seletiva, busca-se com vigor guiar neurites

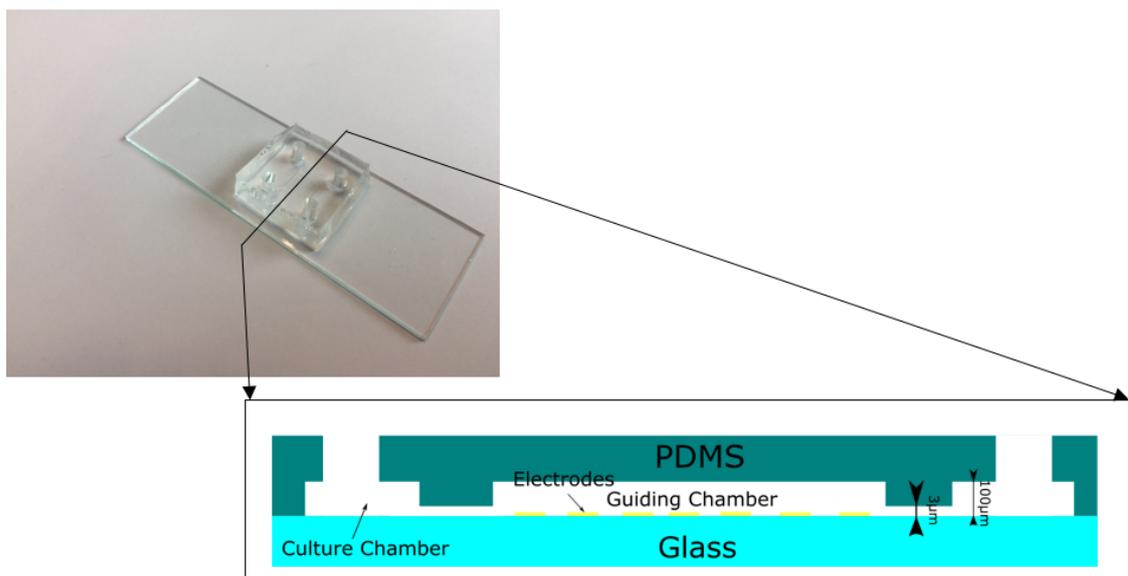
através de F_{DEP} . Isso significa que parâmetros que satisfaçam a condição $F_{DEP} > F_{EHD}$ terão preferência nos experimentos com as culturas celulares, ou seja, é desejável que os parâmetros de frequência e amplitude mantenham sempre a razão entre F_{EHD} e F_{DEP} abaixo de 1 (ver Figura 17).

3 Caracterização elétrica dos chips

3.1 Projeto dos chips e dos eletrodos

Necessita-se de chips microfluídicos capazes de suportar a inserção das células e estimulação axonal. Como visto anteriormente, um conjunto de eletrodos com formato de barras paralelas possui o potencial de fornecer os resultados de orientação necessários para o projeto. A Figura 18 exemplifica o formato escolhido para o chip. Ele é constituído por conjunto de eletrodos depositados sobre a superfície superior de uma lâmina de vidro coberta por um bloco fabricado de PDMS. As células são semeadas na abertura de $100\ \mu\text{m}$ de profundidade. O canal de $3\ \mu\text{m}$ de profundidade foi projetado para possibilitar apenas a passagem dos axônios para a câmara contendo os eletrodos. Dessa forma, o cone de crescimento deve cruzar toda a extensão do canal para formar sinapses com os dendritos das células presentes no canal situado na posição oposta. O processo de fabricação do PDMS foi anteriormente descrito no Capítulo 2.2.1.

Figura 18 – *Seção transversal do projeto de um chip microfluídico utilizado no projeto. Duas câmaras de cultura (extremidades) são utilizadas para inserção das células com o intuito de formar após estímulo na câmara central (Guiding chamber). Pode-se também verificar a presença do conjunto de eletrodos, responsáveis pela aplicação do campo elétrico alternado, na câmara central.*

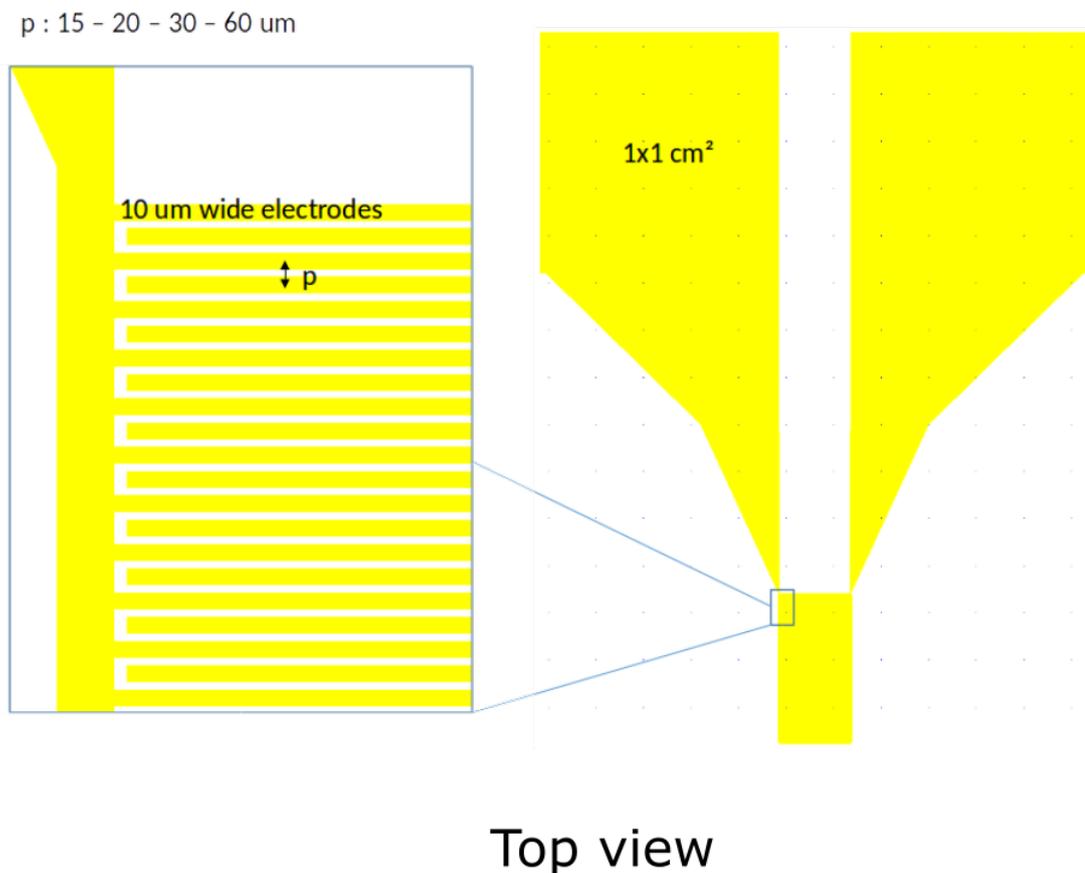


Grandes valores de módulo de campo elétrico são necessários para mover partículas micrométricas por dielectroforese (WU, 2008). Esses campos devem possuir intensidades

na ordem de $10^4 Vm^{-1}$ para serem capazes de mover uma célula com diâmetro na ordem de $10 \mu m$ (dimensões comparáveis a um axônio e ao cone de crescimento). Eletrodos fabricados com escala micrométrica são adequados a esse propósito. Dois eletrodos paralelos alimentados por 4 V e separados por uma distância de $20 \mu m$ podem fornecer um campo elétrico com intensidade de $2 * 10^8 Vm^{-1}$, o que está de acordo com as necessidades do projeto sem a necessidade de um gerador de sinais capaz de fornecer grandes amplitudes.

Para facilitar visualização microscópica, os eletrodos foram fabricados sobre amostras de vidro usando óxido de estanho de índio (indium tin oxide, ITO). Esse material é condutivo e transparente, possibilitando a utilização de técnicas de microscopia. A condutividade da amostra aumenta com a largura da camada depositada, que também reduz a sua transparência. O formato dos eletrodos interdigitados é mostrado na Figura 19. Aqui, valores diferentes de distância entre os eletrodos serão explorados. Cada barra possui $10 \mu m$ de largura e o formato de $1 x 1 cm$ é utilizado para garantir o contato elétrico entre o gerador de estímulos e o conjunto de eletrodos. A barra interdigitada pode ser produzida utilizando técnicas clássicas de litografia, que serão descritas em breve.

Figura 19 – *Esboço dos eletrodos. Cada barra possui $10 \mu m$ de largura. Diversos espaçamentos (p : 15, 20, 30, $60 \mu m$) entre os eletrodos foram considerados. A área de $1 x 1 cm^2$ é responsável pelo contato elétrico com os gerador de estímulos.*

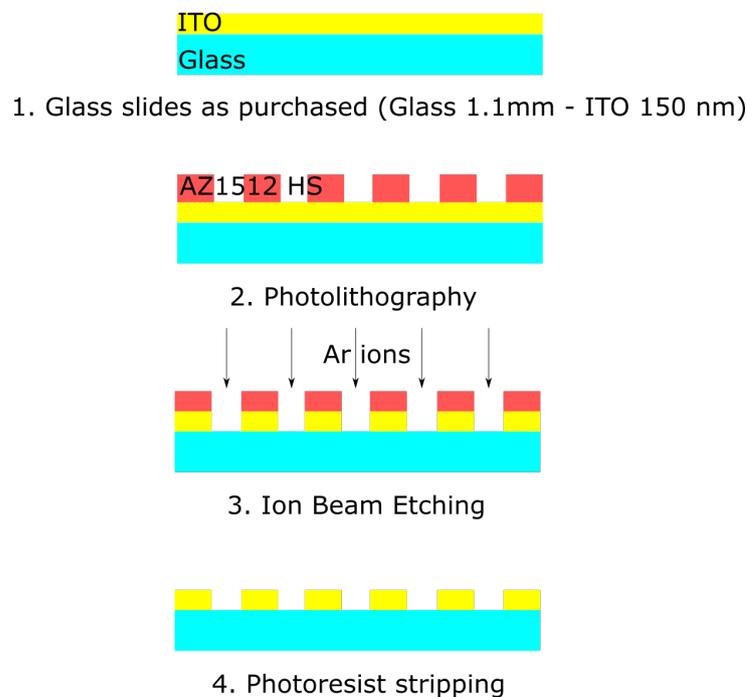


3.1.1 Fabricação dos eletrodos

Foram adquiridas lâminas cobertas por uma camada de 150 nm de ITO para a fabricação dos eletrodos. O processo de litografia pode ser observado na Figura 20. Primeiramente, o ITO é coberto por uma camada de fotoresiste positivo (AZ 1512HS). Uma máscara contendo o negativo do formato do conjunto de eletrodos é posicionada sobre o sistema. A amostra coberta é exposta a luzes ultravioleta que induzem mudanças na estrutura da camada de resina. Fotoresiste positivos são solúveis após exposição luminosa, o que os torna facilmente removíveis. Após a lavagem, apenas a parte não exposta do fotoresiste permanece fixa à superfície protegendo a camada de ITO. Existem diferentes métodos de gravação para remoção do ITO indesejável. Nesse caso, o método físico de gravura de argônio é utilizado. É importante ressaltar que para projetos de corrosão puramente físicos, todos os materiais são desgastados na mesma velocidade. Isso torna crucial a deposição de uma camada de resina mais fina que a camada de ITO para evitar danos aos eletrodos.

Figura 20 – Processo de fabricação do conjunto de eletrodos utilizando fotolitografia. Lâminas de vidro com uma camada de 150 nm de ITO na superfície são submetidas a um processo de gravura utilizando feixes de argônio.

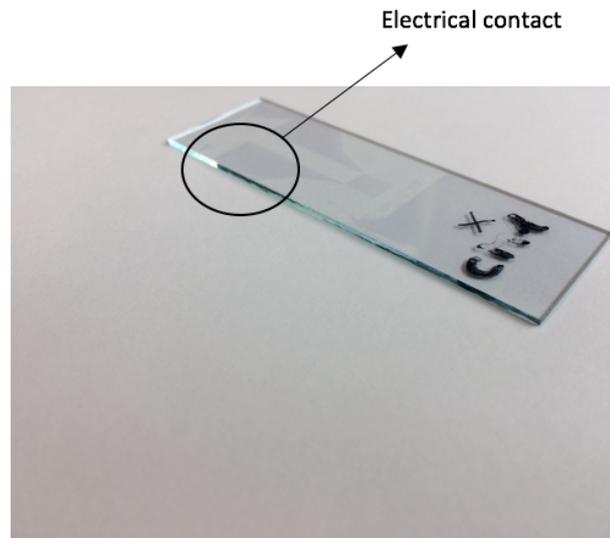
Fabrication of electrodes array (cross-section)



A Figura 21 mostra o resultado final do processo de fabricação. Devido à diferença entre os índices de refração, pode-se observar uma pequena diferença de coloração entre

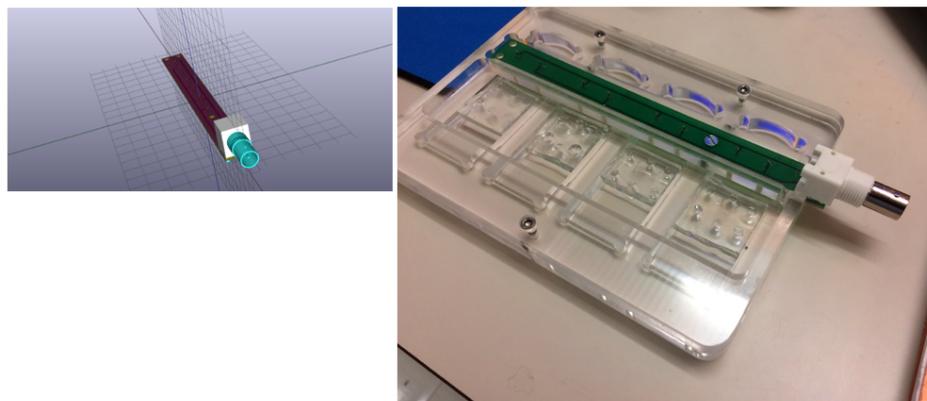
a área gravada e a área coberta com ITO. O contato elétrico com o gerador de sinais é realizado pela faixa mais larga destacada pelo círculo na imagem.

Figura 21 – *Lâmina de vidro com eletrodos de ITO fabricados através de processos de litografia.*



Além disso, a realização de experimentos com mais de uma amostra simultânea é encorajada para obtenção de mais dados estatísticos. Dessa forma, um suporte capaz de conectar e estimular 4 amostras simultaneamente com sinal de mesma frequência, amplitude e fase foi construído (Figura 22). O contato elétrico é feito através de eletrodos de ouro retráteis presentes na superfície inferior da placa. O sinal é transmitido através de um conector do tipo BNC presente na extremidade do conjunto. O projeto da placa de circuito impresso foi realizado utilizando a ferramenta de projetos KICAD.

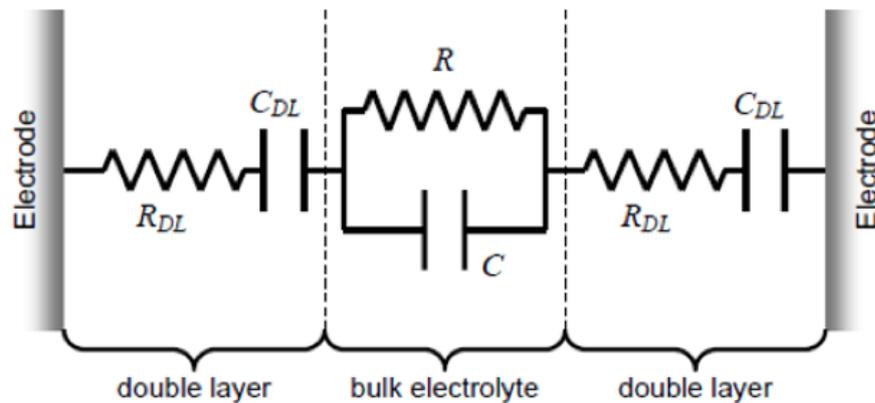
Figura 22 – *Placa de circuito elétrico de contato (esquerda) e suporte para as amostras (direita).*



3.2 Condutividade do meio de cultura: simulação numérica

Existe uma preocupação em relação à condutividade do meio de cultura no momento em que esse é submetido a sinais de diferentes frequências e amplitudes. A presença de íons dentro da amostra pode causar um grande impacto na condutividade do meio e causar queda de tensão durante a estimulação. Dois eletrodos separados espacialmente por um meio iônico podem ser modelado como mostra a Figura 23. Usando esse modelo, pode-se observar como o meio influencia no consumo de energia da amostra. Nota-se que o circuito possui caráter capacitivo devido ao aparecimento de íons depositados entre os eletrodos e o meio. A frequência de estimulação também possui influência na impedância total do circuito, devido ao seu caráter capacitivo ($X_c = \frac{1}{2\pi fC}$). Isso pode causar um grande impacto na queda de tensão nos eletrodos dependendo da impedância de saída do gerador de funções. Para confirmar os valores de impedância, simulações numéricas foram realizadas, em conjunto com a caracterização elétrica dos eletrodos micro-fabricados.

Figura 23 – Modelo elétrico de dois eletrodos separados com meio de cultura iônico preenchendo a lacuna.



Fonte – (MORGAN; GREEN, 2003)

A simulação numérica a seguir foi fornecida por (FIKAR, 2016), PhD pela Universidade Paris Est, que gentilmente ofereceu seu auxílio no projeto. Os resultados finais são mostrados nas próximas imagens e no anexo C.

Foi simulado o modelo numérico de um par de eletrodos separados por 1 mm de distância, sob a aplicação de 1 V de tensão contínua. O objetivo é investigar o efeito da condutividade do meio no consumo de corrente do sistema. No anexo C, pode-se observar a mesma simulação estendida ao caso de múltiplos pares de eletrodos.

Tais dados serão posteriormente comparados aos resultados da caracterização elétrica das amostras. Os resultados das caracterizações irão também permitir a prevenção de curtos-circuitos ou outros defeitos causados pelos processos de fabricação. Também, mencionado

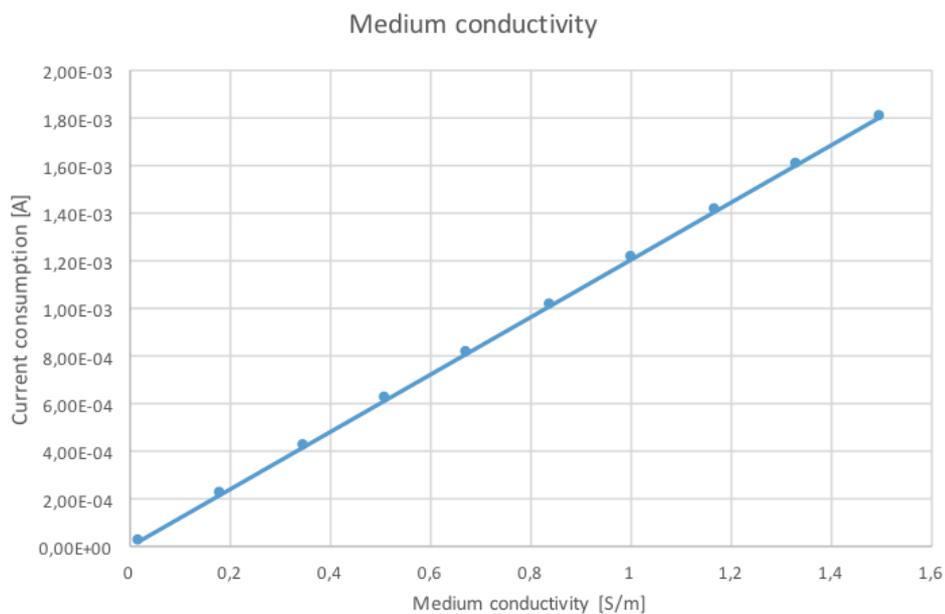
anteriormente, é necessário estimar a impedância do circuito para ser capaz de fazer o casamento de impedâncias com o circuito de saída do gerador de estímulos. Um bom casamento evita reflexão de sinais e ruídos indesejados no sistema.

Na Figura 24 pode ser observada a relação linear entre a condutividade do meio e o consumo de energia do sistema. Foi observado também que a largura dos eletrodos e a largura do espaço entre eles possuem efeitos que são insignificantes na impedância geral do sistema (anexo C). A condutividade do meio de cultura de células do hipocampo para sinais oscilantes foi medida no estudo publicado por (HONEGGER et al., 2013). Valores de $0.98 \pm 0.08 Sm^{-1}$.

3.2.1 Medida de impedância do arranjo de eletrodos

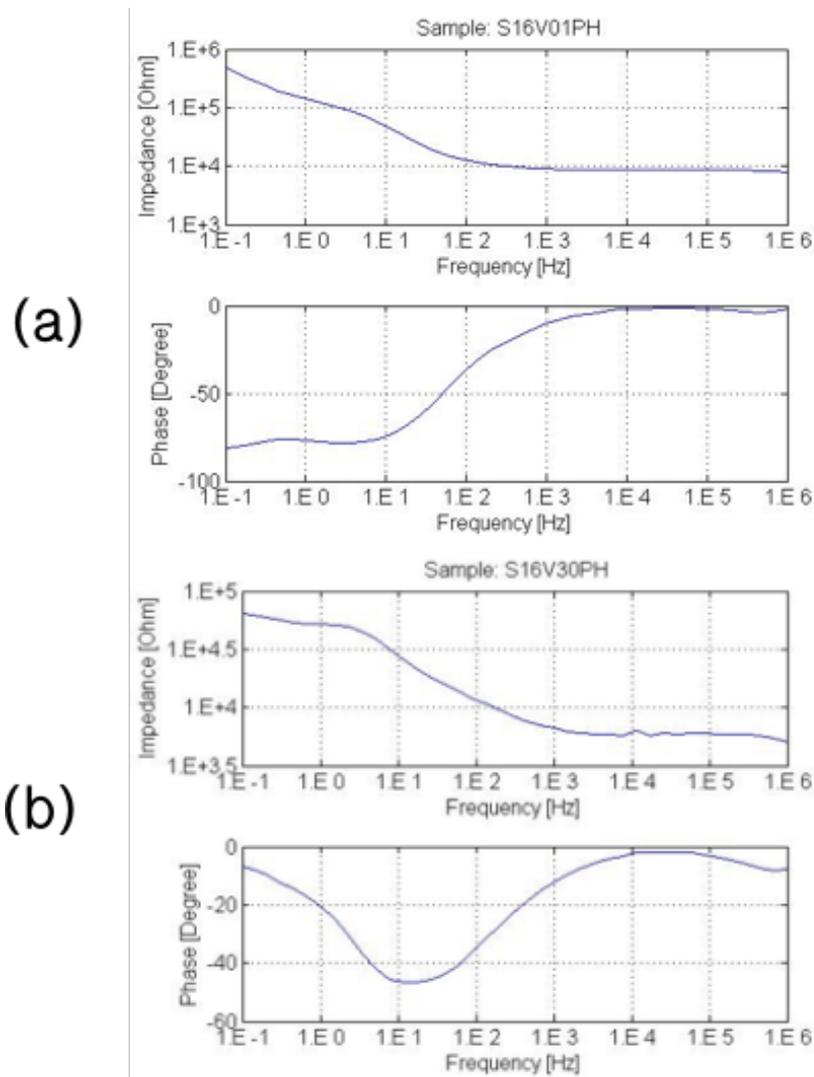
Precisa-se ter certeza que os eletrodos são capazes de entregar a quantidade correta de energia para o meio de cultura celular. Como detalhado anteriormente, a amostra pode ser modelada por um circuito RC capaz de ter sua condutividade alterada conforme as frequências de estimulação. DEP é um fenômeno dependente da frequência, a verificação do quanto esse parâmetro pode influenciar os experimentos é de crucial importância para a continuidade do projeto. Além disso, a presença de íons no meio de cultura celular pode modificar a condutividade levando a um aumento no consumo de corrente (Figura 24), o que pode ajudar a criar desbalanceamento entre as impedâncias do gerador de sinais e das amostras. Isso faz com que seja necessário fazer a caracterização elétrica das lâminas de forma que seja assegurada a entrega do nível de tensão desejado ao sistema.

Figura 24 – *Efeito da condutividade do meio no consumo de energia.*



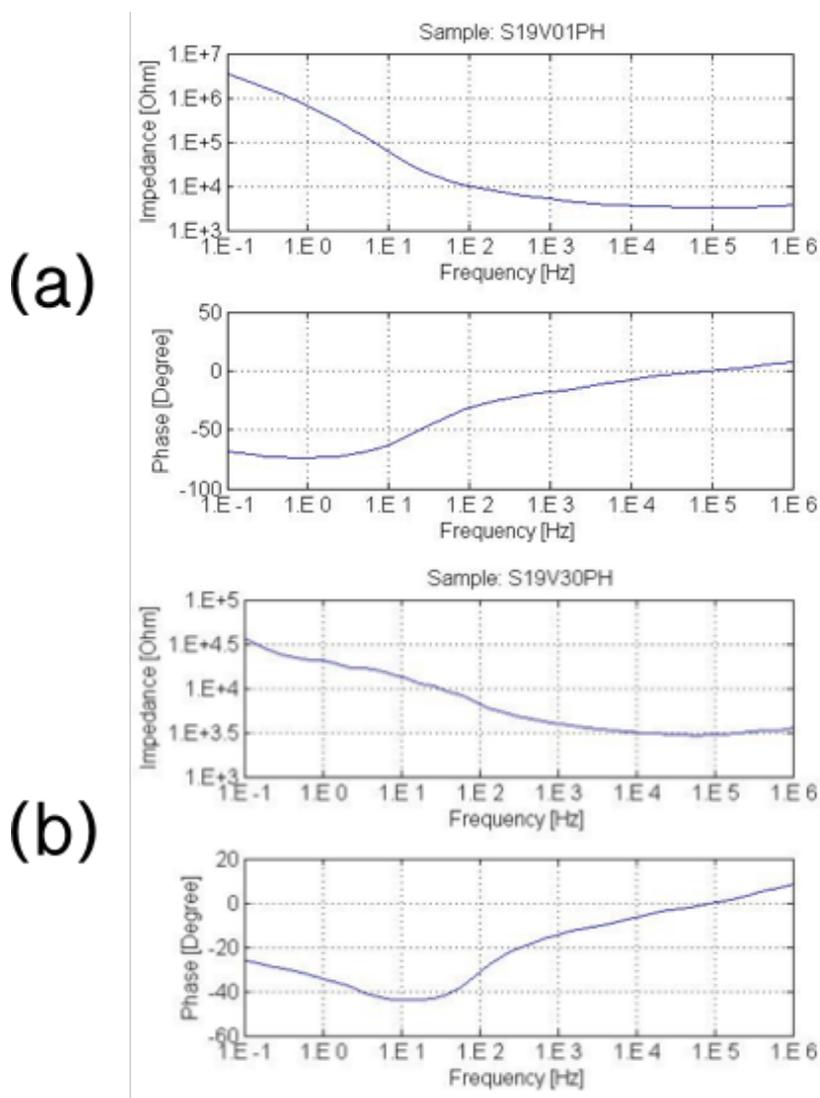
Para que isso seja possível, os chips foram submetidos à sinais de tensão e frequência variável ($[10^{-1} - 10^6]$ Hz e $[0,1 \text{ e } 3]$ V) usando uma estação de testes capaz de entregar valores de frequência com magnitude na ordem de 12,5 e medir valores de impedância com magnitude na ordem de 18 (Novocontrol Alpha A). Eletrodos cobertos por canais microfluídicos em PDMS foram conectados à máquina usando um fixador de 4 posições (Figura 22). Os chips foram preenchidos com meio de cultura celular. Foram realizadas medições de capacitância, impedância e deslocamento de fase. Uma parte dos resultados obtidos são mostrados nas imagens abaixo (Figuras 25, 26 e 27).

Figura 25 – Magnitude da impedância elétrica (Z), diagrama de fase (Phase) de uma amostra contendo água. O gráfico de impedância está exibido utilizando escala logarítmica. As especificações dos eletrodos são: espaçamento = $30 \mu\text{m}$ e comprimento = $500 \mu\text{m}$. (a) $V_{rms} = 0,1 \text{ V}$ (b) $V_{rms} = 3 \text{ V}$.



Os resultados obtidos mostram um decréscimo na impedância das amostras preenchidas com meio de cultura celular quando comparadas com àquelas preenchidas com

Figura 26 – Impedância elétrica (Z), diagrama de fase ($Phase$) de uma amostra contendo meio de cultura celular. O gráfico de impedância está exibido utilizando escala logarítmica. As especificações dos eletrodos são: espaçamento = $30\ \mu\text{m}$ e comprimento = $500\ \mu\text{m}$. (a) $V_{rms} = 0,1\ \text{V}$ (b) $V_{rms} = 3\ \text{V}$.



água. O comportamento das impedâncias observado se assemelha ao previsto através das simulações, pois um meio com abundância de partículas polares ou polarizáveis aumenta a condutividade e, conseqüentemente, o consumo de energia. Além disso, pode-se observar uma grande variação de impedância para faixas menores de frequência, conforme modelado. Tão grande é a frequência, menos capacitivo é o sistema e maior é a sua condutividade (i.e., maior é o fator de potência do meio). Tal caráter é possível ser observado nos gráficos de frequência mostrado nas figuras 25 e 26, em que pode ser observada defasagens de -90° para baixas frequências, característica de capacitores. A Tabela 27 mostra as variações das medidas impedância de acordo com as mudanças geométricas do arranjo de eletrodos. Apesar dos desvios causados pelas imprecisões dos experimentos (observada nas duas

Figura 27 – Medida de impedância de amostras com diferentes geometrias de eletrodos.

Chip	Voltage	Medium	Pitch (m)	Length (m)	Impedance @1.0000e-01 Hz	Impedance @1.9753e+05 Hz
A2	3	Cell culture	6.00E-05	5.00E-04	1.05E+05	1.03E+03
95	3	Cell culture	3.00E-05	5.00E-04	3.73E+04	3.10E+03
92	3	Cell culture	6.00E-05	1.00E-03	6.44E+04	8.64E+03
97	3	Cell culture	2.00E-05	1.00E-03	6.09E+05	3.21E+03
96	3	Cell culture	2.50E-05	3.00E-04	1.29E+05	1.64E+03
93	3	Cell culture	3.00E-05	3.00E-04	5.01E+06	6.96E+05
A1	0.1	Cell culture	2.50E-05	5.00E-04	1.89E+07	9.75E+02
95	0.1	Cell culture	3.00E-05	5.00E-04	3.59E+06	3.31E+03
92	0.1	Cell culture	6.00E-05	1.00E-03	3.07E+07	9.71E+03
97	0.1	Cell culture	2.00E-05	1.00E-03	2.72E+08	2.25E+05
96	0.1	Cell culture	2.50E-05	3.00E-04	9.24E+06	1.67E+03
93	0.1	Cell culture	3.00E-05	3.00E-04	3.37E+07	6.13E+05

primeiras linhas da tabela), os resultados mostraram um comportamento linear entre a impedância e distância entre os eletrodos (quanto maior o espaçamento entre os eletrodos, maior a impedância). Pode-se também observar uma relação inversa entre o tamanho dos eletrodos e a sua impedância (quando menor é o eletrodo, maior é a impedância).

A Figura 26 mostra uma impedância próxima a um valor de $4\text{ k}\Omega$ após atingir a estabilidade em frequências muito maiores que a frequência de corte (aproximadamente 100 Hz). O chip tem comprimento de $500\text{ }\mu\text{m}$, significando uma condutância de 0.5 S/m . Sob uma tensão de pico de 3 V, a mostra mostrou $7.5e-04\text{ A}$ de consumo de corrente. Esse ponto (0.5 S/m , $7.5e-04$) é muito próximo dos valores simulados na Figura 24. Esse valor de condutividade possui mesma ordem de grandeza que os valores previamente medidos em (HONEGGER et al., 2013). Os intervalos de frequências utilizados no teste em ambos os experimentos diferem, o que provavelmente explica a razão de se obter duas medidas distintas.

3.3 Implicações para o projeto do gerador de sinais

O sistema de chips apresentou ser funcional. Pode-se confirmar a influência do meio utilizado no preenchimento dos dispositivos na condutividade do sistema. Meio de cultura iônico possui menor impedância se comparado à água e, também, foi observado o caráter capacitivo dos chips. Foi, brevemente, possível observar a influência da geometria dos eletrodos (largura, distância e comprimento) na impedância total do sistema.

Havia a preocupação de ter dispositivos com baixa impedância devido ao meio de cultura celular iônico. Eles apresentaram impedância na ordem de $10^3\Omega$ para frequências que são interessantes para o presente estudo, o que é um ótimo resultado dada a baixa impedância de geradores de função comerciais. Essas medidas também foram importantes para estimar um circuito de casamento de impedâncias adequado ao gerador de estímulos

ou qualquer outro sinal de entrada aplicado às amostras. Para aplicações em que a entrega de potência é importante, o casamento é otimizado quando a saída do gerador possui mesma impedância conjugada que a impedância de resposta dos chips. Esse estudo não possui pretensões de fornecer potência, mas sim amplitude de sinal para os eletrodos. Isso significa que o gerador de sinais deve possuir uma impedância bem pequena se comparada a impedância dos dispositivos de forma a evitar grandes quedas de tensão.

4 Gerador de funções de corrente alternada

Forças eletrocinéticas em geral, como as Forças DEP (F_{DEP}), são dependentes da frequência e da amplitude do sinal de estímulo. Um gerador de sinais comercial pode facilmente fornecer tais sinais. Entretanto, tais equipamentos em sua maioria não são portáteis, o que torna sua utilização muitas vezes incômoda devido ao transporte do equipamento entre laboratórios e também devido a organização geral dos experimentos. Durante os experimentos, os neurônios precisam sobreviver sob condições específicas de temperatura, concentração de CO_2 e umidade, o que torna indispensável o uso de uma incubadora para preservar as amostras. Isso faz com que um gerador de sinais portátil seja interessante para os propósitos da pesquisa.

O projeto foi realizado seguindo os seguintes critérios de desenvolvimento:

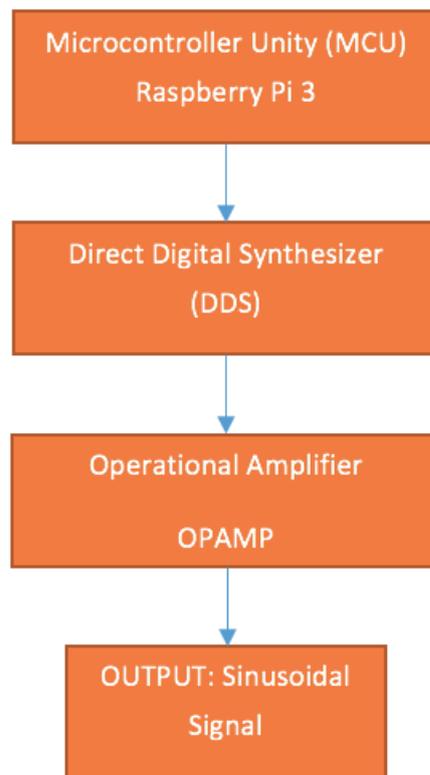
- Necessidade de miniaturização
- Entrega de frequências de até 1 MHz
- Facilidade de programação

Sintetizador digital direto (DDS) é um circuito capaz de gerar tensões de corrente alternada estáveis. Esse dispositivo pode entregar formas de onda de diversos formatos (sinusoidal, triangular ou quadrática). Um DDS pode ser facilmente programado e pode fornecer sinais com as frequências necessárias para esse projeto. Além disso, ele é um circuito versátil capaz de controlar parâmetros como amplitude e fase do sinal de saída, o que pode ser útil para diversas aplicações. Uma vez que tal componente pode ser encapsulado em pequenos circuitos integrados, o protótipo da placa de circuito impresso pode possuir pequenas dimensões.

O diagrama completo do projeto é mostrado na Figura 28:

Nesse projeto, a unidade micro-controlada (MCU) é responsável por enviar os parâmetros desejados para o DDS através de comunicação serial. O DDS recebe a sequência binária e traduz a informação em um sinal com amplitude, fase e frequência controlada. Usando um amplificador operacional, o sinal existente na saída do DDS é amplificado e enviado aos chips. A interface entre as amostras e o gerador de sinais é feita através de um conector BNC e o suporte anteriormente mencionado (Figura 22). As próximas seções explicarão em detalhes cada bloco do circuito.

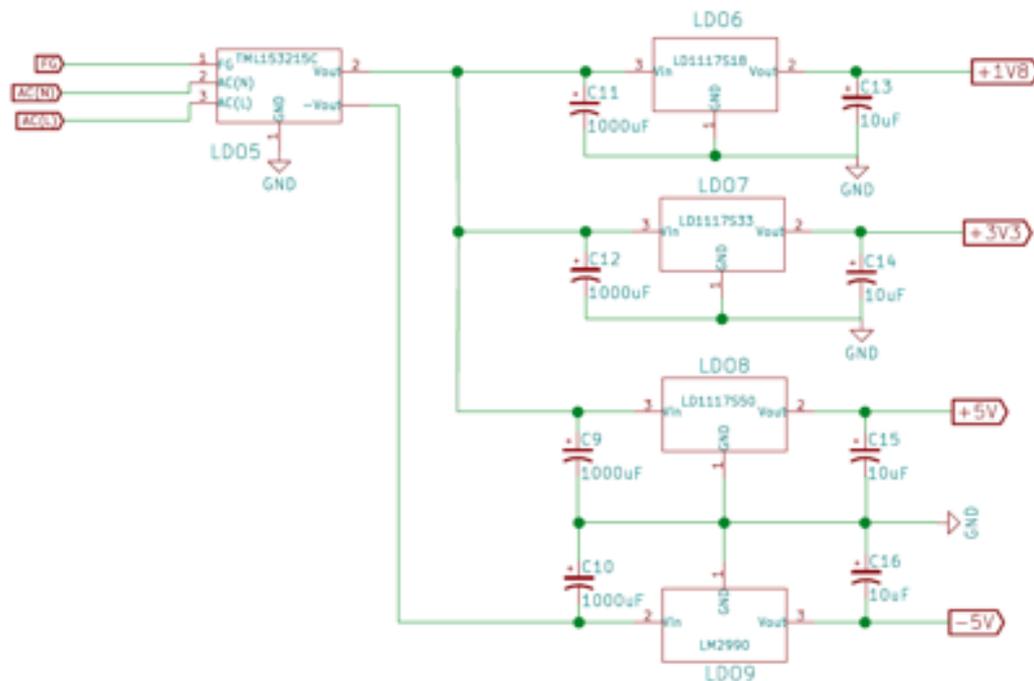
Figura 28 – Diagrama de blocos do circuito.



4.1 Fonte de alimentação

O circuito como um todo necessita de diversos níveis de tensão contínua para alimentar cada bloco. O circuito de DDS funciona com tensões de 1,8 V e 3,3 V. O bloco amplificador necessita de alimentação simétrica de -5 V e +5 V, bem como o detector de potência RMS e o conversor digital analógico que funcionam com +5 V. Para que isso fosse possível, a solução encontrada foi usar um módulo conversor de corrente alternada para corrente contínua ($\pm 15V$). A tensão é então regulada através do uso de reguladores de tensão (Figura 29). Os valores de capacitância de $1000 \mu F$ e de $100 \mu F$ foram escolhidos para diminuir as oscilações de tensão o máximo possível. A comunicação entre os circuitos pode ser feita seja usando um conector USB micro ou através de um soquete de 6 pinos.

Figura 29 – Diagrama de blocos do circuito. A tensão de corrente contínua de 15 V na saída do conversor LDO5 é rebaixado para 1.8 V, 3.3 V, -5 V e +5 V.



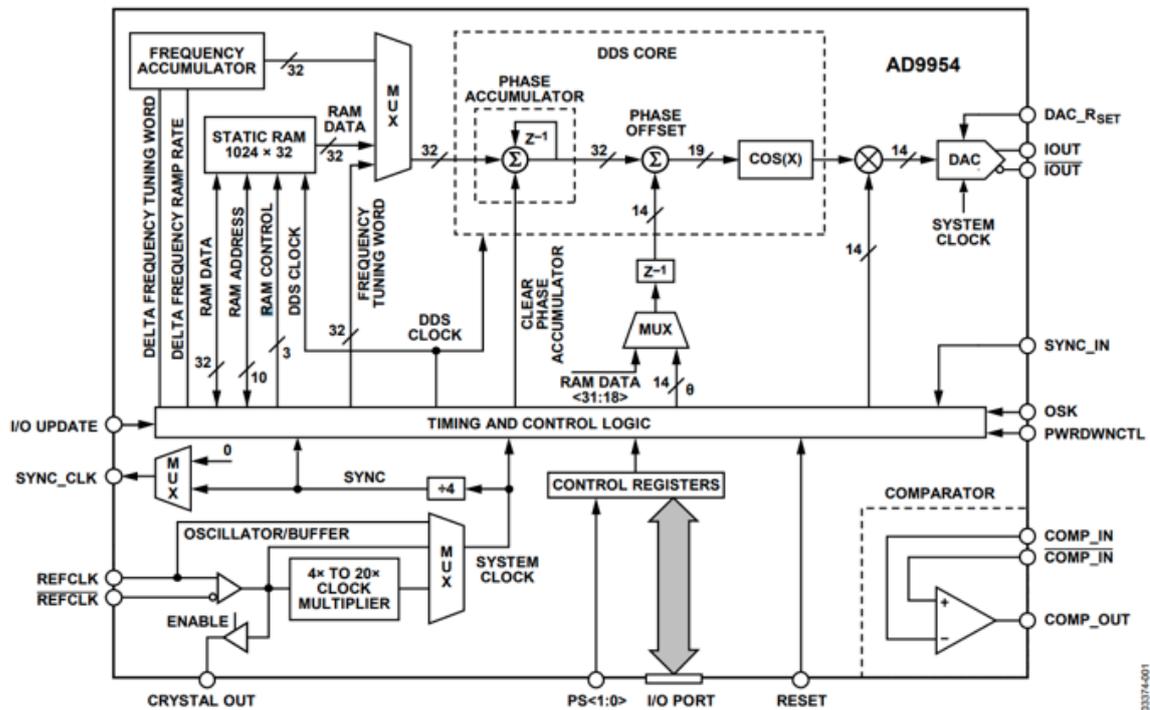
4.2 Sintetizador digital direto (DDS)

O modelo escolhido para o DDS (AD9954) apresenta as seguintes especificações:

- Clock interno de 4000 MSPS (Mega amostras por segundo).
- Conversor Digital/Analógico programável de 14 bits para fase e amplitude.
- Precisão de 32 bits para a frequência
- Controle serial de entrada e saída (I/O)
- Memória RAM integrada de 1024 palavras de 32 bit
- Multiplicador REFCLK
- Precisão de 32 bits para a frequência
- Oscilador interno
- Modulação de fase
- Sincronia de múltiplos chips

O circuito do DDS funciona usando o princípio da acumulação de fase. Na Figura 30 é esboçado o diagrama de blocos do AD9954.

Figura 30 – Diagrama de bloco funcional do AD9954.

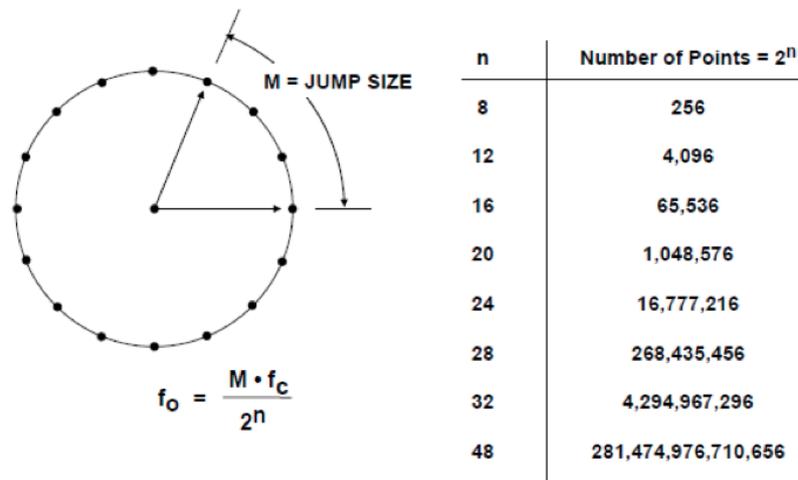


Fonte – (DEVICES, a)

O DDS possui um registrador interno de 2^{32} para o acumulado de fases. Cada endereço presente no registrador é associado a um ponto de fase entre 0° e 360° . O que representa uma discretização em 2^{32} pontos sendo cada pulso de clock responsável pela troca no registrador de contagem. A frequência de saída é ajustada pelo registrador Frequency Tuning Word (FTW), que é alterado através de dados enviados via comunicação serial usando uma placa de desenvolvimento Raspberry Pi 3. Essa palavra binária estabelece o limite do registrador para um ciclo completo (saída de frequência é uma fração da frequência de clock). Na Figura 31, FTW é representada como o salto M, que é traduzido como o tamanho do salto no "círculo de fase"(ou seja, são obtidos maiores valores de frequência quando M é incrementado).

Na Figura 31, cada ponto no círculo representa uma troca de fase do registrador acumulador de fase. O fator M controla o número de pulsos de clock necessários para finalizar cada ciclo. Cada posição de fase é associada a um valor de amplitude (que pode ser alterada utilizando um registrador interno do AD9954) que é então convertido para um

Figura 31 – *Círculo de fases digital*. A variável M representa o tamanho do salto dado a cada pulso de clock incrementado. O número de pontos representa a quantidade de valores possíveis de frequência.



Fonte – (DEVICES, b)

valor analógico utilizando um conversor digital para analógico (DAC) presente no circuito interno do AD9954 (ver diagrama de blocos na Figura 32).

A frequência de saída do AD9954 é definida pelas relações abaixo:

$$f_o = \frac{FTW * f_s}{2^{32}}, 0 \leq FTW < 2^{31} \quad (4.1)$$

$$f_o = f_s * \left(1 - \frac{FTW * f_s}{2^{32}}\right), 2^{31} \leq FTW < 2^{32} - 1 \quad (4.2)$$

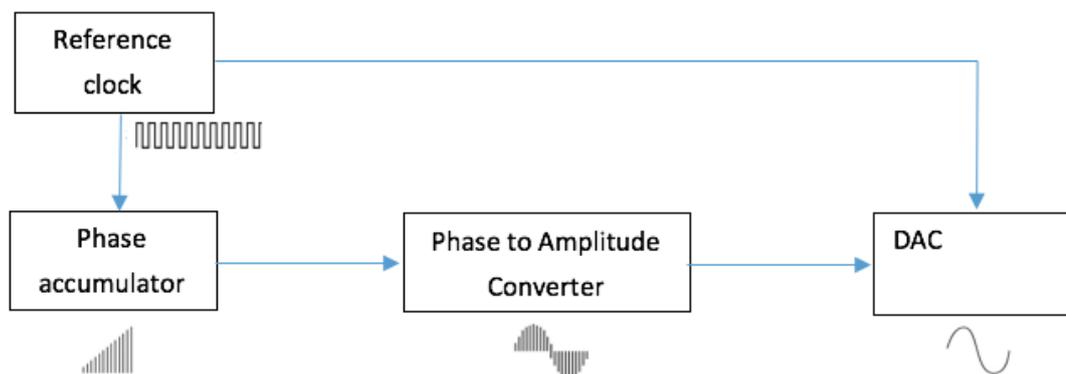
Sendo

- f_s a frequência de clock do sistema (quatro vezes maior que o frequência do cristal de quartzo)
- f_o a frequência de saída
- FTW o valor equivalente a variável M anteriormente mencionada

4.2.1 Algoritmo de comunicação com o DDS

Como foi previamente mencionado, a comunicação com os registradores internos do DDS foi realizada utilizando pinos seriais presentes no circuito. A placa de desenvolvimento Raspberry Pi oferece pinos de uso geral (GPIO) que podem facilmente comunicar com

Figura 32 – Princípio da síntese do sinal sinusoidal utilizando o princípio de acumulação de fase. O acumulador de fase incrementa seu valor a cada pulso de clock. A cada valor de fase é atribuído um valor de amplitude de acordo com a função a ser gerada, que é então convertido em sinal analógico pelo DAC.



hardware externo utilizando frequências de até 4,5 MHz. Tal computador também possui a possibilidade de controlar seus periféricos utilizando linguagens de programação como C e Python. A informação desejada é enviada para o DDS utilizando um algoritmo denominado "Bit Banging" (envio bit a bit). Esse algoritmo funciona da seguinte forma: o DDS (AD9954) possui um tamanho mínimo de 8 bits para cada registrador interno do circuito. Isso significa que 1 byte é o tamanho mínimo de dados aceitável para que se conclua um ciclo de comunicação completo. Sendo assim, os valores binários presentes nos pinos de saída da Raspberry Pi devem ser enviados em pacotes de 1 byte (ver ciclo de envio de dados na Figura 34). O que pode ser alcançado utilizando o seguinte algoritmo baseado em python de máscara binária.

Sabendo que:

- Data corresponde ao conteúdo do byte a ser enviado
- SDIO é o pino de saída serial
- SCLK é o nome do pino de clock da comunicação serial

Como o DDS geralmente possui diversos registradores internos, o ciclo de instrução mais simples acontece em duas etapas (exemplificado na Figura 34): a primeira etapa acontece ao enviar a localização binária do registrador requisitado e a segunda ao se enviar a informação armazenada para os buffers internos. Observe que os buffers apenas salvam a informação após um pulso de nível alto no pino de clock serial.

Figura 33 – Algoritmo de envio de dados bit a bit. O bit menos significativo de cada byte é enviado para o pino SDIO após cada pulso de clock SCLK. Após cada ciclo o valor binário armazenado na variável data é deslocado um bit para a direita.

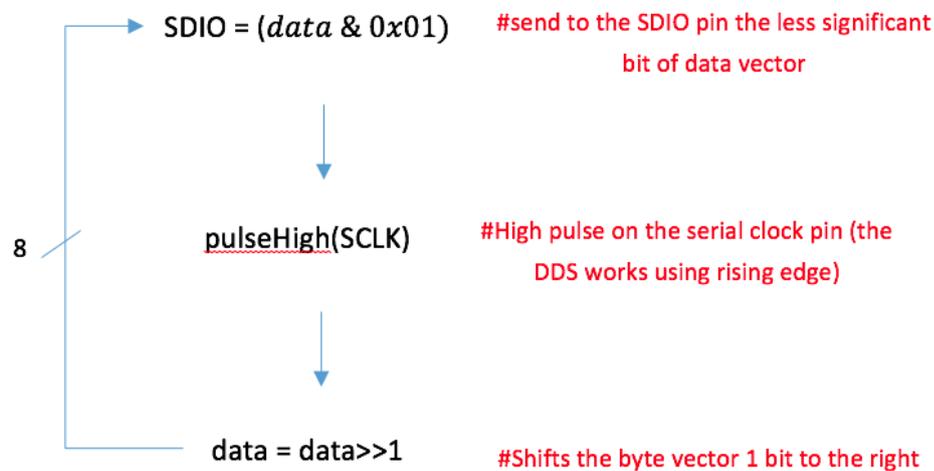
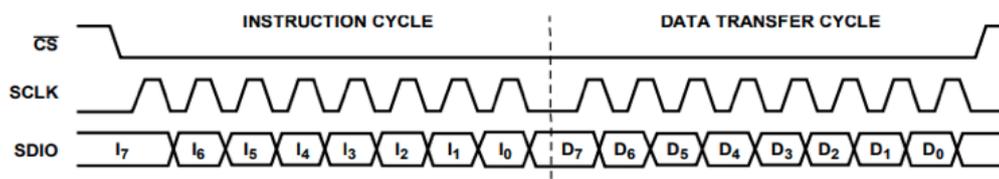


Figura 34 – Ciclo de instrução de comunicação serial do chip AD9954. O primeiro byte enviado corresponde ao endereço de memória do registrador a ser alterado. O segundo byte (data) corresponde ao valor binário que se deseja transferir.



Fonte – (DEVICES, a)

4.2.2 Circuito de saída de sinal do DDS

O DDS possui o modelo de circuito para a saída analógica do DAC interno observado na Figura 35.

Isso significa que a saída de sinal é dada pela diferença de potencial entre os pinos I_{out} e \bar{I}_{out} . Esse sinal é desbalanceado pois não está referenciado ao terra. Tal contratempo é corrigido utilizando um transformador com relação de transformação 1:1 (denominado balun). O balun possui sua saída de sinal referenciada ao terra, criando assim uma saída balanceada para o próximo bloco do circuito. Esse circuito é mostrado parcialmente na Figura 36, em que o pino 1 representa o ponde de saída de sinal balanceado.

Figura 35 – Circuito de saída de sinal analógico.

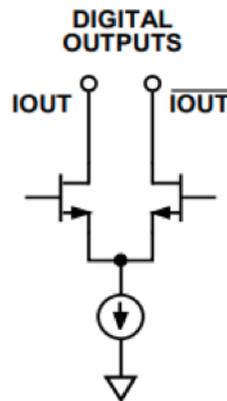
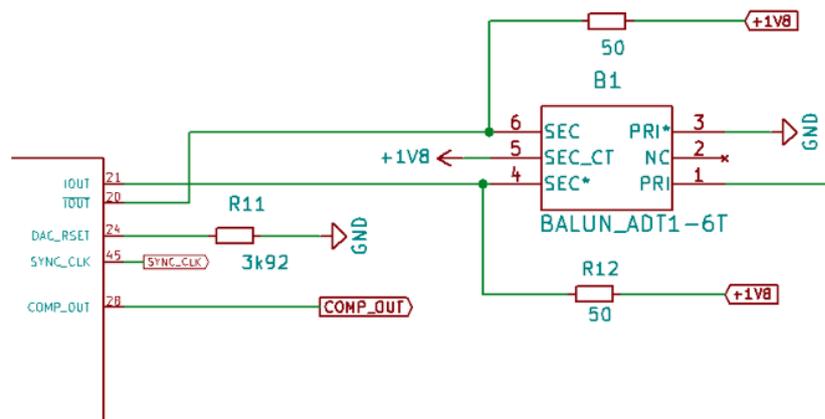


Figura 36 – Circuito de saída de sinal analógico com referencia ao terra



A corrente de saída é fixada utilizando a seguinte definição:

$$R_{\text{set}} = \frac{39.19}{I_{\text{out}}} \quad (4.3)$$

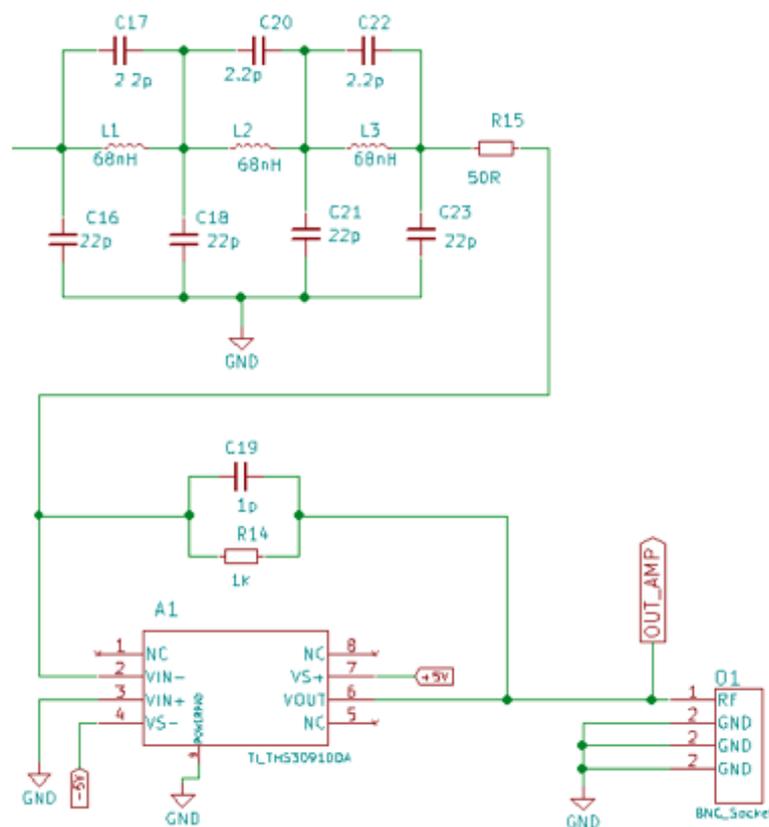
Com o objetivo de evitar distorções causadas pelo DAC, a corrente é fixada para aproximadamente 10 mA utilizando um resistor R_{set} de 3.92 k Ω conforme é descrito em (DEVICES, a). Na Figura 36, R_{set} é denominado R11. Tal escolha permite que a saída de sinal possua uma excursão entre 1,8 - 0,5 V e 1,8 + 0,5 V.

4.3 Amplificador Operacional

O sinal é amplificado aproximadamente 20 vezes por um amplificador operacional (THD3091) operando como filtro inversor (ver Figura 37). Como mostrado anteriormente,

os parâmetros responsáveis pelo controle de F_{dep} são a variação do campo elétrico e a frequência de saída. Isso significa que para essa aplicação busca-se entregar tensão para os eletrodos e não potência, ou seja, quanto menor for a resistência de saída do circuito melhor. A impedância de saída do amplificador operacional é de $0.06\text{ k}\Omega$ (DEVICES, a), o que é um valor diminuto se comparado ao menor valor de impedância medido para os arranjos de eletrodos [$10^3 - 10^4$] Ω em frequências na banda de [100 kHz - 2 MHz]. Como o circuito está conectado em série com um conector BNC de $50\ \Omega$, a impedância total de saída é de aproximadamente $50\ \Omega$. Isso causa uma perda máxima de 50000 ppm (partes por milhão) na saída do circuito devido a dissipação de potência.

Figura 37 – Bloco de amplificação do circuito.



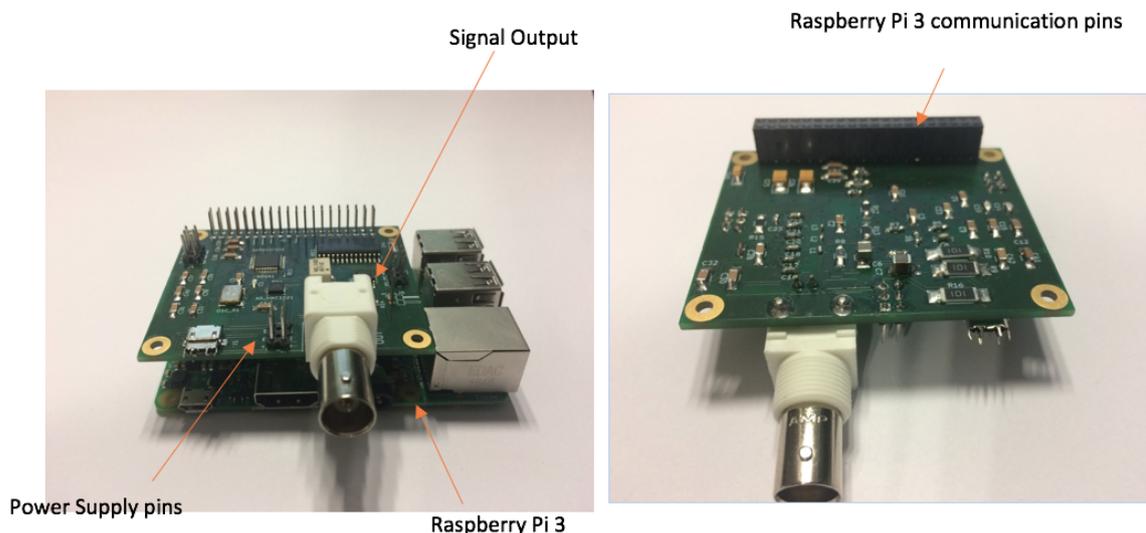
O circuito completo é mostrado no Anexo B.

4.4 Montagem e teste da placa de circuito impresso (PCB)

O projeto do circuito foi realizado utilizando uma plataforma virtual de projetos denominada KICAD (software livre). A impressão do layout da placa foi realizada fora das dependências do laboratório. A montagem dos componentes foi realizada de forma

manual utilizando diversos equipamentos como pistola de ar quente e ferro de solda. O resultado final é mostrado na Figura 38.

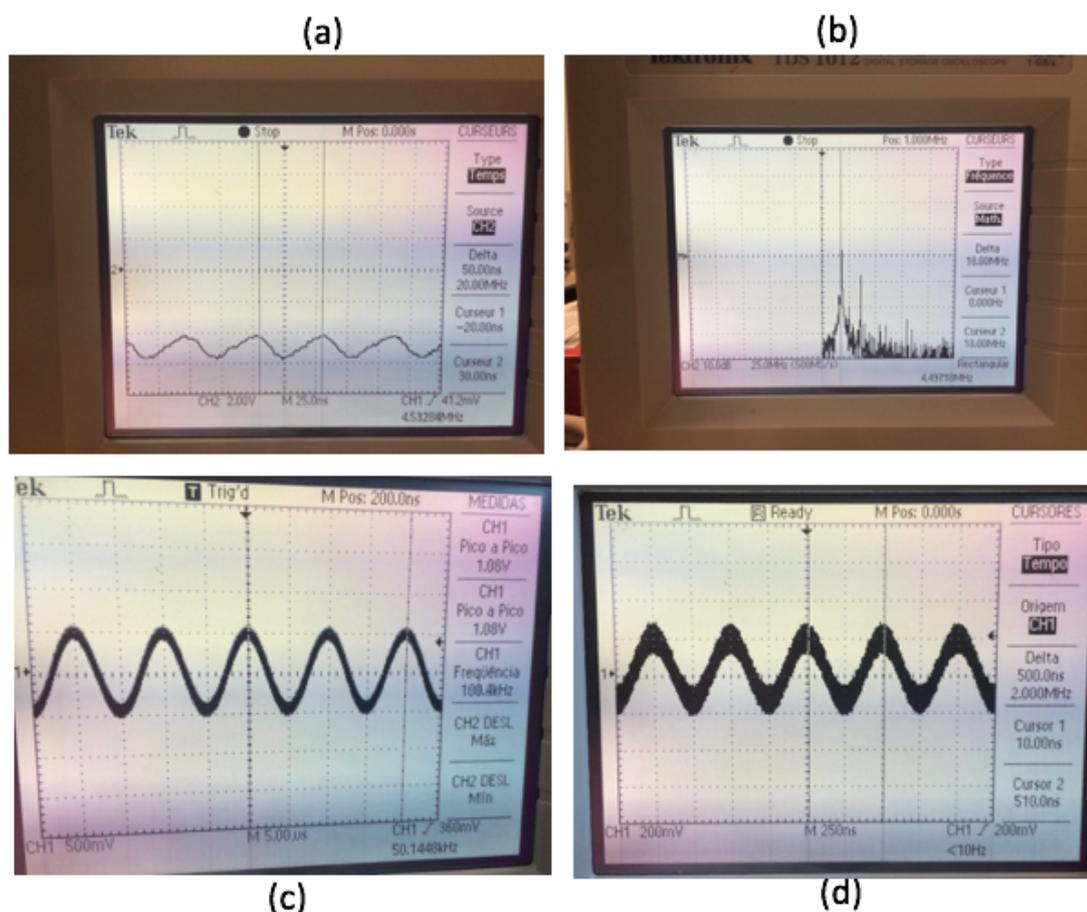
Figura 38 – Gerador de sinais.



Após sua montagem, a placa apresentou oscilação de 1 Vpp @18MHz na linha de -5 V do amplificador operacional (Figura 39 (a) e (b)). A falta de capacitores de desacoplamento em paralelo a linha de -5 V pode tornar o circuito suscetível a ruído de modo comum oriundo do plano de terra. Alguns filtros rejeita-faixa foram utilizados para amortecer esa frequência do espectro, porém uma grande parte da potência do sinal está presente em 18 MHz. A Figura 39 (b) mostra a transformada de Fourier da linha de -5 V. Como pode-se observar, as componentes de frequência próximas a 18 MHz possuem uma grande influência na potência entregue na alimentação do circuito e quanto mais essa frequência é atenuada, menos será o valor médio de saída do filtro. Uma possível abordagem para resolver esse problema seria a introdução de novos zeros na função de transferência do amplificador operacional. Isso poderia implicar em uma maior estabilidade no sinal, prevenindo sua oscilação.

O sinal na saída inversora do amplificador operacional pode atingir valores de frequência de até 2 MHz (Figura 39 (c) e (d)). Como pode ser observado na Figura 39 (c) e (d), a amplitude do sinal é amortecida quando a frequência aumenta de 100 kHz para 2 MHz devido à ação do filtro. Isso diminui a razão sinal ruído do sinal (SNR), causando impacto na qualidade do sinal. O bloco de amplificação também induz um considerável ganho na amplitude do ruído. Essa interferência mostra ser mais influente para pequenas frequências do sinal gerado pelo DDS. A próxima figura mostra que para um estímulo de 500 kHz e 10 Vpp existe uma maior influência do ruído quando comparado a um sinal

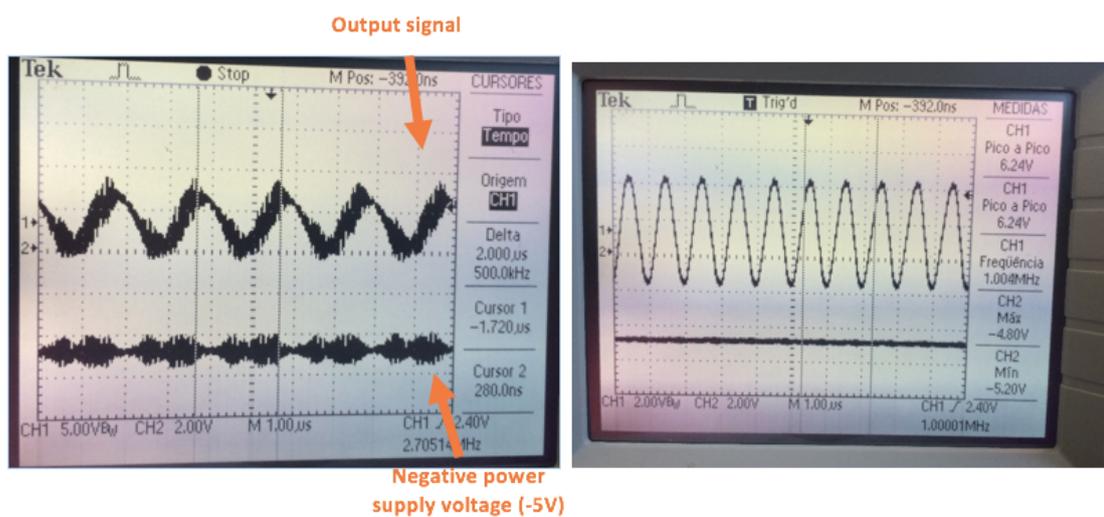
Figura 39 – (a) Oscilação na linha de -5 V da alimentação simétrica do circuito amplificador. (b) Deslocamento harmônico do sinal de -5 V para 18 MHz. (c) Sinal de entrada do amplificador operacional em 100 kHz - 1 Vpp. (d) Sinal de entrada do amplificador operacional em 2 MHz - 480 mVpp.



de 1 MHz e 6,24 Vpp de saída (aqui a tensão de saída é também amortecida devido ao aumento da frequência e, conseqüentemente, ação dos filtros passa baixa).

O projeto atende às prerrogativas relacionadas a portabilidade, frequência, impedância e amplitude de tensão. Pôde-se observar uma tensão máxima de excursão de 10 Vpp na frequência de 500 kHz, com distorção causada pelo ruído. Além disso, frequências de 2 MHz puderam ser alcançadas (causando conseqüente diminuição da razão sinal-ruído). Através do uso da Raspberry Pi foi possível realizar com facilidade a transferência das seqüências binárias necessárias para se alterar os registradores do DDS e, assim, se alterar parâmetros como frequência, fase e amplitude do sinal. A introdução de ruído à oscilação da linha de -5 V e também devido ao amplificador é um contratempo que necessita ser resolvido sem que haja interferência em outros parâmetros.

Figura 40 – Sinal de saída de 10 Vpp a uma frequência de 500 kHz (esquerda) e sinal de saída de 6,24 Vpp com frequência de 1 MHz (direita)



5 Experimentos Eletrocinéticos

Os seguintes experimentos foram realizados paralelamente ao projeto do circuito do gerador de funções. Assim sendo, foi utilizado um gerador de sinais Gw Instek SFG-1013 capaz de fornecer tensões sinusoidais com amplitude de 10 V_{pp} (para cargas de 50 Ω) e uma ampla banda de frequências gerada por um DDS interno que chega a 3 MHz. Dado os resultados da caracterização elétrica das plataformas microfluídicas, pode-se garantir a entrega adequada de tensão necessária para a realização de procedimentos. Dessa forma, foi possível realizar tais experimentos em paralelo ao projeto do gerador de sinais. O experimento a seguir possui o intuito de verificar a capacidade dos eletrodos em guiar partículas, bem como a influência da amplitude do sinal e sua frequência.

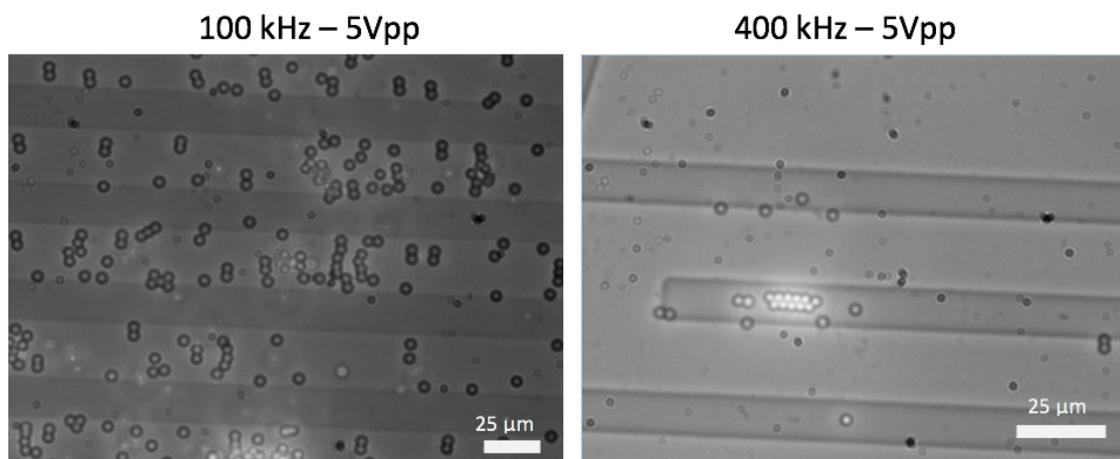
5.1 Microesferas

Microesferas neutras de latex foram inseridas nas plataformas para verificar o efeito de dielectroforese nas amostras. Cada esfera possui diâmetro com dimensões próximas a 10 μm. O experimento foi realizado com o objetivo de observar microscopicamente os efeitos de estímulos sinusoidais sob diferentes frequências e, dessa forma, confirmar os efeitos de DEP e EHD (hidrodinâmicos). As esferas foram diluídas em água em diversas concentrações para que se pudesse encontrar um ponto ótimo de visualização.

As próximas figuras (Figura 41 (a) e (b)) mostram comportamento oposto das esferas em frequências distintas de 100 kHz e 400 kHz com amplitude de 5 V_{pp}. Quando a frequência do sinal é 100 kHz as partículas mostraram deposição preferencial entre a superfície dos eletrodos. Um comportamento contrário foi observado com $f = 400$ kHz, em que houve convergência das esferas sobre a superfície dos mesmos. Os efeitos de ambas as forças (DEP e Eletrosmose) são difíceis de serem identificados nesse experimento. Existe a possibilidade da eletrosmose ser a força dominante em 100 kHz uma vez que nos casos onde DEP é dominante a força de maior amplitude se encontra nas bordas dos eletrodos. No caso da frequência de 400 kHz, provavelmente existe uma combinação de forças com amplitudes similares.

Apesar de não poder ser determinado quais forças estão regendo do fluxo das microesferas, foi possível validar nosso aparato experimental (gerador, suporte de chips e conjunto de eletrodos) ao se observar o confinamento físico das partículas de acordo com os parâmetros do sinal. O próximo passo será investigar os efeitos da plataforma em organelas como os microtúbulos.

Figura 41 – Comportamento das microsferas sendo estimuladas sob sinais sinusoidais a 100kHz e 400 kHz.



5.2 Microtúbulos

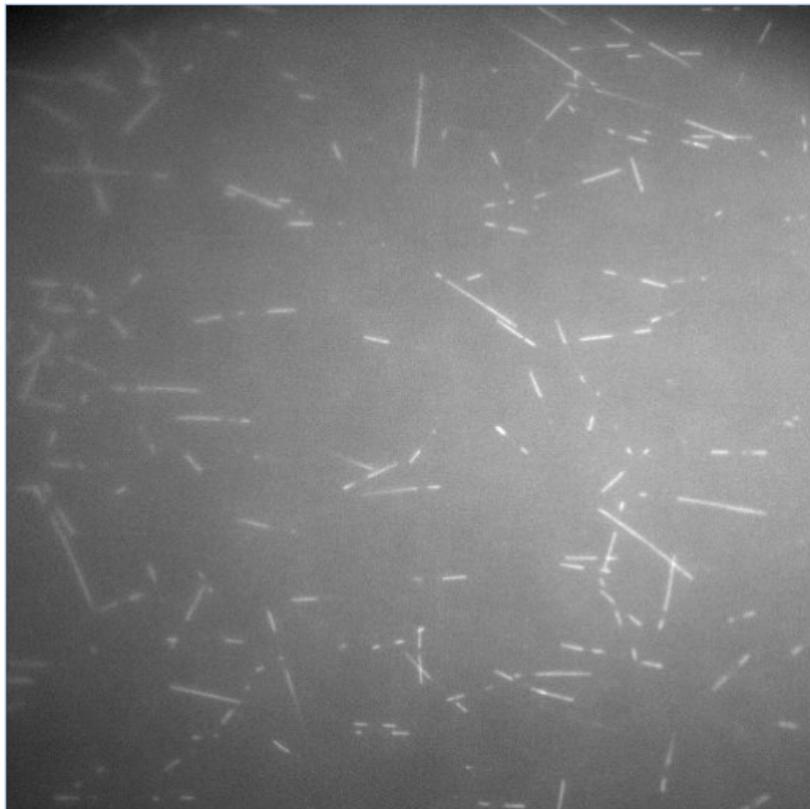
A polimerização de actina e microtúbulos é o motor por trás da migração do cone de crescimento. Realizar experimentos utilizando corrente alternada nessas moléculas pode ser importante para se tirar conclusões sobre os mecanismos de prolongamento axonal. No artigo publicado por (UPPALAPATI et al., 2008) foi demonstrado que unidades de microtúbulos são menos polarizáveis que células ou as microsferas, o que torna necessário o uso de sinais de maior amplitude para que efeitos eletrocínéticos possam ser observados. Dois experimentos foram realizados utilizando uma diferente técnica de microscopia para observar os microtúbulos.

A técnica de microscopia de Fluorescência Total da reflexão interna (TIRF) foi utilizada para observar microtúbulos marcados com moléculas fluorescentes durante o estímulo em corrente alternada. Esse experimento foi realizado no Instituto de Neurociências de Grenoble (GIN) com parceria do grupo liderado por Isabelle Arnal, que estuda a dinâmica e estrutura do citoesqueleto. Sua equipe gentilmente ofereceu sua infra-estrutura e auxiliou no desenvolvimento do experimento. Microscopia TIRF é uma técnica capaz de gerar imagens axiais com resolução abaixo de 100 nm, fazendo com que seja possível observar a dinâmica de microtúbulos. Microscópios que usam TIRF utilizam efeitos de reflexão interna total na interface entre a lâmina de vidro e o meio, o que produz campos evanescentes que excitam os fluorofóros próximos da superfície do vidro. Dessa forma, microscopia TIRF necessita de uma lâmina de vidro bastante fina (aproximadamente 100 μm de altura).

Microtúbulos marcados com fluorescência foram inseridos entre lâminas de ITO e o uma lâmina de vidro de 170 μm . O espaçamento entre ambas as lâminas foi feito

utilizando uma fita com $70\ \mu\text{m}$ de espessura. Todo o aparato possui orientação invertida com o vidro mais fino ocupando a posição mais próxima da lente objetiva do microscópio. Isso se fez necessário pois os vidros cobertos por ITO possuem $1,1\ \text{mm}$ de espessura e são muito largos para se poder focar na interface com o meio. As frequências utilizadas para realização do estímulo foram de $100\ \text{kHz}$ e $500\ \text{kHz}$. Nenhum alinhamento pode ser observado pois os microtúbulos se concentraram muito longe do ponto focal devido à orientação reversa do sistema (Figura 42). Esse problema pode ser resolvido fabricando-se os eletrodos sobre os slides mais finos utilizando técnicas de litografia.

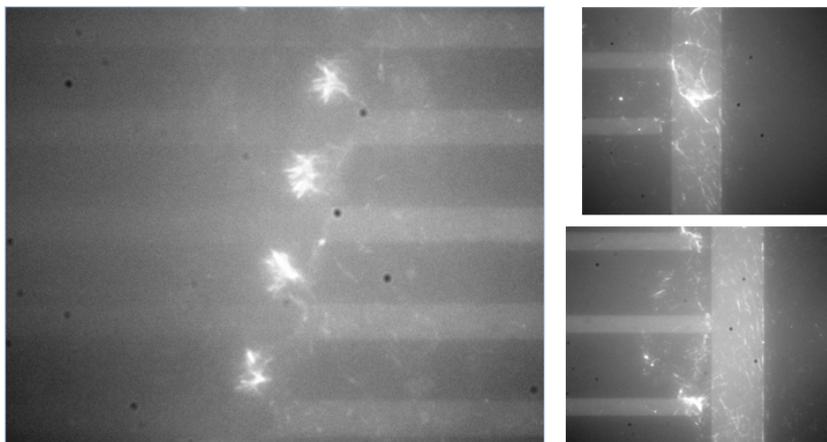
Figura 42 – *Imagem TIRF de filamentos de microtúbulos. Microtúbulos sob estímulo de corrente alternada podem ser observados. Frequência = $100\ \text{kHz}$.*



Um experimento similar foi realizado utilizando técnicas clássicas de microscopia, tornando possível focalizar a imagem sobre o arranjo de eletrodos. Essa técnica utiliza uma plataforma de microscopia Axio Observer (fabricada pela Zeiss). Os microtúbulos foram semeados e estimulados sob sinais de $10\ \text{Vp}$ a $1\ \text{MHz}$ de frequência (43).

As imagens da Figura 43 mostram deposição de microtúbulos em partes específicas do conjunto de eletrodos após a secagem das amostras, provando o caráter dos eletrodos em guiar tais partículas. Técnicas clássicas de microscopia não são adequadas para observar dinamicamente as partículas (ao contrário da microscopia TIRF), sendo assim, o efeito apenas pôde ser observado após a quase completa evaporação do meio. Além disso, o

Figura 43 – Comportamento de microtúbulos sob estímulos de 10 Vp e 1 MHz de frequência.



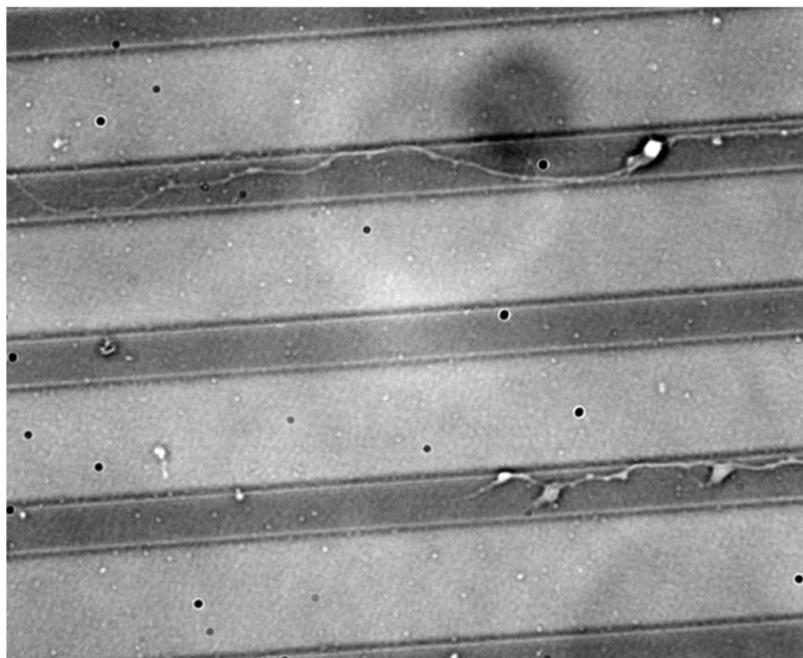
estímulo elétrico e o aparato experimental causaram muito fluxo de fluido, o que tornou impraticável a observação de alinhamento entre as moléculas. Enquanto campos de corrente alternada se provaram capazes de afetar a deposição dos microtúbulos, os mecanismos por trás desse fenômeno não são claros. Como explicado por (UPPALAPATI et al., 2008), fluxo eletrosmótico e DEP são ambos efeitos de importante influência em sistemas com condições similares as encontradas nos experimentos desse projeto. Como explicado anteriormente, microscopia TIRF pode ser mais precisa com eletrodos depositados sobre o topo das lâminas de vidro mais finas. Isso permitiria observar microtúbulos mais próximos aos eletrodos o que, conseqüentemente, contribuiria para uma visualização referenciada. Também, investigações futuras sobre os limites entre DEP e eletrosmose podem auxiliar a encontrar numericamente a precisa influência de cada parâmetro como frequência e amplitude nos chips. Isso permitiria uma clara interpretação do fenômeno que pôde ser observado em cada experimento.

5.3 Neurônios

O maior objetivo desse projeto é estudar células neurais sob influência de estímulos de corrente alternada e os mecanismos por trás da orientação do cone de crescimento. Tal fenômeno necessita ser explicado e otimizado. Para isso, células neuronais foram inseridas no dispositivo microfluídico e estimuladas durante um longo período de tempo dentro de uma incubadora sob tensão de 2 Vp e 100 kHz de frequência. O protocolo da cultura das células é detalhado no capítulo 2.2 e no anexo D. Problemas com contaminação das células em cultura, grande densidade de aglomeração neuronal e mecanismos rápidos de apoptose celular atrasaram os experimentos. Entretanto, alguns experimentos preliminares (ver Figura 44) se mostraram promissores. Os neurônios demonstraram direção de crescimento

preferencial, estando depositados sobre os eletrodos. Conclusões sobre tal fenômeno são prematuras e o projeto de investigação será continuado.

Figura 44 – *Campos de corrente alternada aplicados sobre células neuronais do hipocampo.*
Tensão aplicada = 2 Vp e frequência = 100 kHz.



6 Conclusões e perspectivas

Dispositivos microfluídicos foram caracterizados eletricamente (eletrodos e canais gravados em PDMS). Esses dispositivos mostraram medidas consistentes quando comparados aos valores obtidos através de simulações numéricas. O sistema de eletrodos representado por duas barras espaçadas entre si pode ser modelado como um circuito resistivo e capacitivo. A medida de impedâncias confirmou tal característica do sistema, mostrando valores maiores de impedância em frequências mais baixas, com um grande decaimento na amplitude após alcançar a frequência de corte. A geometria do arranjo de eletrodos provou sua influência na impedância do sistema, porém mais medidas são necessárias para estabelecer uma equação para tal dependência. O caráter iônico do meio de cultura celular possui influência na condutividade da amostra, entretanto a impedância do circuito permanece maior que $4\text{ k}\Omega$ e portanto não afeta os experimentos.

Um gerador de sinais sinusoidais foi projetado e fabricado para atender às necessidades dos experimentos. O projeto é capaz de oferecer o a banda de frequências necessária para o projeto bem como as tensões necessárias para que se possa observar os efeitos de DEP em experimentos com neurônios. O circuito foi projetado usando a ferramenta KICAD como plataforma de desenvolvimento. A montagem do circuito foi feita utilizando técnicas de soldagem com pistola de ar quente. Uma raspberry pi 3 foi usada para comunicar com o DDS via porta serial. Essa comunicação utiliza o algoritmo de envio de bit, que é um método clássico de enviar e receber dados digitais usando comunicação serial. A Raspberry pi oferece uma interface gráfica amigável que permite uma rápida programação. O código foi desenvolvido utilizando Python como linguagem de programação.

O projeto mostrou problemas de instabilidade causado por frequências parasitas na linha negativa de alimentação do amplificador operacional. O ruído pode ser causado devido a reflexão de sinal entre o terra e as trilhas que conduzem o sinal do cristal de quartzo. Para resolver esse problema, polos de maior frequência devem ser introduzidos no circuito amplificador operacional. essa abordagem foi feita utilizando componentes RC na malha de saída do circuito. Além disso, alguns filtros rejeita-faixa foram testados para atenuar a influência de tal oscilação na linha negativa da fonte de alimentação. Entretanto, uma boa parte da potência desse circuito está deslocada para a frequência de 18 MHz, causando uma queda de potencial indesejada na linha contínua. Essa queda de tensão pode atingir magnitudes próximas a -2 V , o que significa dissipação e perda de energia.

Com o intuito de resolver tais contratempos sem apelar para soluções temporárias, o projeto da placa de circuito impresso deve ser alterado. Deve ser adicionada uma camada extra para as trilhas que conduzem o sinal oriundo do cristal de quartzo, bem como a adição

de novos capacitores de desacoplamento na linha de -5 V. Para resolver as dificuldades com instabilidade, um circuito RC deve ser adicionado ao projeto. Além disso, os circuitos de 1,8 V e 3,3 V podem ser transferidos para a placa de circuito impresso do DDS, facilitando a incorporação do cabo micro USB para conectar as placas. Adicionalmente, seria necessário trabalhar no código python para receber dados do conversor analógico-digital (ADC) por comunicação serial. A placa projetada é capaz de medir a amplitude do sinal na saída do amplificador operacional, porém o software não foi desenvolvido.

Em paralelo ao projeto eletrônico, experimentos eletrocinéticos foram realizados. Microesferas foram inseridas dentro das plataformas microfluídicas para observar a influência do fluxo eletrodinâmico e da DEP. As esferas mostraram diferentes padrões de deposição para frequências distintas de 100 kHz e 400 kHz (5 V_p), o que permitiu a validação do aparato experimental. Microtúbulos estáveis foram depositados e estimulados no dispositivo. Foi possível observar aglomeração das partículas guiadas sobre a extensão dos eletrodos a uma amplitude de 10 V_p e 2 MHz de frequência. Isso sugere o potencial de controle de partículas do dispositivo. Finalmente, neurônios mostraram prolongamento neuronal favorecido em uma determinada direção sob um sinal de 100 kHz e 2 V_{pp}. Os mecanismos por trás desse resultado necessitam ser investigados.

Para futuros experimentos, a visualização do cone de crescimento em detalhes durante a estimulação pode fornecer uma boa pista das forças agindo sobre as células. Através desse experimento poderá ser observado se a neurite é submetida a um confinamento imediato causado pelas forças eletrodinâmicas ou se tais forças agem sobre as partículas e organelas que influenciam o crescimento axonal. Adicionalmente, isso poderia ajudar a escolher a abordagem das próximas investigações. Experimentos com filamentos de actina e moléculas envolvidas no seu caminho de sinalização podem ser interessantes pois há a possibilidade que essas sejam afetadas pelos campos elétricos. Efeitos eletrocinéticos necessitam ser melhor investigados e compreendidos para que se possa explicar o fenômeno de orientação aqui abordado.

Referências Bibliográficas

ABCAM. *Nerve Growth Factor pathway*.

ARIZA, C. A. et al. The influence of electric fields on hippocampal neural progenitor cells. *Stem Cell Rev*, Department of Chemical and Biological Engineering, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA., v. 6, n. 4, p. 585–600, Dec 2010. ISSN 1558-6804 (Electronic); 1550-8943 (Linking).

ASBURY, C. L.; DIERCKS, A. H.; ENGH, G. van den. Trapping of dna by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA, USA., v. 23, n. 16, p. 2658–2666, Aug 2002. ISSN 0173-0835 (Print); 0173-0835 (Linking).

ASOKAN, S. B. et al. Two-dimensional manipulation and orientation of actin-myosin systems with dielectrophoresis. *Nano Letters*, v. 3, n. 4, p. 431–437, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nl0259434>>.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, Nature Publishing Group SN -, v. 3, p. 205 EP -, 03 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd1330>>.

CAJAL, S. Ramón y. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. Paris: Maloine, 1909. v. 1. 1012 p. Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/item/103261>>.

DEVICES, A. *AD9954 - Datasheet*. [S.l.].

DEVICES, A. *Fundamentals of Direct Digital Synthesis (DDS)*. [S.l.].

DUDINK, J. et al. Evolution of unilateral perinatal arterial ischemic stroke on conventional and diffusion-weighted mr imaging. *American Journal of Neuroradiology*, American Journal of Neuroradiology, v. 30, n. 5, p. 998–1004, 2009. ISSN 0195-6108. Disponível em: <<http://www.ajnr.org/content/30/5/998>>.

EHRLICHER, A. et al. Guiding neuronal growth with light. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Center for Nonlinear Dynamics, Department of Physics, University of Texas, Austin, TX 78712, USA., v. 99, n. 25, p. 16024–16028, Dec 2002. ISSN 0027-8424 (Print); 0027-8424 (Linking).

ELVEFLOW. *ELVEFLOW: PLUG AND PLAY MICROFLUIDICS*.

FARGALI, S. et al. Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. *Journal of molecular neuroscience : MN*, v. 48, n. 3, p. 654–659, 11 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3480664/>>.

FIELDS, R. D. Release of neurotransmitters from glia. *Neuron Glia Biol*, v. 6, n. 3, p. 137–139, Aug 2010. ISSN 1741-0533 (Electronic); 1740-925X (Linking).

FIKAR, P. *Dielectrophoretic cytometry for measurement of live cell dielectric signatures on population level*. Tese (Theses) — Université Paris-Est, dez. 2016. Disponível em: <<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01534827>>.

HEUVEL, M. G. L. van den et al. Electrophoresis of individual microtubules in microchannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 19, p. 7770, 05 2007. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/104/19/7770.abstract>>.

HONEGGER, T. et al. Electrokinetic confinement of axonal growth for dynamically configurable neural networks. *Lab Chip*, Department of Electrical Engineering and Computer Science, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Room 36-824, Cambridge, MA 02139, USA., v. 13, n. 4, p. 589–598, Feb 2013. ISSN 1473-0189 (Electronic); 1473-0189 (Linking).

KAECH, S.; BANKER, G. Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, Nature Publishing Group SN -, v. 1, p. 2406 EP -, 01 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.356>>.

KANDEL, E. *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw-Hill Education, 2013. (Principles of Neural Science). ISBN 9780071390118. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=s64z-LdAIsEC>>.

KILPATRICK, D. C. W. *Synapse Formation*.

KIM, K. et al. *Electric field-induced reversible trapping of microtubules along metallic glass microwire electrodes*. [S.l.: s.n.], 2015. v. 117. 144701 p.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 16, p. 1130–1143, 1998. PMID: 9770561. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199810153391607>>.

LI, Z. et al. Fabrication of pdms microfluidic devices with 3d wax jetting. *RSC Adv.*, The Royal Society of Chemistry, v. 7, p. 3313–3320, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA24884E>>.

MORGAN, H.; GREEN, N. *AC Electrokinetics: Colloids and Nanoparticles*. Research Studies Press, 2003. (Microtechnologies and microsystems series). ISBN 9780863802553. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=FKhPkgEACAAJ>>.

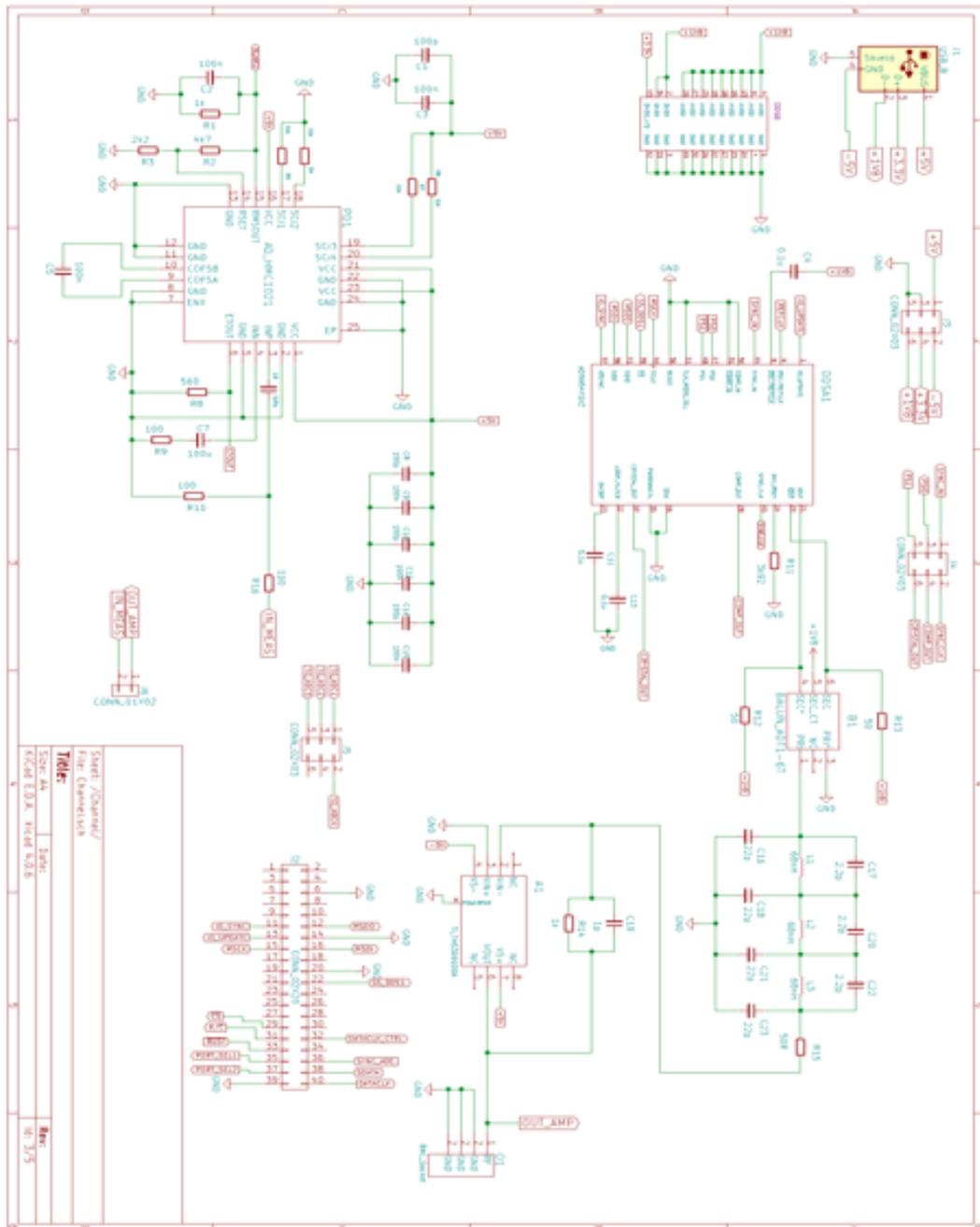
MORIN, F. O.; TARHAN, M. C.; FUJITA, H. Probing and using the dielectric properties of microtubules within microsystems integrating indium-tin oxide microelectrodes. In: *2006 International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology*. [S.l.: s.n.], 2006. p. 56–59.

OMOTADE, O. F.; POLLITT, S. L.; ZHENG, J. Q. Actin-based growth cone motility and guidance. *Mol Cell Neurosci*, Department of Cell Biology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, United States; Center for Neurodegenerative Diseases, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, United States., v. 84, p. 4–10, Oct 2017. ISSN 1095-9327 (Electronic); 1044-7431 (Linking).

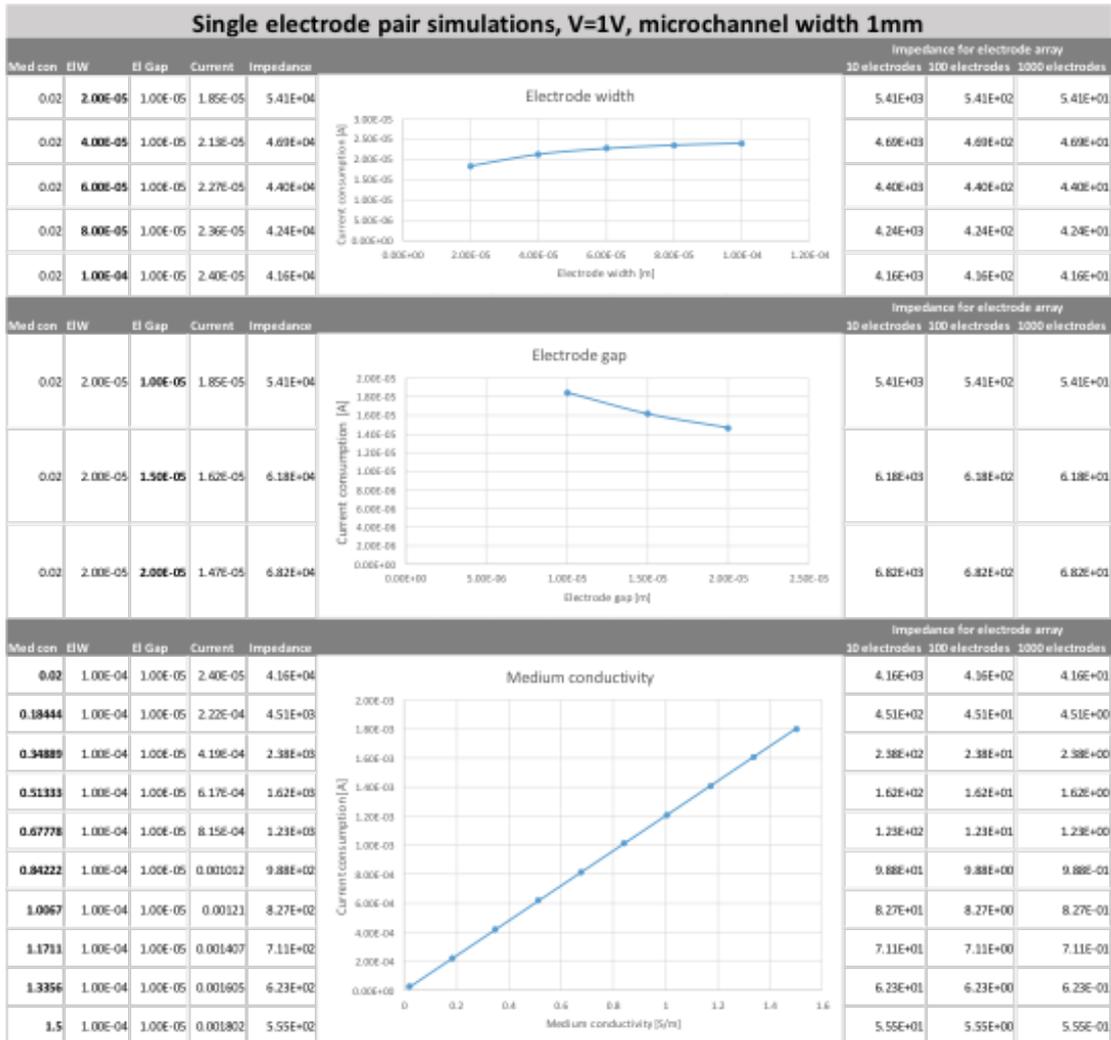
PARK, J. W. et al. Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nature Protocols*, Nature Publishing Group SN -, v. 1, p. 2128 EP -, 12 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.316>>.

- PERLMUTTER, J. S.; MINK, J. W. Deep brain stimulation. *Annual review of neuroscience*, v. 29, p. 229–257, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4518728/>>.
- PURVES, D. et al. *Neuroscience*. Sinauer Associates, 2001. ISBN 9780878937431. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=F4pTPwAACAAJ>>.
- RAJAPAKSE, T.; KIRTON, A. Non-invasive brain stimulation in children: applications and future directions. *Translational neuroscience*, v. 4, n. 2, p. 10.2478/s13380-013-0116-3, 06 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807696/>>.
- SIDDIQUE, R.; THAKOR, N. Investigation of nerve injury through microfluidic devices. *Journal of the Royal Society Interface*, The Royal Society, v. 11, n. 90, p. 20130676, 01 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836319/>>.
- UPPALAPATI, M. et al. Microtubule alignment and manipulation using ac electrokinetics. *Small*, Department of Bioengineering 229 Hallowell Bldg. Penn State University University Park, PA 16802, USA., v. 4, n. 9, p. 1371–1381, Sep 2008. ISSN 1613-6829 (Electronic); 1613-6810 (Linking).
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, Nature Publishing Group SN -, v. 442, p. 368 EP -, 07 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature05058>>.
- WU, J. *AC Electrokinetics: Dielectrophoresis (DEP)*. [S.l.], 2008.
- ZHAO, C.; YANG, C. *Advances in electrokinetics and their applications in micro/nano fluidics*. [S.l.: s.n.], 2012. v. 13.

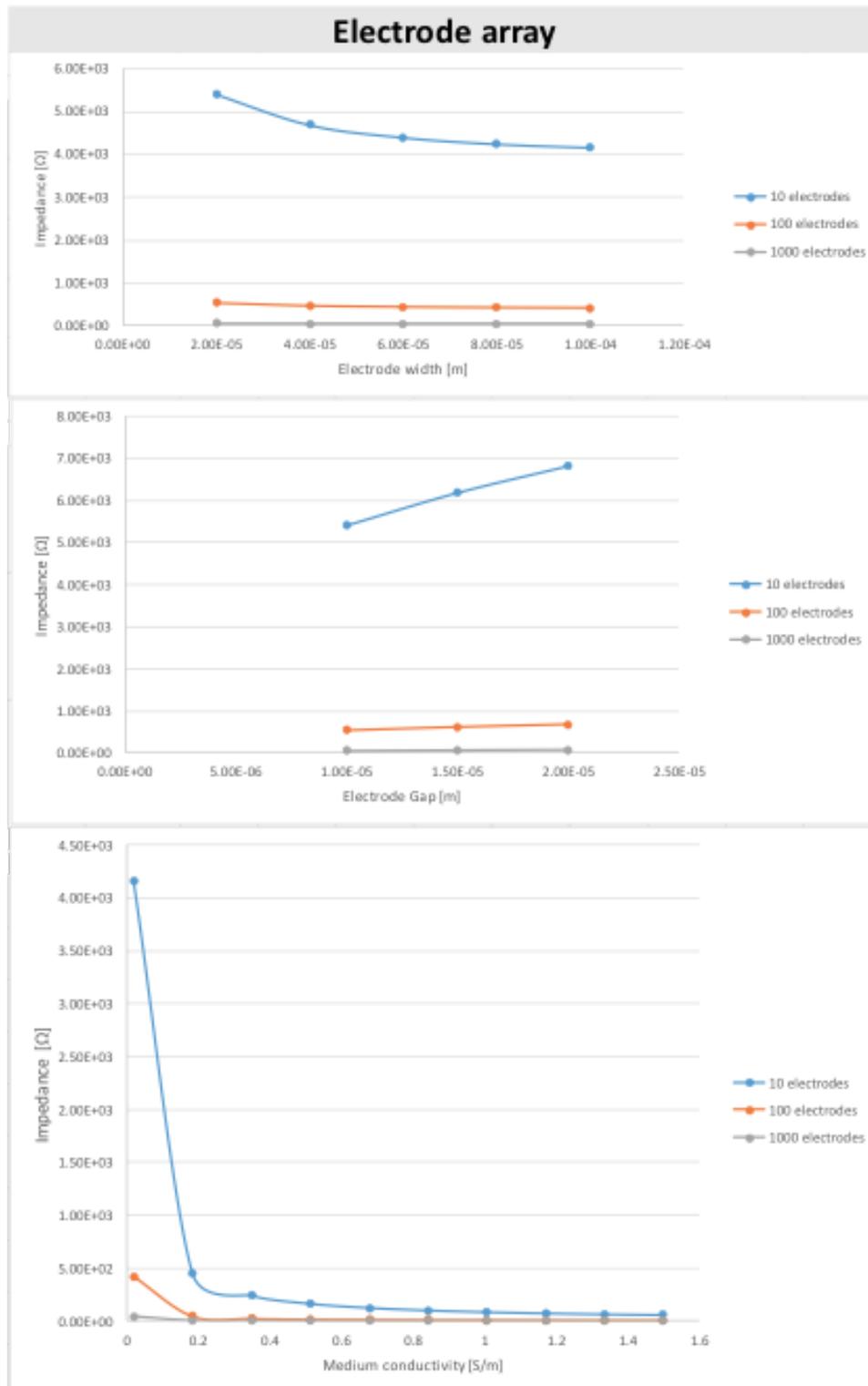
ANEXO B – Esquemático do gerador de funções e detector de tensão eficaz



ANEXO C – Simulação de um par de eletrodos 1



ANEXO D – Simulação de um par de eletrodos 2



ANEXO E – Protocolo de cultura celular

Cell Culture

General Information

The ethanol used is at 70% in DI water

All incubations are done at 37°C and 5% CO₂

The water bath is always set at 37°C. Be careful to always clean thoroughly with ethanol whatever is taken out of the water bath and the incubator

Materials

PDL (0.1mg/mL)

Preparation of aliquot of 5mL of a powder mother solution at 1mg/mL

Add 500 μ L of PDL in 4500 μ L of DI sterilized water and shake gently well for the solution become homogeneous

Use a syringe and a filter to sterilize the solution

Aliquot in the freezer in Eppendorf of 500 μ L and 1000 μ L (0.5mL and 1mL)

Laminin (20 μ g/mL)

Preparation of aliquot of 1mL of a mother solution of 1.2 mg/mL

Add 16.6 μ L of laminin to 983.3 μ L of DI sterilized water and shake gently well for the solution become homogeneous

Aliquot in the freezer in Eppendorf of 500 μ L and 1000 μ L (0.5mL and 1mL)

Digestion enzyme

Mix in a 15mL Eppendorf - homogenize at the end:

2mL HEPES buffered in HBSS from the fridge

40 μ L EDTA 50 mM from the fridge;

Prepare EDTA stock solution (0.333 M) by combining 13.859 g of EDTA powder with 100 mL of deionized water. Store at 4°C for up to 3 months.

Prepare EDTA solution from liquid solution (0.5M) by diluting 10 x with sterilized DI water. Add 900mL of water with 100 ml of (0.5M) EDTA. Store at 4°C up to 3 months

40 μ L L-Cysteine 100x from the freezer, After defrosting it is possible that white particles remain visible, Mix before use,

Prepare L- Cysteine stock solution (100X, at 24.2mg/mL) by measuring 242 mg of L-cysteine and dissolving it into 10 mL of DI sterilized water. Use syringe and a filter to sterilize the solution. Aliquot 50 μ L in Eppendorf tubes and store at -20°C.

52 μ L of Papain (find concentration) from a small brown bottle in the fridge, Mix before use,

Take it last from the fridge and put it back directly after using it

Hippocampus culture media

Prepared in SteriCup under the hood and stored at 4°C (fridge)

Add 48mL of Neurobasal (fridge)

Add 1mL of B27 50X supplement (freezer)

Add 1mL of 25mM L-Glutamine ? Pen ? Strep (freezer)

Prepare L-Glutaminestock solution (25mM) by diluting L-Glutamine 200mM 8 times in Neurobasal. Make 1mL aliquots for future uses and store them in the freezer.

Close the cover of the stericup and remove the air from it using the pump

Methods

Sterilizing

Enter sterilized petri dish under the hood after cleaning it from outside with ethanol (rub it well), and let it dry by itself

Spray the chips with ethanol from both sides (keep your hand a bit far from the chip so the bonding doesn't get messed up). Let the chips dry by themselves under the hood.

After drying, put the chips inside the petri dish and never remove it again. (the chips are not to be touched anymore)

Add volume of ethanol in the inlet of neurons chamber, wait 1 minute for the flow to wash the whole chamber and the microchannels, then add again a small volume in the neurons inlet to force the flow in the chamber and microchannels. Fill again the inlet of the axons chamber and let the flow to the outlet of the chamber. (This technique is to be used for every filling/cleaning to be made).

Remove the ethanol with the pump: remove ethanol from the outlet chamber of the axons and then rapidly from the inlet of the axons chamber. After, remove ethanol from the outlet of the neurons chamber and then from the inlet of the neurons chamber.

Be careful not to empty the chambers of water, for some products can be toxic for the cells. (This technique is to be used for every emptying/cleaning to be made)

Clean 3 X with sterile DI water (using the technique above of filling and emptying), then refill with water

Put chips under UV light for 45 minutes

Functionalizing

Remove water from chips

Add 40 μL of PDL (0.1mg/mL) in both inlets of the chip

Incubate overnight

Clean 3x with sterile DI water. On the third time, leave water for 15 minutes then remove it.

Coat 40 μL of Laminin(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in both inlets of the chip

Incubate for 2 hours before the surgery

Clean 3x with sterile DI water. On the third time, leave water for 15 minutes then remove it.

Add culture media in the chips and incubate for the surgery

Cells treatment

Place neurobasal and media culture in the water bath before going to surgery as well as frozen L-cysteine and HBSS under the hood.

Place the activation enzyme in the water bath for activation 20 minutes before placing neurons

After hippocampus are transported from surgery in HEPES buffered HBSS on ice (10 mM HEPES in HBSS, 4ml 1M NaOH/litre), remove half of the liquid with the pump (stay on the surface so the cells don't get aspirated too)

Gently remove the neurons with a 1mL pipette and place them into the digestion enzyme. You must take all neurons and place them gently at the bottom of the eppendorf containing the enzyme.

Keep in water bath for 40 minutes

Make sure to have 3 10mL pipettes and 1 50mL Eppendorf under the hood,

Gently shake the neurons before entering them into the hood.

Remove the enzyme till the end (Be careful not to aspirate the cells). Start with the pump and finish with manual pipetting,

Wash the cells 3x with warm neurobasal (With the pipette of 10mL, fill and unfill with it. Use 3 different pipette to avoid any risk of contamination of the medium by cells or contaminants that might be present with the neurons). Wait for sedimentation of the neurons before removing the neurobasal. Place the neurobasal in the 50ml Eppendorf.

After 3 times washing, remove as much as possible of remaining liquid with a pipette.

Add 100 μL of warm culture media and gently triturate the neurons until they become homogeneous

Take 5 μL of neurons and dilute it in 495 μL of culture media. Measure the concentration of the dilute solution with the electronic cell counter. The concentration of the mother solution is 100x higher than the measured value.

Dilute the mother solution in culture media to reach a concentration of 2.107 cells/mL.

Be careful to keep neurons vial in water bath if not using it.

Cell seeding

Remove culture media from neurons chamber; wait 1-2 minutes for the flow to stabilize.

Seed 4 μL of $C=2.107$ cells/mL under the microscope to observe the flow

Incubate for 2-3 hours (enough time for neurons to attach)

Add 5 μL by 5 μL of culture media in inlet and outlet of neurons chamber simultaneously. Control flow and counter flow under the microscope.

Leave chips in incubator and watch on microscope with petri dish

Culture Media Change

Heat the culture media in water bath 10/15 minutes before use

Using the pipette, remove 25 μL of culture media from outlet and inlet chamber of axons simultaneously, then neurons chamber

Add 10 μL by 10 μL of culture media in inlet and outlet of neurons chamber simultaneously.

Change the pipette tip for each filling of culture media to prevent the risk of contaminating it because the tip will be in contact with the chip at each filling.