

DESARROLLO DE UNA INTERFAZ BIOELECTRÓNICA PARA ESTABLECER COMUNICACIÓN ELÉCTRICA CON POBLACIONES NEURONALES

RICARDO JOSÉ SILVA BUSTILLOS ^{1,2}, JUAN JOSÉ GÁRATE PIRELA ³

¹ Laboratorio de Biociencias Integradas “Prof. Luis Lara Estrella”, Universidad Simón Bolívar, Venezuela,
Ricardo.silvab@ffccmm.ug.edu.ec

² Programa Prometeo, Universidad de Guayaquil, Ecuador

³ Siemens Helthcare, Venezuela, juanjogp1@gmail.com

Recibido: febrero 2013

Recibido en forma final revisado: ocyubre 2013

RESUMEN

El proyecto presenta un sistema modular para la adquisición de señales bioeléctricas proveniente de poblaciones neuronales, el acondicionamiento y registro de la información obtenida así como la evaluación de los resultados empleando métodos de procesamiento de señales. La etapa adquisición parte del diseño y elaboración de electrodos (fabricados con “ITO”: aleación de óxido de indio y óxido de estaño) empleando técnicas de pulverización catódica y evaporación térmica. Se observó que la técnica de pulverización catódica ofreció mejores resultados en cuanto a composición de las películas, transparencia y conductividad eléctrica. La etapa de acondicionamiento y pre – procesamiento de la señal está representada por un amplificador diferencial con filtro de banda pasante, con frecuencia inferior de corte (100 Hz) y corrección de línea base, un filtro Butterworth de cuarto orden de condensador conmutado para establecer la frecuencia superior de corte (2 kHz) y un amplificador de aislamiento eléctrico de alta precisión. Realizando un análisis temporal y espectral del comportamiento del circuito, se determinó que cumplía con los requerimientos estipulados (alto rechazo a modo común, eliminación de efecto triboeléctrico y ancho de banda entre 100 y 2 kHz). La etapa de procesamiento de la información se fundamenta en la descomposición de la misma empleando métodos matemáticos, basados en transformada de ondículas. A través de bancos de filtros pasa – bajo, se pudo determinar que la descomposición de mayor nivel de cada ondícula ofrece información sobre la magnitud de la actividad neuronal, mientras que al aplicar bancos de filtros pasa – alto se resaltaron determinados componentes ruidosos de la señal, permitiendo eliminar dichas perturbaciones.

Palabras clave: Neuronas, Adquisición, “ITO”, Amplificador, Ondículas.

BIOELECTRONIC INTERFACE DEVELOPMENT TO ESTABLISH COMMUNICATION WITH ELECTRIC NEURONAL POPULATIONS

ABSTRACT

The project presents a modular system for bioelectric signal acquisition from neuronal populations, signals conditioning and recording, and the assessment of the results using signal processing methods. The acquisition stage of the design consisted on the development of electrodes (made from “ITO”) using sputtering and thermal evaporation techniques. It was observed that the sputtering technique produced better results in terms of composition of the films, transparency and electrical conductivity. The conditioning step and pre-processing of the signal is represented by a differential amplifier with a bandpass filter with low cutoff frequency (100 Hz) and baseline correction, a fourth-order Butterworth filter switched capacitor to set the upper cutoff frequency (2 kHz) and an electrical isolation amplifier with high accuracy. Through a temporal and spectral analysis of the behavior of the circuit, it fulfilled the defined requirements (high common mode rejection, triboelectric effect removal, and bandwidth between 100 and 2 kHz). The processing stage of the information is based on the decomposition of the signal using mathematical methods based on wavelet transform. Using low pass filters banks, it was determined that the highest-level decomposition of each wavelet provides information on the magnitude of neuronal activity while applying high-pass filter banks certain noisy signal components were highlighted allowing the elimination of such disturbances.

Keywords: Neurons, Acquisition, “ITO”, Amplifier, Wavelets.

INTRODUCCIÓN

Las señales provenientes de los microelectrodos de registro, han sido ampliamente utilizadas para soporte a científicos y neurólogos en la localización de zonas cerebrales donde se requiere investigar, excitar, lesionar o implantar grupos de células madre, como en el caso de la enfermedad de Parkinson; así como también en el diseño de interfaces cerebro – máquina de comunicación neuronal bidireccional para el control de prótesis mecánicas, en la localización de dianas para tratar desórdenes obsesivos compulsivos severos y en casos de depresión (Orozco *et al.* 2006). En general, todos estos procedimientos necesitan reconocer de alguna forma la actividad eléctrica de las estructuras neuronales convergentes alrededor del microelectrodo de registro.

Hoy día el desarrollo de interfaces de comunicación neuronal bidireccional están emergiendo; por ejemplo, la información proveniente de las señales neuronales obtenidas del sistema nervioso periférico, son utilizadas para desafiantes aplicaciones en la estimulación eléctrica funcional (en pacientes con daño en la espina dorsal, es posible detectar las intenciones del paciente y estimular la zona deseada haciendo una especie de “by – pass” o en personas amputadas, dicha información permitiría controlar una prótesis) (Sayas, 2005).

El desarrollo de chips microscópicos, fabricados sobre sustratos poliméricos, ha permitido registrar la actividad neuronal y liberar fármacos en el cerebro simultáneamente (Altuna *et al.* 2013). Estos diseños han permitido integrar los electrodos al mismo nivel que la superficie del polímero. La integración posterior de canales fluidicos se ha llevado a cabo mediante técnicas de litografía y el desarrollo de un sistema de encapsulado que garantiza el registro y la liberación simultánea de los fármacos (Altuna *et al.* 2013). Dichos dispositivos suponen un avance en la intervención farmacológica, genética o eléctrica para estudiar la actividad neuronal. En muchos casos, la detección de la epilepsia, el Parkinson y el Alzheimer sólo puede realizarse a través de electrodos implantados de forma semicrónica en el cerebro. Las tecnologías empleadas para ello deben ser lo menos invasivas posible y garantizar una respuesta biocompatible y la integridad de los circuitos neuronales adyacentes al implante (Altuna, 2013).

A su vez, el empleo de electrodos en la corteza prefrontal ha develado como dicha estructura del cerebro permite o inhibe la realización de comportamientos selectivos en función de las condiciones del entorno, según un reciente estudio que ha mostrado en animales los mecanismos cerebrales

que posibilitan la toma de decisiones y la elección de los comportamientos más adecuados en cada situación (Leal *et al.* 2013). Por medio de sistemas electrónicos sensibles a la dinámica neuronal, los investigadores han demostrado que el córtex prefrontal modifica su actividad eléctrica en función de los posibles comportamientos que se pueden realizar en una situación, y según las circunstancias ambientales, a fin de permitir la liberación de su expresión en las condiciones espaciales y ventanas temporales más adecuadas (Leal *et al.* 2013).

JUSTIFICACIÓN

Como se ha expuesto, las interfaces bioelectrónicas neuronales presentan aplicaciones diversas en el ámbito científico. Algunos ejemplos de situaciones en las cuales la aplicación de señales neuronales integradas (sumadas), puede proveer información útil referente al comportamiento neuronal son:

1. Estudios científicos presentados a nivel internacional han demostrado que corrientes alternas a distintas frecuencias producen efectos fisiológicos en células vivas; estos efectos pueden abarcar el campo de la regeneración celular y también el campo de la muerte celular para fines de esterilización, entre otros (Cucullo *et al.* 2005; Matos & Cicerone, 2010). Asimismo, existen estudios que demuestran las propiedades piezoeléctricas de la matriz extracelular; por lo tanto, es posible estimular eléctricamente una célula y producir una deformación mecánica que estimule su reproducción. La interfaz bioelectrónica en cuestión puede utilizarse tanto para estimular eléctricamente cultivos celulares neuronales con fines de regenerar células, como para destruirlas. Este último caso es de utilidad si se trata de investigar nuevas formas de combate ante patologías como el cáncer (línea celular de neuroblastomas) (Matos & Cicerone, 2010).
2. Desarrollo de aplicaciones de biosensores neuronales, en las cuales la detección del incremento de las descargas eléctricas provenientes de una población de neuronas sintetizadas puede proveer información útil para detectar la presencia de ciertas sustancias bioquímicas como neuroestimuladores dopaminérgicos, neurotoxinas, drogas, entre otros (Gaumont *et al.* 2002; Barrett *et al.* 2004; Barrett *et al.* 2005).
3. Desarrollo de aplicaciones de bioactuadores neuronales, en las cuales, empleando señales eléctricas controladas (de voltaje o de corriente), se podría estimular e inducir determinadas respuestas en las poblaciones neuronales a nivel de los canales iónicos de cada neurona, empleando

incluso lazos de realimentación, para así controlar la amplitud de la señal de salida y garantizar la estabilidad del sistema (concepto semejante en el cual están basados los procedimientos fisiológicos de “voltage clamp” y “current clamp”) (Silva, 2005).

4. Caracterización de la estabilidad de cualquier sistema constituido por multielectrodos (“in vivo” o “in vitro”), en los cuales puede ser útil el monitoreo de las señales neuronales integradas para observar si el espectro frecuencial decrece en ancho de banda a lo largo del tiempo, sugiriendo movimiento de las neuronas lejos de los electrodos debido a la encapsulación o a la deposición de proteínas (Barret *et al.* 2004; Barrett *et al.* 2005).
5. Estudio de la generación de conexiones sinápticas, en las cuales el surgimiento y ocurrencia de señales cuyas energías sean diferentes a las de línea base pre-registrada, y que se producen varios milisegundos después del pico de una señal de “forma de onda promedio”, puede proporcionar una caracterización cuantitativa progresiva de las sinaptogénesis en vivo, aportando una nueva dimensión en los estudios “in vitro” (Silva *et al.* 2005).
6. Estudios de degeneración neuronal como las enfermedades de Parkinson o Alzheimer diseñando sistemas en los cuales si a una red sináptica completa se le permite degenerarse, produciéndose así un debilitamiento y atenuación de la comunicación entre células, se obtendría una herramienta valiosa capaz de proveer información útil para medir y cuantificar el nivel de degeneración neuro – sináptica (Silva *et al.* 2003).

DINÁMICA NEURONAL

La doctrina fisiológica establece que la base de la función neurológica, radica en las neuronas como entidades discretas desconectadas físicamente, cuyas interacciones (mediadas por sinapsis) son complejas y pueden generar cambios en el potencial interno de cada una de estas células (Silva *et al.* 2005). Para lograr un alto nivel de comunicación, dichas células estructuran redes, las cuales son poblaciones de neuronas interconectadas (por mediadores químicos) o un grupo de neuronas aisladas que reciben señales que procesan a la manera de un circuito reconocible (Silva *et al.* 2003; Silva *et al.* 2005).

La comunicación entre neuronas implica procesos electroquímicos; una vez que una neurona es excitada a partir de cierto umbral, ésta se despolariza transmitiendo a través de su axón una señal que estimula a neuronas aledañas, y así sucesivamente. Por medio de conocimientos

técnicos, este comportamiento puede ser modelado a través de sistemas de información eléctricos estudiados y analizados con anterioridad para otros problemas similares (Cucullo *et al.* 2005; Matos & Cicerone, 2010).

Algunas características comunes de las señales neuronales son su baja amplitud en el rango de 500 μ Vp – 2 mVp y un ancho de banda en un rango de frecuencias desde los 100 Hz hasta los 2000 Hz (Cucullo *et al.* 2005; Matos & Cicerone, 2010); ambos parámetros hacen del diseño de un circuito integrado para registrar la actividad neuronal un gran desafío debido a la complejidad embebida en el proceso de reconocer de manera inequívoca la actividad propia de los patrones neuronales; la mayoría de las técnicas propuestas requieren como hipótesis un registro limpio (Orozco *et al.* 2006).

Comúnmente en neurociencia se asume que el cerebro codifica la información de acuerdo a la tasa de impulsos generados por las neuronas, dicha tasa se refiere al número de potenciales de acción en un determinado intervalo de tiempo (Navarro *et al.* 2005); consecuentemente, lograr distinguir en la señal obtenida lo que es realmente actividad de estos potenciales de acción y que es ruido se considera el primer paso para la decodificación de la actividad neuronal. Desde el punto de vista ingenieril, la neurona, conjuntamente con las funciones que desarrolla, puede representarse a través de un sistema electrónico de comunicaciones (de entradas y salidas analógicas) capaz de captar señales eléctricas procedentes de otras neuronas por medio de un conjunto de transductores especializados que interpretan dichas señales como aportes pesados de potencial a su voltaje interno, el cual depende de los estímulos sentidos y que al alcanzar un umbral determinado (a -55 mVolts) activa, por medio de una señal binaria, “todo o nada”, la generación de impulsos nerviosos continuos (todos idénticos por lo cual son semejantes señales digitales también) cuya frecuencia y cantidad dependen de la amplitud medida en la cual se ha superado dicho potencial de umbral (modulación por frecuencia, FM) (Gaumond *et al.* 2002; Silva, 2005).

Estos impulsos eléctricos viajan a través de un conductor o canal de comunicaciones sumamente especializado (axón) y al llegar a los botones sinápticos son nuevamente registrados por otros transductores, también altamente especializados, que captan la frecuencia de dichos impulsos y la traducen en una cantidad de neurotransmisor a segregar dependiente proporcionalmente de dicha frecuencia senada (Figura 1) (Gaumond *et al.* 2002; Silva, 2005).

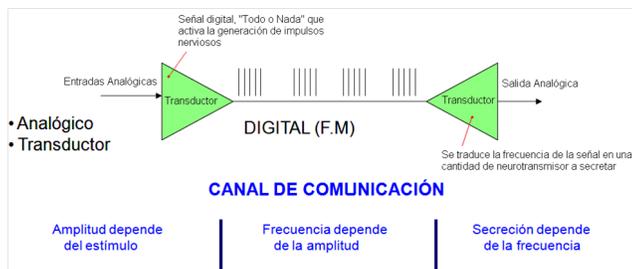


Figura 1. Representación de la neurona como un sistema electrónico de comunicación

MARCO METODOLÓGICO

A partir del estudio de modelos propuestos y oportunidades técnicas, se pudo orientar el proyecto en cuestión, esbozando así un diseño estructural modular.

En principio se planteó el diseño de una plataforma de adquisición de las señales neuronales y/o estimulación del conjunto celular considerando la interacción electrodo – tejido neuronal tanto en términos de biocompatibilidad de la superficie del electrodo como de biocompatibilidad estructural (Navarro *et al.* 2005); Se puntualizó la importancia de la afinidad de los materiales en contacto con el tejido, cuya disolución incluso en cantidades mínimas pudiesen generar respuestas del sistema vivo. Los electrodos debían cumplir con las mayores exigencias en cuanto a la bioestabilidad y biofuncionalidad, de modo que se pudiese asegurar la estabilidad temporal de las propiedades de la interfaz electrodo – electrolito.

A continuación se esbozó el diseño y construcción de un sistema de amplificación y pre – procesamiento de las señales neuronales obtenidas, considerando su capacidad para adecuar y acondicionar las señales neuronales recibidas durante la etapa de adquisición por los pares electrodos – neurona; la conexión se diseñó de forma diferencial y comprendiendo el empleo de cables conductores apantallados dispuestos de forma trenzada (par trenzado), configuración óptima para eliminar el ruido inductivo puesto que crea un efecto de cancelación de señales inducidas y del efecto triboeléctrico generado por la estática.

Por último, el proyecto en cuestión se constituyó del diseño e implementación de algoritmos de procesamiento de las señales recibidas y extracción de parámetros relevantes de las mismas partiendo del principio de que las señales digitalizadas pueden pasar por diferentes procesos de identificación y selección de sus características relevantes como filtrado, medida de la amplitud de voltaje, análisis espectral o separación de una sola neurona (Silva *et al.* 2003; Wood *et al.* 2004). La estructura general del proyecto se

presenta a modo de diagrama en la Figura 2 contemplando las etapas expuestas.

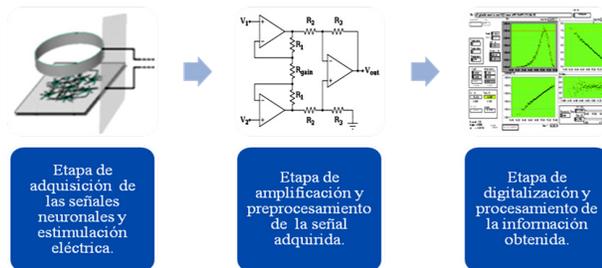


Figura 2. Esquema que presenta las etapas que definen la estructura del sistema modular que constituye a la interfaz bioelectrónica

Tomando como estructura conceptual este esquema modular fundamental, se comenzaron a postular y evaluar propuestas funcionales para el diseño, construcción y/o implementación de las mismas, las cuales se presentan a continuación.

Propuesta de diseño y elaboración de la plataforma de adquisición de las señales neuronales y/o estimulación del conjunto celular: La propuesta de diseño estructural de la plataforma de adquisición – estimulación (electrodos sensores – estimuladores) contempló la fabricación de láminas conductoras de “ITO” (aleación de óxido de indio y óxido de estaño) depositadas sobre sustratos de vidrio (Figura 3), empleando técnicas basadas en pulverización catódica (“sputtering”) y evaporación térmica de metales al vacío.

La elección de dicho óxido semiconductor cumplió con consideraciones basadas en la biocompatibilidad superficial y estructural entre la aleación y el tejido neuronal, la estabilidad temporal de la interacción electrodo – electrolito, baja impedancia, alta relación señal ruido y selectividad. Esta última se refiere a la capacidad para registrar o estimular eléctricamente grupos particulares de neuronas (Navarro *et al.* 2005).



Figura 3. Superficie de “ITO” estructurada sobre sustrato de vidrio

Por otro lado, los electrodos construidos con películas de “ITO” presentan un bajo consumo energético y alta resistencia a la corrosión durante la estimulación eléctrica o el ataque de los fluidos biológicos, gran estabilidad electroquímica, impedancia y frecuencia de respuesta estable y estabilidad contra el ruido y otros artefactos (Matos & Cicerone, 2010).

A continuación, se diseñó la plataforma de adquisición de las señales provenientes de las descargas eléctricas de la población neuronal, así como de estimulación eléctrica del conjunto celular en cuestión, para lo cual fue imprescindible el uso de pares electro – neuronales (Figura 4), que a su vez requirieron de la buena localización y la selectividad de la interfaz electrodo – neuronal; en otras palabras, la plataforma de adquisición – estimulación se diseñó con uno o más pares de electrodos para el registro de la información eléctrica y/o la excitación del cultivo.

Cómo se mencionó anteriormente, la conexión de estos pares a la siguiente etapa (amplificación y pre – procesamiento) se diseñó considerando el empleo de cables conductores apantallados dispuestos de forma trenzada (par trenzado), para procurar aislamiento adecuado e integridad de la señal neuronal.

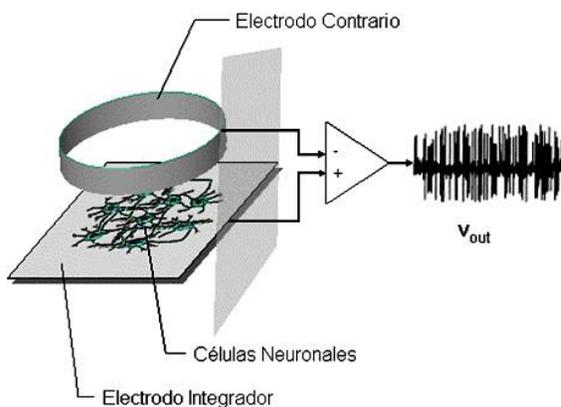


Figura 4. Diseño de pares electro – neuronales para adquisición – estimulación simple (Modificado de Silva, 2005)

Propuesta de diseño y construcción del sistema para la amplificación y pre – procesamiento (adecuación) de las señales neuronales obtenidas: La etapa de adquisición eléctrica de la información y conversión analógica – digital de la misma, se realizó analizando varias propuestas, eligiendo la opción que más se ajustaba a los requerimientos que exigía la naturaleza de la medición. Entre dichas opciones se destacan tres esquemas circuitales:

- Circuito constituido por amplificador de transistores MOS – bipolares.
- Circuito constituido por amplificador diferencial (basado en amplificador operacional de transconductancia) con filtro de banda pasante.
- Circuito constituido por amplificador diferencial (basado en amplificador de instrumentación) con filtro de banda pasante.

La elección de la propuesta que comprendería el diseño circuital de la etapa en cuestión, estuvo marcada por su factibilidad, la facilidad de su implementación, versatilidad, desempeño y su efectividad para adecuar y acondicionar las señales neuronales recibidas durante la etapa de adquisición (las cuales, como ya se ha mencionado, presentan una amplitud entre 500 μ Vp y 2 mVp y un rango de frecuencias desde los 100 Hz hasta los 2.000 Hz).

De acuerdo con estas consideraciones se pudo concluir que la tercera propuesta (Figura 5) es la que mejor se adapta a los requisitos establecidos; dicha propuesta estaba enmarcada por el empleo de un amplificador de instrumentación (implementado con el integrado “INA118”) realimentado negativamente con un circuito integrador, constituyendo un filtro activo pasa – altos (implementado con el integrado “TL084”) para eliminar la distorsión introducida por el ruido de 60Hz y para realizar la corrección de línea base (así como para eliminar las señales de “offset”), con una etapa final de filtrado pasa – bajo de cuarto orden, conformada por una configuración de condensador conmutado Butterworth anti – aliasing (implementado con el integrado “TLC04”) y un amplificador de aislamiento de alta precisión (implementado con el integrado “AD210”).

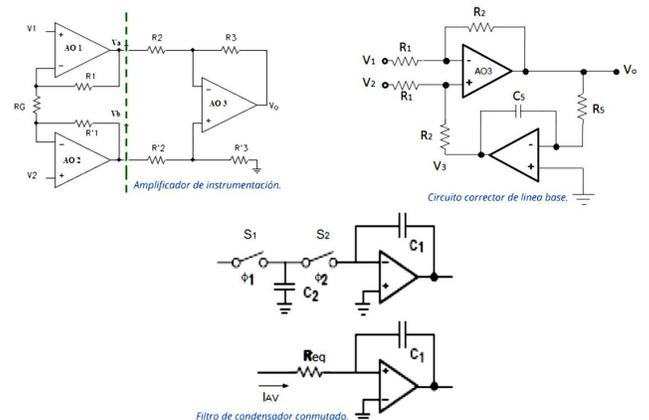


Figura 5. Circuito constituido por amplificador diferencial (basado en amplificador de instrumentación) con filtro de banda pasante

Por motivos prácticos y de disponibilidad se empleó una tarjeta de adquisición de datos de la compañía “National Instruments”, modelo “NI PCI – 6251” de 16 Bits, con 16 entradas para señales analógicas la cual es capaz de captar hasta 1.000.000 muestras por segundo (1 MS/s) en la configuración multicanal y 1.250.000 muestras por segundo (1,25 MS/s) en su configuración unicanal.

Propuesta de diseño e implementación de los algoritmos de procesamiento de las señales recibidas y extracción de parámetros relevantes de las mismas: En el proyecto se emplearon métodos de procesamiento de señales basados en transformadas de Ondículas, (“Wavelets transform”) ya que estos procedimientos permiten realizar análisis de señales no estacionarias (señales cuya frecuencia varía en el tiempo y cuyos momentos estadísticos no son constantes), como es el caso de las señales neuronales (Silva *et al.* 2005; Castaño *et al.* 2007), con funciones bases más apropiadas y gracias a la teoría de banco de filtros se logra tener mayor resolución a las frecuencias de interés.

Se requiere el empleo de ondículas que puedan ser escaladas y desplazadas en el tiempo, generando familias de señales que permitan obtener mayor resolución a determinadas frecuencias y así realizar un mejor análisis espectral de la misma (Daubechies, 1990).

Dado que la señal asociada con un potencial de acción es asimétrica y presenta una forma muy particular, es recomendable emplear para su representación una familia de ondículas que posean esta característica común y morfología semejante ya que la señal proveniente de la actividad eléctrica integrada de un conjunto de neuronas se genera a partir de la superposición de potenciales de acción pesados y desfasados en el tiempo. Por otro lado, la señal proveniente del micro registro de la actividad eléctrica de un conjunto neuronal puede presentar irregularidades (poca suavidad) y asimetría; por ende, para el análisis de esta señal se debería emplear una familia de ondículas que también presenten esta propiedad (Daubechies, 1990).

El procesamiento de la información se realizó de forma digital por medio de un software computacional (MATLAB), por ende es necesario utilizar familias de ondículas que permitan realizar transformadas discretas de las mismas y que presenten soporte compacto para facilitar y disminuir el tiempo de cómputo de los valores obtenidos. Considerando las características expuestas de la señal a analizar y comparándolas con las propiedades de algunas familias de ondículas comunes, se puede concluir que las que mejor se adaptan al procesamiento de la señal son la Daubechies (específicamente las ondículas “db3” y “bd4”),

Coiflets (específicamente las ondículas “coif2” y “coif3”) y Symlets (específicamente las ondículas “sym4”, “sym6” y “sym8”); dichas ondículas se presentan en la Figura 6.

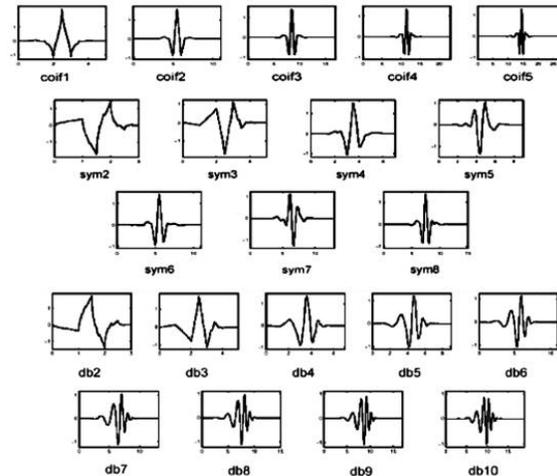


Figura 6. Familia de ondículas seleccionadas para representación de la información neuronal

En el caso de las mediciones de señales eléctricas de conjuntos neuronales, el ruido infiltrado es gaussiano o blanco y en los peores casos, presenta amplitudes de orden de magnitud semejante o mayor al de los biopotenciales neuronales (Matos & Cicerone, 2010). Las ondículas con gran soporte compacto tal como Daubechies de orden 24 (soporte compacto = 47) son más suaves pero presentan un mayor número de cambios de signo de pendiente y de cortes en cero (oscilaciones), tienen una resolución de frecuencia más fina por lo cual son más eficientes para filtrar ruido (Daubechies, 1990); realizando filtrados pasa – alto gracias a la descomposición de la señal en bancos de filtro.

Otras ondículas pueden ser empleadas para el filtrado del ruido, como las Symlets (a partir del orden 25); sin embargo, dichas señales bases presentan una alta variación por lo cual se requiere más capacidad de cómputo y tiempo (Donoghue, 2002).

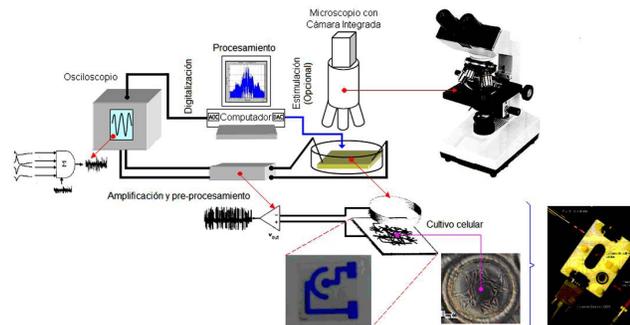


Figura 7. Sistema integrado que contempla módulos electrónicos para adquisición de las señales y comunicación con plataformas de procesamiento de la señal obtenida

En la Figura 7 se presenta un esquema representativo del sistema integrado que contempla la interconexión de las etapas descritas de la interfaz bioelectrónica (módulos electrónicos para adquisición de las señales y comunicación con plataformas de procesamiento de la señal obtenida).

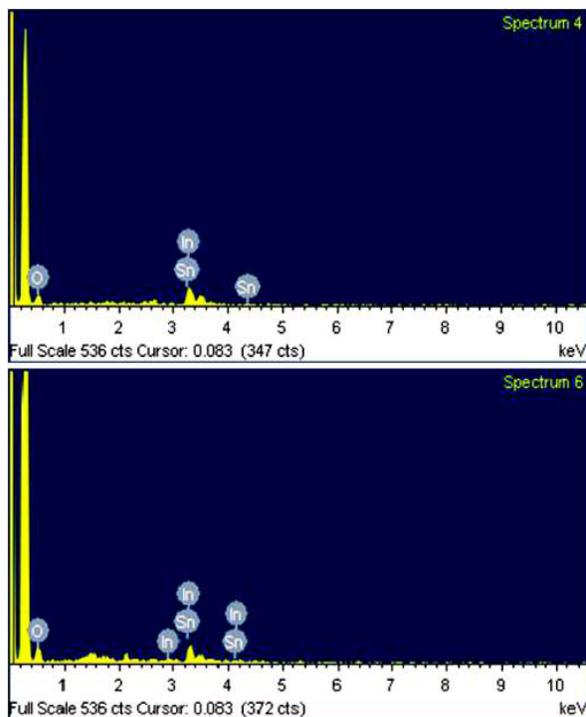


Figura 8. Análisis constitutivo de películas de “ITO” sobre: Muestra transparente (gráfica superior) y muestra opaca (gráfica inferior)

Resultados de la etapa de adquisición de las señales neuronales y/o estimulación del conjunto celular: Las películas de “ITO” se lograron depositar a través del equipo de pulverización catódica (chisporroteo) por magnetron DC (“DC – magnetron sputtering”) sobre láminas de vidrio (portaobjetos). El análisis constitutivo llevado a cabo con el microscopio electrónico de barrido, se realizó con el objetivo de determinar la influencia de la composición sobre la transparencia y conductividad de dos muestras extremas (una transparente y una opaca). En la Figura 8 se evidencia que la muestra de mayor transparencia (muestra 1) posee menos contenido de oxígeno que la muestra más opaca (muestra 2). Se pudiera concluir que la muestra más transparente debe contener mayor porcentaje de oxígeno según lo reportado. La relación In – Sn de la primera muestra es de 94% In y 6% Sn, en cambio, en la segunda muestra la relación es 86% In y 14% Sn, en consecuencia, no se puede realizar una comparación directa porque existen dos variables.

Empleando la pulverización catódica se debía someter al gas a una diferencia de voltaje que permitiese su ionización

(generación de plasma) y no fundiese el cátodo; por otro lado, se debía confinar dicho gas a una presión determinada para garantizar la eficiencia del procedimiento; sin embargo la eficiencia y la efectividad de la deposición también dependían del uso exclusivo del equipo.

Empleando la evaporación térmica al vacío, las deposiciones se lograban realizar con alta eficiencia (en menos de 15 minutos); sin embargo, la diferencia de puntos de ebullición de los elementos contribuyentes (In y Sn) hacía que la deposición o recubrimiento en el sustrato de vidrio no fuese uniforme, por lo cual la aplicación de esta técnica es muy complicada y de baja efectividad; además se requería la presencia de oxígeno para poder oxidar los materiales a depositar; evaluando estas técnicas, se puede observar que realizando recubrimientos por medio de la pulverización catódica se lograron tener películas de “ITO” conductoras y transparentes, a diferencia de las películas depositadas con el evaporador térmico al vacío, que sólo contenían la aleación de indio y estaño (IT), eran opacas y no eran conductoras. Con el fin de mejorar la efectividad de la técnica de evaporación térmica, se podría emplear plasma de oxígeno generado por un electrodo de radiofrecuencia entre el crisol de tungsteno y el sustrato.

Se realizaron deposiciones variando la cantidad de oxígeno presente en la cámara de “sputtering”, obteniendo una muestra transparente y una muestra opaca. Se observa que la relación In – Sn de la muestra transparente es de 94% In y 6% Sn, en cambio, la muestra opaca posee una relación de 86% In y 14% Sn, ocasionando que la primera muestra sea menos conductora que la segunda, a pesar de que esta última esté más oxidada; los resultados obtenidos se presentan por medio de los diagrama de columnas de las Figuras 9 y 10.

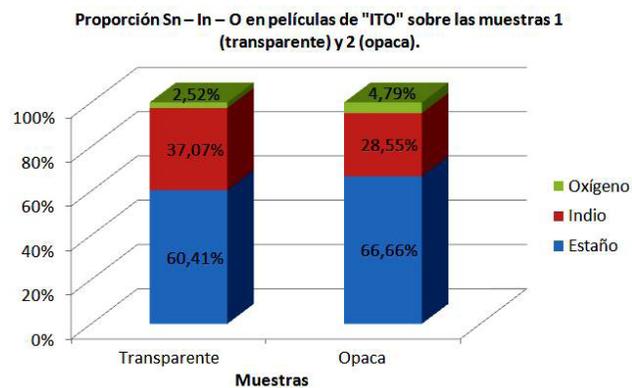


Figura 9. Diagrama de columnas representativo de la constitución del “ITO” en las muestras

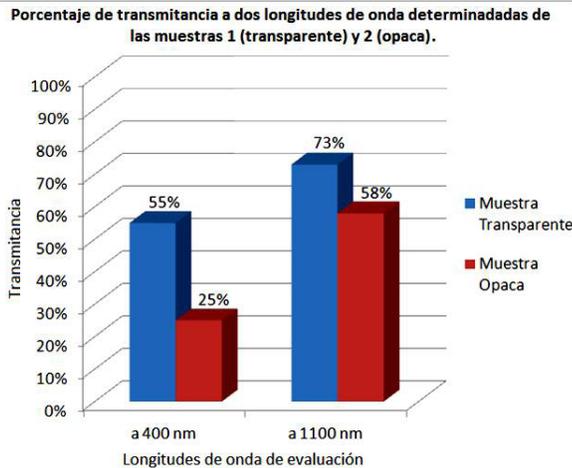
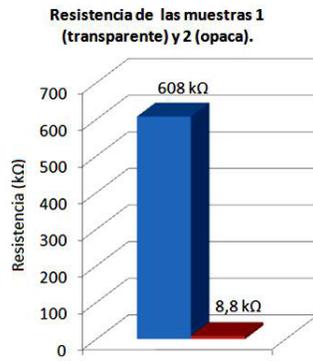


Figura 10. Características generales de las películas de “ITO” en las muestras analizadas. A la izquierda se presentan las resistividades eléctricas de ambas muestras y a la derecha se presentan los porcentajes de transmitancia analizados a dos longitudes de onda

Analizando los diagramas presentados en las Figuras 8 y 9, y evaluando los resultados obtenidos se pueden realizar las siguientes afirmaciones, concluidas a partir de la experiencia:

La conductividad térmica y la transparencia de las películas de “ITO” depositadas sobre los porta objetos (sustratos de vidrio) están determinadas, por el contenido de oxígeno y de estaño.

La conductividad eléctrica y la transparencia de las películas de “ITO” dependen, por otro lado, de la estructura de bandas energéticas del indio, dado que mientras más dopado se encuentre el óxido de indio, menor será la brecha de energía entre la banda de conducción y la banda de valencia, aumentando así la concentración de portadores de carga y disminuyendo la resistencia eléctrica y transparencia de las películas depositadas. El contenido de oxígeno es importante para la determinación de las propiedades electro-ópticas de las películas de “ITO”; sin embargo, este factor se desplaza a un segundo plano porque la relación In – Sn

no es constante entre las muestras.

Resultados de la etapa de amplificación, pre – procesamiento (acondicionamiento) y digitalización de la señal adquirida: Con el objetivo de evaluar el funcionamiento real de la plataforma de hardware implementada para constituir el filtro pasa banda, comprendido de forma ideal entre los 100 Hz y los 2 kHz, se realizó un barrido de frecuencias para la señal de entrada de dicho filtro, analizando la ganancia de la señal de salida del sistema en comparación con la ganancia otorgada por el amplificador de instrumentación (ganancia de 10); como se puede observar en la Figura 11, la frecuencia inferior a la cual se reduce a la mitad la ganancia del sistema realimentado (ganancia de -3 dB), corresponde a los 85 Hz (atenuando así el ruido de 60 Hz proveniente de líneas de alimentación eléctrica externas), donde se ubica entonces la primera frecuencia de corte de dicho filtro de primer orden. La frecuencia superior a la cual se reduce a la mitad la ganancia del sistema que comprende el filtro (ganancia de -3 dB), corresponde a los 2,17 kHz (cerca a los 2 kHz establecidos en los requerimientos), donde se ubica entonces la frecuencia de corte de dicho filtro de cuarto orden.

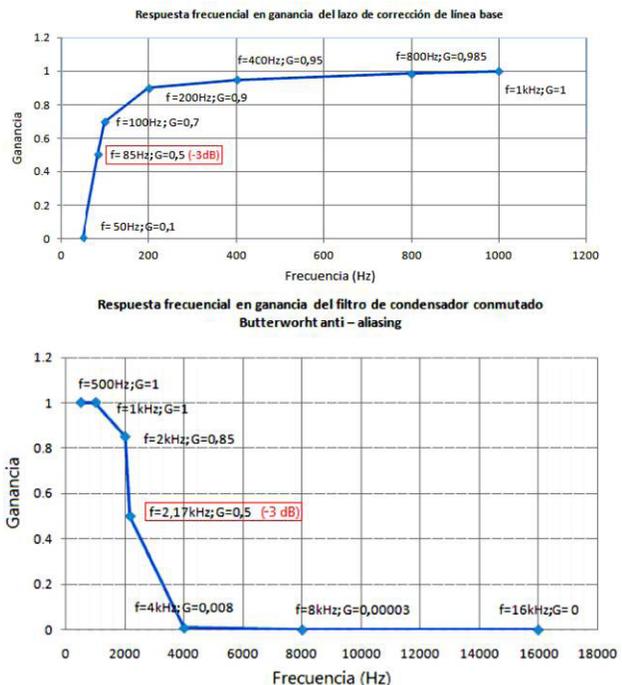


Figura 11. Respuesta frecuencial de magnitud de sistema de amplificación y pre – procesamiento

Posteriormente se analizaron las diferencias entre estas frecuencias de corte establecidas y las frecuencias reales obtenidas (de 85 Hz para la frecuencia de corte inferior y de 2,17 kHz para la frecuencia de corte superior); los errores

obtenidos se muestran en el diagrama de barras de la Figura 12, observando que para la frecuencia de corte inferior el error es mayor al obtenido para la frecuencia de corte superior.

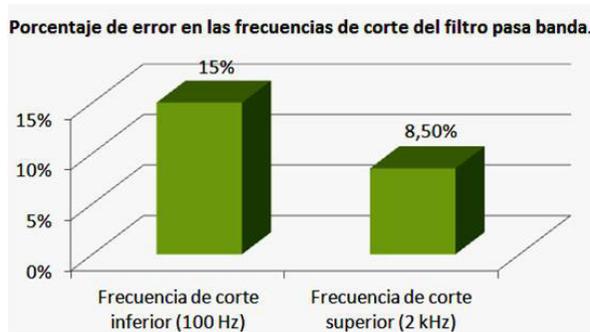


Figura 12. Porcentaje de error entre las frecuencias de corte inferior y superior del filtro pasa banda configurado

Los porcentajes de error mostrados en la Figura 11, se deben principalmente a que el ancho de banda del filtro pasa banda se constituyó por la intersección de los anchos de banda de un filtro pasa – alto de primer orden y un filtro pasa – bajo de cuarto orden; la ganancia de un filtro de primer orden varía aproximadamente 20 dB por década mientras que la ganancia de un filtro de cuarto orden varía 4 veces más rápido (80 dB por década), por lo cual el filtro de cuarto orden es más preciso y su frecuencia de corte (frecuencia a la cual se atenúa la ganancia 3 dB) es mucho más cercana a la calculada y esperada, a diferencia del filtro de primer orden cuya pendiente es más suave y este punto de -3dB de ganancia (mitad de la ganancia) puede distanciarse más de la frecuencia establecida.

Por otro lado, es muy importante destacar que al emplear un filtro pasa – bajo Butterworth de cuarto orden para limitar la frecuencia superior de corte, conjuntamente con un sistema digitalizador configurado a una alta velocidad de muestreo (superior a los 20 kHz) para señales neuronales, como indica la literatura (Gaumond *et al.* 2002) y un cuantizador superior a los 12 bits (en este caso particular, la tarjeta “NI PCI – 6251” ofrece 16 bits de cuantización) se logró disminuir considerablemente el error por “aliasing” embebido en el proceso de digitalización de la información al aumentar la tasa de muestreo como se puede apreciar en la Figura 13, en la cual se consideraron tres casos de muestreo y los resultados experimentales para cada uno de ellos:

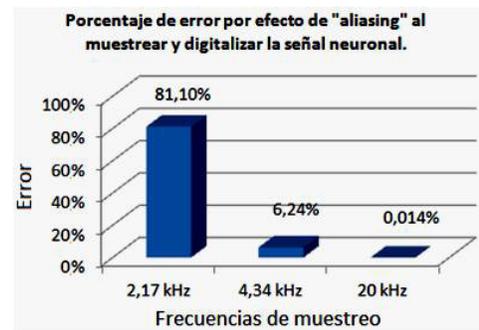


Figura 13. Porcentaje de error por efecto de “aliasing” para diferentes frecuencias de muestreo

Resultados de la etapa de procesamiento de la señal: La descomposición de mayor nivel – para “LPF(n.ω)” – de cada ondícula presentada, ofrece gran información sobre la magnitud de la actividad eléctrica neuronal; altos valores de dicha magnitud están relacionados con espacios de tiempo donde la activación eléctrica de las neuronas es más intensa y donde la tasa de disparos de las mismas es mayor, lo cual indica mayores niveles de comunicación celular, sincronización neuronal, sinaptogénesis, entre otros. Por el contrario, bajos valores de esta magnitud indican menores tasas de disparo de las neuronas, depresión eléctrica de la población y un menor nivel de sincronización. Dicha afirmación se puede aseverar por medio de las gráficas presentadas en la Figura 14 para la descomposición de una señal neuronal con la familia de ondículas “sym8”

En la Figura 15 se presentan los valores de los coeficientes de ondícula (transformada con “sym8”), mostrando mayor resolución a bajas frecuencias; se puede observar que el ancho de banda de la señal, calculado por medio de esta ondícula, representa una mejor aproximación a las características frecuenciales de la misma.

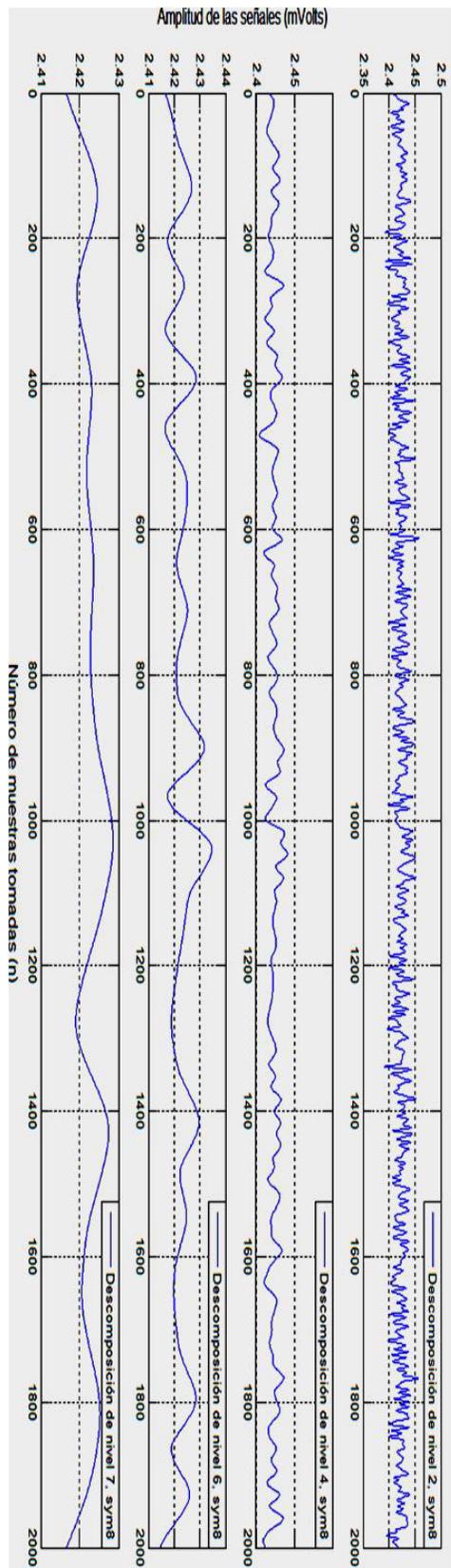


Figura 14. Descomposición de la señal neuronal en sus elementos de baja frecuencia, a los niveles especificados, empleando la ondícula "sym8"

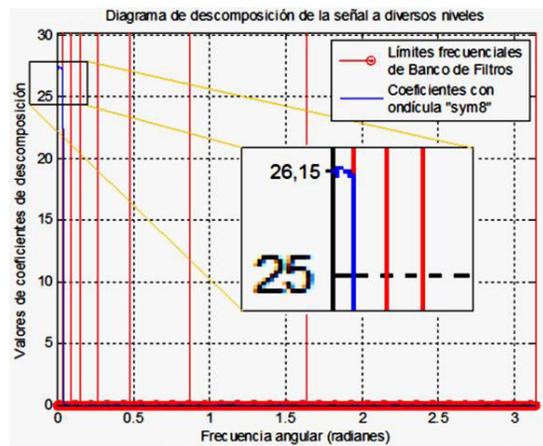


Figura 15. Coeficientes de ondícula "sym8" en función del dominio frecuencial

En las Figuras 16 y 17 se demuestran las similitudes estadísticas del procesamiento con las familias de ondículas seleccionadas.

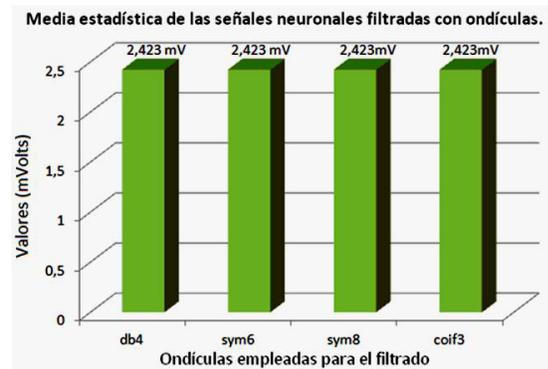


Figura 16. Media estadística de las señales neuronales filtradas con ondículas

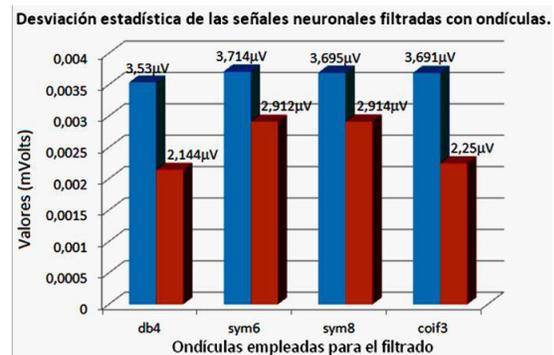


Figura 17. Desviación estándar de las señales neuronales filtradas con ondículas

A continuación se realizó la evaluación de los resultados obtenidos a partir de la práctica de los procedimientos de eliminación de ruido gaussiano basados en filtrados pasa – alto con ondículas, para lo cual se promediaron los valores del error cuadrático medio ($\langle \epsilon^2 \rangle$) y la relación señal a ruido (SNR) de la señal filtrada con distintas ondículas Daubechies

“db24” – “db30”, relacionándolas, por medio de la gráfica que presenta la Figura 18, con las características de la señal contaminada con el ruido gaussiano.

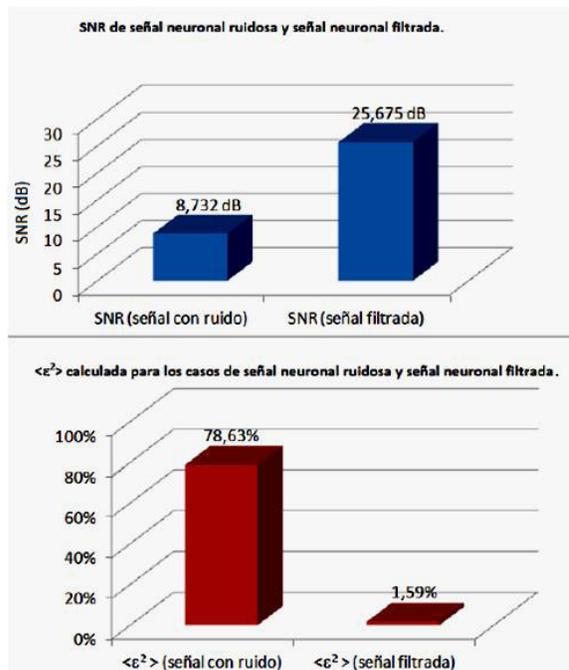


Figura 18. “SNR” y “ $\langle \epsilon^2 \rangle$ ” calculado para los casos mencionados

Se puede apreciar como los procedimientos de filtrado pasa – alto implementados con ondículas de alto orden (“db24” – “db30”) permitieron eliminar en una gran proporción el factor de distorsión agregado (ruido gaussiano), aumentando casi tres veces la relación señal a ruido y alcanzando un error cuadrático medio, entre la señal original y la señal filtrada, cercano al 1,6 %, lo que significó una disminución de casi 50 veces el error cuadrático medio calculado entre la señal original y la señal neuronal ruidosa, por lo cual se puede certificar la calidad y efectividad de estos procedimientos (empleo de banco de filtros pasa – alto con ondículas).

A partir de la experiencia y de la evaluación de los resultados obtenidos, se pueden realizar las siguientes afirmaciones:

La descomposición de la señal neuronal por medio de filtros pasa – bajo “LPF(n.ω)” (“Low Pass Filter”, donde: “n” representa el nivel de descomposición), ofrece gran información sobre la magnitud de la actividad eléctrica neuronal, así como lo ofrece el cálculo de la desviación estándar de la misma; altos valores de dicha magnitud están relacionados con espacios de tiempo en los cuales la activación bioeléctrica de las neuronas es más intensa y la tasa de disparos de las mismas es mayor, lo cual indica mayores niveles de comunicación celular, sincronización neuronal, sinaptogénesis, entre otros. Por el contrario, bajos

valores de esta magnitud indican menores tasas de disparo de las neuronas, depresión eléctrica de la población y un menor nivel de sincronización (incluso, muerte celular).

A medida de que aumenta el nivel de descomposición del filtro pasa – bajo, la ondícula madre empleada se ensancha en tiempo por lo cual tiene mayor resolución frecuencial (el ancho de banda de dicha ondícula se hace más estrecho); es decir, el cálculo de cada uno de los valores de la señal filtrada considera más puntos de la señal neuronal, por lo cual la señal procesada presenta mayor suavidad; caso contrario ocurre cuando el nivel de descomposición es menor.

Las ondículas que permitieron obtener mayor resolución de la información, relacionada con las componentes de baja frecuencia de la señal neuronal, fueron las ondículas “db3”, “db4” y “sym4”, las cuales ofrecieron ocho niveles de descomposición o filtrado; seguidamente se encuentran las ondículas “coif2”, “sym6” y “sym8” que ofrecieron siete niveles de descomposición o filtrado y por último se encuentra la ondícula “coif3” la cual ofreció seis niveles de descomposición o filtrado.

La descomposición de la señal neuronal por medio de filtros pasa – alto “HPF(n.ω)” (“High Pass Filter”, donde “n” representa el nivel de descomposición), permite resaltar determinadas componentes de alta frecuencia de la señal como el ruido (aunque este puede ser también gaussiano o blanco, y en los peores casos, presenta amplitudes de orden de magnitud semejante o mayor al de los biopotenciales neuronales), para poder eliminar dicha perturbación de la señal de interés representada por los biopotenciales neuronales únicamente.

Por otro lado, empleando la transformada ondícula se puede monitorear la variación temporal del ancho de banda de las señales neuronales; por ejemplo si dicho ancho de banda decrece a lo largo del tiempo se puede sugerir que han ocurrido movimientos de las neuronas lejos de los electrodos debido a la encapsulación o a la deposición de proteínas.

CONCLUSIONES

El proyecto desarrollado permitió establecer las bases, de un procedimiento técnico y experimental, vinculadas con el desarrollo de una interfaz bioelectrónica de comunicación eléctrica con poblaciones neuronales, para obtener parámetros relevantes sobre su comportamiento ante entornos definidos o para estimularlas y generar determinadas respuestas de la misma.

Por otro lado, con este trabajo queda demostrada la factibilidad técnica para la fabricación de este tipo de dispositivos bioelectrónicos dentro de Venezuela utilizando procesos sencillos y poco costosos.

Una vez evaluadas un conjunto de posibilidades técnicas y económicas así como la viabilidad de recursos materiales y humanos en el ámbito universitario y empresarial nacional, se diseñó un sistema modular apropiado para: la adquisición de señales bioeléctricas y/o la estimulación de dichas poblaciones por medio de electrodos (fabricados con "ITO" depositado en portaobjetos), el registro de la información obtenida por medio de la tecnología brindada por el amplificador de instrumentación y las tarjeta de adquisición de "National Instrument", así como la evaluación de los resultados empleando métodos de procesamiento de señales basadas en transformada de ondículas (específicamente las Daubechies, Coiflets y Symlets); siguiendo los lineamientos dictados por los objetivos, alcance y limitaciones del proyecto.

Por medio de los mecanismos, algoritmos y métodos presentados en el capítulo anterior, se evaluaron las distintas etapas del sistema modular que constituye la interfaz bioelectrónica, determinando su correcto funcionamiento y que el sistema diseñado responde a los objetivos planteados.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Facultad de Ciencias de la ilustre Universidad Central de Venezuela, docentes (especialmente Antonio D'Alessandro y Pedro Rojas) y personal técnico que brindaron gran apoyo al presente proyecto. Por otro lado deseamos agradecer a la ilustre Universidad Simón Bolívar, profesores (especialmente Germán González, Guillermo Villegas, Luis Lara Estrella, Luis Azpúrua y Álvaro Herrera) y ayudantes técnicos (Rubén Lugo y Zhayda Sierra), ya que sin ellos este trabajo no habría sido posible. Ricardo Silva agradece especialmente al Programa Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología del Ecuador.

REFERENCIAS

ALTUNA, A., BELLISTRI, E., CID, E., AIVAR, P., GAL, B., BERGANZO, J. (2013). SU-8 based microprobes for simultaneous neural depth recording and drug delivery in the brain. royal society of chemistry, Revista lab on a chip, N° 13, PP.1422-1430.

BARRETT, E. W., PHELPS, MWITA V.B.; SILVA, B., R. J. GAUMOND, R. P., ALLCOCK, H. R. (2004). Patterning Poly (organophosphazenes) for Selective Cell Adhesion Applications. Pennsylvania State University.

BARRETT, E. W; SILVA, B., . J., WILSON, D. E., DONALD, N. GAUMOND R. P. ALLCOCK, H. R. (2005). Novel Material for Patterned Neural Networks". Pennsylvania State University.

CASTAÑO, J.P., GARCÍA, Q.F., VILLA, M.A. (2007). Interfaces neuronales y sistemas máquina cerebro: fundamentos y aplicaciones.

CUCULLO, L., DINI, G., HALLENE, K.L., FACIO, V., ILKANICH, E., V., IGOBECHI, C., KIGHT, K.M., AGARWAL, M. K., GARRITY-MOSES, M., JANIGRO, D. (2005). Very low intensity alternating current decreases cell proliferation. *Glia*. 51(1):65-72.

DAUBECHIES, I. (1990). The wavelet transform, time-frequency localization and signal analysis, *IEEE Transactions on Information Theory*, vol. 36, N° 5, Septiembre.

DONHOUGHUE, P. (2002). Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces. Nature Publishing Group.

GAUMOND, R., MOYER, J., SILVA, R.J. (2002). A whole – cell neurosensor simulation of summed asynchronous neural activity. Pennsylvania State University.

LEAL C., R., DELGADO G., J.M., GRUART, A. (2013). The Rostral Medial Prefrontal Cortex Regulates the Expression of Conditioned Eyelid Responses in Behaving Rabbits, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España.

MATOS, M.A. & CICERONE, M.T. (2010). Alternating current electric field effects on neural stem cell viability and differentiation. *Biotechnol Prog.*:664-70.

NAVARRO, X., KRUEGER, T.B., LAGO, N., MISERA, S., STIEGLITZ, T., DARIO, P. (2005). A critical review of interfaces with the peripheral nervous. *Journal of the Peripheral Nervous System* 10:229 – 258.

OROZCO, A., GUARNIDO, C., ECHEVERRI, J. (2006). Análisis de reducción de ruido en señales provenientes de microelectrodos de registro. *Sienta et Técnica Año XII, No 32. UTP. ISSN 0122-1701* 55.

- SAYAS, S. (2005). Procesamientos posteriores a la etapa de adquisición de señales nerviosas en dispositivos implantables neuronales. Núcleo de Ingeniería Biomédica (Facultad de Medicina y Facultad de Ingeniería, UDELAR), Montevideo, Uruguay.
- SILVA, B., RICARDO, J. ZOOK, J., GAUMOND, R. P. (2003). Extraction of action potential waveform from summed neural signals. Pennsylvania State University.
- SILVA B., R. J. (2005). Neuroblastoma biosensor system. Pennsylvania State University.
- SILVA B., R. J., BARRETT, E. W. KOWAL, J., KIM, J., ALLCOCK, H. R.. GAUMOND, R. P. (2005). A Synaptogenic Pacing Cell Line. Neuroblastoma biosensor system. Pennsylvania State University.
- WOOD, F., BLACK, M.J., VARGAS-IRWIN, C., FELLOWS, M., DONOGHUE, J.P. (2004). On the variability of manual spike sorting. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, Volumen. 51, No 6, pp. 912.