Diseño e implementación de un implante para el registro crónico de actividad neuronal en roedores en libre movimiento

E. Lopetegui, M.J. Nicolás, S. Arrieta, I. Cordón, M. Alegre, J. Artieda, M. Valencia

Laboratorio de Neurofisiología Clínica, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, Pamplona, España, elopetegui.1@alumni.unav.es, mvustarroz@unav.es

Resumen

Se presenta el diseño e implementación de un implante crónico para el registro de actividad neuronal en roedores de pequeño tamaño. El sistema está construido mediante impresión 3D combinando algunos componentes de acero y ofrece la posibilidad de incluir varios micro-manipuladores independientes. Testeado en animales en libre movimiento ha demostrado ser capaz de obtener 16 canales de actividad unitaria y de campo distribuidos en 4 estructuras diferentes mediante electrodos que se mueven independientemente con precisión micrométrica.

1. Introducción

En las últimas décadas los hallazgos obtenidos en genética y biología molecular han supuesto una revolución en neurociencias. Sin embargo, y dado que estamos muy lejos de comprender las bases neuronales que gobiernan procesos motores o cognitivos como la memoria, la navegación espacial, la toma de decisiones o la planificación de movimientos [1][2], resulta imprescindible llevar a cabo registros electrofisiológicos a nivel cerebral. Estos procesos implican la coordinación de diferentes estructuras cerebrales; circunstancia que determina la necesidad de realizar registros simultáneos en distintos puntos del cerebro [3]-[5]; registros que además han de ofrecer información acerca de la actividad neural a diferentes niveles, desde el actividad unitaria (neurona individual) hasta otros más globales (como los potenciales de campo local o electrocorticográficos) [6].

Si bien es posible obtener esta información a partir de estudios realizados en humanos (ya sean pacientes o sujetos sanos), frecuentemente se plantean cuestiones éticas que impiden esta posibilidad y que por tanto motivan la realización de estudios neurofisiológicos en modelos experimentales. Generalmente estos modelos animales se desarrollan sobre animales de pequeño tamaño (roedores). Por tanto, esto hace que se dificulten las tareas de registro de actividad neuronal, máxime cuando los animales están despiertos y en libre movimiento. En este contexto, y a fin de no alterar la conducta de los animales, se diseñan implantes que van fijados sobre el cráneo y que han de ser tan pequeños y ligeros como sea posible. Estas soluciones incorporan la utilización de micro-manipuladores que permiten desplazar los electrodos con alta precisión y han sido utilizadas para realizar implantes agudos [7][8], semicrónicos [9] y crónicos [10]. Generalmente los implantes son diseñados por empresas especializadas y tienen costes muy elevados. Como alternativa, varios laboratorios han intentado desarrollar sus propios sistemas [11][12], dando lugar a soluciones sólo un poco más flexibles y asequibles que las comerciales.

Aquí presentamos una solución basada en el modelado mediante impresión en 3D [13]–[16] que consta de varios micro-manipuladores independientes que permiten obtener actividad neurofisiológica (a nivel global e unitario) en animales de pequeño tamaño en libre movimiento y que siendo de coste bajo, ofrece una gran flexibilidad en el diseño. Respecto a otras soluciones propuestas, la que aquí se presenta permite registrar por primera vez actividad de diferentes núcleos distantes mediante este tipo de dispositivos.

2. Material y métodos

2.1. Carcasa y micro-manipuladores

El implante consta de una carcasa, 4 micro-manipuladores implementados mediante pletinas que se desplazan por medio de un sistema de tornillo sinfín y una tapa que cierra la carcasa y que sirve para conectar los electrodos al equipo de registro (Figura 1).



Figura 1. Elementos del sistema de micro-manipuladores. A) carcasa; B) tapa; C) pletina; D) tornillo; E) barra de acero.

El diseño ha sido realizado utilizando software de código abierto para el modelado de piezas en 3D (FreeCAD, http://freecadweb.org/). En la construcción de los elementos plásticos se ha utilizado una impresora ProJet® 3510 HD (3D systems, South Carolina, USA), cuya precisión es de 25 μ m. El material utilizado es resina acrílica fotosensible de color blanco que emula las características mecanofísicas del ABS.

El emplazamiento de los micro-manipuladores se define en base a la localización de las dianas de registro. En este ejemplo se han definido como dianas diferentes núcleos de los ganglios de la base y del tronco cerebral. Sin embargo, y dada la versatilidad del diseño, éste puede modificarse y ajustarse a las necesidades concretas de cada experimento.

Las pletinas constan de dos agujeros: uno de ellos roscado para alojar el tornillo sinfín y otro en el que se envainan los electrodos.

La tapa ha sido diseñada de forma que puede albergar dos conectores unidos mediante resina epoxi (Ultraminiature PCB socket connector, 10 contactos, Preci-Dip, www.precidip.com). Los electrodos van crimpados al propio conector que sirve de interfaz entre los electrodos y los terminales del sistema de adquisición.

2.2. Electrodos de registro

А fin de cumplir con el objetivo de registrar simultáneamente actividad unitaria extracelular y de potenciales de campo local el implante utiliza tetrodos: electrodos construidos mediante 4 hilos trenzados que dan lugar a electrodos de reducidas dimensiones (del orden de micrómetros), que cumplen con los requerimientos de impedancia para el registro de las actividades planteadas [17] y que además posibilitan la utilización de técnicas de procesamiento de señal que permiten aislar potenciales de acción a partir de actividad multi-unitaria [18] (spikesorting). En nuestro caso, el implante consta de 4 tetrodos (4 tetrodos x 4 canales/tetrodo = 16 canales en total) que pueden desplazarse independientemente a lo largo de cada una de las estructuras diana ajustando los micromanipuladores.

En la fabricación de los tetrodos se han utilizado hilos de iridio-platino de 17 μ m (California Fine Wire, USA), los cuales van trenzados. El proceso de construcción de éstos es muy similar al propuesto por Liao y cols.[19], con ligeras modificaciones, y da como resultado tetrodos con un nivel de rigidez mayor al que se obtiene utilizando el protocolo tradicional. Finalmente, y para salvaguardar la integridad de los tetrodos al ajustar el micro-manipulador, éstos se embeben en una vaina de acero inoxidable (Coopers Needle Works Limited, Birmingham, UK).

2.3. Montaje del implante

Para el montaje del micro-manipulador primeramente se hace un agujero en las pletinas para el tornillo y se rosca para que pueda ajustarse el tornillo sinfín (Figura 2A). Con los tornillos metidos en las pletinas, se pegan las barras de acero inoxidable en el otro agujero (Figura 2B).

Usando pines de oro se crimpan los electrodos al conector y se pega el conector a la tapa con adhesivo instantáneo. Se meten las pletinas en la carcasa y se cierra la carcasa con la tapa (Figura 2C). Con ayuda de un destornillador, se comprueba que las barras de acero bajan (sentido antihorario, Figura 2D) y suben (sentido horario, Figura 2E). Para acabar, la tapa se fija a la carcasa con un tornillo y adhesivo instantáneo.

Cada pletina tiene un recorrido de 4,5 mm, lo que permite abarcar la extensión total de la práctica totalidad de las estructuras cerebrales de los roedores, desde su porción más dorsal hasta su porción más ventral.

2.4. Testeo del implante

El diseño ha sido testeado en el propio Laboratorio de Neurofisiología Clínica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Universidad de Navarra) siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra. El sistema se ha implantado tanto en ratas como en ratones, realizándose registros con los animales despiertos durante sueño fisiológico y mientras realizan diferentes tareas comportamentales; siempre en libre movimiento.



Figura 2. (A-E) Esquema del montaje del micro-manipulador paso a paso. A) roscar el tornillo en las pletinas, B) pegar las barras de acero en el otro agujero de cada pletina; C) crimpar los electrodos y pegar el conector en la tapa y los electrodos en las barras; D-E) comprobar que funciona el mecanismo de cada micro-manipulador. F) Representación del resultado final una vez montado y, G) implantado en el animal.

3. Resultados

Los registros realizados demuestran que el implante diseñado tiene la capacidad de obtener registros con una alta estabilidad.

En la Figura 3 se observa el aspecto real del implante (Figura 3A), y el aspecto del resultado final del sistema de micro-manipuladores sobre un animal real (Figura 3B). Además, se muestra como ejemplo la actividad oscilatoria de 4 canales del propio animal en libre movimiento (Figura 3C). Aquí, se puede observar actividad de potenciales de campo en todos los canales de registro, además de apreciarse potenciales de acción de forma simultánea en los 3 últimos canales. De la actividad multi-unidad de estos tres canales, se han aislado mediante la técnica de *spike-sorting* los disparos de cuatro neuronas individuales (Figura 3D).



Figura 3. A) Aspecto real del sistema de micro-manipuladores.
B) Ejemplo de un animal implantado. D) Registro electrofisiológico de potenciales de campo local y potenciales de acción con el animal implantado en libre movimiento. E) Actividad unitaria aislada.

Los registros son estables a lo largo de diferentes sesiones. El movimiento de los animales tampoco afecta a la calidad de las señales, y el desplazamiento individual de uno de los micro-manipuladores no afecta a la señal del resto de electrodos. Además, los requerimientos de nuestros experimentos han hecho que los animales estén implantados alrededor de 5 semanas, sin que este hecho haya comprometido la calidad de la señales del registro, pudiendo seguir a lo largo de varios días la actividad unitaria. En la Figura 4 se puede observar la estabilidad del registro de tres días diferentes. Se ha promediado el espectro de potencias de cinco animales explorando en campo abierto los días 11, 27 y 35 de registro sin hallar diferencias significativas.

Análisis histológicos posteriores permiten determinar con exactitud la localización de los puntos de registro con una resolución comparable a la ofrecida por las soluciones comerciales.

Una de las características esenciales a requerir por todo implante es su ligereza, para mayor comodidad del animal. En cuanto al sistema de 4 micro-manipuladores y 16 canales de registro, el implante (con el conector incluido) pesa 2,30 g, que no supone más que aproximadamente el 0,6 % del peso total de los animales en los que se implanta (ratas adultas). También se ha diseñado otro implante que consta de un micromanipulador con 8 canales de registro para implantar en ratones cuyo peso es de 0,48 g (en torno al 2 % del peso de un ratón adulto).

Destacar que el coste de nuestra implementación resulta ser en torno a 8 ó 10 veces menor que el ofrecido por otras soluciones comerciales o experimentales [16], soluciones que por otro lado resultan mucho más rígidas a la hora de definir el número y la localización de las dianas del registro.



Figura 4. Media y desviación estándar del espectro de potencias de cinco animales implantados los día 1 (azul), 17 (rojo) y 25 (verde) post-cirugía.

4. Discusión

En esta comunicación presentamos el diseño e implementación de un sistema de registro multi-canal para realizar registros de actividad neuronal en distintos puntos del cerebro de modelos animales basados en roedores. El sistema es flexible, fácilmente modificable y de bajo coste.

La tecnología utilizada está basada en la impresión en 3D; tecnología que permite obtener prototipos de bajo coste con alta precisión y prestaciones además de robustez y que ha sido utilizada en diferentes entornos, desde joyería con plata y oro, hasta en la impresión de órganos humanos [20], incluyendo orejas biónicas [21], huesos [22], agregados de células [23] y vasos sanguíneos [24] entre otros.

El sistema propuesto protege los micro-manipuladores mediante una carcasa implementada en un material de impresión de altas prestaciones, dotándolo de robustez suficiente para ser utilizado en entornos en los que los animales están en libertad de movimiento (y por tanto el implante puede sufrir deperfectos) sin que por ello la calidad de la señal se vea afectada.

La utilización de micro-manipuladores independientes permite el registro simultáneo de actividad oscilatoria en diferentes estructuras cerebrales y abre la posibilidad de realizar estudios a nivel de circuitos. Por otro lado, la precisión micrométrica en el desplazamiento de los electrodos hace mucho más accesible poder obtener potenciales de acción de un mayor número de neuronas en un mismo animal, lo que permite reducir el número de animales involucrados en los experimentos.

Testeado bajo condiciones reales, tanto en ratas como en ratones, el sistema ha demostrado ser capaz de obtener registros de actividad oscilatoria neuronal de forma precisa y fiable.

Por todo ello consideramos que el sistema aquí propuesto tiene un gran potencial para ser utilizado de forma rutinaria en estudios electrofisiológicos en modelos animales orientados a ampliar nuestro conocimento acerca de los procesos neuronales involucrados en el normal/anormal funcionamiento cerebral.

Agradecimientos

Eneko Lopetegui agradece el apoyo del Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco, Programa Predoctoral.

También queremos agradecer al Dr. Juan Mena-Segovia de la Universidad de Oxford y al Dr. Todor Gerdjikov de la Universidad de Leicester su consejo y ayuda en el prototipo.

Referencias

- [1] Johnson A, Van der Meer MAA, Redish AD. Integrating hippocampus and striatum in decision-making. *Curr. Opin. Neurobiol.*, Vol 17, No 6, 2007, pp 692–5.
- [2] Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory, *Neuron*, Vol 35, No 4, 2002, pp. 625–16.
- [3] López-Azcárate J, Nicolás MJ, Cordon I, Alegre M, Valencia M, Artieda J. Delta-mediated cross-frequency coupling organizes oscillatory activity across the rat cortico-basal ganglia network. *Front. Neural Circuits*, Vol. 7, 2013.
- [4] Nicolás MJ, López-Azcárate J, Valencia M, Alegre M, Pérez-Alcázar M, Iriarte J, Artieda J. Ketamine-induced oscillations in the motor circuit of the rat basal ganglia. *PloS One*, Vol 6, No 7, 2011, p e21814.
- [5] Valencia M, López-Azcárate J, Nicolás MJ, Alegre M, Artieda J. Dopaminergic modulation of the spectral characteristics in the rat brain oscillatory activity. *Chaos Solitons Fractals*, Vol 45, No 5, 2012, pp 619–9.
- [6] Nicolelis MAL, Ghazanfar AA, Faggin BM, Votaw S, Oliveira LMO. Reconstructing the Engram: Simultaneous, Multisite, Many Single Neuron Recordings. *Neuron*, Vol 18, No 4, 1997, pp 529–8.
- [7] Gray CM, Goodell B, Lear A. Multichannel micromanipulator and chamber system for recording multineuronal activity in alert, non-human primates. J. *Neurophysiol.*, Vol 98, No 1, 2007, pp 527–9.
- [8] Santos L, Opris I, Fuqua J, Hampson RE, Deadwyler SA. A novel tetrode microdrive for simultaneous multi-

neuron recording from different regions of primate brain. *J. Neurosci. Methods*, Vol 205, No 2, 2012, pp 368–6.

- [9] Galashan FO, Rempel HC, Meyer A, Gruber-Dujardin E, Kreiter AK, Wegener D. A new type of recording chamber with an easy-to-exchange microdrive array for chronic recordings in macaque monkeys. J. Neurophysiol., Vol 105, No 6, 2011, pp 3092–13.
- [10] Feingold J, Desrochers TM, Fujii N, Harlan R, Tierney PL, Shimazu H, Amemori,K-I, Graybiel AM. A system for recording neural activity chronically and simultaneously from multiple cortical and subcortical regions in nonhuman primates. *J. Neurophysiol.*, Vol 107, No 7,2012, pp 1979–16.
- [11] Battaglia FP, Kalenscher T, Cabral H, Winkel J, Bos J, Manuputy R, Van Lieshout T, Pinkse F, Beukers H, Pennartz C. The Lantern: An ultra-light micro-drive for multi-tetrode recordings in mice and other small animals. *J. Neurosci. Methods*, Vol 178, No 2, 2009, pp 291–9.
- [12] Rennaker RL, Ruyle AM, Street SE, Sloan AM. An economical multi-channel cortical electrode array for extended periods of recording during behavior. J. *Neurosci. Methods*, Vol 142, No 1, 2005, pp 97–8.
- [13] Chang EH, Frattini SA, Robbiati S, Huerta PT. Construction of microdrive arrays for chronic neural recordings in awake behaving mice. J. Vis. Exp. JoVE, No 77, 2013, p e50470.
- [14] Kloosterman F, Davidson TJ, Gomperts SN, Layton, Hale G, Nguyen DP, Wilson MA. Micro-drive Array for Chronic in vivo Recording: Drive Fabrication. J. Vis. Exp. JoVE, No 26, 2009.
- [15] Otchy TM, Ölveczky BP. Design and assembly of an ultra-light motorized microdrive for chronic neural recordings in small animals. *J. Vis. Exp. JoVE*, No 69, 2012.
- [16] Patel SR, Ghose K, Eskandar EN. An Open Source 3-D Printed Modular Micro-Drive System for Acute Neurophysiology. *PLoS ONE*, Vol 9, No 4, 2014, p e94262.
- [17] Fujisawa S, Buzsáki G. A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. *Neuron*, Vol 72, No 1, 2011, pp 153–12.
- [18] Lewicki MS. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Netw. Comput. Neural Syst.*, Vol 9, No 4, 1998, pp R53– R78.
- [19] Liao Y-F, Tsai M-L, Yen C-T, Cheng C-H. A simple method for fabricating microwire tetrode with sufficient rigidity and integrity without a heat-fusing process. *J. Neurosci. Methods*, Vol 195, No 2, 2011, pp 211–4.
- [20] Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.*, Vol 21, No 4, 2003, pp 157–4.
- [21] Mannoor MS, Jiang Z, James T, Kong YL, Malatesta KA, Soboyejo WO, Verma N, Gracias DH, McAlpine MC. 3D printed bionic ears. *Nano Lett.*, Vol 13, No 6, 2013, pp 2634–5.
- [22] Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater. Today*, Vol 16, No 12, 2013, pp 496–8.
- [23] Jakab K, Norotte C, Damon B, Marga F, Neagu A, Besch-Williford CL,... & Forgacs G. Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. *Tissue Eng. Part A*, Vol 14, No 3, 2008, pp 413–8.
- [24] Cui X, Boland T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*, Vol 30, No 31, 2009, pp 6221–6.