Desarrollo de un sensor superficial sobre el polímero blando COP para el registro de actividad cortical en el modelo experimental de rata

I. Tubía Antillera[1], M. Valencia Ustárroz[2], M. Mujika Garmendia[1], J. Artieda González-Granda[2], S. Arana Alonso[1]

[1] CEIT y Tecnun (Universidad de Navarra), Manuel de Lardizábal 15, 20018 San Sebastián, España
itubiaa@alumni.tecnun.es, {mmujika, sarana}@ceit.es

[2] CIMA (Universidad de Navarra), Avda. Pío XII, Nº55, 31008 Pamplona, España {mvustarroz, jartieda}@unav.es

Resumen

Se ha desarrollado un sensor superficial para el estudio de la actividad cortical en el modelo experimental de rata. El dispositivo se ha fabricado en oro sobre Cyclic Olefin Polymer (COP) y Cyclic Olefin Copolymer (COC) mediante el uso de tecnología de microsistemas. De esta manera, se ha logrado un sensor flexible, personalizable, biocompatible y con propiedades reproducibles durante el proceso de fabricación. Los sensores presentan impedancias en el rango de 100 kΩ, siendo por tanto adecuados para registrar potenciales de campo sobre la superficie cortical. En este artículo se presentan los resultados obtenidos tras la implantación del sensor en animales de experimentación (ratas). Dicho sensor ha sido implantado de forma bilateral sobre el córtex motor de animales control para evaluar la actividad cortical en libre movimiento y bajo el efecto de diferentes drogas administradas. Los registros así obtenidos presentan características acordes con el actual estado del arte.

1. Motivación

Gran parte del conocimiento acerca del funcionamiento cerebral y de la forma en que diferentes procesos neurales se coordinan para atender a las necesidades derivadas de la realización de tareas cognitivas o motoras, proviene de la información obtenida a partir de registros electrofisiológicos [1].

En algunas patologías, como por ejemplo el Parkinson, la esquizofrenia o la epilepsia, la implantación de sistemas de estimulación y monitorización constituye una valiosa fuente de registros de actividad oscilatoria. Sin embargo, frecuentemente se plantean cuestiones éticas que imposibilitan la realización de determinados protocolos. Como alternativa, para llevar a cabo estos estudios, se utilizan modelos animales.

A la hora de plantear la utilización de registros electrofisiológicos, existen principalmente dos opciones que no tienen por qué ser excluyentes [2]. Los registros pueden alcanzar estructuras en la profundidad del cerebro, o bien, pueden restringirse a la superficie cortical. En este segundo caso, el procedimiento utilizado más frecuentemente consiste en realizar pequeñas craneotomías en las que se fijan tornillos que se conectan mediante terminales al sistema de registro. Ésta es una opción adecuada por su sencillez en la ejecución, además de no resultar excesivamente invasiva ni dolorosa para el animal y tener un costo económico muy bajo. Sin embargo, existen situaciones en las que se requiere registrar la actividad electrofisiológica de regiones amplias de la superficie cortical, por lo que la aproximación basada en tornillos no puede utilizarse. Aplicando en animales de experimentación procedimientos similares a los utilizados en pacientes afectos de epilepsia, pueden instalarse mallas de electrodos cubriendo el área cortical que se pretende estudiar. A pesar de que existen soluciones comerciales adaptadas para el registro en animales de tamaño considerable (por ejemplo en monos), estas soluciones son difícilmente aplicables a animales de menor tamaño como ratas o ratones. Sin embargo, son estas especies las que se utilizan principalmente en la mayoría de estudios sobre fisiología cerebral, fisiopatología de determinadas enfermedades, estudios genéticos o evaluación de fármacos experimentales.

Por otro lado, en las últimas décadas, el desarrollo en el campo de los bioMEMS y los avances en la micro y la nanociencia han abierto una ventana de oportunidades para minimizar e implementar sistemas mecatrónicos que pueden dar lugar a aplicaciones biomédicas. En este trabajo se presenta el proceso de diseño y testeo de dos tipos de sensores superficiales basados en polímeros blandos que pueden ser utilizados para realizar implantes crónicos en modelos animales de pequeño tamaño (roedores). Gracias a la micro-fabricación de estos sensores se alcanza una mayor cobertura de la superficie cortical y se aumenta el grado de precisión en cuanto a la localización de los sensores, a la vez que se mejora el proceso de implantación de los mismos en los animales. Como resultado, se logra una mejora en la recuperación de los animales y una mejor calidad de registro.

2. Material y métodos

2.1. Diseño y fabricación del sensor

Los materiales seleccionados para la fabricación de sensores superficiales han sido el COP y el COC. Estos polímeros blandos ya han sido previamente utilizados en procesos de micro-fabricación, poseen cierta flexibilidad y

son fácilmente adaptables (pueden recortarse con unas simples tijeras de escritorio) tras su producción [3].

En este estudio se han diseñado un total de 45 geometrías diferentes. En dichos diseños se han variado tanto la distribución como en el número de contactos (8, 16 ó 32). Además, se han evaluado diferentes diámetros de contacto para estudiar la relación superficie/impedancia así como diferentes longitudes. En la Figura 1-A, se muestran algunos ejemplos de diseño de sensores. En todos ellos las pistas fabricadas son de 100µm de anchura. En cuanto a los contactos, dependiendo del modelo éstos varían en su diámetro, fabricándose con diámetros de 100, 125 y 150µm.

El proceso de micro-fabricación de los sensores superficiales consta de varias etapas. En la primera, se definen los electrodos y las pistas de los sensores. Para ello, se emplean técnicas de micro-fabricación basadas en un proceso de fotolitografía, un depósito y finalmente un proceso de *lift-off*. Para la fotolitografía se emplea la insoladora EVG 620 con resina positiva s1818. El depósito del metal se realiza mediante la técnica de PVD (*Physical Vapor Deposition*). El espesor del depósito de oro se ha fijado en 200nm [4].

Durante la siguiente etapa de fabricación, se aíslan las pistas dejando al descubierto los electrodos. Dado que los polímeros utilizados son materiales hidrofóbicos, la activación de la superficie se realiza mediante plasma utilizando una máquina Thierry Pico 5 Liters. Tras realizar la activación, se realiza nuevamente un proceso de fotolitografía con la resina negativa SU-8 que además de aislar el sensor, proporciona una alta biocompatibilidad. La capa de resina empleada es de 3,632µm (Figura 1-B).

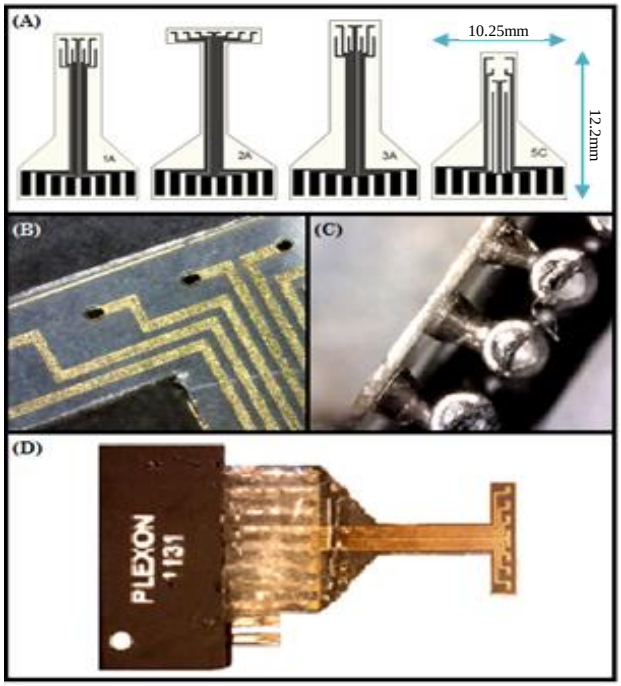

Figura 1. *(A) Muestra algunos de los diseños fabricados de los sensores. (B) Contactos del sensor de uno de los modelos. (C) Unión conector-sensor mediante estaño. (D) Resultado final de la etapa de diseño y fabricación del sensor.*

A continuación se pasa a la etapa de ensamblado del sensor: se corta con la morfología deseada, se une a un mini-conector y finalmente se consolida mediante resina epoxi. Así, mediante el uso de un bisturí y ayudándose de un microscopio Dino-Lite Pro AM4113T, se ha recortado el sensor dándole la forma deseada. Para el ensamblado se han utilizado mini-conectores tipo Plexon A11365-001, conectores que corresponden con el sistema de registro electrofisiológico del que se dispone en el Laboratorio de Neurofisiología Clínica del CIMA. La unión se realiza mediante soldadura de estaño (Figura 1-C). En último lugar, a fin de aislar las soldaduras y robustecer el montaje, se aplica resina epoxi cubriendo la conexión conector-sensor (Figura 1-D).

Finalmente, se realiza un último proceso de comprobación de las impedancias de cada uno de los contactos del sensor utilizando el dispositivo Nano-Z de Neuralynx, que permite realizar la medida de las impedancias, electro deposición de oro y otros materiales, así como la limpieza de los contactos.

2.2. Testeo *in vivo* del sensor

A fin de comprobar la operatividad de los sensores implementados, éstos se han implantado en animales de experimentación, realizándose registros en diferentes estados: con los animales despiertos, durante sueño fisiológico, durante la realización de diferentes test comportamentales y bajo los efectos de diferentes fármacos; siempre en libre movimiento.

Tanto las cirugías de implantación como los registros, se han llevado a cabo en el Laboratorio de Neurofisiología Clínica del CIMA, siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra.

De entre el conjunto de sensores diseñados, se ha seleccionado el diseño de 8 electrodos de 125µm de diámetro dispuestos de forma lineal y separados entre sí por 1mm (Figura 1-D).

Los sensores se han colocado de manera bilateral sobre la corteza motora primaria de tres ratas tipo Wistar (Figura 2 y Figura 3-A). Para ello y bajo anestesia inhalatoria, se realizaron craneotomías en las que se alojaron los sensores y se colocaron 2 tornillos sobre la región cerebelar (electrodos de tierra y referencia). Las craneotomías se cubrieron con vaselina estéril, fijando el conector al cráneo mediante cemento dental (Facident). Para finalizar se cerró la herida, tras su limpieza y desinfección. Después de la operación, solamente quedaba al descubierto la parte del sensor correspondiente al conector.

Entre los días 5 y 7 posteriores a la cirugía y con los animales ya totalmente recuperados de la intervención, se procedió a la realización de los registros electrofisiológicos.

3. Resultados

Los sensores diseñados en COC resultaron demasiado rígidos para ser implantados en los animales. Por otro lado, en los experimentos realizados con sensores en COP el proceso de implantación de los mismos finalizó satisfactoriamente: son suficientemente pequeños para ser alojados sobre la superficie cerebral y son fácilmente adaptables debido a su sencillez de manipulación para realizar cortes y su flexibilidad, permitiendo modificar la geometría (dentro de las restricciones marcadas por la situación de las pistas y electrodos).

La recuperación de los animales fue completa llegando a ser totalmente autónomos sin llegar a presentar ningún tipo de alteración motora o comportamental.

En el proceso de comprobación de impedancias de los sensores se pudo determinar que la impedancia de los contactos se encuentra en el rango de los 100 kΩ (media ± desviación estándar: 108.75 ± 13.899 kΩ), cumpliendo por tanto con los requerimientos experimentales para potenciales de campo en este tipo de registros.

Figura 2. *Muestra el resultado final tras ser implantado el sensor sobre el modelo experimental de rata.*

Los registros realizados demuestran que el implante diseñado tiene capacidad para obtener registros con una alta estabilidad. En la Figura 2, se puede comprobar el resultado final de la implantación del sensor en uno de los animales monitorizados. En la Figura 3-A se muestra un ejemplo típico de registro de actividad basal (16 canales) junto con el esquema de localización de los sensores sobre la corteza motora. La finalidad del trabajo es comprobar la idoneidad del sensor desarrollado, haciendo hincapié en las características que van a permitir su implantación en animales de experimentación.

Los registros han sido estables a lo largo de diferentes sesiones, el movimiento de los animales no afecta a la calidad de los mismos y la distribución de los contactos permite mapear las variaciones de actividad a lo largo de la extensión del sensor (topografía cortical).

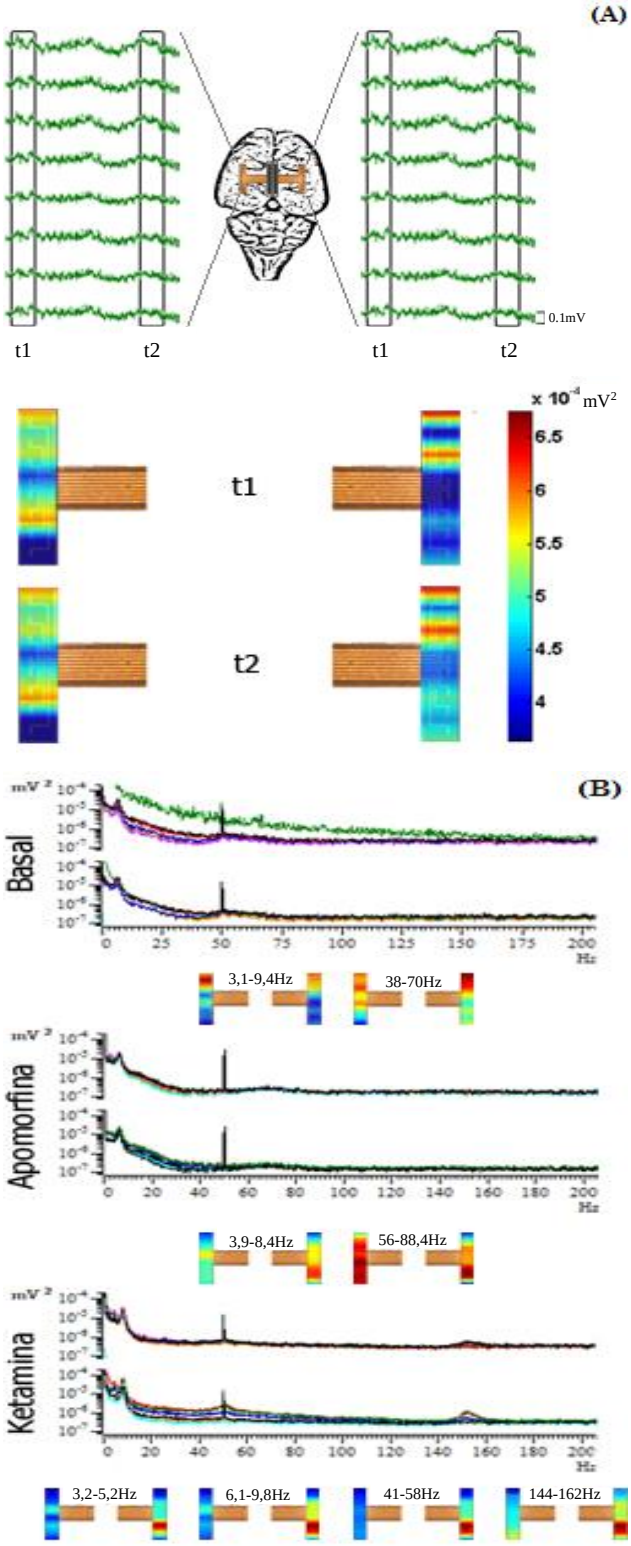

Figura 3. *(A) En la parte superior se muestra el cerebro de la rata, donde se le han implantado dos sensores en paralelo. A cada lado del cerebro se puede observar la señal obtenida en un determinado tiempo, proveniente de los contactos de cada sensor. En la parte inferior se observa la actividad cortical para dos tiempos dados (t1 y t2). (B) Muestra los espectros de potencia de los tres estados estudiados (superior hemisferio izquierdo e inferior hemisferio derecho). Para cada estado, se muestra la actividad de los sensores implantados para cada pico de interés, siendo de color rojo el área de mayor nivel.*

En la Figura 3-B se muestran los espectros de potencia correspondientes a los registros típicos obtenidos en un animal control en condiciones basales (tras inyección de suero salino), bajo los efectos de apomorfina (agonista dopaminérgico) y tras la administración de ketamina (anestésico con acción antagonista NMDA). Puede comprobarse que la acción de las drogas induce la aparición de diferentes picos de actividad espectral tal y como se relata en la literatura [5, 6]. Estos sensores desarrollados, han permitido estudiar la localización de esta actividad, variando la misma en distintos puntos del cerebro.

4. Conclusiones

Se han fabricado sensores para el registro de actividad cortical sobre la superficie cerebral en animales de experimentación de pequeño tamaño (rata/ratón) utilizando los polímeros blandos COC y COP.

Los basados en el polímero COC se han descartado debido a que no son suficientemente flexibles para ser implantados adecuadamente. Por el contrario, los diseñados en COP poseen la flexibilidad requerida, para poder ser implantados durante un largo período de tiempo.

El COP es biocompatible, flexible, fácilmente adaptable y tiene un precio asequible. En cuanto a su proceso de micro-fabricación, los procedimientos son simples, pueden llevarse a cabo con rapidez y permiten obtener sensores con una alta reproducibilidad, tanto en términos de morfología como de características físicas y eléctricas.

Para comprobar la idoneidad de los diseños, los sensores han sido testeados en animales de experimentación y se han realizado registros en el entorno de investigación en neurociencias. El hecho de haber utilizado una cepa de rata que se utiliza habitualmente en los proyectos que desarrolla el grupo de Neurofisiología Clínica del CIMA demuestra la utilidad e idoneidad de los mismos para su utilización en la rutina de investigación. Finalmente, destacar que los resultados logrados con las pruebas llevadas a cabo en los animales implantados demuestran que los registros obtenidos tienen una calidad similar a la observada mediante la utilización de sensores especializados.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer al personal de CEIT y CIMA por la confianza depositada, trato recibido y asesoramiento para llevar a cabo este trabajo. Además de agradecer a FEUN por facilitarme una beca que me ha permitido poder realizar las prácticas en Pamplona. Finalmente, agradecer a María Jesús Nicolás su colaboración en la implantación y manipulación de los animales involucrados en este desarrollo.

Referencias

[1] Buzsáki, G., 2006. Rhythms of the brain. Oxford University Press, Oxford; New York.

[2] Nicolelis, M.A. (Ed.), 2008. Methods for Neural Ensemble Recordings, 2nd ed, Frontiers in Neuroscience. CRC Press, Boca Raton (FL).

[3] Gandhiraman RP1, Gubala V, Le NC, Volcke C, Doyle C, James B, Daniels S, Williams DE. Deposition of chemically reactive and repellent sites on biosensor chips for reduced non-specific binding. ELSEVIER, 2010. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.04.009.

[4] Vladimir Gubala, Nam Cao Hoai Le, Ram Prasad Gandhiraman, Conor Coyle, Stephen Daniels, David E. Williams. Functionalization of cyclo-olefin polymer substrates by plasma oxidation: Stable film containing carboxylic acid groups for capturing biorecognition elements. ELSEVIER, 2010. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.055.

[5] Nicolas, M.J., Lopez-Azcarate, J., Valencia, M., Alegre, M., Perez-Alcazar, M., Iriarte, J., Artieda, J., 2011. Ketamine-Induced Oscillations in the Motor Circuit of the Rat Basal Ganglia. PLoS One 6. doi:10.1371/journal.pone.0021814.

[6] Valencia, M., López-Azcárate, J., Nicolás, M.J., Alegre, M., Artieda, J., n.d. Dopaminergic modulation of the spectral characteristics in the rat brain oscillatory activity. Chaos, Solitons & Fractals. doi:10.1016/j.chaos.2011.12.019.