

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

**Dispositivos poliméricos para el confinamiento neuronal y registro electrofisiológico *in vitro*.
Métodos de fabricación y prueba de concepto.**

Tesis doctoral:

“Dispositivos poliméricos para el confinamiento neuronal y registro electrofisiológico *in vitro*. Métodos de fabricación y prueba de concepto.”

Autor: Ricardo Morales-Carbajal

Universidad Politécnica de Cataluña

Director: Enric Claverol Tinturé

Programa doctoral de Ingeniería Biomédica

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona

Barcelona, junio 2013

Esta Tesis es presentada para aspirar al grado de Doctor en la Universidad Politécnica de Cataluña.

Resumen

La presente tesis trata del diseño y fabricación de un nuevo dispositivo para registrar la actividad eléctrica neuronal espontánea y estimulada farmacológicamente, en redes neuronales *in vitro*. La forma de operar esta herramienta es simple, su producción es de bajo coste y además, ofrece una interfaz neurona-electrodo estable a largo plazo más allá de lo posible con tecnologías electrofisiológicas basadas en micropipeta.

El dispositivo es una pieza polimérica (polidimetilsiloxano) con dos compartimientos (zona de sembrado de los cultivos neuronales) comunicados entre sí a través de un microcanal de dimensiones comparables a las dimensiones de los axones y dendritas.

La actividad eléctrica neuronal es registrable tras el crecimiento espontáneo de las neuritas dentro del microcanal (10 a 14 días de sembradas las neuronas). Un par de electrodos, ubicados de extremo a extremo del microcanal, aprovechan las propiedades conductoras del medio extracelular para registrar los potenciales eléctricos.

La tecnología para microfabricar el dispositivo es una combinación de la técnica de fotolitografía (para crear los másteres) y de la técnica de *elastomer casting* (para fabricar las piezas poliméricas).

El procesamiento de datos de las señales es un algoritmo matemático diseñado para analizar la información registrada por el dispositivo; este algoritmo es ejecutado con el *software* de “Matlab”. El procesamiento de datos asigna y contabiliza como potenciales de acción a las señales que sobrepasen el umbral predeterminado ($170 \mu\text{V}$) de los registros y presenta los resultados en gráficas de barras de número de potenciales de acción por unidad de tiempo (minuto).

Abstract

The thesis describes the design and manufacturing of a new tool to support electrophysiological investigation of both individual neuronal electrical activity and neuronal networks electrical activity *in vitro*. The operation mode is simple, easy to learn and the device can be produced at low cost. Neuron-electrode interface stability is better than electrophysiology micropipette interface.

The device is a two compartments polymeric (polydimetilsiloxane) structure (neurons are placed) interconnected by a microchannel. The microchannel aperture is comparable to axon and dendrites diameter.

The neuronal electrical activity is recorded after spontaneous neurites grew inside the microchannel (10 to 14 days of neurons be culturated). Each compartment has an electrode and the conductivity electrical propriety of the extracellular medium supports to record electrical potentials end-to-end of the microchannel.

The device microfabrication process is a combination of photolithography technique (to create masters) and elastomer casting technique (to manufacture the polymeric parts).

Spike frequency analysis is a mathematical algorithm designed. The algorithm runs at Matlab *software*. Spike frequency analysis counts electrical activity higher than 170 μV as action potential. Results frequency are presented as graphic bars of spike amount per time (minute).

Agradecimientos

Este trabajo de tesis representa la dedicación de cinco años y medio de estudios e investigación. Deseo agradecer a mi tutor y director de tesis el Doctor Enric Claverol-Tinturé por ayudarme con la oportunidad de iniciar y terminar esta tesis doctoral. Agradezco su dirección, revisiones y correcciones.

Agradezco al Parque Científico de Barcelona (PCB) y al Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) por dar la oportunidad de poder investigar y experimentar dentro de sus instalaciones. Agradezco la accesibilidad al equipo de trabajo, como la oportunidad de interactuar con otros investigadores que laboran en sus laboratorios; esto me ha enriquecido tanto a nivel profesional como personal. Agradezco la ayuda y amistad recibida por mis compañeros del grupo de Neuroingeniería del “IBEC” y quienes formaron parte de “Aleria Biodevices”.

Agradezco a la Universidad Politécnica de Catalunya (UPC) por permitirme ser uno de sus alumnos, así como por todo el apoyo, material, equipo y servicios que llegaron a facilitar.

Agradezco a toda mi familia, por el soporte que me han otorgado en todo momento durante mi estancia en España y fuera de ella.

Agradezco el apoyo económico recibido por casi 4 años de beca de investigador tipo FI, por parte de la Generalitat de Catalunya y al contrato laboral de 3 meses por parte del grupo de Neuroingeniería del IBEC. Con ello encontré el sustento para mi estancia doctoral.

Índice

Resumen	ii
Abstract	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Listado de ilustraciones	x
Listado de siglas y acrónimos	xii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Introducción	1
1.2 Motivación	1
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Estructura de la tesis	4
Capítulo 2: Estado del arte de las tecnologías para registros electrofisiológicos.....	6
2.1 Introducción	6
2.2 Neurona	6
2.2.1 Características	6
2.2.2 Anatomía y fisiología	6
2.2.3 Mecanismos de comunicación	7
2.2.4 Modelo eléctrico de la neurona	7
2.3 Registro electrofisiológico de la Actividad Eléctrica Neuronal (AEN)	9
2.3.1 Patch-clamp	9
2.3.2 Registro extracelular	9
2.3.3 Whole-cell	9
2.3.4 Loose-patch	10
2.3.5 Ventajas y desventajas	10
2.4 Técnica de <i>patterning</i>	11

2.4.1 Microislas: un ejemplo de patterning	11
2.5 Microestructuras.....	13
2.5.1 Sistema Micro Electro-Mecánicos (MEMS)	13
2.5.2 Matriz de Microelectrodos (MEA).....	13
2.5.3 Neurochip.....	14
2.6 Propuesta de proyecto de tesis: Tecnología dos pozos y un microcanal.....	14
2.6.1 Características del dispositivo polimérico	15
2.6.2 Circuito amplificador para el registro de la AEN	17
2.6.3 Registro de AEN	19
2.6.4 Procesamiento de datos.....	19
2.7 Conclusiones.....	19
Capítulo 3: Microfabricación de dispositivos poliméricos	21
3.1 Introducción.....	21
3.2 Objetivos.....	22
3.3 Materiales y Métodos	22
3.3.1 Microfabricación de la máscara	24
3.3.2 Microfabricación del máster	24
3.3.3 Microfabricación de piezas poliméricas	28
3.3.4 Caracterización de las piezas poliméricas	32
3.4 Resultados.....	32
3.4.1 Microfabricación de la máscara	33
3.4.2 Microfabricación del máster	33
3.4.3 Microfabricación de piezas poliméricas	38
3.4.4 Moldes alternativos	43
3.4.5 Caracterización de los dispositivos polimérico.....	44
3.5 Conclusiones.....	44
Capítulo 4: Procesamiento de datos de la actividad eléctrica neuronal.....	47
4.1 Introducción.....	47
4.1.1 Concepto de Potencial de Acción (PA)	47

4.1.2 Los <i>bursts</i>	47
4.2 Objetivos del capítulo.....	47
4.3 Registro de señales eléctricas	48
4.3.1 Características del muestreo.....	48
4.3.2 Tipos de filtros	48
4.4 Procesamiento de datos	48
4.4.1 Modelado de Poisson en la AEN.....	48
4.4.2 Detección automática de PA	49
4.5 <i>Software</i> para el procesamiento de datos.....	50
4.6 Criterios para el procesamiento de datos de nuestro dispositivo polimérico	51
4.6.1 Características de la AEN	51
4.6.2 Parámetros para el desarrollo del algoritmo	54
4.7 Evaluación de datos.....	55
4.7.1 Tipos de registros	56
4.7.2 Características del algoritmo para la cuantificación de PA	56
4.8 Resultados.....	57
4.8.1 Conteos de PA por unidad tiempo.....	58
4.8.2 Representación gráfica de la AEN	58
4.8.3 Conteo de <i>bursts</i>	61
4.9 Conclusiones y discusión.....	61
Capítulo 5: Registros de actividad eléctrica neuronal.....	63
5.1 Introducción.....	63
5.1.1 Cultivos celulares de hipocampo.....	63
5.1.2 Factores que intervienen en el crecimiento celular	63
5.2 Objetivos del capítulo.....	64
5.3 Materiales y Métodos	64
5.3.1 Fármacos y sus efectos	64
5.3.2 Protocolos	65
5.4 Resultados.....	65
5.4.1 Registro de la AEN.....	66

5.4.2 AEN espontánea.....	66
5.4.3 Sistema de pipeteo manual y sistema de perfusión.....	67
5.4.4 Solución salina y neurobasal como medio extracelular.....	68
5.5 Respuesta de la AEN bajo la aplicación de diversos fármacos.....	68
5.5.1 Tetradotoxina (TTX).....	68
5.5.2 Acetilcolina.....	69
5.5.3 Pentilenotetrazol (PTZ).....	70
5.5.4 Glutamato.....	71
5.5.5 Haloperidol.....	72
5.6 Discusión.....	72
5.6.1 Características de los electrodos.....	72
5.6.2 Sembrado en un solo pozo o en dos pozos.....	74
5.6.3 Cambio del medio extracelular.....	75
5.6.4 Sistema de perfusión.....	75
5.7 Conclusiones.....	76
Capítulo 6: Conclusiones.....	77
6.1 Conclusiones generales.....	77
6.2 Limitaciones.....	78
6.3 Contribuciones.....	79
6.4 Proyecciones futuras.....	80
Referencias.....	84
Publicaciones derivadas de la tesis.....	111
Congreso.....	112
Anexo A: Moldes Adicionales para la Técnica de Elastomer Casting.....	114
Anexo B: Diseño para Inyección de Molde.....	117

Anexo C: Herramientas para la Fabricación de Matrices de dispositivo polimérico	119
Anexo D: Microfabricación a Base de Fotorresinas	121
Anexo D-1 Fotorresina AZ 9260	121
Anexo D-2 Fotorresina SPR220	121
Anexo D-3 Fotorresina SU-8	122
Anexo D-4 PDMS	123
Anexo E: Protocolos para Cultivos Neuronales	124
Anexo E-1 Disección	124
Anexo E-2 Protocolo para el criopreservamiento	124
Anexo E-3 Recubrimiento de poli-L-lisina sobre placas	124
Anexo E-4 Protocolo para el medio extracelular con Neurobasal	125

Listado de ilustraciones

Figura 2.1	La neurona	7
Figura 2.2	Imagen de dos neuronas dentro de una microisla	12
Figura 2.3	Vista del extremo inferior de la pipeta	12
Figura 2.4	Modelo en 3D del dispositivo polimérico	15
Figura 2.5	Simulación 3D de microcanal y dendrita	16
Figura 2.6	Corrientes iónicas	16
Figura 2.7	Imagen de cultivo celular	17
Figura 2.8	Registro con una matriz de 6 dispositivos poliméricos	18
Figura 2.9	Registro con una matriz de 40 dispositivos poliméricos	18
Figura 3.1	Máscara	25
Figura 3.2	Modelo para inyección de molde	29
Figura 3.3	Modelo 3D del proceso de microfabricación	31
Figura 3.4	Modelo 3D de pieza elastomérica con 40 pares de perforaciones	32
Figura 3.5	Línea de la máscara	33
Figura 3.6	Trinchera con fotorresina AZ	34
Figura 3.7	Trinchera de la fotorresina SPR sobre el sustrato de acero	34
Figura 3.8	Medición de la pista de SU-8	35
Figura 3.9	Pista de níquel electrodepositada sobre sustrato de níquel	37
Figura 3.10	Electrodeposición de pista de níquel sobre máster de níquel	37
Figura 3.11	Medición de la sección transversal de la pista de níquel con perfilómetro	38
Figura 3.12	Medición de las pistas del máster de PDMS mediante interferómetro	39
Figura 3.13	Pieza polimérica de PDMS con el microcanal formado	41
Figura 3.14	Fotografía de la matriz de PDMS	42
Figura 3.15	Fotografía de 1 par de pozos y 6 pares de pozos	43
Figura 3.16	Unión de dos piezas de PS	43
Figura 3.17	Dispositivo PDMS sobre PS con <i>Lucifer Yellow</i>	44
Figura 4.1	Potencial de acción	52
Figura 4.2	<i>Bursts</i>	52
Figura 4.3	Potenciales de campo	52
Figura 4.4	Ruido ambiental de alta amplitud	53
Figura 4.5	Ruido del artefacto	53
Figura 4.6	<i>Spikes</i> por minutos	58
Figura 4.7	Aumento espontáneo en la AEN	59

Figura 4.8	Gráfica con colores que indica la amplitud de los PA	59
Figura 4.9	Conteo de PA por minuto	60
Figura 4.10	Gráfica con las amplitudes de los PA	61
Figura 5.1	PA espontáneos	65
Figura 5.2	AEN espontánea	66
Figura 5.3	Cambio de AEN	67
Figura 5.4	Cambio de AEN al cambiar neurobasal por solución salina	68
Figura 5.5	Introducción de TTX por pipeteo	69
Figura 5.6	Introducción de TTX por bomba peristáltica	69
Figura 5.7	Efecto de acetilcolina	70
Figura 5.8	Efecto de pentilenotetrazol	70
Figura 5.9	Efecto de glutamato	71
Figura 5.10	Efecto de 50 μ M de glutamato	71
Figura 5.11	Efecto de haloperidol en las neuronas	72
Figura 5.12	AEN con electrodos de plata “clorificados”	73
Figura 5.13	AEN con electrodos de plata sin clorificar	74
Figura A.1	Modelo de resina epoxi	114
Figura A.2	Molde mixto de vidrio y epoxi	115
Figura B	Modelo de las piezas poliméricas para inyección molde	118
Figura C.1	Modelo de las herramientas	120
Figura C.2	Procedimiento de uso de las herramientas	120

Listado de siglas y acrónimos

3D	Tridimensional
AEN	Actividad Eléctrica Neuronal
ANOVA	Análisis de Varianza
DPI	Puntos Por Pulgada (Dots Per Inch)
LIGA	Litografía para el Moldeo Electroformado (<i>Lithography Galvanoforming (electroplating) Abformung (moulding)</i>)
MEA	Matriz de Microelectrodos (<i>Microelectrode Array</i>)
MEMS	Sistemas Micro Electro-Mecánicos (<i>Micro-Electro-Mechanical Systems</i>)
PA	Potencial de Acción
PCB	Parque Científico de Barcelona
PDMS	Polidimetilsiloxano
PS	Poliestireno
PTZ	Pentilenotetrazol
RMS	Valor Cuadrático Medio (<i>Root Mean Square</i>)
RPM	Revoluciones Por Minuto
TTX	Tetrodotoxina
UV	Ultravioleta

Capítulo 1: Introducción

1.1 Introducción

Las neurociencias utilizan técnicas electrofisiológicas a microescala [Dworak & Wheeler, 2009; Wagenaar et al., 2006] y a nanoescala (nanotubos) [Patolsky et al., 2006; Cooper & Nadeau, 2009], para estudiar el comportamiento y el nivel de interacción neuronal, de manera individual y colectiva (redes neuronales). También se estudian las enfermedades neurodegenerativas, sus efectos y la manera en que pueden ser erradicadas [SfN, 2012].

Además, la investigación científica requiere el sacrificio de mamíferos, como ratones [WHO, 2004], para experimentos y pruebas farmacológicas [Andersen & Krewski, 2008; Collins et al., 2008; Gibb, 2008; Johnstone et al., 2010]. La cantidad de animales sacrificados puede llegar a reducirse al mejorar las herramientas de trabajo *in vitro*.

La presente tesis introduce un dispositivo polimérico, diferente a los tradicionales dispositivos de electrofisiología, como una alternativa para el registro de la Actividad Eléctrica Neuronal (AEN) *in vitro*.

La presente tesis describe:

- El diseño del dispositivo polimérico.
- Los procesos de microfabricación requeridos para fabricar el dispositivo polimérico.
- El procesamiento de datos de los registros neuronales para cuantificar la AEN.
- La aplicación del dispositivo polimérico en pruebas farmacológicas inhibitorias y excitatorias.

1.2 Motivación

El registro y estudio de la Actividad Eléctrica Neuronal (AEN) *in vitro*, es realizado mediante técnicas de electrofisiología [Perkins, 2006]. Así mismo, en los últimos años se han introducido métodos basados en Matrices de Multielectrodos (MEA) [Taketani & Baudry, 2006].

Los neurocientíficos necesitan herramientas prácticas y económicas para investigar el hipocampo, sobre todo cuando es afectado por patologías como el Alzheimer [WHO, 2004], la esquizofrenia [Rametti, 2008], el desorden depresivo mayor, el desorden del estrés post-traumático [DeCarolis & Eisc, 2010], la epilepsia [Dedeurwaerdere, 2005], la apoplejía [WHO, 2004] y la esclerosis [Duvernoy, 2005].

Las técnicas electrofisiológicas tipo *patch-clamp*, basadas en el uso de micropipetas, registran la AEN a un máximo de 3 neuronas simultáneas en un cultivo neuronal [Fitzsimonds

et al., 1997; Erickson et al., 2008]. Por otra parte, los MEA pueden registrar la AEN en múltiples puntos de un cultivo neuronal (más de 64), pero el proceso de fabricación de estos dispositivos resulta complejo [Erickson et al., 2008].

El proceso de microfabricación del dispositivo polimérico, propuesto en esta tesis, es sencillo, económico (en comparación a los dispositivos tradicionales) y para operar el dispositivo, solo se requiere de un entrenamiento básico. El cambio de medio extracelular y la incorporación de fármacos pueden realizarse a través de un sistema de perfusión o pipeteo. En esta tesis, el procesamiento de datos tiene lugar, principalmente, bajo el *software* "Matlab".

El dispositivo polimérico puede realizar registros desde 1 hasta de 40 cultivos neuronales, de manera simultánea. Los cultivos son de hipocampo y están constituidos desde 50.000 hasta 75.000 neuronas disgregadas. Las neuronas son obtenidas de embriones de ratón con 18 días de gestación. La AEN se registra a partir de 10 a 14 días de ser cultivadas [Fitzsimonds et al., 1997; Morales et al., 2008].

Las neuronas de los ratones tienen la ventaja de ser muy parecidas a las humanas. Los ratones poseen arriba del 80% de genes idénticos a los genes humanos [Waterston et al., 2002; Ceccarelli, 2008]. Las diferencias genéticas entre los ratones y los humanos, radica en que los ratones tienen más genes relacionados con el apareamiento y el sistema inmunitario [Waterston et al., 2002]. El genoma del ratón tiene $2,5 \times 10^9$ bases, mientras que el del humano tiene $2,9 \times 10^9$ bases [Kirkness et al., 2003].

Se prefiere trabajar con neuronas del hipocampo por lo destacable de sus funciones de aprendizaje [Rametti, 2008], memoria [Gamon & Bragdon, 2010], configuración espacial [Traub & Miles, 1991; Gingell, 2005], dominio sobre algunos aspectos de control motriz y regulación del hipotálamo [Duvernoy, 2005; Fink, 2007; Hok et al., 2007; Cutsuridis et al., 2010]; así como también, a su plasticidad a nivel molecular, celular, estructural y funcional al recibir un estímulo específico [DeCarolis & Eisc, 2010].

Trabajar el hipocampo *in vitro* que *in vivo*, permite realizar una investigación más controlada y sistemática [Traub & Miles, 1991]. Por otra parte, se podría trabajar *in vitro* con rebanadas de hipocampo [Traub & Miles, 1991] para estudiar las conexiones de los axones, las propiedades sinápticas y las redes dinámicas [Poindron et al., 2005]; pero los trabajos con cultivos neuronales, permiten realizar mejores estudios sobre un grupo controlado de neuronas o, incluso, hasta de una sola neurona.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

El objetivo general de la tesis es diseñar y caracterizar un dispositivo polimérico que represente una combinación entre las técnicas de electrofisiología y MEA. El proceso de fabricación del dispositivo polimérico tiene que ser sencillo, fácil y de bajo coste. El dispositivo polimérico será una herramienta para el registro no invasivo de la AEN espontánea y estimulada farmacológicamente.

1.3.2 Objetivos específicos

El objetivo general está compuesto por una serie de objetivos específicos, tanto científicos como técnicos:

1. Diseño del dispositivo:

Diseñar un dispositivo polimérico, cuya estructura 3D esté constituida por dos compartimentos (pozos) y un microcanal (o microtúnel). Los compartimentos confinarán el crecimiento celular. El microcanal será el conducto que comunique un compartimento con otro compartimento. El diámetro del microcanal tendrá un valor intermedio entre el diámetro del soma de las neuronas de hipocampo y diámetro de sus neuritas.

2. Microfabricación:

Estudiar, analizar y determinar el tipo de material apropiado para realizar una producción en serie del dispositivo polimérico. Este material debe ser económico, biocompatible y debe cumplir con las características eléctricas, físicas y ópticas para mediciones electrofisiológicas e inspecciones ópticas.

Analizar y evaluar las diversas técnicas de microfabricación. Determinar el tipo de técnica eficiente y eficaz para fabricar piezas maestras (máster). Determinar el tipo de técnica eficiente y eficaz para realizar una producción en serie del dispositivo polimérico y garantizar una alta calidad en la replicación del microcanal.

3. Funcionamiento del dispositivo:

Caracterizar la eficiencia de registrar la AEN al utilizar 6 dispositivos poliméricos de manera simultánea. Caracterizar la eficiencia de registrar la AEN al utilizar 40 dispositivos poliméricos de manera simultánea. Caracterizar y comparar los resultados de registrar la AEN de un dispositivo polimérico con cultivo neuronal sembrado en los dos compartimentos, con respecto a un dispositivo polimérico con cultivo neuronal sembrado en solo un compartimento.

4. Cultivo Neuronal:

Registrar, analizar y comparar la AEN al introducir fármacos diluidos en solución salina y al introducir fármacos diluidos en neurobasal. Caracterizar la AEN al introducir medio extracelular por el sistema de pipeteo y por el sistema de perfusión.

Registrar, analizar y comparar la AEN espontánea del hipocampo con respecto a la AEN estimulada bajo diversas concentraciones de fármacos inhibitorios (haloperidol y tetradoxina) y excitatorios (acetilcolina, glutamato y pentilenotetrazol).

5. Procesamiento de datos:

Investigar y determinar el tipo de *software* o algoritmo matemático adecuado para procesar la información de los registros de la AEN de los cultivos de hipocampo, de manera “*offline*”.

1.4 Estructura de la tesis

La presente tesis se estructura en 6 capítulos más anexos. El primer capítulo presenta los objetivos generales y su contexto; el segundo capítulo profundiza en el estado del arte; los capítulos 3, 4 y 5 contienen los resultados de las técnicas de producción propuestas para el dispositivo polimérico, el estudio de diferentes técnicas de medir la AEN registrada y, los resultados de la AEN espontánea y estimulada, respectivamente; el capítulo sexto contiene las conclusiones de la tesis. En la sección de anexos se describe con detalle la sección de microfabricación y, los protocolos correspondientes al capítulo 3 y al capítulo 5.

Capítulo Primero: Introducción. Este capítulo está orientado a dar una introducción general de la tesis, su motivación, sus objetivos y la estructura de la tesis misma.

Capítulo Segundo: Introducción a las Mediciones Neuronales. Este capítulo realiza una introducción a la forma tradicional de registrar la AEN, explica las diversas técnicas empleadas *in vitro* y describe el dispositivo propuesto en esta tesis.

Capítulo Tercero: Microfabricación de Dispositivos Poliméricos. Este capítulo presenta la investigación realizada de los procesos de microfabricación sobre estructuras poliméricas, también se muestran los resultados obtenidos de la microfabricación del máster y del dispositivo polimérico.

Capítulo Cuarto: Procesamiento de Datos de Señales Neuronales. Este capítulo realiza una investigación sobre las diversas técnicas existentes para el procesamiento de datos de la AEN, además se establecen los parámetros para cuantificar la AEN bajo el *software* de “Matlab”.

Capítulo Quinto: Cultivos Neuronales. Este capítulo muestra la AEN espontánea y estimulada (acetilcolina, glutamato, haloperidol, pentilenotetrazol y tetradoxina) de cultivos neuronales *in vitro*.

Capítulo Sexto: Conclusiones. Este capítulo expresa las conclusiones generales, las limitaciones y las aportaciones de todo el trabajo de la tesis.

La sección de **Anexos** contiene información relacionada con moldes, métodos y herramientas de fabricación descritos en el capítulo tercero; así como los protocolos de disección, criopreservamiento, preparación de placas y preparación de medio extracelular.

Capítulo 2: Estado del arte de las tecnologías para registros electrofisiológicos

El presente capítulo establece el estado del arte de las tecnologías utilizadas para el registro de la AEN del hipocampo *in vitro*, con especial énfasis en electrofisiología clásica y en los dispositivos MEA, y se identifican las limitaciones de dichas tecnologías. Por otra parte, se definen las características del dispositivo polimérico propuesto en esta tesis como vía alternativa para el registro de la AEN *in vitro*.

2.1 Introducción

Unos de los factores que caracterizan una red neuronal son su geometría, densidad, patrón de interconexión, tipo de neurona y el sustrato utilizado para su contención [Vogt, 2003; Jun et al., 2007; Shein et al., 2008].

Para estudiar la dinámica de las redes neuronales se requiere de métodos electrofisiológicos [Ghatak, 2010] y morfológicos (*patterning*), que describan las conexiones e identifiquen a las neuronas individuales o los grupos neuronales. Sin embargo, las técnicas convencionales para registrar la AEN utilizan electrodos en contacto directo con el cuerpo neuronal, lo cual afecta para registrar AEN espontánea.

2.2 Neurona

2.2.1 Características

Las neuronas son células del sistema nervioso, su principal característica es la excitabilidad de su membrana plasmática y su permeabilidad selectiva [Buño & Araque, 2007].

2.2.2 Anatomía y fisiología

La neurona está constituida por el soma (cuerpo celular), un axón y múltiples dendritas [WHO, 2004; Tablada & Torres, 2009]. Al conjunto de axón y dendritas se le denomina neuritas. La mayoría de las neuronas del hipocampo tienen una estructura piramidal.

Las neuronas se componen de 4 regiones funcionales:

- Los componentes de entradas con ramificaciones de dendritas.
- El soma donde se encuentra el núcleo.
- Los componentes de gatillo e integración (que dispara un PA en el axón hillock) y el elemento de conducción (axón).
- Los componentes de salida (donde se realiza la sinapsis).

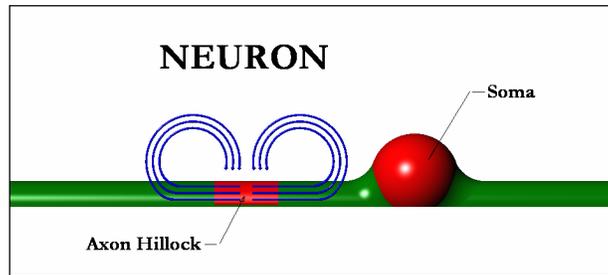


Figura 2.1 La neurona. Representación gráfica en modelo 3D de una neurona con su axón. El cuerpo celular y el axón hillock (marcados con rojo). Cuando se genera un PA los iones de Na^+ atraviesan la membrana del axón hillock (flechas azules).

2.2.3 Mecanismos de comunicación

Las neuronas se comunican entre sí a través de sinapsis, las cuales pueden ser eléctricas o químicas. Las sinapsis eléctricas permite el transporte directo de iones y la propagación del PA a la neurona vecina [Piccolino, 1998]. En cambio, las sinapsis químicas liberan sustancias transmisoras recibidas por los receptores postsinápticos de otra neurona.

Las células gliales, neuroglías o glía, tienen la función de ser sustento y puente de comunicación para las neuronas. La proporción de glía con respecto a las neuronas, en un ratón es de 10:1 *in vivo* [Magistretti & Ranson, 2002] y 50:1 *in vitro* [Evrard, 2002; Brahmachari et al., 2006].

La glía sobre el hipocampo induce neurogénesis, influye en la AEN y en la fuerza sináptica, y aparece como tercer compañero en la transmisión sináptica (sinapsis tripartita) [Moises et al., 2002]. Sin la glía las neuronas morirían con facilidad en un lapso corto de tiempo.

2.2.4 Modelo eléctrico de la neurona

Las diferentes concentraciones de sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloro (Cl^-) existentes entre el interior y exterior de la célula, resultan en un potencial eléctrico a lo largo de la membrana celular. Este potencial se encuentra afectado por el flujo de iones a través de ella. Si durante los cambios de voltaje se llegara a cruzar el umbral de la membrana [WHO, 2004], entonces la neurona pasaría a ser despolarizada y dispararía un PA [Dayan & Abbott, 2001].

En 1880 Walther Nernst dedujo la ecuación que vinculaba el potencial eléctrico y la concentración iónica.

$$E_{ion} = \frac{RT}{FZ} \ln \left(\frac{[Ion]_e}{[Ion]_i} \right)$$

$$E_{ion} = \text{Potencial de equilibrio}$$

$$R = \text{Constante del gas } \left(8,31 \frac{J}{\text{Mol} \cdot K}\right)$$

T = Temperatura absoluta

$$F = \text{Constante de Faraday } \left(96.406 \frac{C}{\text{Mol}}\right)$$

Z = Valencia del ión

$[Ion]_e$ = Concentración iónica extracelular

$[Ion]_i$ = Concentración iónica intracelular

La ecuación de Nernst determina que la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la membrana neuronal es de -70 mV. El interior de la membrana es la parte más negativa. Por convicción, el potencial en el exterior de la membrana es definido como potencial cero.

La neurona está representada morfológicamente por un soma, un axón y dendritas. El soma posee forma semiesférica (*in vitro*). El axón posee una extensión cilíndrica de tamaño reducido y constante. Las dendritas son consideradas cilindros con diversas ramificaciones que contienen espinas dendríticas [Traub & Miles, 1991].

La neurona está representada eléctricamente por resistencias, condensadores y baterías. Las resistencias suelen modelar el espacio intracelular y el componente resistivo de la conducción transmembranal. La batería corresponde a la diferencia de potencial entre el interior y exterior de la membrana [Dayan & Abbott, 2001; Joye et al., 2008]. La membrana es un lípido, actúa como aislante, mide menos de 10 nm de espesor y tiene una capacitancia aproximada de $1 \frac{\mu F}{\text{cm}^2}$ [Bookman et al., 1987].

El medio intracelular es una solución compleja de electrolitos. El valor de resistencia del medio intracelular es mayor dentro de las neuritas que dentro del soma, debido al reducido grosor de las neuritas mismas.

Los potenciales eléctricos que viajan a lo largo de las neuritas manifiestan un decremento de su valor, debido a la fuga de corriente de la membrana en las neuritas. Esta conducta puede ser representada por el modelo matemático “ecuación del cable” [Anson & Roberts, 1998].

Sin embargo, otro tipo de modelos, más realistas, consideran la conducta eléctrica de la neurona como un modelo no lineal [Georgiev, 2004], porque implementan la regeneración del PA a lo largo del axón para impedir el decremento de la propagación de la señal [Johnston, 1999; Dayan & Abbott, 2001; Georgiev, 2004; Svensson & Coombes, 2009]; pero, esta tesis solo se enfocará en las propiedades pasivas de la neurona.

2.3 Registro electrofisiológico de la Actividad Eléctrica Neuronal (AEN)

La electrofisiología es una herramienta que ayuda a investigar la AEN de células y tejidos [Ghatak, 2010]. Los electrodos, ya sean de metal o de vidrio, son empleados para medir, registrar y estimular los PA y los potenciales de campo en un cultivo neuronal [Taketani & Baudry, 2006].

2.3.1 Patch-clamp

Patch-clamp es una técnica electrofisiológica utilizada para estudiar desde simples hasta múltiples canales iónicos celulares. Este tipo de técnica puede ser aplicada a una gran variedad de células; pero es mucho más útil en células excitables como las neuronas, los cardiomiocitos, las fibras musculares y las células beta del páncreas.

La técnica de *patch-clamp* utiliza una micropipeta como electrodo, con un diámetro comprendido desde centenas de nanómetros hasta varios micrómetros.

Dentro de la micropipeta existe un electrodo de plata bañado con cloruro de plata (Ag/AgCl) contenido en solución extracelular; otro electrodo de plata es usado como referencia para el registro de la AEN [Walz, 2007].

El objetivo de la técnica de *patch-clamp* es hacer contacto sobre una pequeña área de la membrana celular; la cual contiene desde uno hasta varios canales iónicos.

Una micropipeta puede acercarse a la membrana de una célula y crear un sellado no fuerte (*loose*), para estimular y medir corrientes de PA [Barbour & Isope, 2000] o un sellado fuerte (*tight*) para invocar a los PA y registrar los potenciales de descanso y sinápticos [Perkins, 2006].

2.3.2 Registro extracelular

En la configuración “registro extracelular”, el electrodo es situado cerca de la neurona sin tocar el cuerpo celular. Esta técnica es no invasiva y registra la diferencia de voltaje entre dos puntos: por fuera y a lo largo de la neurita [Drongelen 2007]. Los registros obtenidos son de baja amplitud, del orden de 10 μV a 500 μV .

2.3.3 Whole-cell

Whole-cell es una técnica que consiste en formar un giga-sello sobre la membrana celular, para después romper a la membrana misma y tener acceso directo a su interior [Walz, 2007]. Esta técnica es invasiva.

En *whole-cell* se utiliza una micropipeta como electrodo, las micropipetas deben de poseer de 3 $\text{M}\Omega$ a 7 $\text{M}\Omega$ de resistencia en la apertura de su punta y en su interior contener un fluido

equivalente al medio intracelular de la neurona [Srinivas et al., 2007]. La micropipeta solo puede ser utilizada una sola vez [Barbour & Isope, 2000].

La técnica de *whole-cell* está limitada a realizar, como máximo, 3 *whole-cells* simultáneos; debido a la dificultad de posicionar un gran número de micromanipuladores en un único *setup* de electrofisiología [Fitzsimonds et al., 1997; Erickson et al., 2008].

2.3.4 Loose-patch

Loose-patch es una técnica no invasiva donde la pipeta es llenada con solución salina externa y es usada como electrodo que se coloca sobre la membrana celular. La baja resistencia de la conexión de la pipeta con la membrana neuronal es, eléctricamente comparable a la resistencia que el resto de la membrana percibe del medio extracelular, por lo que la célula apenas nota algún cambio de tipo eléctrico [Barbour & Isope, 2000].

La resistencia ideal para la punta de la pipeta es entre 1 M Ω y 3 M Ω [Traub & Miles, 1991; Forti et al., 1997; Nunemaker et al., 2003; Drongelen, 2007].

El inconveniente de la técnica de *loose-patch*, es que en ocasiones genera una pequeña protuberancia, en la membrana de la célula, dentro de la zona del sellado, lo cual altera los valores del registro de la AEN [Milton & Caldwell, 1990].

2.3.5 Ventajas y desventajas

Las ventajas de utilizar el método de *loose-patch* con respecto a *whole-cell* consisten en que las pipetas no forman giga-sellos en las membranas, por lo que pueden ser reutilizadas y reposicionadas varias veces sobre diferentes neuronas [Bookman et al., 1987], se puede realizar un rápido muestreo sobre las neuronas e incluso estimular la membrana [Barbour & Isope, 2000] a través de una corriente que pase por la capacitancia de contacto (*patch-capacitance*). Los mejores resultados se logran a través de estímulos cortos (20 μ s).

La desventaja de *loose-patch* consiste en que la estimulación eléctrica se consigue con potenciales elevados para poder alcanzar el listón de disparo de la neurona, lo cual, provoca muchas veces la ruptura en la membrana y como consecuencia la muerte celular.

Los equipos comerciales para electrofisiología, pueden realizar estimulación eléctrica; sin embargo, trabajan mejor en modalidad *whole-cell* (como “Optopatch Amplifier”) que en *loose-patch*, debido a que no están fabricados para generar grandes cantidades de voltaje y corriente.

Sin embargo, se puede llegar a fabricar un amplificador “*custom*” para que registre en modo “*loose-patch*” o bien, se puede utilizar un amplificador tradicional en modo “*current-clamp*”, para que el pulso de corriente sea empleado como estímulo eléctrico y la AEN sea registrada como voltaje [Barbour & Isope, 2000].

Otra opción, es combinar la técnica de *loose-patch* con la técnica de *whole-cell*: estimular el soma celular mediante la técnica de *whole-cell* y registrar, mediante la técnica de *loose-patch*, la propagación del PA a lo largo de las neuritas [Anson & Roberts, 1998; Kinnamon et al., 1988].

2.4 Técnica de *patterning*

La técnica de *patterning* consiste en depositar un patrón de biomoléculas adherentes [Kleinfeld et al., 1988] con una orientación predeterminada sobre un sustrato, antes de sembrar un cultivo celular, para delimitar el crecimiento celular y así, crear geometrías específicas en la red neuronal *in vitro* [Stenger et al., 1992; Jun et al., 2007].

Los patrones químicos se pueden crear a través de diversas técnicas [Dusseiller et al., 2005]: soft-litografía [Kane et al., 1999; Zhang et al., 1999; Tan & Desai, 2003], escritura directa de célula a través de láser [Odde & Renn, 2000; Nahmias & Odde, 2006], técnica de fotolitografía [Bhatia et al., 1992; Liu et al., 2002], nanotecnología con "*dip-pen*" [Piner et al., 1999; Wilson et al., 2001] o inyección de proteínas por sistema de impresión [Roth et al., 2004].

La técnica de *patterning* puede utilizar estructuras poliméricas 3D, como paredes y surcos, para la contención neuronal [Mahoney et al., 2004] o electrodos planares para el registro de la AEN de cada neurona [Prasad et al., 2003].

2.4.1 Microislas: un ejemplo de *patterning*

Los cultivos en microislas [Chena et al., 2004] proveen un simplificado sistema para estudiar las expresiones de fenotipo celular, excitabilidad, formación de sinapsis y mecanismos regulatorios pre- y postsinápticos [Bekkers & Stevens, 1991; Segal, 1991; Takada et al., 2005] sin el problema de interacciones complejas por una gran cantidad de neuronas (miles de neuronas).

Las señales que se registran de "auto contacto" en una microisla (figura 2.2) son similares a las señales de transmisión de un cultivo con miles de neuronas [Bekkers & Stevens, 1991; Mennerick et al., 1995; Allen, 2006].

La técnica consiste en dirigir la adherencia y el crecimiento de una neurona o pequeño grupo de neuronas, sobre discretas "islas" (20 a 500 μm de diámetro) con sustrato aplicado (poli-L-lisina, poli-D-lisina o colágeno) sobre una capa no adherente (como el poliestireno). Si la microisla tiene al menos 150 μm de diámetro, entonces la neurona tiene mayor posibilidades de vivir [Ruardij et al., 2001].

El sustrato aplicado puede ser depositado mediante un atomizador de microgotas [Kimura et al., 1997; Allen, 2006; Padmashri et al., 2006], mediante robots o incluso hasta por un sistema casero de impresora modificada [Sanjana & Fuller, 2004].

Si el sustrato no es tratado bajo ningún patrón, entonces es imposible mantener un patrón celular con solo depositar neuronas a cierta distancia entre sí; ya que las neuronas tienden a desplazarse fuera de su posición inicial, sobre todo si existe perturbación del medio extracelular por consecuencia del movimiento de la pipeta durante la deposición de neuronas sobre el sustrato (figura 2.3).

Las microislas pueden estar constituidas desde una neurona hasta decenas de neuronas. Esta cantidad facilita la identificación óptica y electrofisiológica de cada neurona y su nivel de participación en la mini red neuronal.

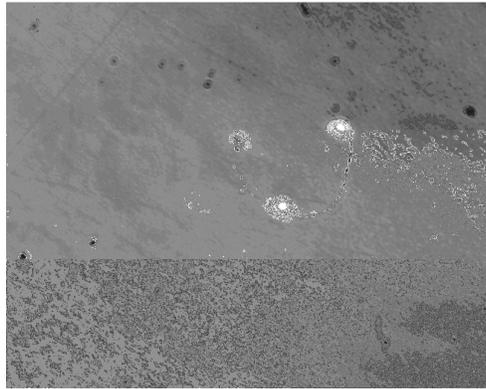


Figura 2.2 Imagen de dos neuronas dentro de una microisla. Fotografía (resolución 20X) de 2 neuronas (puntos luminosos) dentro de los límites de una microisla de poli-L-lisina, ambas conectadas entre sí.

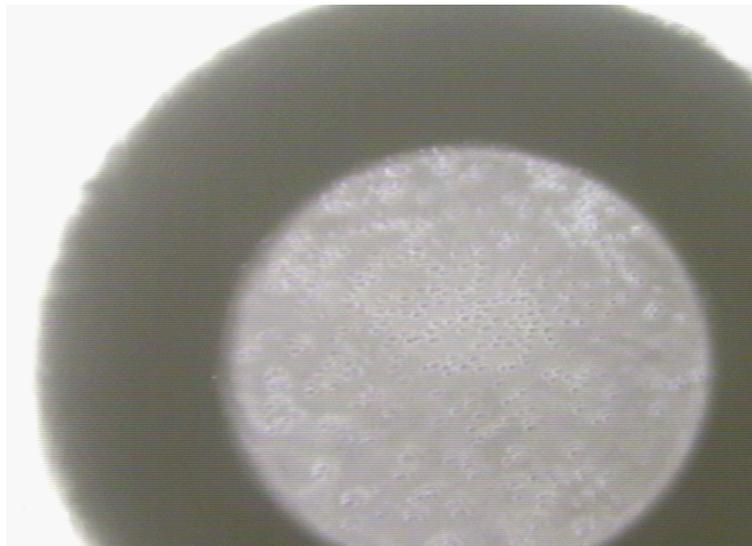


Figura 2.3 Vista del extremo inferior de la pipeta. Resolución 10X. La foto muestra la caída celular a través de la pipeta. Los pequeños círculos son neuronas que caen por el extremo inferior de la pipeta hacia la placa de Petri.

Sin embargo, las microislas pueden alterar el crecimiento y la maduración de la misma célula; por lo tanto, las señales registradas de un cultivo con pocas neuronas bajo la técnica de *patterning* podrían ser diferente a las señales registradas de un cultivo con miles de neuronas interconectadas entre sí [Gomperts et al., 2000; Rao et al., 2000; Arikkat, 2009; Liu et al., 2009].

2.5 Microestructuras

Para poder entender el funcionamiento de una red neuronal es indispensable trabajar a microescala [Rutten et al., 2001]. Esto consiste, usualmente, en emplear múltiples electrodos para registrarla AEN de diversas neuronas, de manera simultánea, en una red neuronal cerebral [Brown et al., 2004].

A continuación se mencionan las diversas técnicas utilizadas para el registro y estímulo de la AEN.

2.5.1 Sistema Micro Electro-Mecánicos (MEMS)

Sistema Micro Electro Mecánico (MEMS de sus siglas en inglés) es un término empleado para hacer referencia a la microfabricación de estructuras micrométricas como microsensores, microactuadores, micromanipuladores, microválvulas y microespejos [Chollet & Liu, 2010]. Se han utilizado, por ejemplo, microelectrodos de 1 μm de diámetro para el registro de PA [Drongelen, 2007].

2.5.2 Matriz de Microelectrodos (MEA)

Los MEA (MEA, por sus siglas en inglés) es una “Matriz de Microelectrodos” o “Matriz de Multi-Electrodos”. Los fabricantes que proveen *software* y *hardware* para el sistema de MEA son: “*Alpha MED Sciences, Osaka, Japan (MED systems formally manufactured by Panasonic); Axion Biosystems, Atlanta, GA; Ayuda Biosystems/SAS Biologics, Lausanne, Switzerland/Claix, France; 3-Brain, Landquart, Switzerland; MultiChannel Systems, Reutlingen Germany; Plexon, Inc., Dallas TX; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL*”. [Johnstone et al., 2010].

La tecnología MEA permite registrar y estimular extracelularmente un cultivo neuronal (cultivo disgregado o rodajas de tejidos) sin dañarlo [Erickson et al., 2008], con el fin de estudiar la AEN en redes [Gross & Rhoades, 1995; Keefer et al., 2001; Ham et al., 2008; Rolston et al., 2009], la plasticidad sináptica y los efectos farmacológicos y toxicológicos

[Johnstone et al., 2010]. La tecnología MEA puede ser aplicable tanto en *in vivo* [Buzsáki, 2004] como *in vitro* [Prasad et al., 2003].

Los MEA están microfabricados sobre placas rígidas de vidrio, silicio o sobre láminas flexibles de polímero que no pinchan a la neurona ni la matan [Yu et al., 2009].

Los MEA utilizan electrodos planares [Morin et al., 2005; Taketani & Baudry, 2006] y poseen la ventaja de combinarse con otro tipo de técnica, como *patterning* [Chang et al., 2000; Prasad et al., 2003; Suzuki & Yasuda, 2007] o con la tecnología MEMS, para la fabricación de microcanales [Dworak & Wheeler, 2009].

Sin embargo, el registro a través de electrodos planares puede proporcionar datos erróneos debido a que los registros provienen de una cantidad desconocida de neuronas. Las neuronas están en constante movimiento y se pueden alejar de los electrodos o se pueden agrupar varias neuronas sobre un mismo electrodo.

2.5.3 Neurochip

El neurochip es una interfase neuroelectrónica creada por microfabricación para contener neuronas. Los electrodos del neurochip facilitan el monitoreo y el estudio del compartimiento e interacción de una red neuronal bajo estimulación [Maher et al., 1999; Zeck & Fromherz, 2001; Fromherz, 2002; Morin et al., 2005].

Un ejemplo particular de neurochip son las neurojaulas o microjaulas fabricadas con parylene (polímero biocompatible). Las neurojaulas son microestructuras 3D utilizadas para atrapar el cuerpo neuronal cerca del electrodo plano (para registrar y estimular).

La neurona puede ser depositada a través de láser [Tokker et al., 2006] o a través de una pipeta [Maher et al., 1999]. Posteriormente, la neurona es retenida con ayuda de unos microtúneles, dentro de los cuales crecen las neuritas, estos microtúneles sirven tanto de anclaje, como de conductos, como medios bajo los cuales, la neurona, se puede comunicar con otras neuronas. La mortalidad en estos casos es del 35% a las 2 semanas de ser sembrado el cultivo neuronal [Erickson et al., 2008].

2.6 Propuesta de proyecto de tesis: Tecnología dos pozos y un microcanal

El dispositivo propuesto en esta tesis tiene como objetivos:

1. Establecer una interfaz eléctrica estable a largo plazo (de días a semanas) entre neuronas y electrodos *in vitro*, mediante el uso de microcanales que confinen axones individuales o grupos de axones.

2. Facilitar el desarrollo de métodos para la fabricación de las estructuras, compatibles según los requerimientos de costes y repetitividad demandados por la industria de *drug screening* (cribaje farmacológico).

2.6.1 Características del dispositivo polimérico

El dispositivo polimérico propuesto en esta tesis consiste en una estructura polimérica 3D formada por 2 pozos con dimensiones de 6 mm de diámetro por 7 mm de altura, intercomunicados entre sí por la parte inferior, a través de un microcanal o microtúnel, de 3,7 μm de altura, por 20 μm de ancho, por 1 mm de longitud [Morales et al., 2008].

Se ha demostrado anteriormente [Claverol-Tinturé, Ghirardi et al., 2005; Claverol-Tinturé, Rosell et al., 2005] que para esta geometría las neuronas crecen de manera espontánea hasta bloquear el microcanal y establecer una configuración de *loose-patch*.

Esta tesis se enfoca en los métodos de fabricación compatibles con la industrialización del dispositivo.

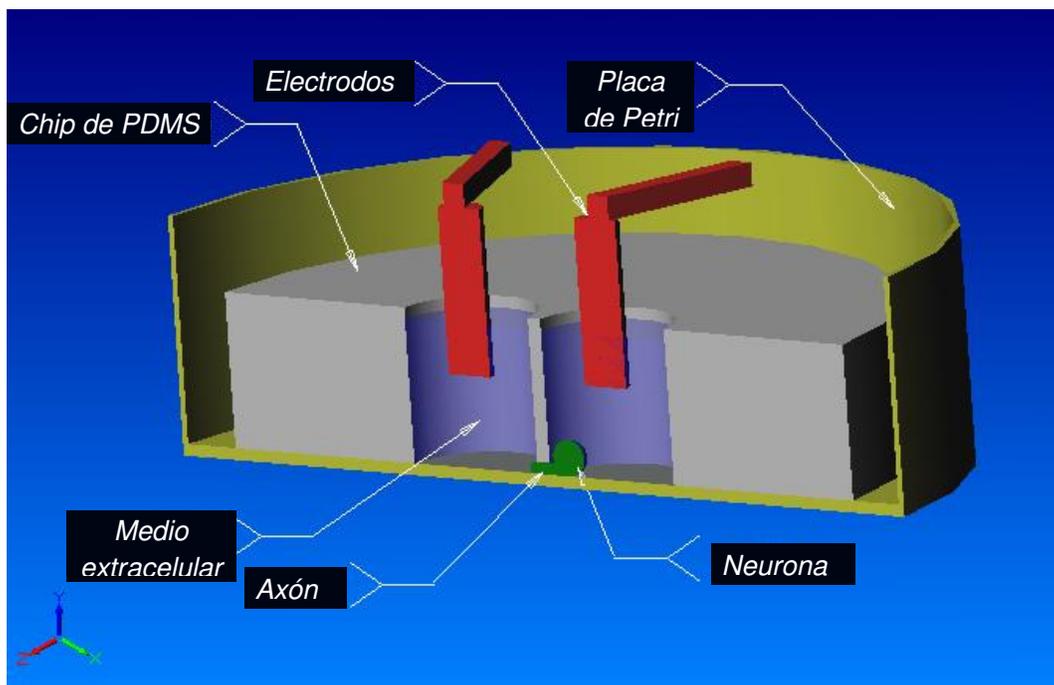


Figura 2.4 Modelo en 3D del dispositivo polimérico. Este modelo muestra las partes que conforman el dispositivo propuesto. La base es una placa de Petri con sustrato de poli-L-lisina. La neurona se encuentra sumergida en medio extracelular (neurobasal más otros aditamentos que se describen en el capítulo 5). El microcanal restringe el crecimiento de las neuritas. La señal emitida a través del microcanal es recogida por los electrodos, aprovechando las características conductivas del medio extracelular.

El chip es un dispositivo polimérico apoyado sobre una base sólida (placa de Petri, por ejemplo) previamente cubierta por una capa de sustrato adherente (poli-L-lisina). Dentro de cada pozo se cultivan desde 50.000 a 80.000 neuronas embrionarias (18 días de gestación) disgregadas de hipocampo [Morales et al., 2008].

El objetivo del dispositivo es facilitar el registro y estudio de la AEN *in vitro*. La señal es recogida por dos electrodos suspendidos en el medio extracelular, a cierta distancia de la neurona (figura 2.4) [Claverol-Tinturé & Pine, 2002]. Técnicamente, esto es un *loose-patch*, ya que existe una impedancia de 10 M Ω a 20 M Ω entre el electrodo y la membrana de la neurita (dentro del microcanal), formando un circuito cerrado para registrar la AEN.

La diferencia entre el dispositivo polimérico propuesto y el *loose-patch* convencional radica en que no existe una pipeta que se acerque a la membrana del cuerpo celular, sino por el contrario, las neuritas de la neurona son las que se acercan al microtúnel.

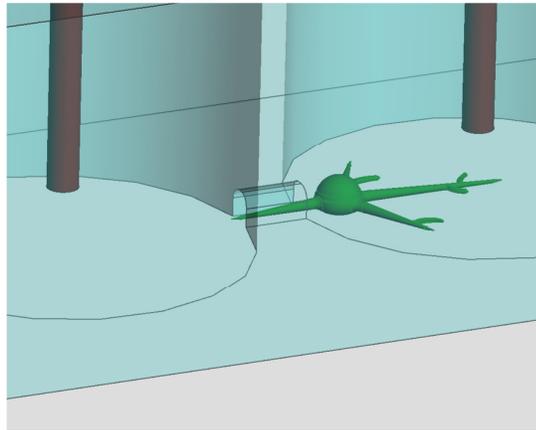


Figura 2.5 Simulación 3D de microcanal y dendrita. Ilustración de una neurona con una dendrita introducida dentro del microcanal de una pieza polimérica.

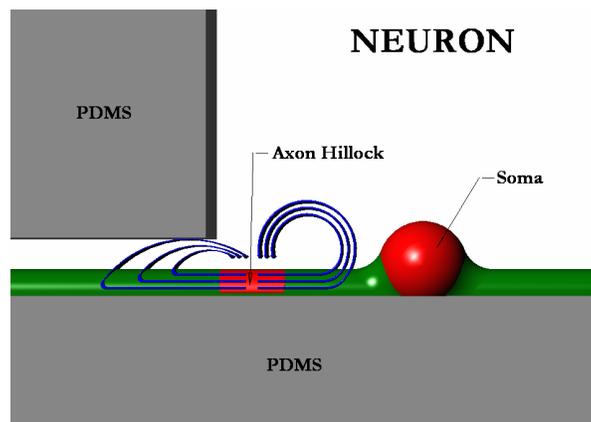


Figura 2.6 Corrientes iónicas. Representación gráfica de un axón dentro del microcanal. Las corrientes iónicas (flechas azules) del axón circulan a través de la membrana y regresan por el axón hillock.

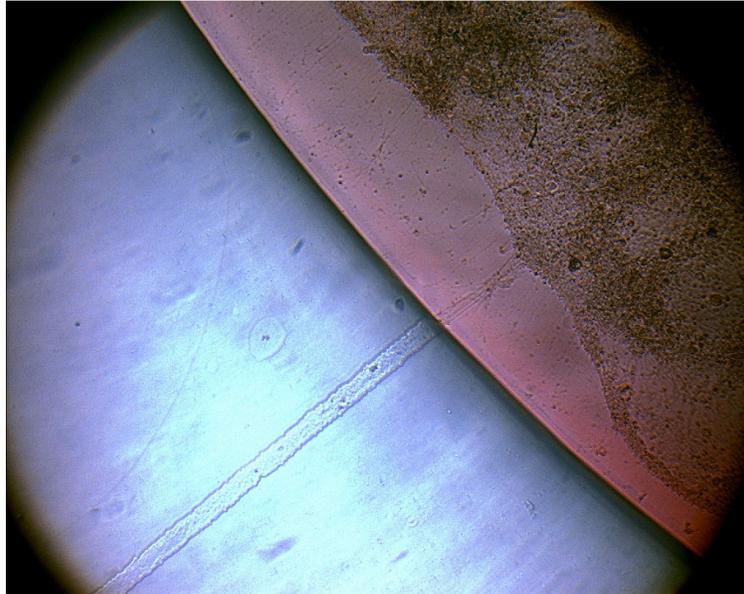


Figura 2.7 Imagen de cultivo celular. Imagen de microscopio (resolución 10X) donde se muestra un cultivo neuronal (3 semanas de sembrado) con sus neuritas extendidas a lo largo del sustrato para llegar al microcanal. El microcanal es el conducto que se aprecia en la parte inferior izquierda de la imagen. El cultivo neuronal está en la parte superior derecha. Las neuritas son las líneas semitransparentes que une el cultivo neuronal con el microcanal.

El crecimiento de glía y neuritas dentro del microtúnel (figura 2.5), reduce el espacio físico y aumenta la resistencia efectiva (de $10\text{ M}\Omega$ a $20\text{ M}\Omega$) por la cual circula la corriente (figura 2.6). La amplitud de las señales va desde $100\text{ }\mu\text{V}$ hasta más de 1 mV pico. La relación de señal-ruido es 100 o superior.

Después de 2 ó 3 días de cultivo, las neuronas desarrollan sus neuritas y las introducen dentro del microcanal (figura 2.7). No se requiere de ningún tipo de interacción con el cultivo neuronal, mas el necesario para renovar el medio extracelular.

2.6.2 Circuito amplificador para el registro de la AEN

Las señales eléctricas son amplificadas y posteriormente son registradas en el ordenador. Existen diversos amplificadores de bajo ruido, en el mercado, que se emplean para aumentar el valor de los PA antes de ser registrados en el ordenador.

En esta tesis, cuando se trabaja con una matriz de 6 dispositivos poliméricos (figura 2.8), las señales se amplifican y registran a través del E2drive “Aleria Biodevices”. Cuando se trabaja con una matriz de 40 dispositivos poliméricos (figura 2.9), las señales son amplificadas por “Multichannel Systems” y registradas a través de la interfase de “National Instruments” [Claverol-Tinturé et al., 2007].

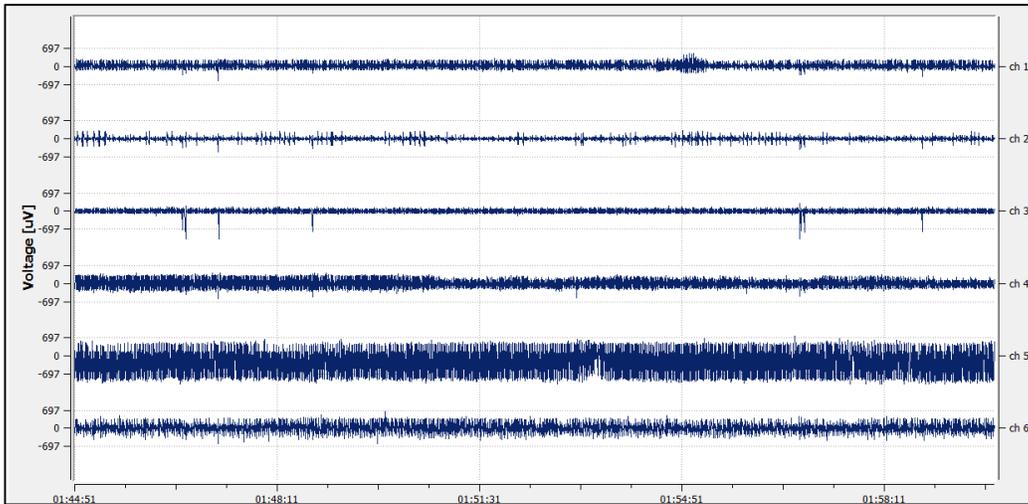


Figura 2.8 Registro con una matriz de 6 dispositivos poliméricos. Imagen del ordenador donde se aprecia la AEN de cada uno de los 6 dispositivos poliméricos.

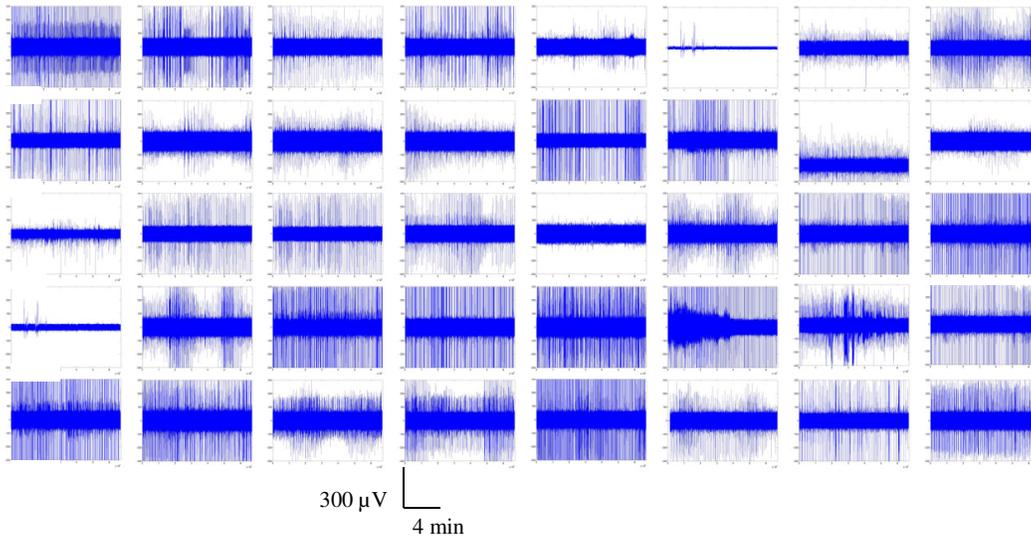


Figura 2.9 Registro con una matriz de 40 dispositivos poliméricos. Imagen del ordenador donde se aprecia la AEN de cada uno de los 40 dispositivos poliméricos.

Principales características del amplificador “Aleria E2 drive”

- Grabación de hasta 6 canales de manera simultánea
- Ancho de banda de 0,8 Hz a 3,9 kHz
- Ganancia de 2300

- Entrada de ruido menor a 1 μV (rms)
- Densidad de ruido es de 18 nV (Hz)^{0.5}

Principales características del amplificador “Multichannel Systems: MEA 1060 Amplifiers Inv-BC Standard (incl. FA605-BC)”.

- Grabación de hasta 60 canales de manera simultánea
- Ancho de banda de 10 Hz a 3 kHz
- Ganancia de 1100
- Entrada de ruido menor a 800 nV (rms)
- Densidad de ruido de 15 nV (Hz)^{0.5}
- Grado de certeza de 5%

2.6.3 Registro de AEN

Los registros que se obtienen de la AEN a través del dispositivo polimérico, pueden ser tanto AEN espontánea como AEN farmacológicamente estimulada.

Los electrodos no tocan a las neuronas, por lo que el registro es no invasivo, esto quiere decir que los electrodos no interaccionan de manera directa con la neurona y por lo tanto no afectan a la obtención de resultados.

2.6.4 Procesamiento de datos

Además del registro de la AEN, se necesita una etapa de procesamiento de datos como está descrita en el capítulo 4. La forma que ha optado para procesar los datos es por medio de la cuantificación de PA por minuto.

2.7 Conclusiones

Las conclusiones que se llegan en este capítulo 2 son:

- 1) Las neuronas se comunican a través de sinapsis, las cuales pueden ser químicas o eléctricas. Se aprovecha la parte de la comunicación eléctrica para, registrar, estimular y analizar la AEN de una red; sin embargo, aún es limitado el identificar a cada una de las unidades participantes y el grado de interacción.
- 2) Para tener éxito en sembrar neuronas bajo un patrón (*patterning*), es necesario, primero preparar el sustrato con un material adherente con un patrón predefinido y después sembrar las neuronas. La deposición neuronal sin estas condiciones no tendrá éxito.
- 3) Las microislas son la formación de pequeños grupos neuronales aislados de otros grupos. Las microislas garantizan el control de la cantidad de neuronas que interaccionan entre sí, y

facilitan la utilización de técnicas de investigación, como *patch-clamp*, para determinar el nivel de participación de cada neurona dentro de una red neuronal. En el laboratorio, se ha tenido éxito en el sembrado de microislas, utilizando un atomizador, de tamaño reducido, para dispersar gotas de poli-L-lisina sobre placas de Petri.

- 4) La electrofisiología convencional se aproxima a los cuerpos neuronales a través de electrodos y pinchazos que pueden alterar las propiedades membranales y matar a las neuronas mismas (después de unas horas de manipulación) [Maher et al., 1999; Erickson et al., 2008]. Por otro lado, los MEA son empleados en el estudio de la AEN como una alternativa menos invasiva [Rutten et al., 2001].
- 5) La técnica *patch-clamp* registra la AEN y con auxilio de la técnica de *patterning* se puede estudiar a cada una de las partes que conforman la red neuronal.
- 6) Al seguir la línea de investigación y los logros obtenidos bajo el grupo de E. Claverol-Tinturé, en esta tesis se propone la fabricación de un dispositivo polimérico innovador, capaz de registrar la AEN de manera no invasiva, con una relación de señal-ruido superior al convencional *loose-patch* y hacerlo con métodos de fabricación industrializables. El costo del dispositivo es inferior al requerido en la producción de los tradicionales MEA.
- 7) El dispositivo polimérico se encuentra constituido por un microcanal y dos pozos; este dispositivo es una herramienta práctica y sencilla para el estudio de la AEN. Su principio es sencillo, simplemente se siembra el cultivo neuronal dentro del pozo del dispositivo polimérico y después de 1 a 2 semanas se puede empezar a realizar registros de AEN y pruebas farmacológicas (por ejemplo, pruebas de toxicología) sobre los cultivos.

Capítulo 3: Microfabricación de dispositivos poliméricos

El capítulo 2 introdujo al estado del arte de los dispositivos empleados para el registro electrofisiológico de la AEN *in vitro*; a partir de ahí, la presente tesis propone, para el registro de la AEN, un dispositivo polimérico innovador, fácil en su proceso de fabricación y sencillo en su utilización.

El presente capítulo realiza un análisis de los procesos de microfabricación para la creación del dispositivo polimérico; los resultados obtenidos son mostrados tanto para los casos de éxito como de no éxito. Al final del capítulo se describen las conclusiones.

3.1 Introducción

La microfabricación es la agrupación de diversas tecnologías empleadas para crear estructuras a microescala. En un principio, la microfabricación estaba enfocada al área de semiconductores, posteriormente ha alcanzado diferentes áreas, donde se han creado partes mecánicas y montajes [Mahalik, 2006], hasta llegar al punto en el que la microtecnología ha podido interactuar con la biología celular, permitiendo la manipulación de células individuales, del ambiente extracelular y, de la forma y organización interna de la célula [Weibel et al., 2007].

Las neurociencias se apoyan en la microfabricación [Walz, 2007] para: (1) crear herramientas (electrodos y microelectrodos) que faciliten la medición y registro de la AEN, y (2) crear patrones físicos (microestructuras) que delimiten el crecimiento neuronal, emular la AEN y estudiar el comportamiento dentro de una red.

El dispositivo polimérico propuesto en esta tesis consiste en un par de pozos comunicados entre sí por un microcanal.

- Las características de los pozos son: 6 mm de diámetro por 7 mm de profundidad.
- Las características del microcanal son: 3,7 μm de altura por 20 μm de ancho por 1 mm de largo.
- Las dimensiones del microcanal limitan el tipo de técnica de microfabricación que puede utilizarse para fabricar el dispositivo.

3.2 Objetivos

El dispositivo propuesto en esta tesis es una pieza polimérica que puede ser creada por diversos procesos de microfabricación. El principal objetivo de este capítulo es identificar el proceso de microfabricación más eficiente para microfabricar la pieza polimérica.

Los objetivos específicos de este capítulo son:

1. Diseñar y crear una máscara para la producción de microcanales.
2. Crear másteres a través de fotorresinas y de técnicas de electrodeposición.
3. Evaluar diversos procesos para fabricar piezas poliméricas.
4. Comprobar y caracterizar el estado de la pieza polimérica final (correcta unión de los pozos y el microcanal con el sustrato, ausencia de fugas de medio de cultivo), a través de fluorescencia.
5. Determinar el procedimiento de fabricación que sea práctico, sencillo (pocos pasos), eficiente (buena calidad de réplica) y de bajo coste, tanto en el campo de la investigación como en el campo de la mercadotecnia.

3.3 Materiales y Métodos

La fabricación de la pieza polimérica se inicia con la creación de la máscara, para crear el máster, el cual será el molde principal en la fabricación en serie de dispositivo polimérico.

La mayoría de las tecnologías que generan piezas poliméricas y que pueden ser útiles para la fabricación de nuestro dispositivo polimérico, tienen su origen con la creación de una máscara. La máscara es una herramienta con la que se trabaja dentro de la sala blanca para microfabricar a la pieza máster.

Una vez que el máster se encuentra microfabricado con sus microestructuras, éste se utiliza como molde principal para hacer varias copias positivas. Las técnicas y protocolos más comunes utilizados para fabricar copias son: inyección de molde, *bonding*, *hot embossing*, *elastomer casting* [Becker & Gärtner, 2008].

Una de las tecnologías disponibles para la creación de microestructuras es el proceso de litografía de rayos X conocido como LIGA (de sus siglas en alemán para litografía, electrodeposición y moldeo), que trabaja con una precisión de micrómetros (plano horizontal). Sin embargo, este tipo de proceso es costoso y demasiado complejo para su uso [Heckele et al., 2001].

El resto de tecnologías que se emplean en la fabricación de piezas poliméricas son proceso menos complejo y tienen un precio más asequible; además, poseen más libertad para trabajar en

diversas posiciones sobre la estructura en comparación a LIGA; aunque, no tienen la misma calidad de LIGA, sus acabados pueden ser aceptables.

Otro tipo de técnicas es el *Rapid Prototyping*, que pueden fabricar piezas poliméricas con una impresora 3D. Esto se logra a través del revelado de diversas capas que se van apilando; sin embargo, las impresoras 3D tienen una resolución limitada y no pueden trabajar dentro de las dimensiones del microcanal de la pieza polimérica que deseamos producir.

Ejemplo de impresoras 3D son las “ED Systems”, que tienen una de las más altas resoluciones: 328 por 328 por 606 DPI (*Dots Per Inch*) (X-Y-Z), lo que equivale a decir 13 por 13 por 23,8 puntos por milímetros. Sin embargo, el microcanal, que es la parte más crítica y pequeña en nuestro proceso de microfabricación, requeriría de una impresora 3D que opere dentro del rango de 1270 por 1270 por 6350 DPI (X-Y-Z), ó 50 por 50 por 250 puntos por milímetros. Por lo tanto, *Rapid Prototyping* no se considera una opción para nuestro proceso de microfabricación.

Esterolitografía y mecanizado por descarga eléctrica son otro tipo de técnicas que no son consideradas porque difícilmente pueden trabajar dentro de la resolución deseada.

Las técnicas que se pueden utilizar para nuestro proceso de fabricación y reproducción de piezas poliméricas son: *hot embossing*, inyección de molde y *elastomer casting*.

Los trabajos de Becker [Becker & Gärtner, 2008] e investigaciones de campo (empresas Tecan, Precisionmicro, Electroform, AIMME) demuestran que hay una relación entre la cantidad de piezas a fabricar, el tipo de técnica a utilizar y la inversión económica que se requiere.

La mejor opción para producir a baja escala (cientos de piezas poliméricas) es *elastomer casting*. La mejor opción para producir a alta escala (decenas de miles de piezas poliméricas) es inyección de molde. La técnica de *hot embossing* es una respuesta intermedia a las técnicas de *elastomer casting* y de inyección de molde.

El molde maestro que se utiliza para la técnica de *elastomer casting*, puede estar hecho de una base de silicio o incluso de vidrio, con una cubierta de fotorresina; pero para las técnicas de inyección de molde y de *hot embossing* es imprescindible un molde de metal, ya que éste requiere ser introducido a alta presión y temperatura para la replicación de la pieza polimérica. Debido a las dimensiones del microcanal, la técnica de fabricación más adecuada para obtener un molde metálico, es la de electrodeposición.

Por lo tanto, las etapas que permiten microfabricar la pieza polimérica deseada, están clasificadas en:

- Creación de la máscara

- Creación del máster
- Microfabricación de la pieza polimérica
- Comprobación del estado de la pieza polimérica

3.3.1 Microfabricación de la máscara

El proceso de microfabricación por lo general se inicia con el diseño de la máscara.

La máscara es una lámina de cristal (transparente al UV) o bien una lámina transparente plástica (transparencia) con una figura impresa (diseñada en ordenador). La máscara se utiliza en la sala blanca, durante el proceso de fotolitografía, para proyectar su imagen sobre un sustrato con fotorresina y de esta manera crear las microestructuras deseadas. Las herramientas utilizadas son:

- Ordenador y *software*.- Se requiere de al menos un ordenador estándar con *software* integrado, con una precisión micrométrica, como “Freehand” o “Autocad”, para diseñar la figura 2D del máster y posteriormente ser impresa en una transparencia.
- Máscara.- Hoja delgada translúcida con propiedades ópticas uniformes y que contiene la impresión de la figura 2D del máster.

La máscara propuesta para esta tesis, está diseñada con el *software* “Macromedia Freehand 10” (Figura 3.1) y se encuentra constituida por 40 líneas, cada una de ellas mide 10 mm de largo por 20 μm de alto. La separación entre cada una de las líneas es de 12 mm (plano vertical) y 9 mm (plano horizontal). Este tipo de diseño es impreso en una filmina transparente (hoja de acetato).

3.3.2 Microfabricación del máster

El máster es el molde principal (imagen negativa) utilizado para fabricar las piezas poliméricas con una imagen positiva.

3.3.2.1 Microfabricación del máster por fotorresinas

El máster es creado por deposición de fotorresina (material sensible a los rayos UV) sobre la base de un sustrato. A través de los procesos de centrifugado (*spinning*) y de fotolitografía es como se forman las microestructuras deseadas.

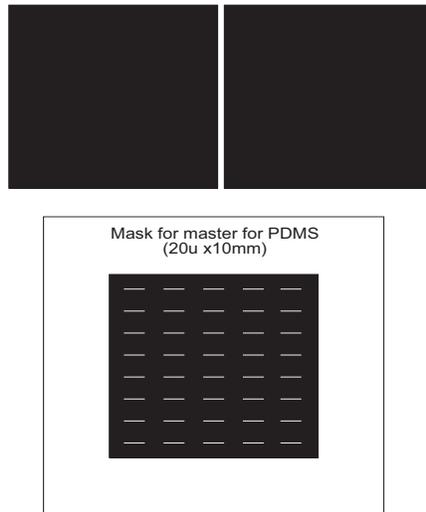


Figura 3.1 Máscara. Imagen de la máscara diseñada con el *software* “Freehand”. Esta máscara se emplea en el proceso de fotolitografía, para la creación del máster. Las dimensiones de cada una de las líneas son de 20 μm de alto por 10 mm de largo.

El sustrato puede ser de silicio, acero, níquel, vidrio u otro material con calidad pulido espejo (llanura con un valor inferior a 0,1 μm y rugosidad con un valor inferior a 0,002 μm).

En esta tesis, para crear el microcanal con las características deseadas, se utilizan la fotorresina AZ 9260, la fotorresina SPR220 y la fotorresina SU-8.

- **Fotorresina AZ 9260.**- Este tipo de fotorresina positiva está diseñada para trabajos de alta resolución y grandes diferencias entre la proporción de la base y la altura. Por lo general se utiliza para trabajos que van desde 2 μm hasta 24 μm de resolución [Chen et al., 2007]. El protocolo para la creación del máster está en **Anexo A-1**.
- **Fotorresina SPR220.**- Es una fotorresina positiva para usos generales que crea una película con un espesor de 1 a 30 μm . También posee excelentes características de adhesión y de cubierta que lo hacen muy útil para aplicaciones en MEMS y en electrodeposiciones [Kukharenka & Kraft, 2003]. El protocolo para la creación del máster está en **Anexo A-2**.
- **Fotorresina SU-8.**- Es un tipo de fotorresina (negativa) epoxi empleada para la microfabricación y otras aplicaciones microelectrónicas, con la que se obtiene una figura térmicamente y químicamente estable [Lorenz et al., 1997].

La resolución con la que se trabaja va del rango de 0,5 μm hasta más de 200 μm de espesor. El protocolo para trabajar con la fotorresina SU-8 está en **Anexo A-3**. El máster que se obtiene

es un sustrato de vidrio con unas pistas de fotorresina SU-8, de valores de 10 mm de largo, por 20 μm de ancho, con un espesor aproximado de 4 μm .

3.3.2.2 *Microfabricación del máster por electrodeposición de níquel*

La creación de un máster de metal (pistas y base) facilita el uso de la técnica de *hot embossing* o de inyección de molde [Piotter et al., 1997; Mekaru et al., 2004] para la microfabricación de microcanales sobre placas de poliestileno (PS) y para incrementar el número de piezas poliméricas que se pueden fabricar por hora.

La técnica de electrodeposición de níquel utiliza másteres con imagen positiva, los cuales pueden ser creados con la fotorresina AZ sobre sustrato de acero, con la fotorresina SPR sobre el sustrato de acero o con la fotorresina SPR sobre el sustrato de níquel.

La técnica de electrodeposición de níquel consiste en introducir dos electrodos dentro de una solución electrolítica, rica en níquel, a la cual se le aplica una corriente eléctrica que provoca que los iones del ánodo (placa de níquel) viajen y se depositen sobre el área descubierta de la superficie conductora del cátodo (trincheras del máster con fotorresina) para crear así, pistas de níquel sobre el sustrato.

La solución electrolítica es un componente clave para el proceso de electrodeposición de níquel; los elementos y las concentraciones que generalmente son empleados varían de acuerdo al gusto del mismo grupo de investigación y a la cantidad de níquel que se desea electrodepositar, como ocurre con Pai y con Kukharenka & Kraft, quienes electrodepositan con una resolución de 3,6 μm sobre un máster con fotorresina SPR [Pai, 2001; Kukharenka & Kraft, 2003] o los trabajos de Lee, Hirai y Ueno cuyas electrodeposiciones son inferiores a 10 μm utilizando diversas fotorresinas [Ueno et al., 1997; Hirai et al., 2002; Lee & Jiang, 2008].

La incorporación de ciertos compuestos dentro de la solución electrolítica pueden ayudar a mejorar la calidad de electrodeposición [Zhu et al., 2006; Monzón et al., 2007]. El empleo de Liebelight SF-1 y Liebelight SF-2 pueden funcionar como agentes resistentes al efecto de picadura sobre el acabado del material electrodepositado [Lim et al., 2007].

Por otra parte, la sacarina reduce el nivel de estrés al que se ve sometido la muestra durante el proceso de electrodepositado [Subramanian et al., 2001] y si además, se añade dodecilsulfato sódico (SDS de sus siglas en inglés Sodium Dodecyl Sulfate), se puede controlar mejor la resolución y evitar el nivel de estrés y de deformación del material [Kelly & Yang, 2001].

Para la presente tesis, se utiliza el siguiente protocolo:

- El máster es una pieza cuyo sustrato es de acero y su superficie está cubierta parcialmente por una fotorresina; el máster se somete a una etapa de pre-activación,

donde la pieza se sumerge en una solución química de 50% ácido clorhídrico (HCl) y 50% agua destilada (H₂O), a temperatura ambiente dentro, por un minuto.

- Posteriormente, el máster se somete a la etapa de activación (por 3 min), donde se sumerge dentro de una solución química denominada “baño *Woods*” (compuesto químico con diversos cloruros ácidos), a temperatura ambiente, y haciendo circular una corriente de densidad de $50 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$, para garantizar una deposición de alta calidad y buena adherencia al sustrato.

La composición química del baño *Woods* es:

- 25% Cloruro de níquel (NiCl₂)
- 25% Ácido clorhídrico (HCl)
- 50% Agua destilada (H₂O)

Luego, el máster se introduce en otra solución electrolítica, llamada “baño *Watts*” o “Sulfamato de níquel”, para depositar níquel sobre las partes descubiertas del máster. La densidad de corriente adecuada para una alta resolución de deposición es por debajo de los $20 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$ [Ueno et al., 1997; Agarwal et al., 2005; Zhu et al., 2006], en nuestro caso aplicamos una corriente de $10 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$, a una temperatura de 55 °C, por 3 horas. Esto equivale a depositar una capa de níquel de 2 μm por cada hora.

La composición química para preparar medio litro de solución acuosa para el proceso de electrodeposición con níquel está expresada en la tabla 3-1. La mezcla debe ser a la temperatura de 55 °C y el pH debe estar cercano al valor de cuatro, de esta manera el compuesto no será demasiado agresivo para el material a electrodepositar.

Tabla 3-1 Composición electroquímica de la solución para electrodeposición de níquel [Kelly & Yang, 2001], conocida también como solución de sulfamato de níquel.

Compuesto	Fórmula	Cantidad
Sulfamato de níquel	Ni(SO ₃ -NH ₂) 4H ₂ O	298,5 gr
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	22,5 gr
Sacarina	C ₇ H ₅ NO ₃ S	1,0 gr
Dodecilsulfato Sódico (SDS)	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	0,1 gr
Agua destilada	H ₂ O	500,0 ml

3.3.3 Microfabricación de piezas poliméricas

Para la creación de las piezas poliméricas, se utilizan materiales con las características de transparencia, biocompatibilidad, alta resistencia eléctrica, un valor de dureza de *Shore A 50*. Algunos de los principales materiales que cuentan con estas propiedades y resultan ser económicos son:

- **Polidimetilsiloxano (PDMS).**- Es una silicona que se emplea para protección contra la corrosión del medio ambiente y como amortiguador mecánico y térmico para evitar vibraciones, sobretodo en el área de óptica [Mata et al., 2005]. Las aplicaciones típicas son: encapsulamiento de amplificadores, bobinas, conectores, placas de circuitos, módulos de equipo, núcleos de ferrita, celdas solares y transformadores. También posee características de biocompatibilidad, transparencia, permeabilidad al O₂ y CO₂. Es económico y fácil de moldear [Morin et al., 2005].
- **Plástico.**- Este tipo de material está clasificado principalmente en dos grandes categorías: termoplásticos (los que se pueden moldear varias veces) y termoformados (los que solo se pueden moldear una vez). Las placas de Petri utilizadas para cultivos celulares son de PS (poliestireno), el cual es termoplástico; sus principales características son: material económico, rígido, transparente, fácil para moldear y con una buena estabilidad dimensional, tiene buenas propiedades eléctricas, tiene una excelente resistencia a las radiaciones gamma; pero las desventajas que posee son: fragilidad, pobre resistencia química (especialmente a químicos orgánicos), es susceptible a la degradación UV y es inflamable. La temperatura a la cual se empieza a derretir está entre 200-250 °C.

3.3.3.1 Técnica de *hot embossing*

Este tipo de técnica consiste en la marcación de figuras o formas sobre piezas poliméricas mediante la aplicación de presión y calor.

Una vez fabricado el máster de metal, éste se coloca junto a una placa de polímero, dentro de la máquina de *hot embossing* para que sean aprisionados, uno contra otro, para hacer el marcado.

A cada placa de polímero, de manera independiente, se le aplica una temperatura elevada. El polímero se calienta hasta llegar a la temperatura de transición vítrea (para reducir su nivel de dureza). Todo este procedimiento se realiza dentro de una cámara de vacío para evitar la

formación de burbujas, tanto de aire como de vapor de agua, y ayudar a incrementar el periodo de vida de las herramientas de níquel, al evitar la corrosión por las elevadas temperaturas.

La fuerza que se aplicada en este tipo de proceso va del orden de 0,5 hasta $2 \frac{\text{kN}}{\text{cm}^2}$ [Becker & Gärtner, 2008]. La pieza polimérica fabricada es una réplica negativa del máster, de muy alta calidad.

3.3.3.2 Técnica de inyección de molde

Esta técnica consiste en calentar un polímero granulado, para transformarlo en una masa plástica y depositarlo dentro del cilindro de plastificación de la inyectora; de esta manera, el material es inyectado en la cavidad del molde metálico, del cual tomará forma. Como el molde se encuentra a una temperatura mucho más baja que el punto de fusión del polímero, entonces éste se enfriará rápidamente adquiriendo la forma de su contenedor [Monzón et al., 2007].

En la figura 3.2 se presenta la sugerencia del diseño de cómo deben ser los acabados de las piezas poliméricas que son fabricadas bajo este tipo de técnica (el **Anexo B** contiene más detalles al respecto). Las partes a inyectar son:

- Una base con los microcanales.
- Una estructura con 6 pares de tubos, que representan los pozos en donde se depositan los cultivos neuronales.
- Una tapa, cuya finalidad es la de cubrir la superficie de los pozos para conservar las condiciones de esterilidad en los cultivos neuronales.

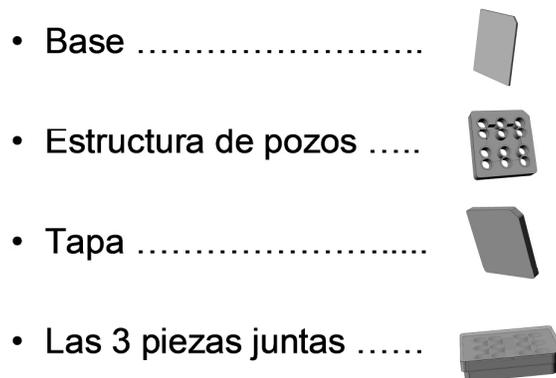


Figura 3.2 Modelo para inyección de molde. Esta figura muestra un modelo en 3D de las piezas de PS para ser creadas por la técnica de inyección de molde. La propuesta consiste en diseñar 3 piezas: la base con el microcanal, la estructura con los 6 pares de pozos y una tapadera para conservar la esterilidad.

3.3.3.3 *Técnica de ensamblaje de piezas poliméricas*

El ensamblaje de materiales consiste en unir las piezas poliméricas creadas mediante las técnicas de *hot embossing* o por inyección de molde, con el objetivo de crear una pieza polimérica única, la cual se encuentra constituida por un par de pozos comunicados por un microcanal.

Las diferentes formas que puede ser llevado a cabo el proceso de ensamblaje de las piezas con los pozos sobre las piezas con los microcanales son por enganchado mecánico o por *bonding*: adhesivo, unión por inducción, unión por temperatura y presión, herramienta de calentamiento para soldar, soldadura por gas caliente, soldadura por fricción o spin, calor por inducción, soldando por ultrasonido, soldado por vibración, soldadura dieléctrica, unión por infrarrojo, unión por láser y la soldadura por disolventes [Harper, 2006].

Los métodos de unión por temperatura y presión, herramienta de calentamiento para soldar, soldadura por ultrasonido o soldadura por rotación, son los más recomendados para los materiales plásticos, ya que sus tiempos de unión son relativamente cortos y no se requiere la incorporación de algún adhesivo, con esto se evita posibles efectos de toxicidad.

3.3.3.4 *Técnica de elastomer casting*

Este tipo de técnica consiste en verter una sustancia elastómera sobre un molde que, bajo cierta cantidad de temperatura y tiempo, se cura y de esta manera, cuando se retira el elastómero del molde contenedor, la pieza polimérica tendrá la forma negativa del molde. El material generalmente utilizado para esta técnica es el polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard© 184. El protocolo para la preparación de silicona PDMS se encuentra en el “**Anexo A-4**”.

La pieza polimérica final es una matriz de 95 mm de lado, por 96 mm de lado, por 7 mm de espesor, que posee 40 pares de perforaciones (figura 3.4) y con un microcanal entre cada par de perforaciones. El microcanal posee 1 mm de longitud con 3,7 μm de profundidad y 20 μm de ancho. Los pozos son de 6 mm de diámetro y 7 mm de longitud. En el “**Anexo C**” se ofrece más información acerca del diseño de las piezas de aluminio utilizadas para fabricar la matriz de PDMS.

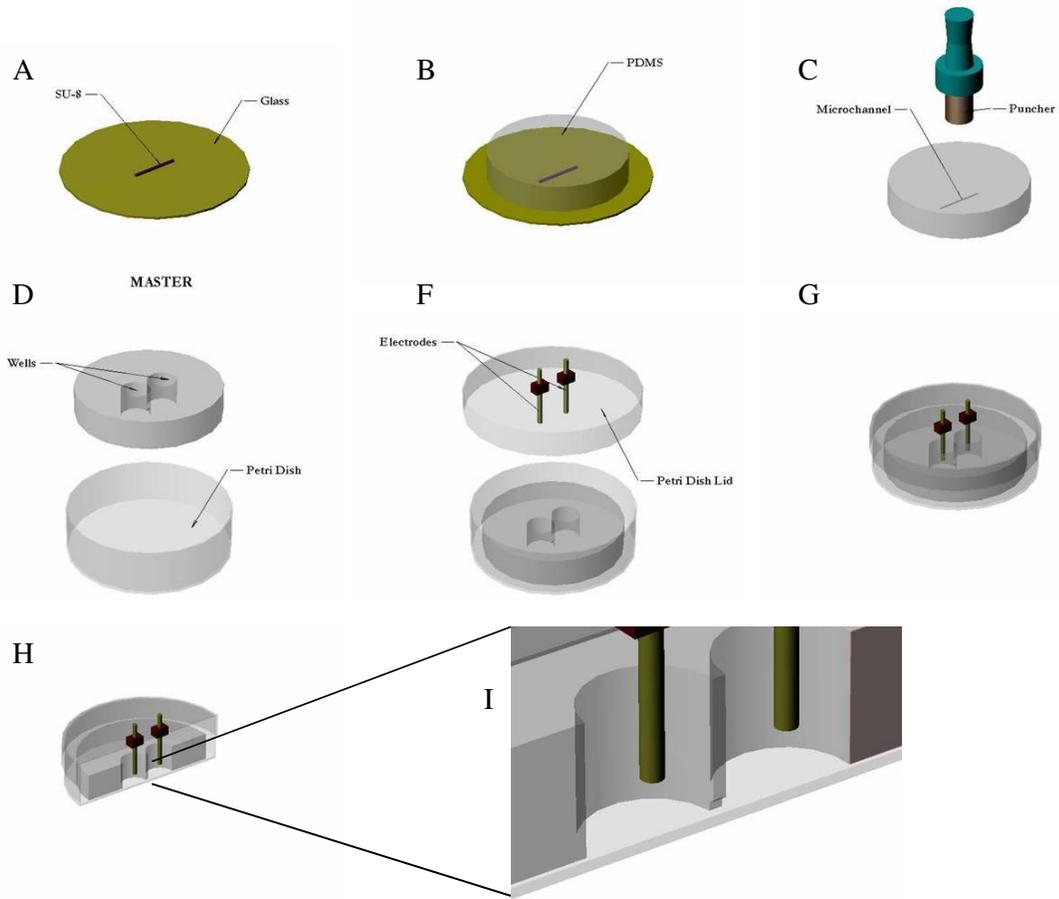


Figura 3.3 Modelo 3D del proceso de microfabricación. Diagrama representativo del proceso de fabricación de las piezas poliméricas de PDMS con el microcanal, mediante la técnica de *elastomer casting*. (A) El máster es una pista de fotorresina SU-8 sobre un sustrato de vidrio. (B) El PDMS es curado sobre el máster y después perforado (C) a través del microcanal para crear dos agujeros que más tarde se convertirán en pozos (D). La pieza polimérica de PDMS es colocada sobre una placa de Petri, recubierta previamente con poli-L-lisina (F). (G) Los electrodos son introducidos a través de la tapa y quedan sumergidos y suspendidos dentro del medio extracelular para realizar registros de la AEN de las neuronas. (H) y (I) Muestra de corte transversal de la pieza polimérica final, donde el microcanal queda expuesto.

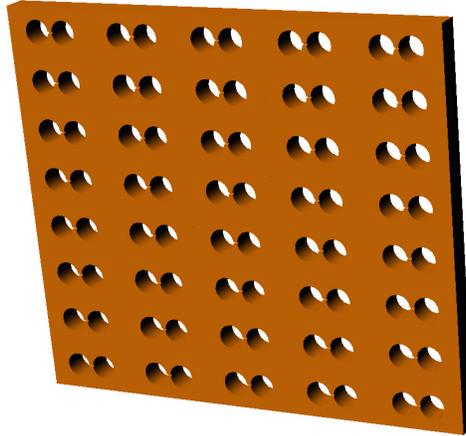


Figura 3.4 Modelo 3D de pieza elastomérica con 40 pares de perforaciones. Este modelo representa la matriz final del proceso de fabricación mediante la técnica de *elastomer casting*.

3.3.4 Caracterización de las piezas poliméricas

Material fluorescente se utiliza para comprobar que la pieza polimérica se encuentra correctamente elaborada y ensamblada. El material fluorescente emite luz cuando está bajo cierto tipo de radiación, esta propiedad se aprovecha para mezclarse con agua destilada y depositarlo dentro del dispositivo polimérico. Todas las cavidades son llenadas y de esta forma se corrobora visualmente que todas las partes se encuentren unidas, sin obstrucciones en el canal y sin fugas en las uniones.

Lucifer Yellow.- Es un colorante fluorescente disulfónico aniónico, propuesto para ser utilizado en la corroboración del estado del dispositivo polimérico, el cual es soluble en agua y tiene un pico de excitación/emisión de 428/536 nm. Se utiliza principalmente para estudios morfológicos neuronales, porque contiene un grupo de carbohidratos que permite estar covalentemente conectado con las moléculas que le rodean durante la fijación del aldehído.

3.4 Resultados

Los resultados de los procesos de microfabricación se presentan en el siguiente orden:

- Microfabricación de la máscara.
- Microfabricación del máster con diferentes fotorresinas (AZ, SPR y SU-8) y por electrodeposición.
- Microfabricación de las piezas poliméricas.
- Moldes alternativos
- Caracterización de los dispositivo polimérico

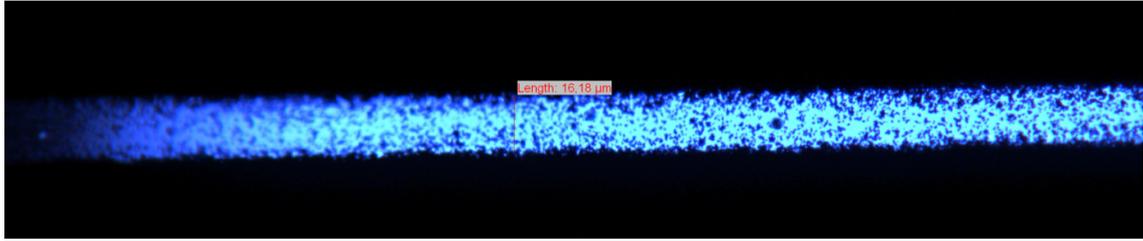


Figura 3.5 Línea de la máscara. La máscara está impresa sobre una hoja de acetato. La fotografía muestra a una de las 40 líneas de la máscara donde se observa que el valor real de su altura mide $16\ \mu\text{m}$

3.4.1 Microfabricación de la máscara

El diseño de la máscara con 40 líneas (figura 3.1) se realiza bajo el *software* “Freehand”, las líneas tienen valores de 10 mm de largo por $20\ \mu\text{m}$ de alto.

Este diseño se imprime en la compañía Leicrom “Taller de preimpresión” a alta resolución (3.500 DPI) sobre una transparencia. Los valores de las líneas impresas sobre la transparencia oscilan entre las 16 y $17\ \mu\text{m}$ (figura 3.5), en lugar de las $20\ \mu\text{m}$ como estaba diseñado.

Las observaciones indican que la hoja de acetato presenta ciertas irregularidades ópticas (motas) en las zonas de la línea donde debería haber solo transparencia; sin embargo, estas motas microscópicas no afectan al proceso de fotolitografía, ya que su tamaño es muy reducido con respecto al área total de la pista.

3.4.2 Microfabricación del máster

Los procesos de microfabricación de los másteres tuvieron lugar en las salas blancas de la Universidad Politécnica de Cataluña (UPC) y en la plataforma de nanotecnología del Parque Científico de Barcelona (PCB).

3.4.2.1 Microfabricación del máster con fotorresinas (AZ, SPR y SU-8)

Máster de fotorresina AZ sobre sustrato de acero.- Este máster se encuentra constituido por un sustrato de acero sobre el cual está depositada una película de fotorresina AZ con unas trincheras que dejan al descubierto la base del sustrato. Las trincheras obtenidas por este proceso presentan ciertas irregularidades sobre su superficie (figura 3.6), por lo que la calidad del microcanal se ve comprometida desfavorablemente.

Máster de fotorresina SPR sobre sustrato de acero.- Este máster se encuentra formado por un sustrato de acero con una película de fotorresina SPR y unas trincheras que dejan al descubierto al sustrato de acero (figura 3.7).



Figura 3.6 Trinchera con fotorresina AZ. Fotografía de la trinchera de una película de fotorresina AZ sobre un sustrato de acero. La trinchera deja al descubierto la naturaleza del sustrato; sin embargo, no es completamente uniforme.

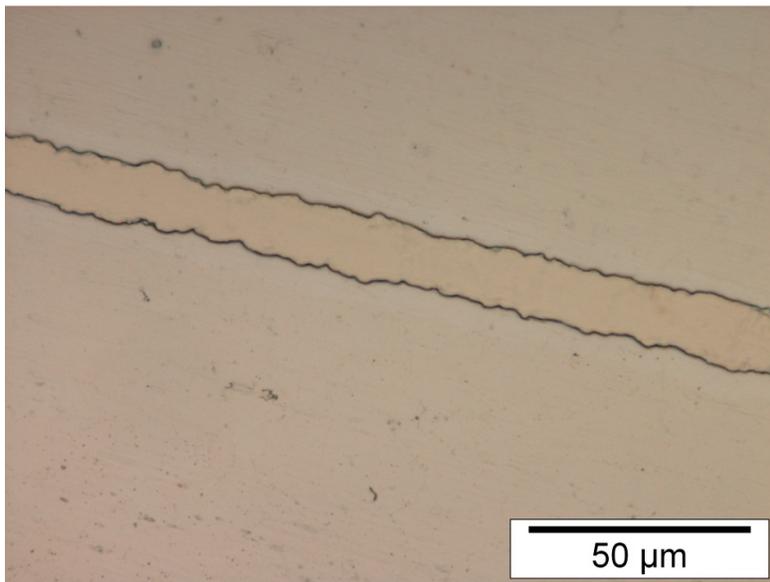


Figura 3.7 Trinchera de la fotorresina SPR sobre el sustrato de acero. La trinchera tiene una desviación estándar de $0,58 \mu\text{m}$ en los bordes.

Los acabados de las trincheras con la fotorresina SPR tienen mejores resultados, en uniformidad, con respecto a la fotorresina AZ.

Máster de fotorresina SPR sobre sustrato de níquel.- Este máster está elaborado de un sustrato de níquel sobre el cual se encuentra una película de fotorresina SPR con trincheras, las cuales dejan al descubierto la base del sustrato de níquel.

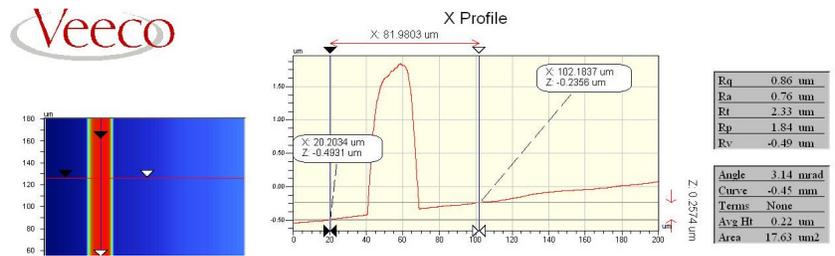


Figura 3.8 Medición de la pista de SU-8. Imagen donde se muestran los resultados gráficos al medir con el perfilómetro las pistas de SU-8 sobre el sustrato de vidrio.

Los resultados del proceso de fotolitografía son similares a los de fotorresina SPR sobre sustrato de acero (figura 3.7).

Máster de fotorresina SU-8 sobre sustrato de vidrio.- Este máster consiste en pistas de fotorresina de SU-8 formadas sobre un sustrato de vidrio. Este tipo de máster es utilizado para el proceso de *elastomer casting*.

Las pistas de SU-8 son caracterizadas con el perfilómetro; la altura de la pista medida es de 3,7 µm. El ancho de la pista es en promedio de 20 µm, este valor es diferente al medido en las líneas originales de las máscaras (figura 3.5), lo que nos indica que los rayos UV se proyectan con un cierto ángulo oblicuo sobre el máster, durante el proceso de fotolitografía.

Este tipo de máster, después de ser utilizado unas decenas de veces, será reemplazado por uno nuevo para evitar que la degradación de las pistas afecte a la réplica del microcanal.

3.4.2.2 Microfabricación de máster metálico por electrodeposición

La electrodeposición de níquel es una técnica popular para generar moldes de metal, en la cual se emplean sustratos de metal cubiertos parcialmente por una resina, como paso previo ante la técnica de inyección de molde o de *hot embossing*. Es por ello que, durante esta etapa, es muy importante que la pieza que se fabrica tenga un acabado excelente.

La técnica de electrodeposición fue desarrollada de manera experimental en las instalaciones del laboratorio del PCB, como parte del estudio en la creación de moldes de metal.

Resinas como PDMS están exentas de ser utilizadas en los procesos de electrodeposición, ya que tienden a separarse del sustrato cuando están sumergidos en la solución electrolítica, modificando las características del área a depositar y alterando los resultados.

Las características paramétricas de la solución electrolítica de sulfamato de níquel con la que se realiza la electrodeposición son:

- pH = 2,92 (temperatura de 55 °C)
- Conductividad = 64,2 $\frac{\text{mS}}{\text{cm}}$ (temperatura de 25 °C)

- Densidad de la corriente aplicada para el proceso de electrodeposición de níquel = $10 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$

Observaciones diversas de la respuesta de la fotorresina del sustrato ante la solución electrolítica:

- La fotorresina AZ se desprende ligeramente al estar sumergida en la solución de sulfamato de níquel, lo cual afecta el área de electrodeposición de algunas de las pistas.
- La fotorresina SPR también se desprende en contacto con la solución de sulfamato de níquel, aunque en menor proporción que con respecto a la fotorresina AZ.

Los resultados muestran que al utilizar fotorresina AZ y SPR, las pistas de níquel electrodepositadas sobre el sustrato de acero y sobre el sustrato de níquel, presentan una adherencia pobre. La pista de níquel electrodepositada puede ser desprendida fácilmente al desplazar una punta de pipeta de plástico sobre su superficie.

Otros trabajos de electrodeposición sobre sustratos de níquel tienen lugar en las instalaciones del “Laboratorio de electrodeposición y corrosión” del departamento de química-física de la Universidad de Barcelona (UB); quienes utilizan su propio protocolo, dando como resultados que las pistas tengan una fuerte adherencia, difícil de desprender del sustrato; pero con una calidad morfológica poco deseable (figura 3.9).

El protocolo del “Laboratorio de electrodeposición y corrosión” consiste en someter al máster a un periodo de activación de por 2 min dentro de un baño Woods, con una densidad de corriente de $12.500 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$; luego se electrodeposita, el máster, dentro de una solución electrolítica.

Para encontrar el mejor punto de electrodeposición, se utilizan diferentes parámetros:

- Electrodeposición de sulfamato de níquel por un tiempo estimado de 15 min.
- Electrodeposición de sulfamato de níquel por un tiempo estimado de 8 min.
- Electrodeposición en un baño Watts con níquel (sulfato) por un tiempo de 15 min.
- Electrodeposición en un baño Watts con níquel (sulfato) por un tiempo de 8 min.

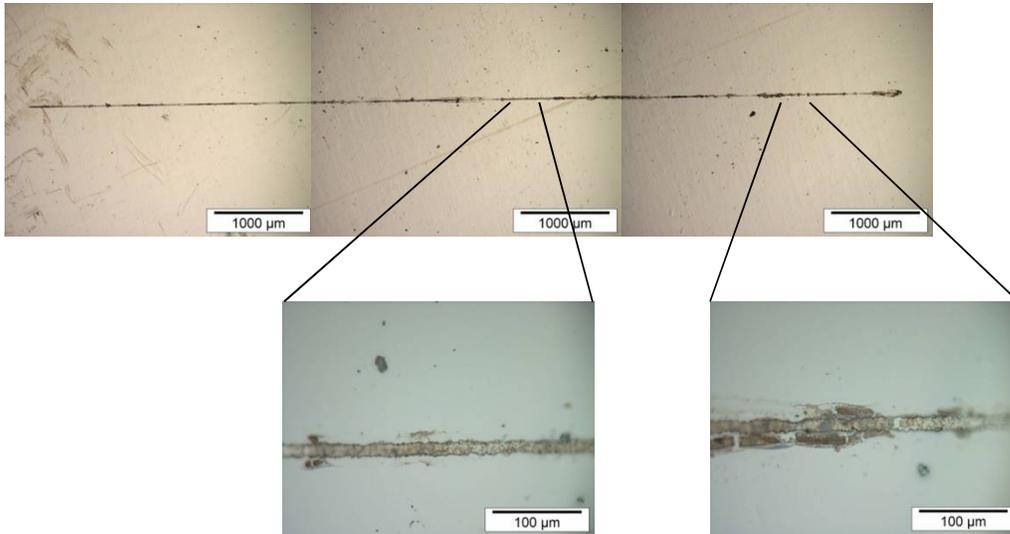


Figura 3.9 Pista de níquel electrodepositada sobre sustrato de níquel. En las imágenes superiores se muestra una pista entera de níquel. En las imágenes inferiores se muestra una sección parcial de la pista ampliada, donde se puede apreciar con más detalle las irregularidades de la pista.

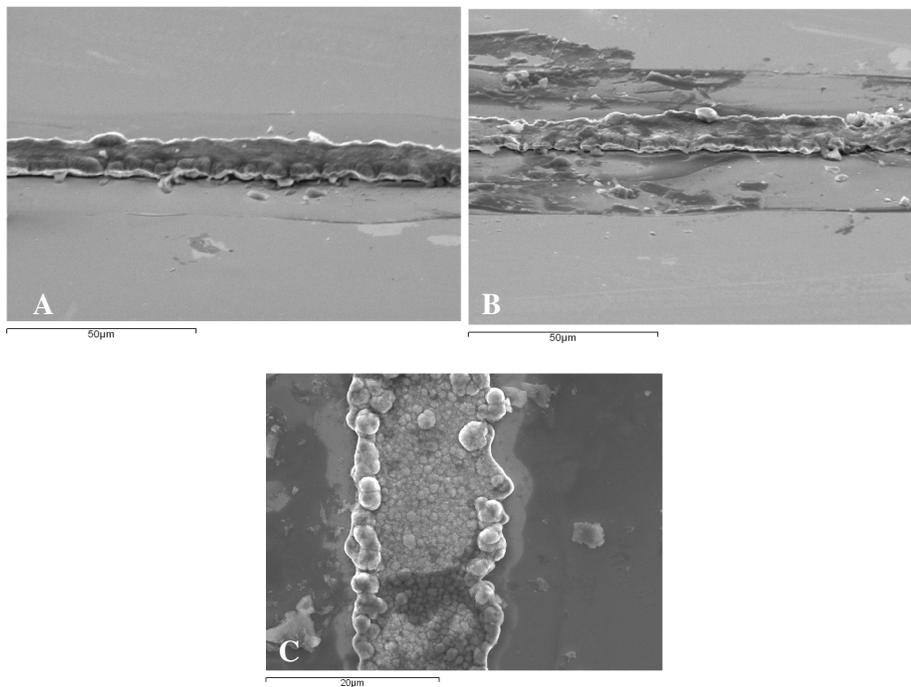


Figura 3.10 Electrodeposición de pista de níquel sobre máster de níquel. Imágenes tomadas por microscopio electrónico de barrido (SEM). (A) Vista superior del sustrato con una inclinación de 60° , aquí se muestra la pista con irregularidades. (B) Depositiones de níquel fuera del área de la pista. (C) Vista superior del sustrato donde se muestra la pista con agrupaciones de níquel en los bordes de la misma.

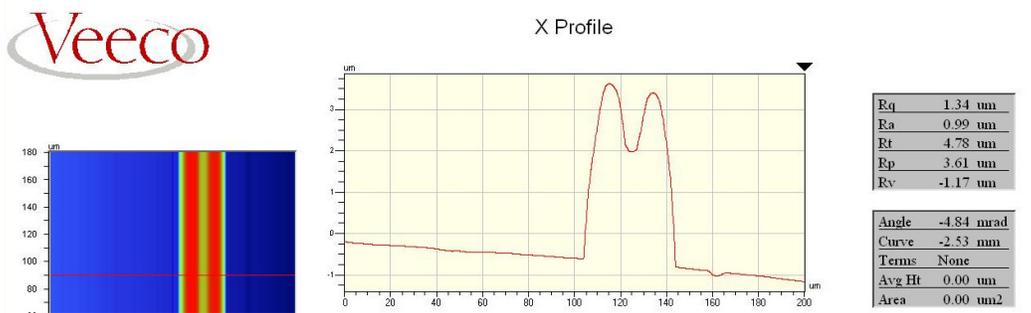


Figura 3.11 Medición de la sección transversal de la pista de níquel con perfilómetro. Medición realizada sobre el ancho de la pista de níquel. Dos picos son registrados sobre la superficie de la pista; estos picos representan una alta concentración de grumos de níquel.

Los resultados que se obtienen de los másteres ante los diversos parámetros de electrodeposición son muy similares entre sí, las pistas se adhieren fuertemente a la base; pero en algunos casos, el níquel se electrodeposita fuera de la pista, debido a una posible filtración entre la fotorresina y el sustrato (figura 3.10 (A) y (B)). También la morfología de las pistas presenta ciertas irregularidades en su superficie (figura 3.10 (C)), corroborado por el perfilómetro (figura 3.11).

3.4.3 Microfabricación de piezas poliméricas

Los resultados obtenidos de utilizar diversas técnicas para la microfabricación de las piezas poliméricas son:

3.4.3.1 Técnica de *hot embossing*

Las operaciones de *hot embossing* se realizan en las instalaciones del PCB, en la plataforma de nanotecnología. El modelo de la máquina que se emplea es “HEX03 Hot Embossing”.

Para este tipo de técnica se utiliza un máster cuya base y pistas están constituidas por PDMS; este máster de silicona se obtiene al utilizar la técnica de *elastomer casting* sobre un máster previamente fabricado por fotolitografía.

Un máster de vidrio con pistas de SU-8 es muy frágil para este tipo de operación. Un máster de vidrio se puede destruir parcial o totalmente durante el proceso de *hot embossing*.

Se puede utilizar un máster de PDMS para hacer las marcas de los microcanales sobre las piezas de PS y unirlos, posteriormente, con otra pieza de PS (con los pozos marcados) a través de alguna técnica *bonding*.

Tabla 3-2 Características de la técnica de *hot embossing*

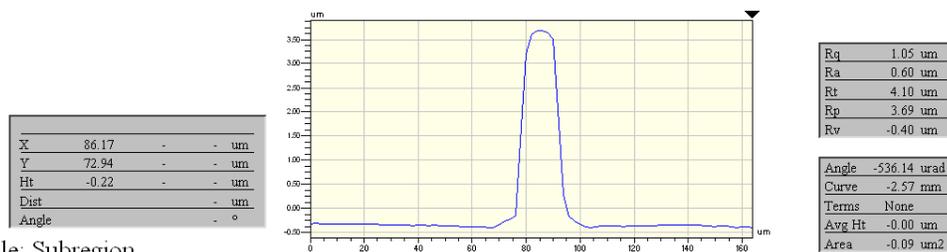
Descripción	Valor
Fuerza aplicada	500 N
Temperatura en la máquina	130 °C
Temperatura real entre las placas PDMS y PS	110 °C
Tiempo de operación	5 min
Altura de la pista del molde PDMS	3,7 μm
Profundidad marcada en el PS	2,7 μm

En la tabla 3-2 se muestra que el valor de la altura de las pistas del máster de PDMS son 3,7 μm (figura 3.12) y el valor de las trincheras creadas sobre las piezas de PS son de 2,7 μm; esto indica que existe una pérdida en la transferencia de forma del 27%.

Un protocolo opcional para marcar piezas de PS (30 mm por 30 mm), es sustituir la máquina de *hot embossing* por un *hot plate* y colocar las piezas apiladas en el siguiente orden, empezando desde abajo: el *hot plate*, el máster, una pieza de PS y un peso cercano a 2 kg; esto último, sirve para hacer presión sobre las piezas poliméricas y ayudar a que se solden. El *hot plate* debe tener una temperatura cercana a los 65 °C.

3.4.3.2 Técnica de inyección de molde

Las características de los moldes de metal que son fabricados por electrodeposición y electrodeformado, presentan ciertas imperfecciones que son críticas en cuanto a la forma, por lo que no se utiliza la técnica de inyección de molde en la presente tesis.



Title: Subregion

Note: X offset:426 Y offset:134

Figura 3.12 Medición de las pistas del máster de PDMS mediante interferómetro. Este máster se encuentra constituido por una placa de PDMS con pistas del mismo material, su altura corresponde a 3,7 μm y el ancho a 17 μm (valor en el punto medio del plano vertical de la pista). Este máster se usa para marcar las piezas de PS por medio de la técnica de *hot embossing*.

3.4.3.3 Técnica de ensamble de materiales

La técnica de ensamble de materiales (*bonding*) une a las piezas bases de PS (microcanal marcado) con las piezas pozos de PS (perforaciones de 6 mm de diámetro) a través de temperatura y presión.

El procedimiento para unir las piezas consiste en apilarlas bajo un peso de 2 kg, dentro del horno a una temperatura comprendida entre los 85 °C y 100 °C, por un tiempo cercano a 2 horas.

El resultado es una pieza única con dos pares de pozos comunicados entre sí por un microtúnel. Utilizar otro tipo de técnica para ensamblar este tipo de piezas poliméricas puede provocar que el microtúnel se obstruya, debido al valor tan reducido de sus dimensiones.

3.4.3.4 Técnica de elastomer casting

Actualmente se trabaja con PDMS de la marca “Sylgard ® 184 Silicone Elastomer”, como silicona por excelencia para la microfabricación del dispositivo polimérico; este tipo de silicona se considera biocompatible y se utiliza por la mayoría de los investigadores como contenedor de cultivos celulares [Mata et al., 2005].

Sin embargo, la compañía Dow Corning, principal distribuidora de este material, no hace explícita que la característica de esta silicona sea totalmente biocompatible [Dow Corning].

Un tipo de silicona totalmente certificada como biocompatible por la compañía Dow Corning, es “Silastic® MDX4-4210 BioMedical Grade Elastomer”.

Al realizar un estudio comparativo para determinar las diferencias entre las siliconas Sylgard 184 y MDX4-4210, se obtienen los siguientes resultados:

Resultados biológicos:

- Después de dos semanas de que los cultivos neuronales son contenidos por las estructuras de PDMS Sylgard 184, estos tienden a desplazarse en sentido opuesto al de las paredes de dicho material.
- La reacción obtenida de los cultivos celulares ante el material MDX4-4210, es que no existe desplazamiento celular en ninguna dirección específica.
- La cantidad de días que llegan a vivir los cultivos neuronales son las mismas con ambos materiales.

Resultados físicos:

- El material Sylgard 184 es de color transparente, lo cual facilita la inspección óptica de los cultivos dentro del microcanal, y posee una dureza de 50 en la escala de Shore, con lo que no existe deformaciones del material, cuando se realizan cortes.

- El material MDX4-4210 tiene un color blanco, esto dificulta la inspección óptica en el microcanal; además, posee una dureza de 30 en la escala Shore A, por lo que se deforma el material cuando es sometido a procesos de cortado y de perforaciones.

Las diferencias biológicas entre ambos materiales no son cruciales; pero las diferencias físicas que presenta el material MDX4-4210 hacen que no sea considerado apto para la microfabricación de dispositivos.

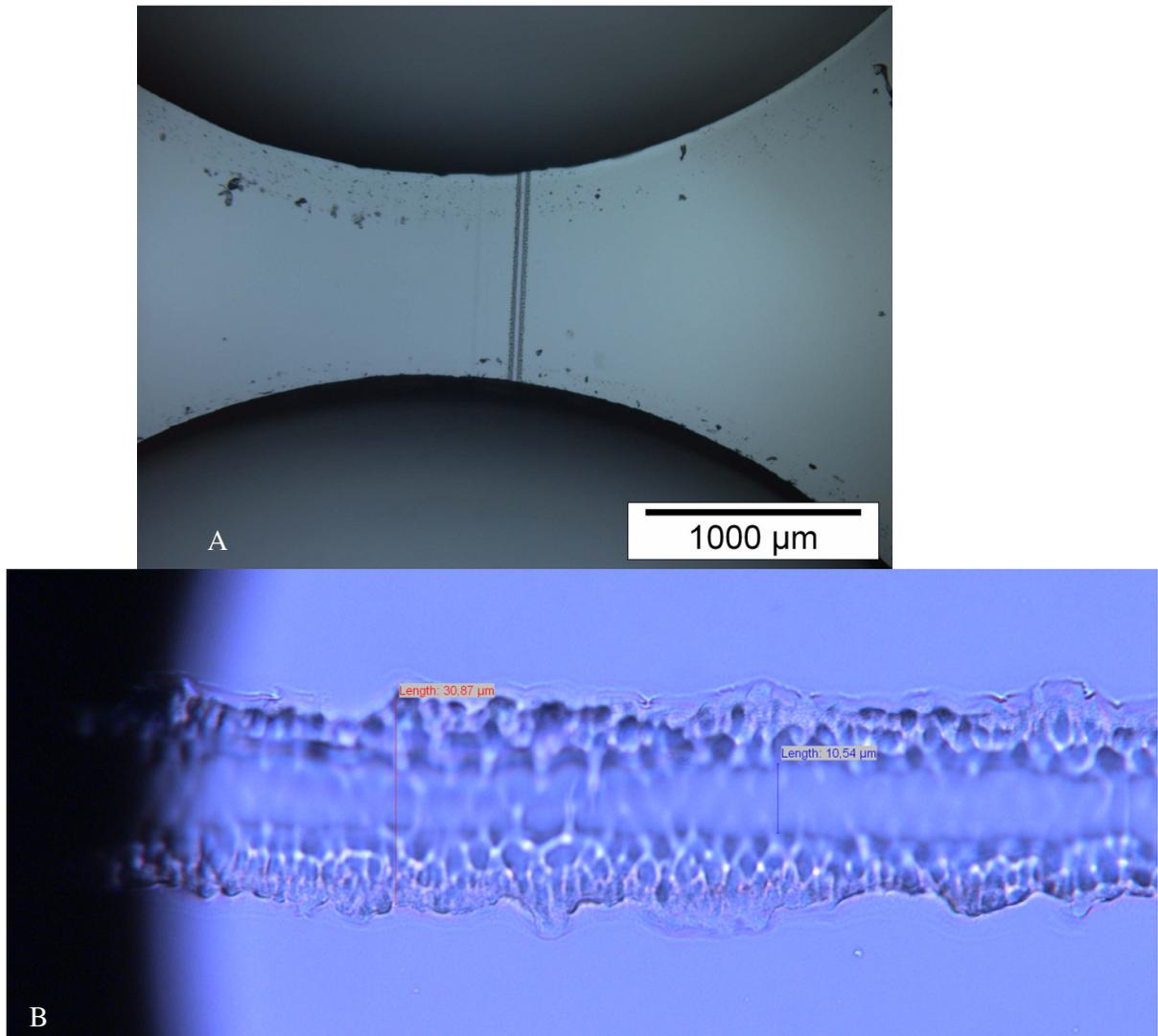


Figura 3.13 Pieza polimérica de PDMS con el microcanal formado. La imagen superior (A, en campo claro) muestra el microcanal comunicando los dos pozos. En la imagen inferior (B, en campo claro) se muestra el microcanal (amplificada 100 veces), donde se aprecia su morfología. La sección más abierta del microcanal mide cerca de 30 μm , mientras que la sección menos abierta del microcanal solo mide alrededor de 10 μm ; el valor de apertura promedio es aproximadamente de 20 μm .

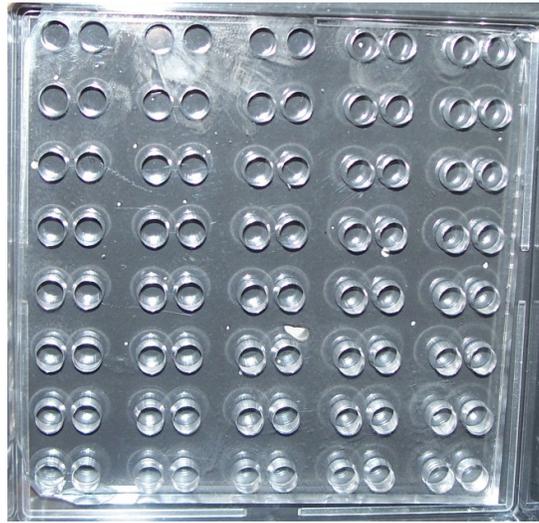


Figura 3.14 Fotografía de la matriz de PDMS. Esta matriz contiene 40 pares de pozos y un microcanal que conecta cada par de pozos. Sus dimensiones son: 95 mm por 96 mm por 7 mm de espesor. Cada pozo tiene un diámetro de 7 mm y el canal (no visible en la imagen) tiene las dimensiones de 3,7 μm de alto, 20 μm de ancho y 1 mm de longitud.

Las piezas poliméricas se fabrican utilizando PDMS Sylgard 184; con esto se logra obtener una matriz donde se puede replicar el microcanal de manera exitosa (figura 3.13) y realizar perforaciones sin problemas, como se ilustra en la figura 3.3. El resultado final es una matriz de 40 pares de pozos (figura 3.14) con un microcanal entre cada par de pozos.

Es necesario aplicar un proceso de limpieza a la pieza para remover las posibles partículas de suciedad que se pudieron adherir durante el proceso de su creación. Posteriormente se depositan sobre una placa de PS previamente tratado con poli-L-lisina.

Una de las ventajas del PDMS es que se adhiere con facilidad a la superficie de PS y con la suficiente fuerza para mantenerse unido, aunque la pieza esté completamente volteada; siempre y cuando, esté libre de impurezas.

Cuando la pieza de PDMS es colocada sobre la superficie de PS, el microcanal pasa a estar en contacto con la superficie y forma un microtúnel (figura 3.3 (G) y figura 3.3 (H)).

La ventaja de crear una matriz polimérica con 40 pares de pozos, es que se puede utilizar como una sola unidad o ser dividida en varias unidades pequeñas tanto de 1 par de pozos como de 6 pares de pozos (figura 3.15).



Figura 3.15 Fotografía de 1 par de pozos y 6 pares de pozos. Estos bloques son formas alternativas en que puede ser cortada la matriz de PDMS. En una placa de Petri de 35 mm de diámetro cabe un bloque de silicona de 1 par de pozos (no se muestra en la imagen) y en una placa de Petri de 60 mm de diámetro cabe un bloque con 6 pares de pozos.

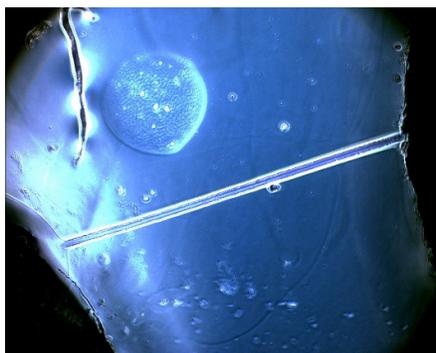


Figura 3.16 Unión de dos piezas de PS. Esta imagen (magnificación 10X) muestra el microcanal y los 2 pozos unidos a través de la técnica de *bonding* (temperatura y presión). *Lucifer Yellow* es aplicado para verificar el estado del ensamble de las piezas poliméricas y del microcanal. En esta imagen se puede apreciar que el microtúnel se encuentra completamente libre, de lo contrario la iluminación sería solo parcial por una parte del microcanal. También se puede observar la existencia de una burbuja de aire y de una pequeña ranura en la parte superior del microcanal, que debió formarse durante el proceso de ensamble; pero estos elementos no afectan a nuestro sistema, porque están afuera del área de nuestro interés.

3.4.4 Moldes alternativos

Existen otros tipos de moldes creados para la técnica de *elastomer casting*, cuyos resultados para reproducir piezas poliméricas son limitados. Pero se considera importante dar a conocer estos moldes, para demostrar que se ha escogido el mejor molde y se podrán ver en el **Anexo D**.

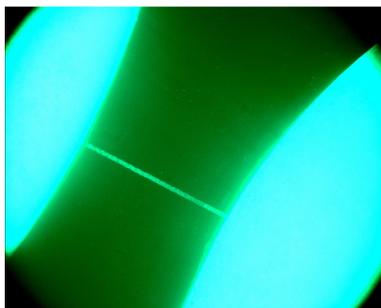


Figura 3.17 Dispositivo PDMS sobre PS con *Lucifer Yellow*. La pieza de PDMS está sobre una superficie de PS y se le ha incorporado agua destilada con *Lucifer Yellow*. En esta imagen se observa con claridad como el microcanal se comunica de manera nítida de un pozo al otro pozo.

3.4.5 Caracterización de los dispositivos polimérico

3.4.5.1 Piezas creadas por *hot embossing*

Se emplea *Lucifer Yellow* como material fluorescente para rellenar los pozos y el microcanal y, de manera óptica, corroborar que las piezas poliméricas estén perfectamente unidas (figura 3.16) sin que el microcanal esté bloqueado.

3.4.5.2 Piezas creadas por la técnica de *elastomer casting*

La verificación de la ausencia de fugas en la unión entre la pieza de PDMS y la placa de poliestireno se puede realizar de manera visual llenando la pieza con *Lucifer Yellow* diluido en agua destilada (figura 3.17). La fluorescencia se emite con mayor intensidad solo en las regiones por donde pasa el líquido.

3.5 Conclusiones

Las conclusiones obtenidas son:

- 1) Máscara.- El proceso de fotolitografía se realiza con éxito al utilizar una hoja de acetato como máscara. La presencia de motas microscópicas sobre su superficie no alteran los resultados.
- 2) Máster.- Los mejores resultados, en orden de calidad descendente, para la creación de microestructuras y adherencia al sustrato en la fabricación del máster son fotorresina SU-8, fotorresina SPR 220 y la fotorresina AZ 9260; respectivamente.
- 3) Fotolitografía.- El ancho de las líneas impresas en la máscara mide entre 16 y 17 μm ; sin embargo, los valores de las pistas de SU-8 sobre el sustrato de vidrio, tienen un valor superior a las 20 μm ; esto indica que los rayos UV se proyectaron con un ángulo obtuso y

no de manera perpendicular, como debería ser, debido, seguramente al poco tiempo de vida que le queda al equipo.

- 4) Electrodeposición.- Los resultados de electrodeposición son limitados y no pueden ser utilizados. En el laboratorio del PCB, la electrodeposición de pistas de níquel sobre sustratos de níquel dan como respuesta pistas con una morfología homogénea, pero con una adherencia pobre al sustrato; en cambio, los resultados que se obtienen en el “Laboratorio de electrodeposición y corrosión” son pistas fuertemente adheridas al sustrato, pero con irregularidades en sus morfologías.

Un excelente proceso de electrodeposición (pista con forma homogénea y buena adherencia) se lograría si se empleara la misma composición electrolítica que utiliza el “Laboratorio de electrodeposición y corrosión”, pero con la misma densidad de corriente empleada en el laboratorio del PCB (valores entre los 10 y 20 $\frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$).

Realizar la modificación antes mencionada, podría ayudar a crear un máster metálico con pistas homogéneas, fuertemente adheridas al sustrato, para utilizarse en la fabricación de piezas poliméricas, sobre todo para el proceso de inyección de molde.

- 5) Ensamble de materiales.- La mejor técnica para unir piezas de plástico y conservar las características del microcanal intactas es unir por medio de temperatura y presión (*bonding*). Cualquier otro tipo de técnica puede provocar una falsa unión entre las partes o una obstrucción parcial o total en el microcanal.
- 6) *Elastomer casting*.- La mejor manera para producir un número reducido de piezas de manera sencilla y fácil, es mediante la técnica de *elastomer casting*. La eficiencia en el tiempo de fabricación es mayor al producir una pieza grande (matriz de 40 pares de pozos) de silicona y posteriormente cortarla en partes más pequeñas.

La silicona Sylgard 184 facilita la inspección óptica de los cultivos en el microcanal; además, sus otras propiedades como alta resistividad eléctrica, dureza de 50 Shore A y biocompatibilidad, lo hacen el material idóneo para la creación de piezas poliméricas para la contención de cultivos neuronales y registro de la AEN. La silicona MDX4-4210 no es apropiada para realizar cultivos, porque su nivel de dureza (30 Shore A) no le permite ser manipulada con facilidad, además de que su color dificulta la inspección física dentro del microcanal.

- 7) Fabricación de piezas.- El tipo de molde más adecuado como máster, es un sustrato de vidrio con pistas de SU-8. La tecnología de *elastomer casting* es la más apropiada para generar piezas poliméricas y poder hacer investigación *in vitro*.

- 8) Comprobación del estado de las piezas poliméricas.- La fluorescencia del *Lucifer Yellow* es una herramienta que auxilia para confirmar las óptimas condiciones de ensamble entre las piezas poliméricas fabricadas.
- 9) Moldes alternativos.- Los moldes hechos con resina MMA o resina epoxi no muestran resultados ventajosos como los que se obtienen con el molde cuya base es de vidrio y pistas son de SU-8; por lo cual, son descartados dentro del proceso de fabricación por considerarse poco prácticos para su utilización.
- 10) Resumen.- En esta tesis, la técnica más apropiada para crear un máster (para una cantidad de decenas de piezas) es usar un sustrato de vidrio con pistas de SU-8, para posteriormente usar la técnica de *elastomer casting* para crear los dispositivos poliméricos.

Capítulo 4: Procesamiento de datos de la actividad eléctrica neuronal

El presente capítulo aborda el estado del arte sobre el procesamiento de datos de la AEN. Será posteriormente, en el capítulo 5, donde se utilizarán las técnicas que se describirán para el análisis de los registros obtenidos con el dispositivo polimérico.

4.1 Introducción

Usualmente, la etapa del procesamiento de datos consiste primero en filtrar la información, haciéndola pasar por un filtro digital pasabanda para reducir ruido y posibles interferencias de 50 Hz o altas frecuencias [Drongelen, 2007]; posteriormente se utiliza un listón (*threshold*) como referencia, para que las señales con cierta amplitud, sean consideradas como PA; luego estos PA son agrupados en base a la similitud de sus formas (*spike sorting*).

4.1.1 Concepto de Potencial de Acción (PA)

La comunicación entre neuronas se realiza mediante corrientes eléctricas que atraviesan su cuerpo cuando modifican su potencial de membrana [Izhikevich, 2007]. Este tipo de señal se denomina “Potencial de Acción” (PA) o “*spike*”. Un PA tiene una duración de 1 ms a 5 ms y su amplitud es de hasta 100 mV registrados intracelularmente o del orden de microVoltios cuando se registra extracelularmente.

4.1.2 Los *bursts*

Un *burst* es la fase donde una neurona o grupo de neuronas disparan múltiples PA de manera consecutiva [Izhikevich, 2006]. Existen diferentes tipos de *bursts* [Morin et al., 2005], acorde a su duración y repetitividad se clasifican en *bursts* de cola larga, *burstiness* y *superbursts* [Wagenaar et al., 2005; Wagenaar et al., 2006].

4.2 Objetivos del capítulo

El presente capítulo tiene como objetivo investigar y seleccionar el procesamiento de datos adecuado para procesar la información de la AEN y representar gráficamente el nivel de AEN de un cultivo neuronal.

4.3 Registro de señales eléctricas

El registro de cualquier tipo de señal biológica, química, eléctrica o física, consiste en amplificar la señal eléctrica [Silberberg et al., 2004], antes de ser grabadas (proceso de digitalización), para utilizar todo el rango dinámico del convertidor analógico-digital y aprovechar al máximo posible el valor de la señal [Bacci et al., 2002; Atzori et al., 2004].

Las características que son consideradas para analizar los registros de las AEN son: frecuencia de disparo, tiempo de duración, amplitud de la señal y forma de onda [Hok et al., 2007].

4.3.1 Características del muestreo

Un PA tiene una duración mínima de 1 ms, por lo tanto la frecuencia mínima de muestreo para registrar la AEN, debe ser de 2.000 muestras por segundo (2 kHz), para satisfacer el teorema de Nyquist [Drongelen, 2007].

Las frecuencias típicas de muestreo para las señales de AEN son 20 kHz [Bacci et al., 2002], 22,2 kHz [Pelt et al., 2004], 25 kHz [Rolston et al., 2007], 32 kHz [Hok et al., 2007] y hasta de 50 kHz [Dworak & Wheeler, 2009].

4.3.2 Tipos de filtros

Con frecuencia se utilizan filtros digitales recursivos tipo *Butterworth* [Atzori et al., 2004; Drongelen, 2007] pasabanda con frecuencias de corte entre 100 Hz y 10 kHz. Por ejemplo, Wagenaar et al., utilizaron 100 Hz y 3 kHz [Wagenaar et al., 2005], mientras que Pelt et al., usaron 250 Hz y 5 kHz [Pelt et al., 2004]. En el extremo superior de la banda, Hok et al., fijaron los cortes en 300 Hz y 10 kHz [Hok et al., 2007], mientras que Mori et al., lo hicieron en 5 kHz y 10 kHz [Mori et al., 2007].

4.4 Procesamiento de datos

El procesamiento de datos tiene la función de determinar la frecuencia de disparo de los PA (o de los *bursts*), determinar su duración [Morin et al., 2005], determinar el porcentaje de PA dentro de los *bursts* y caracterizar su forma de onda [Johnstone et al., 2010].

4.4.1 Modelado de Poisson en la AEN

Predecir el comportamiento de una serie de disparos neuronales se puede conseguir con la probabilidad de distribución de Lévy [Morin et al., 2005], al utilizar el modelo de Poisson [Drongelen, 2007]. En este caso se considera que cada generación de PA es independiente del

resto; pero que dependen de la frecuencia de disparo instantáneo, lo cual puede ser aplicado incluso para describir un *burst* [Dayan & Abbott, 2001].

La hipótesis de Poisson para modelar el comportamiento de la AEN no se considera completamente factible [Amarasingham et al., 2006]. No se puede determinar la frecuencia de disparos con una limitada cantidad de datos en un número finito de series de disparos [Dayan & Abbott, 2001].

4.4.2 Detección automática de PA

La manera más práctica de procesar la información es a través de la detección automática de PA o técnica de “*spike sorting*”, la cual consiste en identificar al número de neuronas participantes en los registros, gracias a diferencias entre la forma de los PA extracelulares generados por diferentes células, y asignar a cada una de estas neuronas la señal identificada [Brown et al., 2004; Oweiss, 2010].

Solo se puede obtener información útil si se realiza correctamente la detección de señales neuronales (como un algoritmo de aislamiento de PA [Buzsáki, 2004]) y si son agrupadas, adecuadamente, en base a sus formas de onda [Lewicki, 1998; Mtetwa & Smith, 2006].

Los métodos de detección automática de PA se clasifica en dos categorías [Mtetwa & Smith, 2006]:

1. Los que comparan la señal con una forma previamente grabada para encontrar a sus semejantes [Salganicoff et al., 1998; Hok et al., 2007], estas formas pueden representar las condiciones de cierto tipo de experimentos, como las señales de control, las señales bajo algún tipo de droga y las señales después de un lavado [Dworak & Wheeler, 2009].
2. Los que marcan un listón de corte para buscar un evento que lo sobrepase [Drongelen, 2007], puede ser por amplitud [Bergman & DeLong, 1992], por el valor de energía [Kim & Kim, 2000], por los coeficientes de transformada [Nenadic & Burdick, 2005] o por la primera derivada de la señal [Mukhopadhyay & Ray, 1998]. El valor asignado al listón de corte puede ser de 4,25 veces [Wagenaar et al., 2005], 4,5 veces [Wagenaar et al., 2006; Rolston et al., 2007], 6 veces [Dworak & Wheeler, 2009] o incluso de hasta 8 veces el valor estimado RMS del ruido [Shahaf & Marom, 2001].

La mayoría de las técnicas de análisis utilizan parejas de neuronas como: *cross-correlogram* [Dworak & Wheeler, 2009], *cross-correlation* [Silberberg et al., 2004], *cross-intensity function*, histogramas de tiempo peri-estimulados (PSTH) [Shadlen & Newsome, 1998], método *likelihood* y métodos en base al dominio de la frecuencia.

Las técnicas que no utilizan parejas de neuronas son: método de clasificación por forma de onda del PA, método de acierto gráfico, estimación parcial coherente y decodificación de las series de la AEN [Brown et al., 2004].

Sin embargo, el proceso de detección de PA y los algoritmos de ordenación y clasificación no son aún perfectos [Joshua et al., 2007], consumen tiempo y llegan a ser subjetivos [Buzsáki, 2004].

Por otra parte, las neuronas no siempre generan PA con una forma y amplitud característica [Mtetwa & Smith, 2006] y los problemas de detección de PA se amplifican cuando las neuronas disparan en forma de *bursts* [Shahaf & Marom, 2001] o cuando múltiples neuronas disparan *bursts* de manera simultánea [Lewicki, 1998].

4.5 Software para el procesamiento de datos

El *software* utilizado por los investigadores para el procesamiento de datos se clasifica en:

1. *Software* de desarrollo. Permite a los investigadores diseñar su propio algoritmo sin tener que ser expertos en el hardware de adquisición de datos [Bacci et al., 2002] como “LabVIEW” o “Matlab” [Drongelen, 2007; Rolston et al., 2007; Srinivas et al., 2007].
2. Paquete de *software*. Proporciona una adquisición y análisis de datos sofisticados, pero el usuario solo puede hacer limitadas modificaciones; aun así, son extremadamente populares por su facilidad de uso [The Axon Guide, 2008].

Algunos de los paquetes de *software* que se pueden encontrar en el mercado son:

- *IGOR Pro*.- *Software* para realizar gráficas científicas, procesar datos e imágenes [Silberberg et al., 2004], y es programable. Se puede hacer análisis de patrones para verificar acciones (eventos) de corriente y agruparlos en intervalos de un minuto, para después ser graficados e identificar los cambios graduales en los patrones de disparo a lo largo del tiempo [Nunemaker et al., 2003]. Este producto tiene en el mercado desde 1989.
- *pCLAMP*.- *Software* para adquirir grabaciones electrofisiológicas y monitorear las señales. También se utiliza para hacer procesamiento y análisis de datos [Bacci et al., 2002; Marrero & Lemos, 2003]; los resultados pueden complementarse con el uso del *test ANOVA* en conjunto con *Bonferroni's Multiple Test Comparasion* [Gomes et al., 2008].

- *ORIGIN*.- *Software* con un gran potencial de trabajo, ya que importa datos (incluso de “Matlab”) y los analiza. Tiene poder para hacer análisis estadístico donde incluye ANOVA.
- *CLAMPLEX*.- *Software* para la adquisición de datos de electrofisiología [Mori et al., 2007].
- *Clampfit*.- *Software* que recibe la información de “*CLAMPLEX*” para hacer análisis y graficar los de datos [Dworak & Wheeler, 2009].
- *Neuroexplorer (Nex technologies)*.- *Software* que posee un lenguaje tipo “script”, analiza y procesa los datos de la AEN [Shafer et al., 2008; Dworak & Wheeler, 2009; Johnstone et al., 2010].
- *Axoclamp*.- Sistema amplificador que aumenta el valor de la señal para la grabación de AEN electrofisiológica. Los datos que se obtienen pueden ser analizados después con otro tipo de *software* como “Matlab” [Gillis et al., 2006].
- *MEABENCH*.- *Software* que interacciona con la tarjeta de adquisición de datos y análisis en línea [Wagenaar et al., 2005].

4.6 Criterios para el procesamiento de datos de nuestro dispositivo polimérico

4.6.1 Características de la AEN

El dispositivo polimérico propuesto en esta tesis, registra las señales de las neuritas que se encuentran dentro del microcanal, estas señales pueden provenir tanto de una neurona como de un grupo de neuronas.

Los registros de las señales eléctricas neuronales contienen señales de origen biológico combinado con contribuciones de varias fuentes de ruido e interferencia.

Las señales de origen biológico en un registro típico pueden ser:

- Los PA producidos por los cambios de voltaje en una neurona (figura 4.1).
- Las ráfagas de PA conocidos como *bursts* (figura 4.2).
- Los potenciales de campo “*field potential*” (figura 4.3).

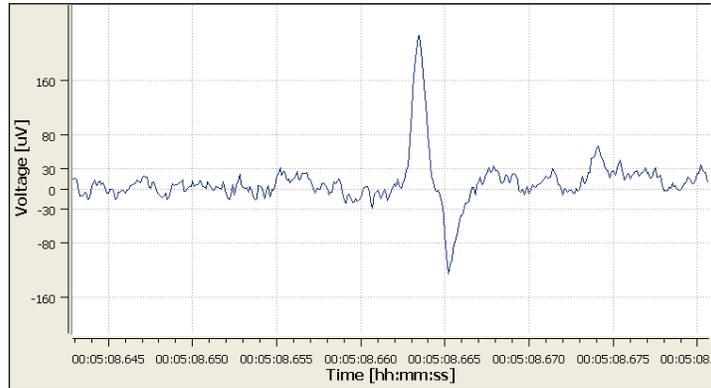


Figura 4.1 Potencial de acción. Gráfica de un PA reproducida de un registro mediante el *software* “Aleria E2 soft”. El eje vertical representa el valor de la amplitud en microVoltios. El eje horizontal representa la línea de tiempo en “horas: minutos:segundo: milisegundos”. En esta imagen el PA tiene una duración de 5 ms.

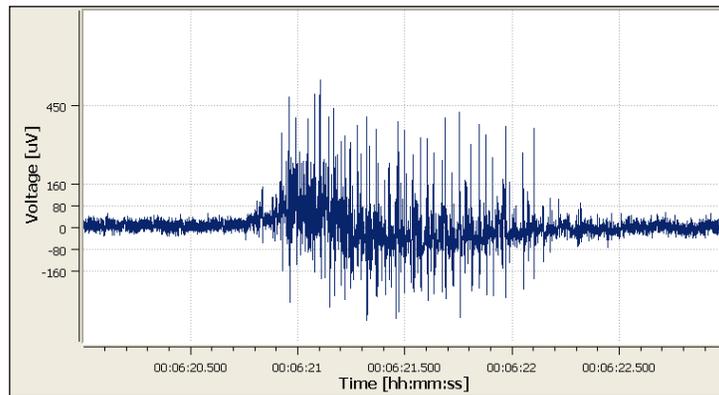


Figura 4.2 Bursts. Gráfica de un *burst*, reproducido de un registro mediante el *software* “Aleria E2 soft”. En esta imagen, el *burst* tiene una duración de 1 s.

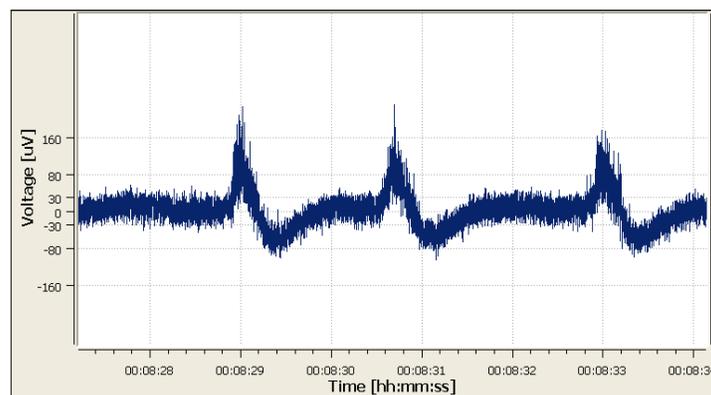


Figura 4.3 Potenciales de campo. Gráfica de potenciales de campo reproducidos de un registro mediante el *software* “Aleria E2 soft”. En este caso se pueden apreciar 3 potenciales de campo acompañados de unos cuantos PA. En esta imagen cada potencial de campo dura 1 s aproximadamente.

Los tipos de señales que acompañan y contaminan la información dentro de los registros de la AEN, se identifican como ruido [Drongelen, 2007; Scanziani & Häusser, 2009] y los más característicos son:

- Ruido ambiental de alta amplitud (figura 4.4).
- Interferencia de 50 Hz con amplitud superior a los 200 μV .
- Señal de ruido producida por movimiento mecánico y de alta amplitud.
- Ruido producido por el artefacto, esto es, provocado por la electrónica del amplificador cuando no hay un buen contacto entre los electrodos y el medio de cultivo o por cuestiones de humedad excesiva (figura 4.5).

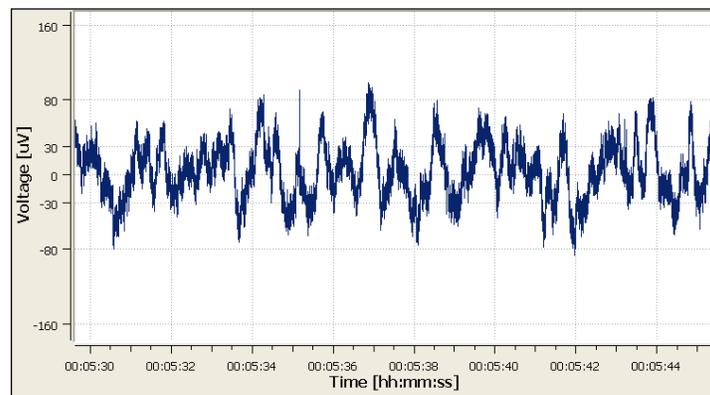


Figura 4.4 Ruido ambiental de alta amplitud. Señales de ruido ambiental reproducidas de un registro mediante el *software* “Aleria E2 soft”.

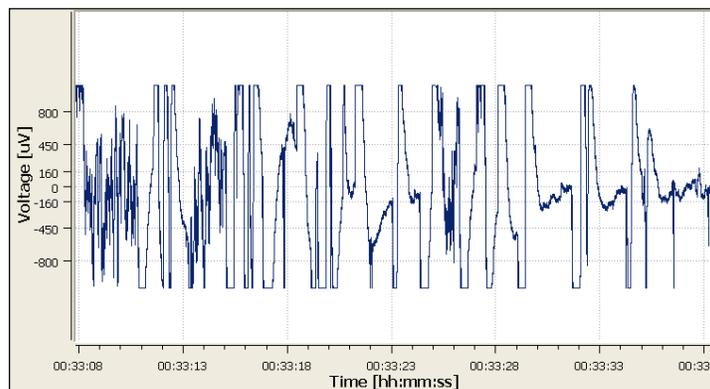


Figura 4.5 Ruido del artefacto. Señales de ruido de artefacto reproducidas de un registro mediante el *software* “Aleria E2 soft”. En este caso en específico, las señales saturan el sistema.

- Ruido térmico o de Johnson-Nyquist de nuestro dispositivo es de 0,585 μV . Este valor se calcula con la fórmula:

$$V_n^2 = 4KTRB$$

$$K = \text{Constante de Boltzman } 1,3806504 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$$

T = La temperatura del cultivo neuronal (grados Kelvin) 310 K

R = La resistencia del microcanal es aproximadamente de 20 M Ω

Si trabajamos con el amplificador “Aleria E2 drive”, que trabaja con un ancho de banda de 0,8 H a 3,9kHz. Entonces:

$$V_n^2 = 4 (1,3806504 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}) (310 \text{ K}) (20 \text{ M}\Omega) (3899,2 \text{ Hz})$$

$$V_n (\text{rms}) = 36,53 \mu\text{V}$$

Si trabajamos con el “Amplificador Multichannel Systems: MEA 1060 Amplifiers Inv.BC Standard”, que trabaja con un ancho de banda de 10 Hz a 3 kHz. Entonces:

$$V_n^2 = 4 (1,3806504 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}) (310 \text{ K}) (20 \text{ M}\Omega) (2990 \text{ Hz})$$

$$V_n (\text{rms}) = 31,99 \mu\text{V}$$

Estos cálculos sirven para conocer el valor del ruido térmico en el microcanal y, en base a ello, considerar un valor superior para seleccionar el listón de corte en el conteo de PA.

4.6.2 Parámetros para el desarrollo del algoritmo

Una vez identificados los tipos de señales y ruidos que se pueden encontrar dentro de un registro de datos, es importante analizar las ventajas y desventajas de un determinado tipo de algoritmo que cuantifique la AEN, tomando en consideración 1) los PA, 2) los *bursts* y 3) los potenciales de campo.

A).- Si se utiliza un algoritmo que cuantifique los PA individuales, entonces:

1. Se contarían todos los PA individuales.
2. Como los *bursts* son un conjunto de PA, podrían ser contados los PA de manera individual dentro del grupo.
3. No se tomaría en consideración los potenciales de campo, porque tienen un tiempo de duración mayor a un PA.

B).- Si se desea cuantificar los *bursts*, entonces:

1. Los PA individuales no serían considerados.
2. Para contar los *bursts* se tendría que definir la cantidad mínima y distancia mínima entre los PA.
3. Los potenciales de campo no serían considerados.

C).- Si se utiliza un algoritmo que cuantifica los potenciales de campo, entonces:

1. Los PA no serían tomados en cuenta.
2. Los bursts no serían tomados en cuenta.
3. Tendríamos el problema de que no todos los cultivos presentan potenciales de campo, además de que cada potencial de campo presenta diferentes amplitudes y tiempos de duración a lo largo del tiempo.

D).- Si se utiliza un algoritmo que cuantifica los intervalos de no actividad entre los PA, entonces:

1. Los PA serían tomados en cuenta.
2. Los bursts serían tomados en cuenta.
3. Los potenciales de campo no serían considerados.

De lo anterior, se puede concluir que las opciones A) y D) toman en consideración más parámetros de la AEN. La presente tesis prefiere trabajar con la opción A) “conteo de PA”, por la simplicidad y sencillez del proceso; también, se trabaja un poco con la opción B) “conteo de *bursts*”; pero solo para obtener información complementaria.

Para la lectura y análisis de los registros se aplica un filtro digital pasa altas, para eliminar las señales de ruido (componentes señal de baja frecuencia), descritas anteriormente: interferencias de 50 Hz, ruidos mecánicos, ruidos de artefacto, ruidos eléctricos y, como caso particular, eliminar los potenciales de campo.

No es necesario utilizar un filtro pasabanda porque no se necesitan eliminar las señales de ruido de alta frecuencia, ya que este tipo de señales poseen una amplitud relativamente baja en comparación a la forma de onda de las señales neuronales.

4.7 Evaluación de datos

El dispositivo polimérico propuesto para esta tesis facilita el registro de la AEN de las neuritas que crecen dentro de un microcanal [Morales et al., 2008].

La cantidad de neuritas que se introducen dentro del microcanal del dispositivo polimérico, así como la amplitud de sus PA, son variables para cada cultivo y, en ocasiones, con respecto al tiempo transcurrido.

El procesamiento de datos de la AEN que se prefiere utilizar, es el que cuantifica la cantidad de PA que sobrepasa un listón, previamente predefinido. Los resultados presentan de manera numérica y gráfica la cantidad PA por unidad de tiempo (minuto) y en casos particulares, el valor de la amplitud de los PA por unidad de tiempo.

4.7.1 Tipos de registros

Dos tipos de registros se han obtenido mediante dos dispositivos poliméricos prototipo:

Registros simultáneos de 40 cultivos.- La señal de la AEN es recogida de la matriz con 40 microcanales, por medio de electrodos de plata sumergidos en cada pozo; la señal es amplificada por el amplificador de “Multichannel Systems”.

Los valores de la AEN se registran dentro del ordenador con el apoyo del *software* “Labview” bajo una frecuencia de 10.000 muestras por segundo. Los datos se almacenan en archivos que contienen 40 segundos de grabación (cada archivo).

Registros simultáneos de 6 cultivos o menos.- La AEN se recoge de una matriz con 6 microcanales, a través de los electrodos sumergidos en los pozos; la señal aumenta su valor con el amplificador “Aleria E2 drive”.

Los valores son registrados dentro de un ordenador con ayuda del *software* “Aleria E2 soft”, utilizando una frecuencia de 10.000 muestras por segundo. Cada archivo que se genera contiene 15 min de grabación.

El *software* utilizado, para el procesamiento de datos de las señales es:

- “Matlab” para cuantificar los PA y graficar de los resultados.
- “Aleria E2 soft” para cuantificar la cantidad de *bursts*.

4.7.2 Características del algoritmo para la cuantificación de PA

Los parámetros que se consideran para crear un algoritmo que se ejecute como rutina en “Matlab” para la detección y conteo de PA son: listón de corte, tiempo máximo sobre el listón, tiempo mínimo sobre el listón [Hok et al., 2007] y frecuencia de corte del filtro pasa altas.

Para procesar la información, el valor de las señales de los registros se convierte a valores absolutos, para cuantificar la fase positiva y negativa de los PA.

A continuación se muestra la evaluación de los parámetros para validar que la señal eléctrica es un PA:

Listón de corte.- Se define como el umbral (valor mínimo en microVoltios) a partir del cual una señal se considera como un PA. La evaluación del listón de corte consiste en tomar 16 posibles valores para el umbral, los cuales son de 50 μ V, 60 μ V, 70 μ V, 80 μ V, 90 μ V, 100 μ V, 110 μ V, 120 μ V, 130 μ V, 140 μ V, 150 μ V, 160 μ V, 170 μ V, 180 μ V, 190 μ V y 200 μ V.

Duración máxima.- Es el tiempo máximo que la señal es mayor, o de igual valor, al listón de corte. Debido a que la máxima duración de un PA es de 5 ms, 9 valores se evalúan: 1,0 ms, 1,5 ms, 2,0 ms, 2,5 ms, 3,0 ms, 3,5 ms, 4,0 ms, 4,5 ms y 5,0 ms.

Duración mínima.- Es el tiempo mínimo que la señal es mayor, o de igual valor, al listón de corte. Son 5 los valores para evaluar: 0,0 ms, 0,1 ms, 0,2 ms, 0,3 ms y 0,4 ms.

Frecuencia de corte del filtro pasa alta.- Es la frecuencia que el filtro usa para eliminar las señales de baja frecuencia. El tipo de filtro a utilizar es filtro digital IIR *Butterworth* de segundo orden. La frecuencia mínima que tiene un PA es aproximadamente de 200 Hz, por lo que se evalúan 6 valores para la frecuencia de corte del filtro: 0,015 Hz, 0,15 Hz, 1,5 Hz, 15 Hz, 150 Hz y 1.500 Hz.

Al multiplicar los 16 valores del listón de corte, por los 9 valores de los tiempos de duración máxima, por los 5 valores de los tiempos de duración mínima, por los 6 valores de la frecuencia de corte, da un total de 4320 combinaciones de valores paramétricos que pueden ser considerados para procesar los registros y contar a los PA.

4.8 Resultados

Se utilizan los registros de 4 diferentes cultivos para evaluar el algoritmo (en forma de rutina de “Matlab”) y para encontrar la mejor combinación en los valores paramétricos para la cuantificación de la AEN.

La frecuencia de corte del filtro se determina al eliminar la posible frecuencia de 50 Hz (línea de voltaje) y su tercera armónica de 150 Hz. Algunos de los valores paramétricos se descartan manualmente, al identificar PA falsos positivos y PA falsos negativos. La selección del resto de los valores paramétricos se basa en los que presentan menos variación al cuantificar la AEN por minuto.

Por lo tanto, los parámetros óptimos para el conteo de PA en los registros de los dispositivos poliméricos son:

- Frecuencia de corte = 150 Hz.
- Margen inferior = 0 ms.
- Margen superior = 2,5 ms.
- Listón de corte (*threshold*) = 170 μ V.

Esto quiere decir que el algoritmo óptimo para el procesamiento de datos debe de consistir en una rutina que aplica un filtro pasa altas, con una frecuencia de corte de 150 Hz, que cuente a todas aquellas señales que valgan o sobrepasan el umbral de 170 μ V y que tengan una duración menor a 2,5 ms.

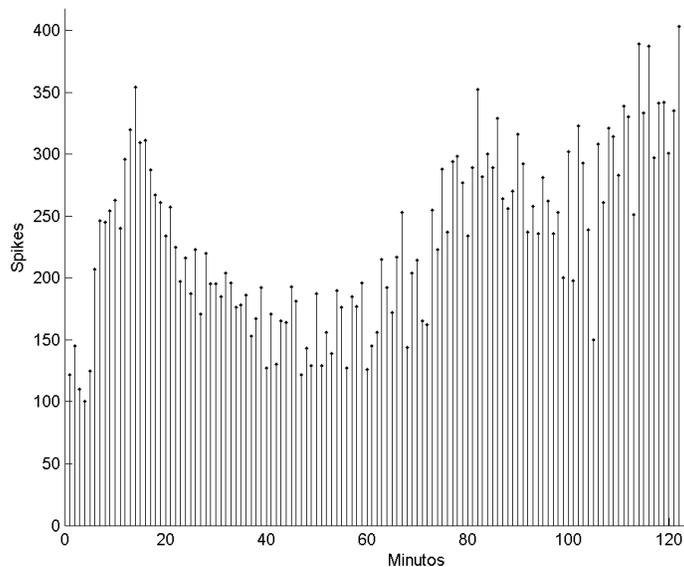


Figura 4.6 Spikes por minutos. Gráfica que muestra la cantidad de PA por minuto de un cultivo neuronal típico. El eje horizontal representa la escala del tiempo en minutos y el eje vertical representa la cantidad de PA que el cultivo neuronal dispara. La variación de la AEN en un cultivo va del 30% al 50%.

4.8.1 Conteos de PA por unidad tiempo

Al seleccionar un minuto como unidad de tiempo para el conteo de PA, la AEN se puede representar gráficamente en la figura 4.6.

4.8.2 Representación gráfica de la AEN

La gráfica de la figura 4.6 muestra cómo es la AEN de un cultivo, la cantidad de PA es indicada por unidad de tiempo (un minuto); pero no el valor de sus amplitudes. Al tomar como referencia la representación en colores de los histogramas para la comparación de la AEN entre dos neuronas [Hok et al., 2007], se ha realizado otras gráficas de la AEN que utilicen colores para indicar la amplitud de los PA detectados (figura 4.8).

Las gráficas de colores son una representación de la AEN en base a PA por minuto, donde la amplitud de la señal se ve reflejada por el tipo de color que lo conforma; este tipo de información ayuda a interpretar si el cambio de AEN en un registro, con respecto al tiempo, es debido a un aumento de AEN en las neuronas o es debido a que una nueva neurita se incorpora en el microcanal.

En la figura 4.7 se aprecia un aumento de AEN; se puede suponer que las neuronas empezaron a disparar con mayor frecuencia.

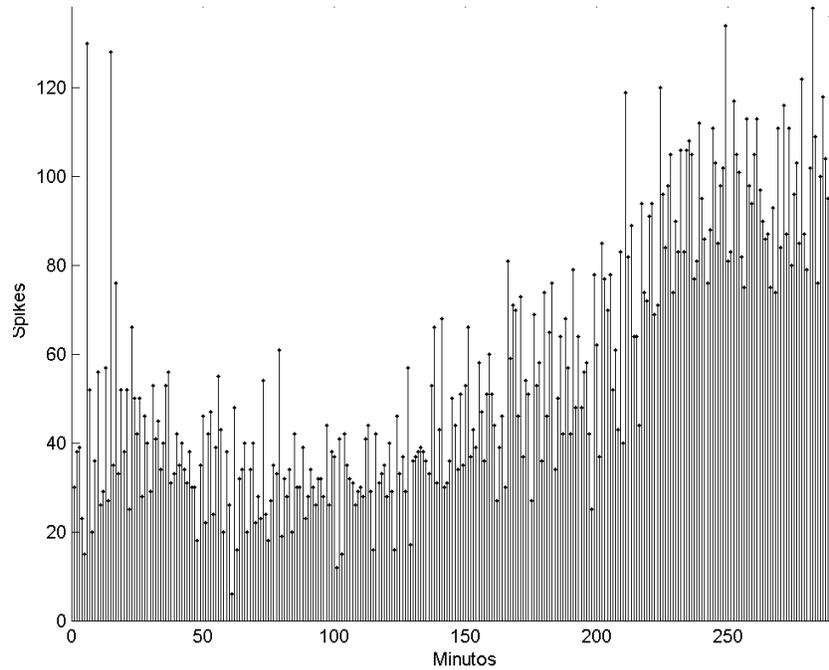


Figura 4.7 Aumento espontáneo en la AEN. Gráfica que muestra un aumento de AEN con respecto al tiempo. El eje horizontal representa la escala en minutos y el eje vertical el valor de la cantidad de PA.

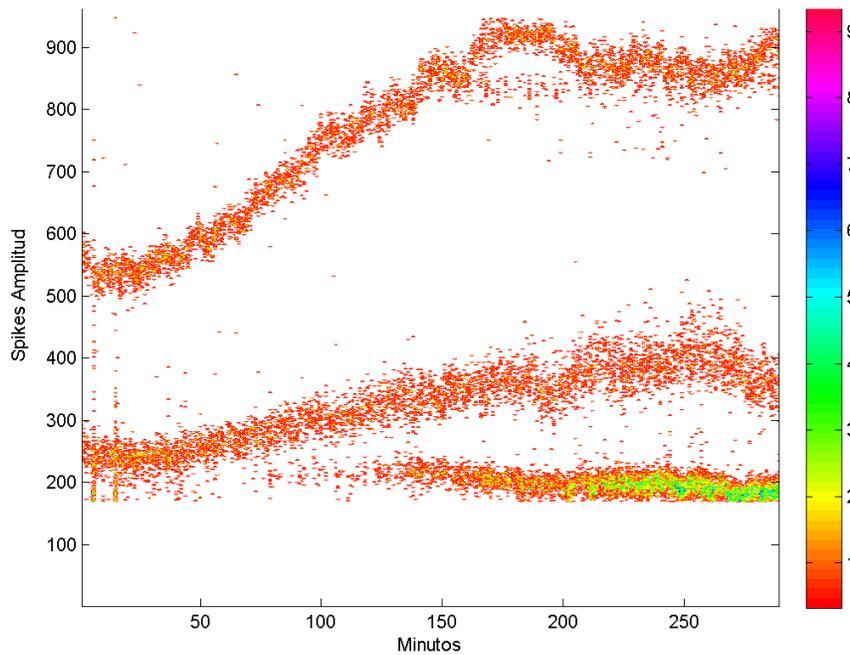


Figura 4.8 Gráfica con colores que indica la amplitud de los PA. Esta gráfica muestra una versión diferente a la de la figura 4.7, a pesar de ser los mismos datos; aquí se indica la amplitud de los PA por minuto. El eje horizontal representa la escala en el dominio del tiempo en minutos, el eje vertical representa la escala de la amplitud de los PA, la barra de colores a la derecha muestra la frecuencia de disparo de los PA.

Sin embargo, si se analizan las amplitudes de los PA (figura 4.8), se aprecia que una nueva fuente empieza a disparar dentro del microcanal; esto es posible si una neurita, o varias neuritas se introducen dentro del microcanal, o debido a que la neurita ya se encontraba en el microcanal, pero la conexión inhibitoria de una neurona dejó de influenciar sobre ella.

La figura 4.8 muestra que la amplitud y la cantidad de PA cambian con respecto al tiempo. De esta manera se confirma, que un algoritmo basado en el seguimiento de forma de onda en base a un patrón solo da información limitada.

Otros ejemplos de los cambios en las amplitudes de los PA se pueden apreciar en las figuras 4.9 y 4.10; donde al minuto 120 el cultivo se somete a un lavado extracelular y la AEN se reduce por varios minutos, después el cultivo se mantiene a temperatura ambiente (25 °C) y la AEN se mantiene estable; alrededor del minuto 500 se da un aumento de temperatura (37 °C) y la AEN se incrementa.

Un detalle a destacar, es que cuando existen muchas neuritas dentro de un microcanal se dificulta analizar los PA por amplitud, debido a la abundancia de señales.

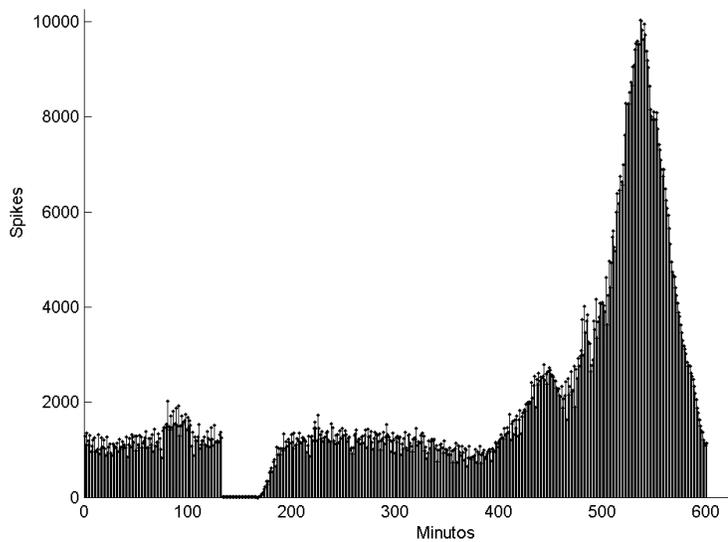


Figura 4.9 Conteo de PA por minuto. La AEN se interrumpe en el minuto 120 por un lavado de medio extracelular. El registro de la AEN se realiza bajo una temperatura de 25 °C y aumenta en el minuto 500 por un aumento de temperatura a 37 °C.

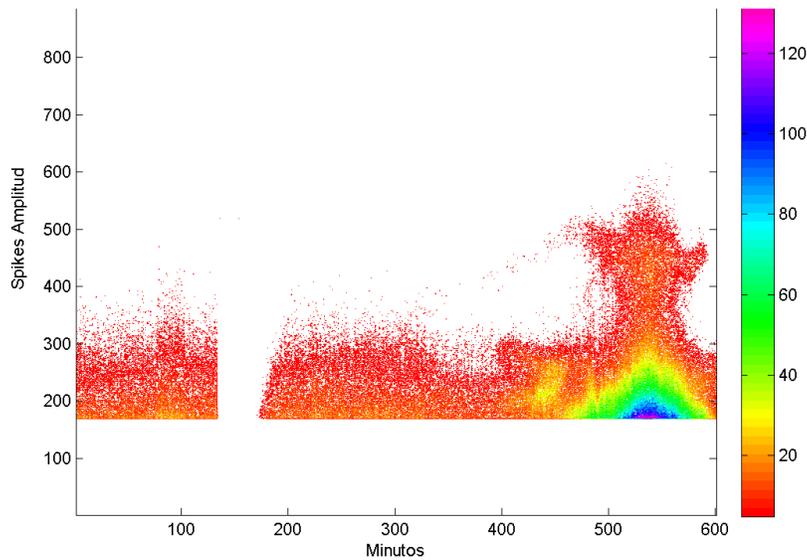


Figura 4.10 Gráfica con las amplitudes de los PA. Representación gráfica de las amplitudes de los PA de la AEN mostrada en la figura 4.9.

4.8.3 Conteo de *bursts*

Análisis de *bursts* (E2 software).- El *software* “Aleria E2 soft” cuenta con la opción para cuantificar la cantidad de *bursts* que aparecen en los registros. Antes de hacer cualquier conteo, la señal es filtrada por un filtro digital IIR *Butterworth* pasa altas de segundo orden, con una frecuencia de corte de 150 Hz.

Un *bursts* se predefine como un periodo de tiempo de 40 ms, donde al menos 5 PA disparan. Sin embargo, existen cultivos que no tienen AEN tipo *bursts*, por lo cual no siempre se puede usar este tipo de herramienta.

Los resultados obtenidos, en ocasiones, suelen diferir con el conteo de PA. Por lo tanto, sólo se usa esta opción para tener información complementaria en el análisis de la AEN.

4.9 Conclusiones y discusión

- 1) La investigación neurocientífica suele procesar la AEN considerando la forma de onda de la señal; sin embargo, los cultivos neuronales tienden a presentar cambios de actividad y cambios en la forma de onda de las señales; algunos de estos cambios no son justificables y se dan a lo largo del tiempo, pero algunos otros de esos cambios si son justificables como cuando ocurre alguna perturbación física, al recibir un ligero golpe (al mover de lugar el soporte de las células) u ocurre algún cambio químico (como renovar el neurobasal, ya sea por pipeteado o perfusión) [Abberger et al., 2006].

- 2) En esta tesis, se considera más confiable el expresar la AEN de un registro, en base a la cantidad de PA por unidad de tiempo sin importar la forma de onda, que el clasificar un PA de acuerdo a su forma de onda.
- 3) El algoritmo propuesto para el conteo de PA, para esta tesis, tiene un listón de corte con valor de 170 μ V, cuando las señales lo sobrepasan, son consideradas PA, siempre y cuando su duración no sea mayor a 2,5 ms, Además, el algoritmo contiene una etapa de filtrado de señal (filtro pasa-altas de 150 Hz) para delimitar la señal y garantizar que no existen falsos positivos, provocados por interferencia de 50 Hz o ruidos mecánicos. Este algoritmo se realiza en una rutina bajo el *software* de “Matlab”.
- 4) Se utiliza el *software* de “Matlab” como procesamiento de datos porque puede generar rutinas automáticas para abrir y analizar los registros, graficar los resultados, calcular las desviaciones estándar y guardar los valores obtenidos.
- 5) El algoritmo desarrollado en esta tesis garantiza que los resultados que se muestren de los registros neuronales serán solo de AEN y que si existieran falsos positivos, estos serían numéricamente insignificantes en comparación a la cantidad de verdaderos positivos.
- 6) Se prefiere trabajar con el *software* “Matlab” que con el *software* “Aleria E2 soft” porque este último está limitado a seleccionar de manera manual a los archivos para la lectura de sus registros y a editar manualmente los parámetros para el conteo de *spikes/bursts*.
- 7) No todas las neuronas tienen AEN tipo *bursts*, como las del cerebelo, por lo cual el conteo de *bursts* no resulta siempre útil para el análisis de datos.
- 8) El conteo de PA por minutos es una técnica que resulta ser útil para el estudio y análisis de la AEN. Las gráficas de colores que muestran el valor de la amplitud de los PA, dan información complementaria del conteo de PA por minuto, como el entender si el aumento de AEN que se produce dentro del microcanal es debido a un incremento de actividad por parte de la misma neurona o a la introducción de una nueva neurita participante.

El algoritmo desarrollado para procesar los datos es utilizado en el capítulo 5 para el estudio del comportamiento de los cultivos neuronales como control, del comportamiento ante la presencia de diversas sustancias y del comportamiento después del lavado.

- 9) A pesar de los años que han transcurrido en la investigación neurocientífica, actualmente no existe un algoritmo universal para el procesamiento de datos. Se ha hecho pública la propuesta para utilizar un mismo algoritmo y unificar criterios (*neuroshare.org*); pero aun así, los investigadores prefieren usar sus propios algoritmos y *software* en base a sus propios criterios.

Capítulo 5: Registros de actividad eléctrica neuronal

En los capítulos anteriores se han descrito las técnicas empleadas en la fabricación del dispositivo polimérico para contener neuronas, confinar su crecimiento y registrar su AEN (capítulo 2 y 3) [Morales et al., 2008]. También se ha presentado el estado del arte de los métodos para poder analizar la AEN (capítulo 4).

El presente capítulo demuestra el uso del dispositivo polimérico, propuesto en esta tesis, para el registro de la AEN, tanto espontánea como estimulada farmacológicamente mediante compuestos con acción excitatoria e inhibitoria. También se analiza cambios espontáneos o inducidos, en la AEN.

5.1 Introducción

Las pruebas de farmacología (*drug screening*) utilizan como herramienta a los cultivos celulares para la investigación de los efectos de los fármacos [Ryan, 2008].

El dispositivo polimérico propuesto está diseñado para poder utilizar diversos tipos de fármacos a los cultivos y poder registrar su AEN.

5.1.1 Cultivos celulares de hipocampo

Los cultivos celulares, utilizados en la presente tesis, son neuronas de hipocampo que requieren de 10 a 14 días de desarrollo para poder obtener registros de AEN de ellas.

5.1.2 Factores que intervienen en el crecimiento celular

Las condiciones comunes que afectan el desarrollo de un cultivo celular son: fluctuaciones de temperatura en la incubadora, uso de fungicida concentrados, falta de agua dentro de la incubadora que garantice condiciones de humedad para el cultivo, incorrecta presión osmótica en el medio (de 260 a 350 $\frac{\text{mOsmol}}{\text{kg}}$) [Invitrogen] y tener un nivel distinto a 7,3 de pH para el cultivo celular [Potter & DeMarse, 2001].

De las causas mencionadas anteriormente, las que son más comunes en la mortalidad celular y por lo tanto, se debe tener mayor cuidado son:

- Hiperosmolalidad

Cuando se trabaja con cultivos neuronales en solución salina es recomendable ajustar su osmolaridad dentro del rango de 325 a 335 $\frac{\text{mOsmol}}{\text{kg}}$ [Kimura et al., 1997]. El ajuste de osmolaridad se logra incorporando NaCl o H₂O [Nunemaker et al., 2003].

Si el medio extracelular que se utiliza es neurobasal, la osmolaridad debe tener un valor cercano a $290 \pm 10 \frac{\text{mOsmol}}{\text{kg}}$ [Hammarström & Gage, 1998].

La evaporación del medio extracelular provoca cambios de osmolaridad, causando que su valor se incremente y un aumento de AEN [Claverol-Tinturé, Ghirardi et al., 2005].

Cuando este incremento de osmolaridad excede de 50 mOsm (existe hiperosmolaridad), entonces el medio se convierte en letal para las neuronas [Potter & DeMarse, 2001]; esta es la causa típica de muerte en los cultivos celulares [Morin et al., 2005].

La presencia de glía en alta densidad sobre el cultivo celular puede afectar el nivel osmolaridad.

- Una infección en el cultivo

Una infección en el cultivo puede tener su origen en el molde empleado para contener a las células, en agentes patógenos aéreos existentes dentro de la incubadora, en trabajar con los cultivos dentro de un ambiente no estéril o en pipetas que son introducidas dentro del cultivo para el cambio de medio.

5.2 Objetivos del capítulo

Los objetivos del presente capítulo son:

1. Demostrar que el dispositivo polimérico puede registrar cambios de AEN al realizar pruebas farmacológicas sobre cultivos neuronales.
2. Caracterizar y comparar las técnicas de perfusión y pipeteo para renovar el medio extracelular o para introducir fármacos en el medio extracelular del cultivo.
3. Determinar las condiciones apropiadas para registrar la AEN de los cultivos neuronales para pruebas farmacológicas.

5.3 Materiales y Métodos

5.3.1 Fármacos y sus efectos

Se define como pruebas farmacológicas a las pruebas que consisten en incorporar diversas concentraciones de fármacos dentro de uno o varios cultivos neuronales y registrar su respuesta.

Con la finalidad de demostrar el correcto funcionamiento del dispositivo polimérico, se realizan diversas pruebas farmacológicas sobre el cultivo neuronal. Los fármacos utilizados en esta tesis son:

Tetradotoxina (TTX).- Esta molécula es una neurotoxina que se encarga de bloquear los canales de sodio dependientes de voltaje [Strowbridge, 1999; Keefer et al., 2001; Hartmann et al., 2008].

Acetilcolina.- Esta molécula excita a las neuronas inhibitorias en la neocorteza y el hipocampo; además, incrementa la resistencia de la entrada de las neuronas en el hipocampo [Valentino & Dingledine, 1981; Nakajima et al., 1986; Traub & Miles, 1991].

Pentilenotetrazol (PTZ).- Es un estimulador para el sistema circulatorio y respiratorio, bloquea los receptores de GABA y provoca un incremento en la AEN [Huang et al., 2001; Easter et al., 2007; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011].

Glutamato.- Es el neurotransmisor excitatorio más abundante del sistema nervioso, el cual ayuda a incrementar las concentraciones de GABA en las neuronas. Esta molécula estimula los procesos sinápticos del hipocampo [Yang et al., 2002; Srinivas et al., 2007; Otsuka & Kawaguchi, 2008].

Haloperidol.- Este fármaco es utilizado en medicina para controlar tics nerviosos, desórdenes psíquicos [Meyer-Masseti et al., 2010] y sobre todo para la esquizofrenia. Bloquea los receptores de los neurotransmisores dopamina y serotonina.

5.3.2 Protocolos

Los cultivos celulares utilizados en esta tesis están constituido por neuronas disgregadas del hipocampo [Keefer et al., 2001], extraídas de los embriones de ratón con 18 días de gestación [Morales et al., 2008].

Los protocolos para disección, criopreservación, preparación de placas, y preparación del medio de cultivo neurobasal se encuentran en la sección de **Anexo E**.

5.4 Resultados

El siguiente apartado muestra los resultados de la AEN al renovar el medio extracelular o al cambiarlo por solución salina, a través de pipeteo o a través de perfusión.

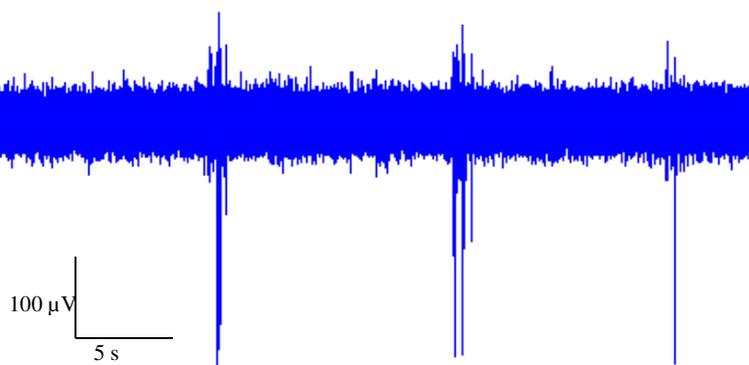


Figura 5.1 PA espontáneos. La imagen muestra algunos PA registrados de un cultivo neuronal.

5.4.1 Registro de la AEN

El registro de la AEN de los cultivos tiene lugar después de 10 a 14 días de que las neuronas se han desarrollado [Morales et al., 2008]. El registro se realiza en el dispositivo polimérico, por medio de los electrodos (figura 2.4) que se encuentran sobre la tapa del dispositivo.

La tapa del dispositivo polimérico es una cubierta de metacrilato con un par de agujeros por donde se introducen el par de electrodos. Los electrodos se sumergen en el medio extracelular y se conectan a un amplificador de bajo ruido (“Multichannel Systems” o “Aleria E2 drive”) para aumentar el valor de la señal detectada (figura 5.1) a través del microcanal (ganancia x1000) y ser grabada en un ordenador a través del *software* “Labview” o “Aleria E2 soft”.

5.4.2 AEN espontánea

Los registros de la AEN espontánea de un cultivo neuronal se realizan con electrodos de plata, bajo condiciones estériles, dentro de la incubadora a 37 °C y con 5% de CO₂. Sin embargo, un registro (de 24 horas) de AEN espontánea, puede ser tener una variación superior al 50% (figura 5.2).

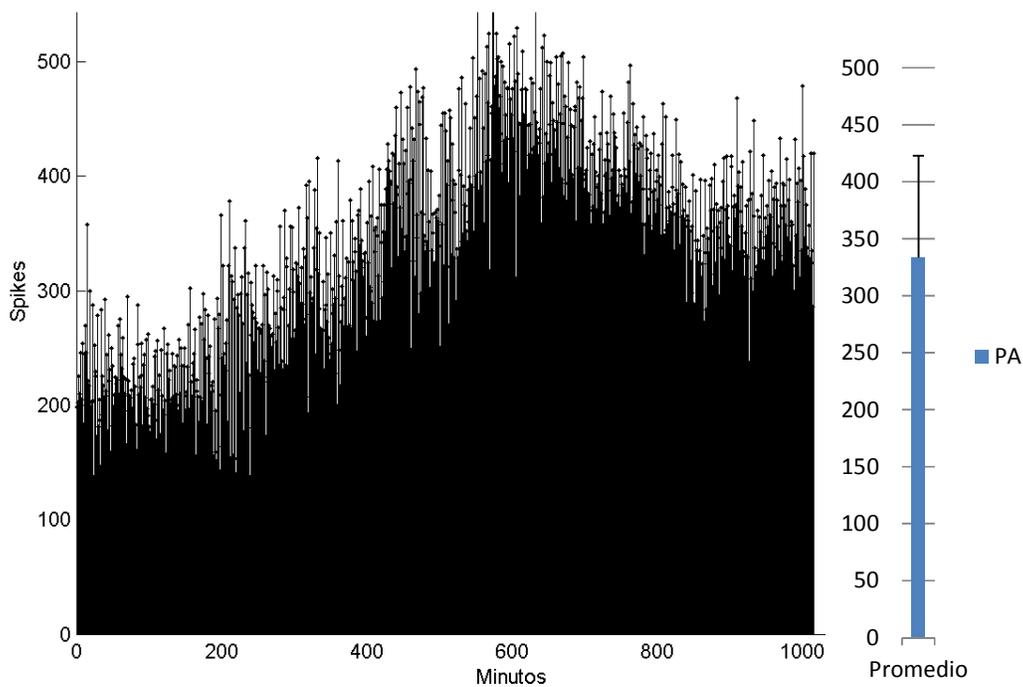


Figura 5.2 AEN espontánea. La imagen, el eje horizontal muestra la AEN que tienen los cultivos neuronales a lo largo del tiempo; el eje vertical indica la cantidad de PA. Este cultivo, en el minuto 223 presenta la más baja actividad de 114 PA y, en el minuto 576 presenta la mayor actividad de 564 PA. La barra de la derecha representa el valor promedio (333,3 PA) de la AEN de la imagen izquierda, con su respectiva desviación estándar (89,5).

5.4.3 Sistema de pipeteo manual y sistema de perfusión

La renovación de medio extracelular, la incorporación de fármacos y el lavado de los cultivos neuronales puede ser realizado por medio de dos métodos:

Sistema de pipeteo manual.- Una pipeta extrae cerca del 75% del medio extracelular del compartimento neuronal (pozo) y con ayuda de otra pipeta se incorpora el medio extracelular faltante, con la opción de estar acompañado por algún fármaco, según sea el caso.

Sistema de perfusión.- Una bomba peristáltica incorpora medio extracelular [Bacci et al., 2002; Rambani et al., 2009] lo más cercano posible al fondo del pozo sin tocar el medio extracelular; mientras tanto otra pipeta, colocada cerca del borde del pozo, está conectada al sistema de vacío para extraer el medio extracelular excedente. La razón de cambio de medio extracelular es de 2 veces por hora.

Es importante destacar, que el simple hecho de renovar el medio extracelular de un cultivo neuronal, sin importar que sea por perfusión o pipeteo, produce un cambio temporal en el comportamiento de su AEN (figura 5.3).

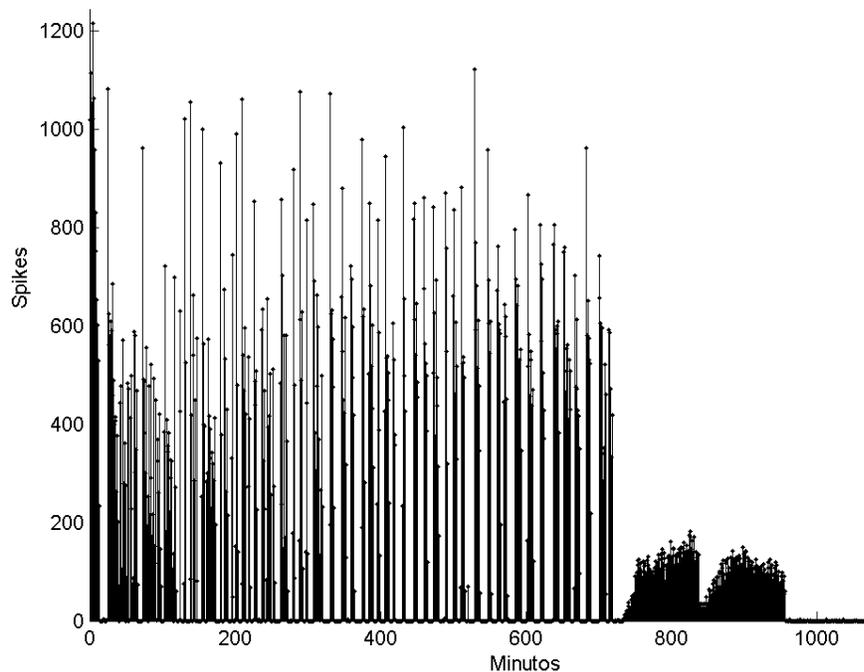


Figura 5.3 Cambio de AEN. Esta imagen muestra la AEN de un cultivo neuronal; al principio la AEN es en forma de *bursts*, donde grupos de neuronas disparan al mismo tiempo. En el minuto 720 y 840, al renovar el medio extracelular (técnica de pipeteo), se trajo como consecuencia que las neuronas dejaran de disparar grupalmente (*bursts*) y, empezarán a disparar de manera individual y con mayor frecuencia.

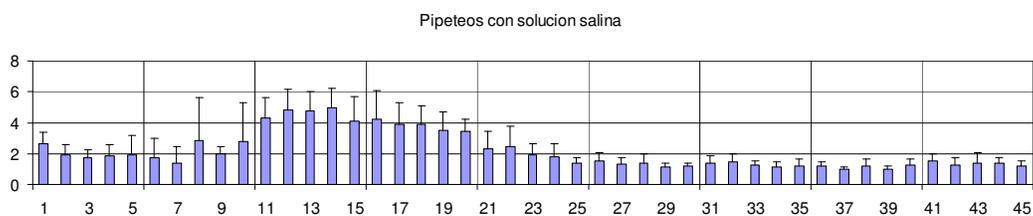


Figura 5.4 Cambio de AEN al cambiar neurobasal por solución salina. Respuesta obtenida al cambiar el medio extracelular neurobasal por solución salina (después de cada 5 min). El eje vertical indica el número de PA por minuto. Las barras representan el promedio de la AEN por minuto (normalizada con respecto al promedio total), también están acompañadas con su desviación estándar. El eje horizontal representa el tiempo que transcurre (unidades en minutos).

5.4.4 Solución salina y neurobasal como medio extracelular

El interés de cambiar el medio extracelular por solución salina es para realizar pruebas farmacológicas sin la necesidad de que el cultivo celular requiera 5% de CO₂ para mantener el pH balanceado.

Sin embargo, cuando se realiza el cambio de medio neurobasal por solución salina, se observa que primero ocurre una disminución en la AEN, luego le precede una etapa de aumento en la AEN y por último, continua con una etapa donde se estabiliza la frecuencia de disparo de la AEN (figura 5.4).

Después de aproximadamente 25 min de haber cambiado el medio extracelular por solución salina, se reduce la variación de AEN. Después de este tiempo es cuando se puede empezar a considerar la AEN para estudiar los efectos de algún tipo de fármaco sobre el cultivo neuronal.

5.5 Respuesta de la AEN bajo la aplicación de diversos fármacos

Los resultados que se muestran a continuación, son los efectos de la tetrodotoxina, acetilcolina, pentilenotetrazol, glutamato y haloperidol, en diversas concentraciones, sobre los cultivos neuronales (sembrados dentro de las piezas poliméricas).

Los resultados son representados en gráficas de barras con su respectiva desviación estándar (barras de error). Las gráficas muestran el promedio de la AEN de diversos cultivos neuronales antes, durante y después de incorporar el fármaco.

5.5.1 Tetrodotoxina (TTX)

El TTX tiene un efecto inhibitorio, la AEN tiende a disminuir conforme se incorpora mayor concentración de fármaco, ya sea a través de pipeteo (figura 5.5) o a través del sistema de perfusión (figura 5.6).

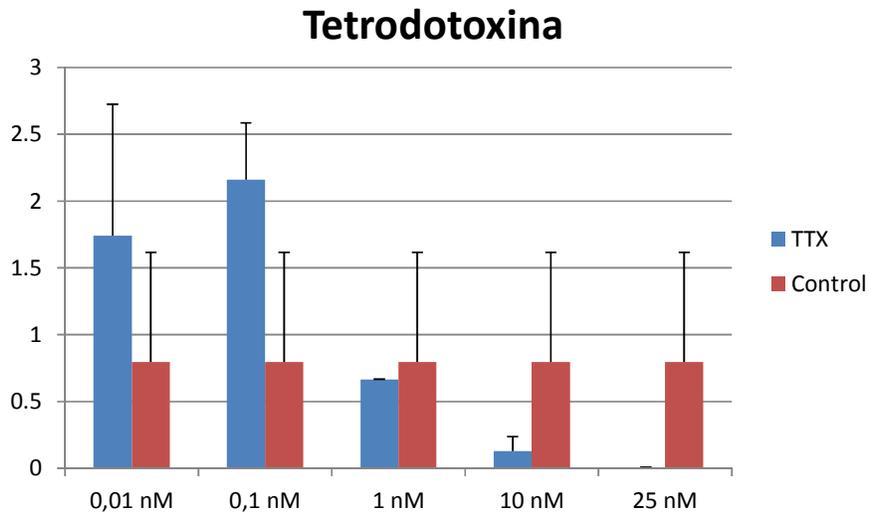


Figura 5.5 Introducción de TTX por pipeteo. Representación del cambio de AEN ante diversas concentraciones de TTX introducidas mediante pipeteo.

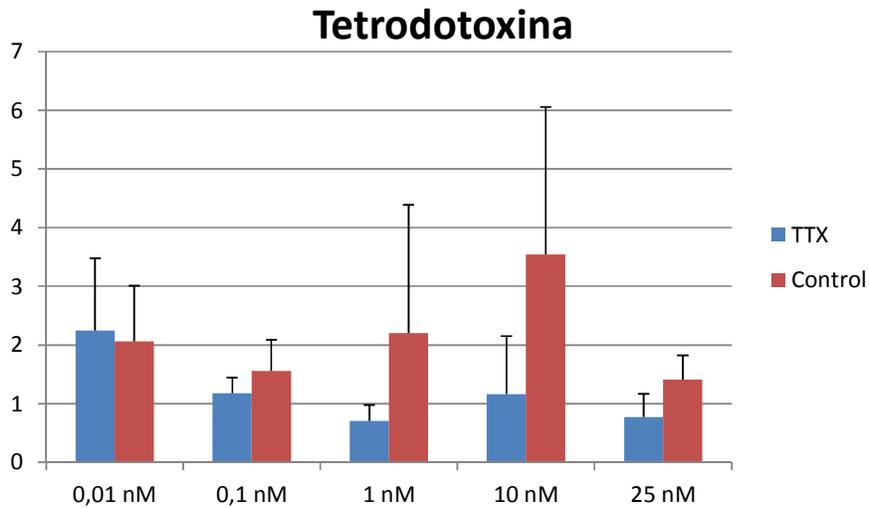


Figura 5.6 Introducción de TTX por bomba peristáltica. En esta gráfica se muestra el cambio de AEN al introducir TTX mediante un sistema de perfusión con bomba peristáltica.

5.5.2 Acetilcolina

La acetilcolina produce un efecto excitatorio en las neuronas del hipocampo (figura 5.7).

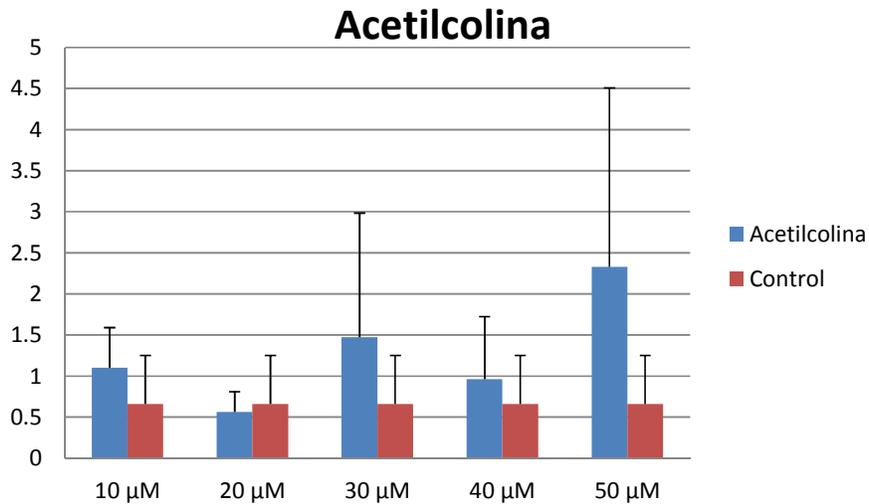


Figura 5.7 Efecto de acetilcolina. Respuesta de las diversas concentraciones de acetilcolina sobre cultivos neuronales (2).

5.5.3 Pentilenotetrazol (PTZ)

El fármaco PTZ produce un efecto excitatorio en la AEN; sin embargo, en altas concentraciones, produce una saturación en la actividad neuronal y posteriormente provoca una reducción de la AEN (figura 5.8).

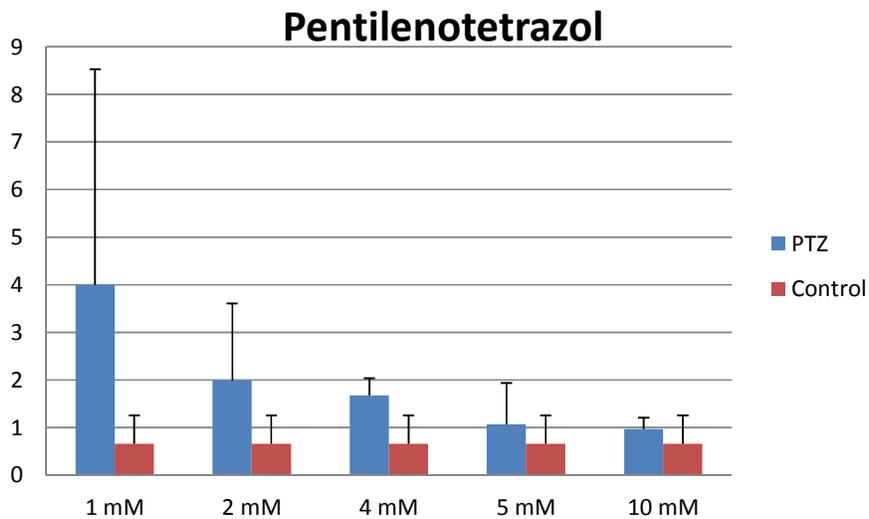


Figura 5.8 Efecto de pentilenotetrazol. Respuesta de la AEN que se obtiene del cultivo neuronal ante diferentes concentraciones de PTZ.

5.5.4 Glutamato

El glutamato tiene un efecto excitatorio, pero a concentraciones altas, ocurre algo similar como con el fármaco PTZ (figura 5.9): el tiempo de disparo se reduce y le prosigue un periodo de calma dando la impresión que las neuronas se inhiben en lugar de excitarse (figura 5.10).

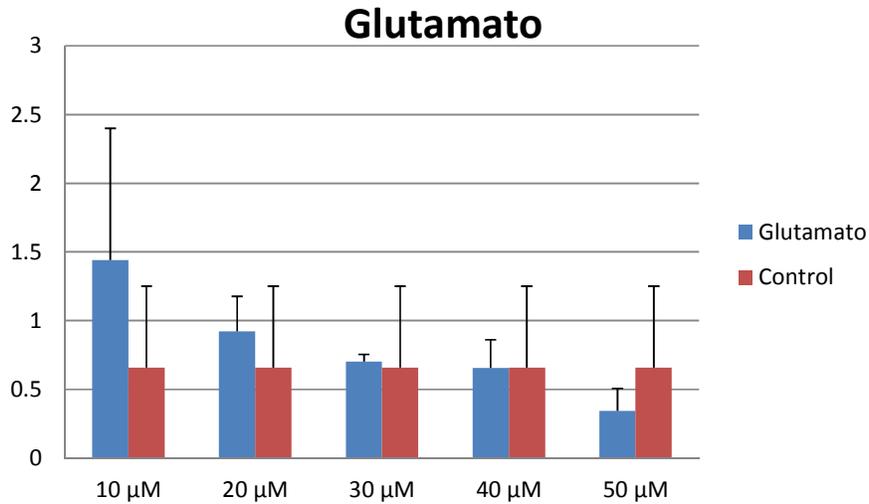


Figura 5.9 Efecto de glutamato. Respuesta de las diversas concentraciones de glutamato sobre los cultivos neuronales.

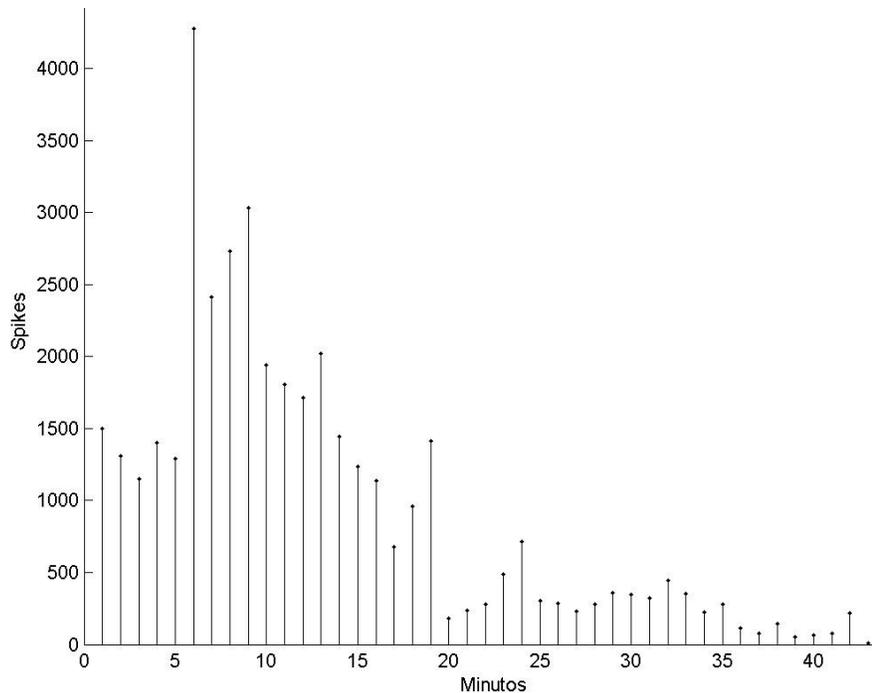


Figura 5.10 Efecto de 50 μM de glutamato. Imagen que muestra el efecto sobre el tiempo de la AEN bajo la concentración de 50 μM de glutamato.

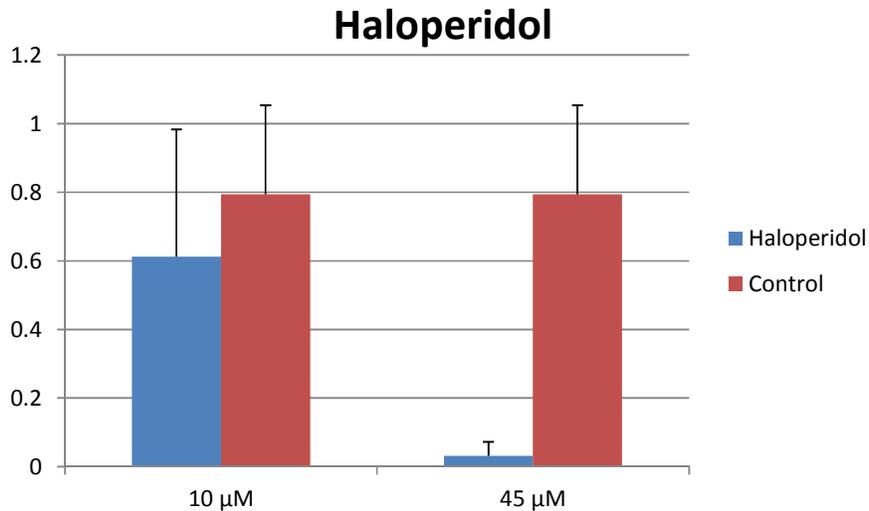


Figura 5.11 Efecto de haloperidol en las neuronas. El haloperidol crea un efecto inhibitorio sobre el cultivo neuronal de manera inmediata. La reducción de la AEN es irreversible.

5.5.5 Haloperidol

El fármaco haloperidol muestra efectos de mortalidad neuronal; además, en cuanto mayor sea la concentración, mayor es la disminución de la AEN (figura 5.11) y es irreversible.

5.6 Discusión

Todas las pruebas son realizadas en neuronas sanas, con la finalidad de estudiar el efecto de los fármacos en la AEN con objetividad.

Todos los datos, con la respuesta de los fármacos, son presentados en gráficas de barras: concentración del fármaco contra el nivel de AEN.

5.6.1 Características de los electrodos

Una de las cuestiones claves en el registro de la AEN, es el tipo de electrodos que se utilizan. En electrofisiología, el electrodo tradicionalmente utilizado es el hilo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) [The Axon Guide, 2008].

La cubierta de AgCl sobre los electrodos de Ag facilita la transmutación de la conducción iónica a electrónica reduciendo la capacitancia del electrodo en la interfase de la solución y mejora el registro de señales de bajas frecuencias [Drongelen, 2007]. Por otro lado, esto puede propiciar ciertos errores (de artefacto) en los registros, sobre todo cuando no es uniforme la cubierta de AgCl o no está en la misma proporción en ambos electrodos.

Una alternativa es utilizar electrodos de platino (Pt), el cual es reversible y no se agota. Aunque, el Pt reacciona con el medio extracelular sirviendo como catalizador en la electrolisis del agua, esto podría producir gases de H_2 y O_2 y provocar cierto cambio en el nivel de pH [The Axon Guide, 2008]

En esta tesis, para realizar registros de la AEN, se introducen un par de electrodos constituidos solo de plata en el medio extracelular de cada cultivo.

Los electrodos pueden ser recubiertos por una capa de cloruro de plata, al sumergirlos en hipoclorito sódico (lejía) por 10 min; pero entonces, los cultivos neuronales podrían morir al ser expuestos a estos electrodos de manera prolongada (más de 2 horas) como se muestra en la figura 5.12. Este procedimiento es diferente al protocolo de clorificado por medio de electrodeposición, donde los hilos de plata son sumergidos en una solución rica de cloro, para hacerles pasar una corriente eléctrica (proceso de electrodeposición) [Galbraith et al., 1995].

Lo que realmente ocurre cuando se sumergen los electrodos de plata en lejía es un efecto de oxidación (que resulta tóxico al cultivo celular), creando una capa de color entre gris negro, y no un color morado gris oscuro [Galbraith et al., 1995], lo cual explica que las neuronas comiencen a morir en exposiciones prolongadas.

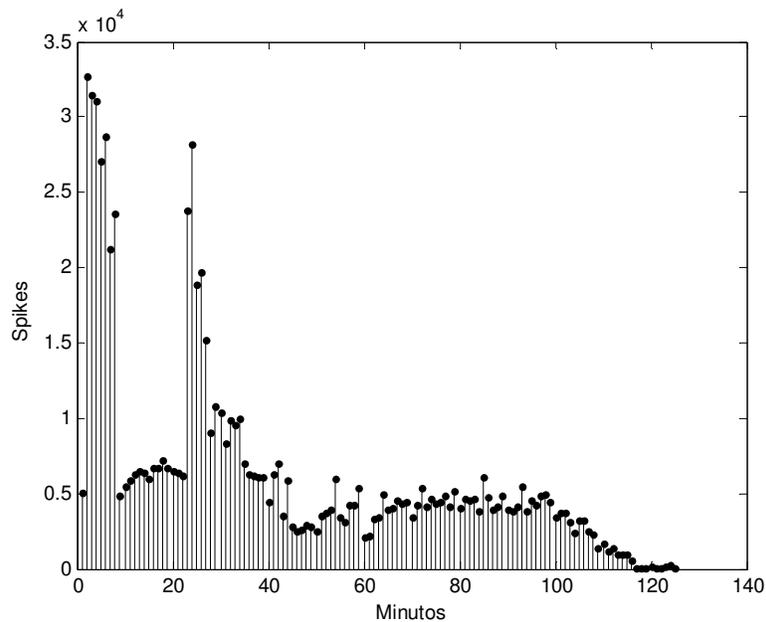


Figura 5.12 AEN con electrodos de plata "clorificados". La gráfica muestra la cantidad de PA (eje vertical) por minuto (eje horizontal), de un cultivo neuronal al ser registrado por electrodos de plata con una cubierta de cloruro de plata. La cubierta fue creada a través de la exposición de los electrodos a lejía. En esta gráfica se puede apreciar como la AEN va decayendo con forme transcurre el tiempo.

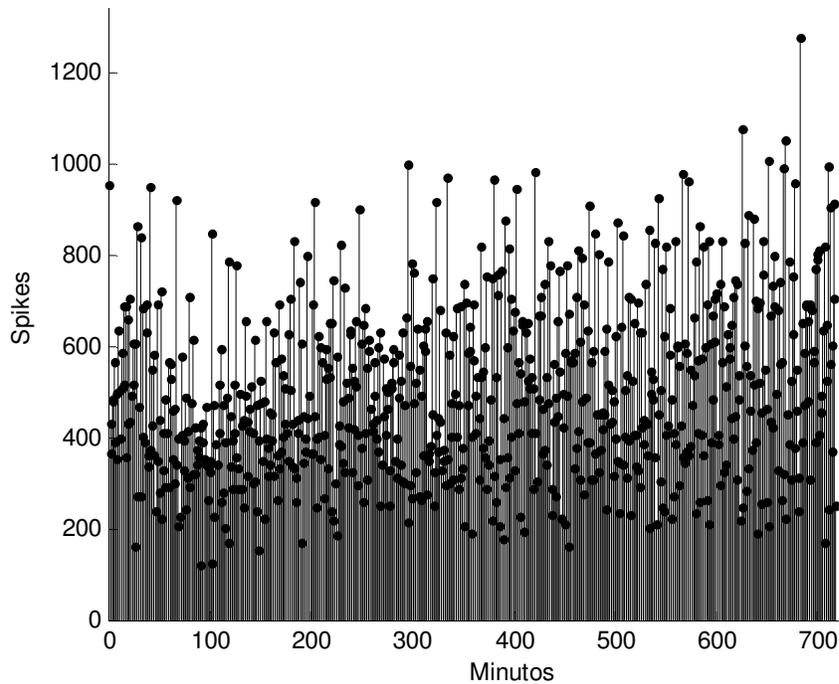


Figura 5.13 AEN con electrodos de plata sin clorificar. Esta es la AEN registrada por 12 horas con electrodos de plata sin clorificar. La AEN se mantiene con la misma variabilidad desde que comienza el registro hasta que termina.

Una buena opción, mientras no se quiera emplear la estimulación eléctrica, es usar los electrodos de plata sin clorificar y, al contrario de lo que se argumenta en *The Axon Guide* (2008), se pueden hacer registros por un tiempo prolongado sobre el cultivo celular sin observar algún tipo de cambio provocado por envenenamiento de proteínas (figura 5.13).

Otro tipo de electrodos con los que se realizaron pruebas, fueron electrodos de fósforo de bronce con una cubierta de baño de oro. Debido a que su grosor (2,54 mm lado por lado) es mayor que los electrodos de plata (0,4 mm de diámetro), los electrodos de fósforo de bronce demuestran tener una menor sensibilidad a las vibraciones mecánicas exteriores y poder disminuir la presencia de ruido mecánico en los registros. Sin embargo, experimentalmente se ha demostrado que los electrodos de fósforo de bronce tienen la desventaja de ser dañinos para el cultivo celular en exposiciones superiores a 60 min.

5.6.2 Sembrado en un solo pozo o en dos pozos

El dispositivo polimérico se encuentra constituido por un microcanal que comunica un par de pozos, llenos de medio extracelular, cada pozo tiene sumergido un electrodo. El registro de la AEN dentro del microcanal aprovecha las propiedades conductivas del medio extracelular.

Pruebas comparativas entre el sembrado del cultivo neuronal en ambos pozos del dispositivo y el sembrado del cultivo neuronal en un solo pozo del dispositivo, demuestran que el nivel de AEN no varía. Pero, la ventaja de sembrar en un solo pozo, es reducir a la mitad el tiempo y esfuerzo al renovar el medio extracelular y al aplicar fármacos.

Si se siembra el cultivo neuronal en un solo pozo del dispositivo, es recomendable que coincida con el pozo donde se introduce el electrodo de referencia. Si la perfusión es realizada en el pozo que contiene el electrodo de referencia, entonces las señales de ruido no serán registradas.

Otra ventaja de colocar el electrodo de referencia en el mismo pozo donde se siembra el cultivo neuronal, es que la mayoría de la AEN registrada poseerá fase positiva, esto facilitará el procesamiento de señales, porque se podrá eliminar las señales de fase negativa.

5.6.3 Cambio del medio extracelular

Cuando se cambia el medio extracelular por nuevo medio extracelular con o sin algún fármaco incorporado, se produce un cambio en la AEN, y en la mayor parte de los casos, un aumento temporal de disparos de PA.

Sin embargo, cada cultivo neuronal varía su AEN de manera distinta, debido a que cada cultivo introduce un número particular de neuritas dentro microcanal y forma su red neuronal particular.

5.6.4 Sistema de perfusión

Un sistema de perfusión tiene mejores ventajas que la técnica manual de pipeteo; ya que un sistema de perfusión puede controlar mejor la cantidad de nutrientes y toxinas del medio extracelular [Jennings et al., 2004; Abberger et al., 2006].

La aplicación del sistema de perfusión debe ser continua (24 horas), así el cultivo neuronal se acostumbra al movimiento del medio y se garantiza que al introducir fármacos, los posibles cambios que ocurran en la AEN sean por el efecto del fármaco mismo y no por las corrientes del medio extracelular.

Uno de los problemas que se tiene al incorporar un fármaco de efecto temporal a través del sistema de perfusión, es que el sistema puede ser tan lento que las neuronas reaccionen con la incorporación gradual del fármaco, y que cuando se termine de renovar el medio extracelular con la concentración correspondiente del fármaco, entonces las neuronas no reaccionen de la misma manera a que si hubiera renovado el medio extracelular con la dosis del fármaco en un instante.

5.7 Conclusiones

- 1) Los cambios de medio extracelular causan una alteración en la AEN durante los primeros 20 a 25 min. Después de 30 min de haber aplicado solución salina, se consideran los resultados de los registros como información válida para ser procesada.

Cuando se renueva el medio extracelular de un cultivo por nuevo medio extracelular, se cuida que la temperatura y el nivel de CO₂ sea la misma para el nuevo medio; pero a pesar de ello, existe una variación en la AEN, la cual puede darse porque el nivel de osmolaridad es diferente, ya que el viejo medio extracelular, dentro del cultivo neuronal, pudo haberse parcialmente evaporado, y crear un aumento en osmolaridad o un cambio en el nivel de pH. Otro de los factores que podrían afectar la AEN, es un efecto mecánico producido por el flujo de líquido al hacer el cambio de medio extracelular.

La forma más adecuada para cambiar el medio extracelular es a través de un sistema continuo de perfusión que renueve el medio extracelular con una razón de dos veces por hora; de esta forma, cuando se agregue algún fármaco (por perfusión), no existirá ningún cambio brusco ni por osmolaridad ni por temperatura, ya que el sistema de perfusión facilita la extracción e incorporación de fármacos de manera continua.

- 2) Los fármacos excitatorios, como el glutamato, aumentan (de manera temporal) la AEN y posteriormente disminuye la AEN. El estudio de este tipo de AEN proporciona un reto para analizar los datos, ya que entre mayor sea la concentración de sustancias como el glutamato y el PTZ, mayor será el aumento de la AEN, pero más corta será su duración excitatoria.

Los resultados muestran el tiempo total de exposición del fármaco sobre el cultivo neuronal y no el tiempo donde el cultivo presentó mayor cambio de actividad, por lo que en algunas ocasiones, da la impresión que los fármacos excitatorios actúan como inhibitorios.

El haloperidol tiene un efecto inhibitorio e irreversible sobre la AEN; el PTZ y el TTX tienen un efecto inhibitorio, pero solo de manera temporal, ya que la AEN regresa al lavar el cultivo. Por otra parte, la acetilcolina tiene el efecto excitatorio esperado.

Sin embargo, es importante tener en consideración que para el caso particular del glutamato, concentraciones mayores a 20 μ M resulta ser tóxico para el cultivo neuronal [Pérez, 2006].

- 3) Los resultados muestran que el clorificar los electrodos de plata por el método de sumergirlos en “lejía” crea un efecto tóxico sobre el cultivo neuronal para exposiciones superiores a 2 horas.

Capítulo 6: Conclusiones

La presente tesis introduce un nuevo diseño de dispositivo polimérico para registrar AEN espontánea y estimulada *in vitro*, bajo. Se muestra la metodología para microfabricar la pieza polimérica y el algoritmo desarrollado para procesar y analizar la información de los registros neuronales.

6.1 Conclusiones generales

- 1) El dispositivo polimérico tiene potencial para convertirse en *high-throughput screening*.
- 2) La microfabricación del dispositivo polimérico es de bajo coste en comparación al resto de los dispositivos electrofisiológicos y MEA.
- 3) El dispositivo polimérico es un diseño híbrido. Eléctricamente es comparable a la tecnología *loose-patch* (la resistencia del sellado entre la neurona y la apertura del microcanal es de varios megaohmios) y estructuralmente es comparable a la tecnología MEA (posee una diversidad de electrodos y microestructuras [Morales et al., 2008]).
- 4) La glía ayuda a conservar y mantener los cultivos neuronales con vida; además, beneficia en incrementar el valor de resistencia del microcanal e incrementar los valores de PA en los registros. Para mantener una población adecuada de glía en el cultivo neuronal (relación de 5:1) [Pérez, 2006], es recomendable utilizar 5% de *horse serum* en el medio de cultivo extracelular o antimetabólicos.
- 5) La técnica de soft-litografía es la que ofrece los mejores resultados para fabricar al dispositivo polimérico, la cual combina la técnica de fotolitografía para crear el máster (pista de SU-8 sobre sustrato de vidrio) y la técnica de *elastomer casting*, para replicar los moldes a través del material PDMS “Sylgard 184”.
- 6) El algoritmo desarrollado para esta tesis, procesa la AEN dentro del microcanal y considera a toda actividad superior o igual a 170 μV e inferior a 2,5 ms como PA. Los resultados son representados en gráficas de cantidad de PA por minuto.

Los resultados muestran que la AEN varía con el transcurso del tiempo; por lo tanto se omite el procesamiento de señales con asociación de parejas neuronales como ocurre con *spike sorting*.

Las amplitudes de PA, obtenidas de registros electrofisiológicos con dispositivos electrofisiológicos o MEA, de cultivos disociados suelen tener valores de 20 μV hasta 100 μV (en ocasiones llegan hasta 500 μV); en cambio, con nuestro dispositivo polimérico, los valores comúnmente obtenidos van desde 100 μV hasta 500 μV (en ocasiones llegan a sobrepasar 1 mV).

- 7) Para determinar el mejor tipo de electrodos para registrar la AEN, se compararon las reacciones de los cultivos entre electrodos de plata y electrodos de plata clorificados. Los cultivos reaccionaron mejor con los electrodos de plata sin clorificar. Los cultivos presentaron una reacción tóxica ante la presencia de los electrodos de plata clorificados.

En la electrofisiología convencional, un cultivo neuronal, no presenta este efecto de toxicidad porque uno de los electrodos (clorificado) está contenido dentro de un tubo capilar (1mm de diámetro) y el otro electrodo (clorificado) se encuentra sumergido en el medio extracelular dentro de la placa de Petri de 35 mm, esto equivale a un volumen 34 veces mayor al de nuestro dispositivo polimérico.

- 8) Utilizar un sistema de perfusión tiene mayores ventajas que pipetear sustancias de manera manual, ya que la perfusión ayuda a cambiar el medio extracelular (de manera gradual), a mantener el sistema de osmolaridad constante y a tener mayor precisión en realizar pruebas farmacológicas.

6.2 Limitaciones

Las limitaciones que se encuentran sobre la presente tesis son:

- 1) En ciertas ocasiones, varias neuronas crecen en la entrada del microcanal, por lo que diversas neuritas suelen introducirse en él y una inspección óptica simple no es suficiente para precisar la cantidad de dendritas o axones existentes dentro del microcanal ni para determinar la cantidad de neuronas que interactúan dentro del microcanal ni identificar con facilidad cual neurita le corresponde a cual neurona. Para este proceso sería necesario auxiliarse de las técnicas de fluorescencias para teñir los cultivos neuronales.

- 2) Los pozos tienen una capacidad de 100 μL a 250 μL , lo que facilita que el medio extracelular sea susceptible a la evaporación al pasar uno o dos días sin renovarlo. Por lo tanto el cultivo neuronal está limitado a tener que recibir renovación de medio extracelular de manera constante para evitar incrementos de osmolaridad.
- 3) La sección de amplificación incrementa el valor de la señal registrada por los dispositivos poliméricos. Esta sección puede estar constituida por un amplificador prefabricado. La etapa de amplificación es un amplificador prefabricado, como “Multichannel Systems”, “Aleria E2 drive” o un amplificador fabricado a la medida. La cantidad de canales disponibles del amplificador limita la cantidad de registros que se pueden realizar de manera simultánea, sobre los cultivos neuronales.
- 4) Los registros de la AEN de un cultivo celular están limitados a que tienen que ser en condiciones de incubadora, es decir: alta humedad y 5% de CO_2 ; pero esto significa que el amplificador y el sistema de perfusión deben de operar también dentro de estas condiciones. Sin embargo, la electrónica no está adaptada para trabajar bajo las condiciones mencionadas, lo que provocará que no opere de manera correcta a lo largo del tiempo.
- 5) El registro de la AEN está limitado a trabajar en condiciones de apantallamiento eléctrico, para evitar interferencias de señales de ruido eléctrico de 50 Hz provenientes de la red o de otros aparatos electrónicos. Por lo que se está limitado a trabajar con el sistema de perfusión y amplificador dentro de una incubadora apantallada o tener una mini-incubadora dentro de una jaula de Faraday.

6.3 Contribuciones

Las aportaciones de esta tesis son:

- 1) Introducción y desarrollo de un dispositivo polimérico para el registro de actividad electrofisiológica de bajo costo, práctico, sencillo, portátil y de fácil manipulación.
Facilidad de que más personas puedan realizar investigación electrofisiológica porque se requiere de menos equipo, menos conocimiento técnico, menos capacitación y por lo tanto menos errores.
- 2) Éxito en el registro no invasivo de la AEN sobre neuronas cultivadas en un dispositivo.

Éxito en la creación y el registro simultáneo de matrices de 6 dispositivos poliméricos y de matrices de 40 dispositivos poliméricos. El registro se realiza a través de “Aleria Biodevices” para 6 dispositivos y “Multichannel Systems” para 40 dispositivos.

- 3) Aplicación del dispositivo polimérico en investigaciones electrofisiológicas como material didáctico, para demostraciones en tiempo real de la AEN de los cultivos neuronales y del tipo de respuesta que se obtiene al ser estimuladas por algún fármaco.
- 4) Reducción del número de ratones sacrificados para el estudio de electrofisiología. Una hembra ratón preñada puede tener hasta una docena de embriones, lo equivalente a sembrar decenas de cultivos neuronales *in vitro*, en nuestro dispositivo. Aumento en el número de ensayos de electrofisiología *in vitro*, ahora puede escalar hasta 40 ensayos por experimento.
- 5) Éxito en el registro y estudio, de manera más sencilla y práctica que la electrofisiología convencional, de la AEN espontánea y estimulada por fármacos con efectos de excitación (acetilcolina, glutamato), inhibición (PTZ, TTX) y necrosis (haloperidol); los mejores resultados se obtuvieron con fármacos inhibitorios.
- 6) Estudio y desarrollo de microfabricación de piezas poliméricas a mediana escala (40 piezas por hora). Estudio y desarrollo del proceso de electrodeposición para la creación de microestructuras para másteres
- 7) Desarrollo de algoritmo para correr bajo el *software* Matlab para el procesamiento de datos de la actividad eléctrica neuronal.
- 8) Aplicaciones del dispositivo para el estudio de AEN en neuronas de hipocampo y neuronas de cerebelo [Morales et al., 2008; Gil et al., 2010]

6.4 Proyecciones futuras

- 1) El dispositivo polimérico con dos pozos y un microcanal, tiene como objetivo principal la investigación y experimentación en cultivos neuronales del hipocampo; sin embargo, podría utilizarse con otro tipo de cultivos celulares que manifiesten actividad eléctrica, como las neuronas del cerebelo, la glía que expresa proteoglicanos NG2 (dispara PA)

[Otis & Sofroniew, 2008] o neuronas de origen diferente al del ratón, como las neuronas de caracol [Claverol-Tinturé, Ghirardi et al., 2005].

- 2) La cantidad de neuronas sembradas en un pozo, van desde 50.000 hasta 75.000 (densidad de 1.773 a $2.660 \frac{\text{neuronas}}{\text{mm}^2}$); esto garantiza que habrá neuronas cercanas al microcanal y que sus neuritas crecerán dentro del microcanal para poder registrar la AEN.

Sin embargo, esta densidad también puede provocar que más de una neurita se introduzca al microcanal y por lo tanto se registre AEN de más de una neurona por microcanal; este tipo de acontecimiento genera dificultad para determinar la participación individual de cada neurona.

Por lo tanto, como proyecto futuro se propone bajar la densidad del cultivo neuronal a $100 \frac{\text{neuronas}}{\text{mm}^2}$ [Claverol-Tinturé & Pine, 2002] y desplazar las neuronas del cultivo neuronal hacia la entrada del microcanal con la técnica de pinzas láser [Pine & Chow, 2009].

También se podría emplear la técnica de *patterning* sobre el sustrato del dispositivo polimérico (antes de ser ensamblado), para que crezcan una o dos microislas [Chena et al., 2004] en la entrada del microcanal; de esta manera se podría monitorear la conectividad de las neuritas y estudiar la AEN de una sola neurona o de un grupo reducido de neuronas.

- 3) Dentro del proceso de microfabricación de la matriz de PDMS con 40 dispositivos poliméricos, la etapa para perforar la matriz requiere de esfuerzo físico (80 Kg de fuerza) y de un tiempo de 10 min. Además la base del soporte para la perforación de la matriz es de aluminio.

Por lo tanto, se propone que en un futuro se cambie el material de elaboración de la base del soporte de perforación de la matriz a acero inoxidable para garantizar la alta dureza, longevidad del soporte y la perforación de la matriz en un solo evento. Además se propone que el sistema de perforación de la matriz de PDMS se conecte a una prensa hidráulica para automatizar el procedimiento, reducir el tiempo de trabajo a un 50% y el esfuerzo a un 80%.

- 4) Con el fin de reducir el espacio de los dispositivos poliméricos y reducir la cantidad de medio extracelular que se utiliza, se propone que se modifique la configuración de los pozos en la matriz de PDMS de 6 y 40 dispositivos poliméricos, para crear un único pozo (central) donde se siembre el cultivo celular (donde estará el electrodo de referencia), del

cual estarán conectados varios microcanales, que desembocarán en otros pozos (donde los electrodos de cada canal), para registrar la AEN de diferentes partes de un cultivo.

Otra opción propuesta, es usar la misma idea de la estructura de un pozo central, pero se sembraría en los pozos de la periferia.

- 5) Como proyecto a futuro, para estudiar la AEN sobre redes neuronales, sería modificar las matrices de 6 y 40 dispositivos poliméricos, y habilitar caminos físicos de comunicación entre los pozos conectados a los electrodos de referencia, entonces cuando se siembre, se haría también en los caminos habilitados y se crearía una gran red neuronal.

Esto habilitaría el registrar (en diferentes partes de la red neuronal) la AEN espontánea, la AEN estimulada farmacológicamente y los cambios en la AEN producidos por un corte anatómico (al realizarse sobre una parte de la red neuronal).

- 6) Para facilitar el trabajo de perfusión, se propone como proyecto a futuro utilizar la matriz elastomérica de 40 dispositivos poliméricos, habilitar físicamente caminos de comunicación entre los pozos conectados al electrodo negativo y sembrar solo en los pozos mencionados, pero sin sembrar en los caminos entre los pozos para asegurar que no se forme una red neuronal.

Entonces se tendrían los pozos en forma de cadena (uno después del otro) y se podría aplicar el sistema de perfusión a través del primer pozo de la cadena y recoger el medio extracelular, a través del último pozo; para garantizar la renovación del medio extracelular en los 40 cultivos.

Este tipo de sistema simplificaría los estudios de toxicología, se podría aplicar los fármacos a los 40 cultivos, de manera casi simultánea y a través de una sola bomba peristáltica.

- 7) Para la preparación de los dispositivos poliméricos (antes del sembrado de cultivo neuronal), los microcanales son saturados con CO_2 y luego se les introduce medio extracelular, para que absorba el CO_2 y de esta manera se garantice el llenado del microcanal.

Una alternativa propuesta para llenar los microcanales consiste en unir las piezas poliméricas con un sustrato de vidrio a través de la técnica de “*plasma cleaner*” o utilizar PS para fabricar los pozos y microcanales, y unirlos por temperatura y presión (técnica de *bonding*) para garantizar una unión irreversible de las piezas poliméricas. De esta manera

se podrían llenar los microcanales por medio de presión fluídica [Fluxion] y omitir la utilización de CO₂.

8) El sistema de perfusión por medio de bomba peristáltica, podría tener incorporado un sistema de control y monitoreo para manipular con facilidad la cantidad, velocidad y temperatura del flujo; así se podría garantizar que el contenido de un pozo se cambie una vez por día, lo cual equivale a 150 μ L por 24 horas, 2,50 μ L por minuto ó 0,04 μ L por segundo.

9) Las piezas poliméricas podrían tener corte anatómico esbelto, donde se siga el contorno de los pozos (en forma de número ocho) y de esta manera se podría reducir el material de silicona utilizado, para abaratar su costo; también, existiría menos superficie de contacto entre la pieza polimérica y la base de sustrato, y así se disminuiría la probabilidad de que alguna impureza impidiera a la pieza polimérica adherirse completamente sobre la base de sustrato.

Las consecuencias de una falsa unión entre la pieza polimérica y la base del sustrato han provocado que el medio extracelular se escape, dejando seco al cultivo neuronal o que se vacíe parcialmente, y que el medio extracelular esté en contacto con el interior del otro pozo, creando cortocircuitos y registros de mediciones falsas.

10) El dispositivo polimérico solo registra la AEN espontánea y estimulada farmacológicamente. Se podría trabajar en la electrónica para que el dispositivo polimérico pudiera aplicar estimulación eléctrica a los cultivos neuronales y de esta manera registrar la AEN estimulada eléctricamente.

11) Una propuesta para mejorar el análisis de datos es usar la función sumatoria “sum” [Mtetwa & Smith, 2006], para aumentar el valor de los PA y hacer más confiables los resultados.

Referencias

[Abberger et al., 2006]

T. Abberger, P. Jennings, A. Mirlach, S. Prajczek & W. Pfaller (2006). “*Application of a population balance model to a perfusion in vitro toxicity system*”. *Toxicology in Vitro*. Vol. 20, No. 7, pp. 1213-1224. DOI :10.1016/j.tiv.2006.03.006.

[Agarwal et al., 2005]

M. Agarwal, R. A. Gunasekaran, P. Coane & K. Varahramyan (2005). “*Scum-free patterning of SU-8 resist for electroforming applications*”. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. Vol. 15, No. 1. DOI:10.1088/0960-1317/15/1/020.

[Allen, 2006]

T. G. J. Allen (2006). “*Preparation and maintenance of single-cell micro-island cultures of basal forebrain neurons*”. *Nature Protocols*. Vol. 1, No. 6, pp. 2543-255, ISSN: 1754-2189, EISSN: 1750-2799, DOI:10.1038/nprot.2006.394.

[Amarasingham et al., 2006]

A. Amarasingham, T. Chen, S. Geman, M. T. Harrison, and D. L. Sheinberg (2006). “*Spike Count Reliability and the Poisson Hypothesis*”. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 26, No. 3, pp. 801-809. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2948-05.2006.

[Andersen & Krewski, 2008]

M. E. Andersen & D. Krewski (2008). “*Toxicology testing in the 21st century: bringing the vision to life*”. *Toxicological Sciences*. Vol. 107, No. 2, pp. 324–30. DOI:10.1093/toxsci/kfn25.

[Anson & Roberts, 1998]

B. D. Anson & W. M. Roberts (1998). “*A novel voltage clamp technique for mapping ionic currents from cultured skeletal myotubes*”. *Biophysical Journal*. Vol. 74, No. 6 pp. 2963–2972. ISSN: 0006-3495. DOI:10.1016/S0006-3495(98)78003-8.

[Arikkat, 2009]

J. Arikkat (2009). “*Spine Morphology and Plasticity in X-linked Mental Retardations*”. The Open Neuroscience Journal. Vol. 3, pp. 134-147. DOI:10.2174/1874082000903010134.

[Atzori et al., 2004]

M. Atzori, J. F. Hernández & J. C. Pineda (2004). “*Interlaminar differences of spike activation threshold in the auditory cortex of the rat*” Hearing Research. Vol. 189, pp. 101-106. DOI:10.1016/S0378-5955(03)00301-0.

[Bacci et al., 2002]

A. Bacci, J. R. Huguenord & D. A. Prince (2002). “*Differential modulation of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat neocortical neurons*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 99, No. 26, pp. 17125-17130. DOI:10.1073/pnas.012481899.

[Barbour & Isope, 2000]

B. Barbour & P. Isope (2000). “*Combining loose cell-attached stimulation and recording*”. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 103, No. 2, pp. 199-208. ISSN: 0165-0270. DOI:10.1016/S0165-0270(00)00318-6.

[Becker & Gärtner, 2008]

H. Becker & C. Gärtner (2008). “*Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems*”. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 390, No.1, pp. 89-111. DOI:10.1007/s00216-007-1692-2.

[Bekkers & Stevens, 1991]

J. M. Bekkers & C. F. Stevens (1991). “*Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). Vol. 88, No. 17, pp. 7834–7838. DOI:10.1073/pnas.88.17.7834.

[Bergman & DeLong, 1992]

H. Bergman & M.R. DeLong (1992). “*A personal computer-based spike detector and sorter: implementation and evaluation*”. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 41, pp. 187-197. DOI:10.1016/0165-0270(92)90084-Q.

[Bhatia et al., 1992]

S. K. Bhatia, J. J. Hickman & F. S. Ligler (1992). “*New approach to producing patterned biomolecular assemblies*”. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 114, No. 11, pp. 4432–3, DOI:10.1021/ja00037a077.

[Bookman et al., 1987]

Bookman, R. J., Reuter, H., Nicholls, J. G. & Adams, W. B. (1987). “*Loose-patch mapping of ion channel distributions in cultured leech neurons*”. *Society of Neuroscience Abstracts*. Vol. 13, pp. 1442.

[Brahmachari et al., 2006]

S. Brahmachari, Y. K. Fung & K. Pahan (2006). “*Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide*”. *The Journal of Neuroscience. Neurobiology of Disease*. Vol. 26, No. 18, pp. 4930–4939. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5480-05.2006.

[Brown et al., 2004]

E. N. Brown, R. E. Kass & P. P. Mitra (2004). “*Multiple neuronal spike train data analysis: state-of-the-art and future challenges*”. *Nature Neuroscience*. Vol. 7, No. 5, pp. 456-461. DOI:10.1038/nn1228.

[Buño & Araque, 2007]

W. Buño & A. Araque (2007). “*Maestría en Neurociencia y Biología del Comportamiento*”. Sección II. Características de los componentes celulares del tejido nervioso. Instituto Cajal. CSIC. Madrid, España. Viguera Editores, S.L, pp. 151.

[Buzsáki, 2004]

G. Buzsáki (2004). “*Large-scale recording of neuronal ensembles*”. *Nature Neuroscience*. Vol. 7, pp. 446-451, DOI:10.1038/nn1233.

[Ceccarelli, 2008]

E. A. Ceccarelli (2008). “*Organismos genéticamente modificados*”. *Explora. Ciencias Naturales*. Programa de capacitación multimedial, pp. 10.

[Chang et al., 2000]

J. C. Chang, G-J. Brewer & B. C. Wheeler (2000). “*Microelectrode Array Recordings of Patterned Hippocampal Neurons for Four Weeks*”. Biomedical Microdevices. Vol. 2, No. 4, pp. 245-253, DOI:10.1023/A:1009946920296.

[Chen et al., 2007]

S. C. Chen, C. H. Cheng & Y. C. Lin (2005). “*Fabrication of components for a valve-less micropump or microjector by multilevel electroforming technology*”. Microsystem Technologies. Vol. 13, No. 5, pp. 455-463. DOI:10.1007/s00542-006-0209-9.

[Chena et al., 2004]

H. Chena, Y. Honseb & S. R. Ikedaa (2004). “*Alternative modalities of adenovirus-mediated gene expression in hippocampal neurons cultured on microisland substrate*”. Neuroscience Letters. Vol. 368, No. 2, pp. 221–225. DOI:10.1016/j.neulet.2004.07.022.

[Chollet & Liu, 2010]

F. Chollet & H. Liu (2010). “*A (not so) short introduction to MEMS*”. MicroMachines Centre, School of MAE, Nanyang Technological University, Singapore. Xml_ID: 1277579024.

[Claverol-Tinturé & Pine, 2002]

E. Claverol-Tinture & J. Pine (2002). “*Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures*”. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 117, No. 1, pp. 13-21, ISSN: 0165-0270, DOI:10.1016/S0165-0270(02)00043-2.

[Claverol-Tinturé, Ghirardi et al., 2005]

E. Claverol-Tinturé, M. Ghirardi, F. Fiumara, X. Rosell & J. Cabestany (2005). “*Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons*”. Journal of Neural Engineering. Vol. 2, No. 2, DOI:10.1088/1741-2560/2/2/L01.

[Claverol-Tinturé, Rosell et al., 2005]

E. Claverol-Tinturé, X. Rosell & J. Cabestany (2005). “*Interfacing with Patterned in Vitro Neural Networks by Means of Hybrid Glass-Elastomer Neurovectors: Progress on Neuron Placement, Neurite Outgrowth and Biopotential Measurements*”. Lecture Notes in Computer Science, pp. 433-437, ISSN: 0302-9743, DOI:10.1007/11494669_53.

[Claverol-Tinturé et al., 2007]

E. Claverol-Tinturé, J. Cabestany, X. Rosell (2007). “*Multisite recording of extracellular potentials produced by microchannel-confined neurons in-vitro*”. IEEE Transactions on Biomedical Engineering. Vol. 54, No. 2, pp. 331-335, DOI:10.1109/TBME.2006.880903.

[Collins et al., 2008]

F. S. Collins, G. M. Gray & J. R. Buche (2008). “*Transforming Environmental Health Protection*”. Toxicology. Vol. 319, No. 5865, pp. 906-907. DOI:10.1126/science.1154619.

[Cooper & Nadeau, 2009]

D. R. Cooper & J. L. Nadeau (2009). “*Nanotechnology for in vitro neuroscience*”. Review. Nanoscale. Vol. 1, No. 2, pp. 183-200. DOI:10.1039/B9NR00132H.

[Cutsuridis et al., 2010]

V. Cutsuridis, B. Graham, S. Cobb & I. Vida (2010). “*Hippocampal Microcircuits*”. Editorial Springer. ISBN 978-1-4419-0995-4, e-ISBN 978-1-4419-0996-1. DOI:10.1007/978-1-4419-0996-1.

[Dayan & Abbott, 2001]

P. Dayan & L. F. Abbott (2001). “*Theoretical Neuroscience: Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems*”. The MIT Press. ISBN: 0262041995.

[DeCarolis & Eisc, 2010]

N. A. DeCarolis & A. J. Eisc (2010). “*Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation*”. Neuropharmacology. Vol. 58, No. 6, pp. 884–893. DOI:10.1016/j.neuropharm.2009.12.013.

[Dedeurwaerdere, 2005]

S. Dedeurwaerdere (2005). “*Thesis: Neuromodulation in Experimental Animal Models of Epilepsy Ghent University*”. Laboratory for Clinical and Experimental Neurophysiology. Department of Neurology.

[Dow Corning]

Dow Corning Company {<http://www.dowcorning.com>} (consultado junio 2012)

[Drongelen, 2007]

W. Drongelen (2007). “*Signal Processing for Neuroscientists: An Introduction to the Analysis of Physiological Signals*”. Academic Press. Editorial Elsevier, pp. 320, ISBN 10: 0-12-370867-2, ISBN 13: 978-0-12-370867-0.

[Dusseiller et al., 2005]

M. R. Dusseiller, D. Schlaepfer, M. Koch, R. Kroschewski & M. Textor (2005) “*An inverted microcontact printing method on topographically structured polystyrene chips for arrayed micro 3-D culturing of single cells*”. *Biomaterials*. Vol. 26, No. 29, pp. 5917-5925. ISSN: 0142-9612. DOI:10.1016/j.biomaterials.2005.02.032.

[Duvernoy, 2005]

H. M. Duvernoy (2005). “*The Human Hippocampus*”. Editorial Springer. Third Edition. ISBN 3-540-23191-9.

[Dworak & Wheeler, 2009]

B. J. Dworak & B.C. Wheeler (2008). “*Novel MEA platform with PDMS microtunnels enables the detection of action potential propagation from isolated axons in culture*”. *Lab on a Chip*. Vol. 9, No. 3, pp. 304-410. DOI:10.1039/b806689b.

[Easter et al., 2007]

A. Easter, T.H. Sharp, J.-P. Valentin & C.E. Pollard (2007). “*Pharmacological validation of a semi-automated in vitro hippocampal brain slice assay for assessment of seizure liability*”. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Vol. 56, No. 2, pp. 223–233. ISSN: 1056-8719.

[Erickson et al., 2008]

J. Erickson, A. Tooker, Y.-C. Tai & J. Pine (2008). “*Caged neuron MEA: A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity*”. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 175, No. 1, pp. 1–16, DOI:10.1016/j.jneumeth.2008.07.023.

[Evrard, 2002]

S. G. Evrard (2008). “*Alteraciones del desarrollo cerebral en el alcoholismo materno-fetal: rol del sistema serotoninérgico y de la astrogliá*”. Tesis de Doctorado. Universidad De Buenos Aires. Facultad de Medicina. Pg. 68.

[Fink, 2007]

G. Fink (2007). “*Encyclopedia of stress*”. Editorial Elsevier. Second Edition. ISBN 10: 0-12-088503-4, ISBN 13: 978-0-12-088503-9.

[Fitzsimonds et al., 1997]

R. M. Fitzsimonds, H. Song & M. Poo (1997). “*Propagation of activity-dependent synaptic depression in simple neural networks*”. Nature. Vol. 388, No. 6641, pp. 439-448, ISSN: 0028-0836, DOI:10.1038/41267.

[Fluxion]

Fluxion Company {<http://www.fluxionbio.com>} (consultado junio 2012)

[Forti et al., 1997]

L. Forti, M. Bossi, A. Bergamaschi, A. Villa, & A. Malgaroli (1997). “*Loose-patch recordings of single quanta at individual hippocampal synapses*”. Nature. Vol. 388, No. 6645, pp. 874-878. ISSN: 0028-0836.

[Fromherz, 2002]

P. Fromherz (2002). “*Electrical Interfacing of Nerve Cells and Semiconductor Chips*”. Chemphyschem. Vol. 3, No. 3, pp. 276-284.
DOI:10.1002/1439-7641(20020315)3:3<276::AID-CPHC276>3.0.CO;2-A.

[Galbraith et al., 1995]

D. W. Galbraith, H. J. Bohnert, D. P. Bourque & L. Wilson (1995). “*Methods in Plant Cell Biology*”. Part A, Vol. 49 (Methods in Cell Biology). Editor: Academic Press. ISSN: 0091-679X, ISBN-10: 0125641516, ISBN-13: 978-0125641517.

[Gamon & Bragdon, 2010]

D. Gamon & A. D. Bragdon (2010). “*Ejercicios Inteligentes Colección Ejercita y Activa tu Cerebro*”. Grupo Editorial Tomo, S.A. de C.V. 6ta. Edición, pp. 75. ISBN: 970-775-088-X.

[Georgiev, 2004]

D. Georgiev (2004). “*The nervous principle: active versus passive electric processes in neurons*”. Electroneurobiología. Vol. 12, No. 2, pp. 169-230. ISSN: 0328-0446.

[Ghatak, 2010]

K. L. Ghatak (2010). "*Techniques and Methods in Biology*" Editorial Prentice-Hall of India Pvt. Ltd; First edition, pp. 49. ISBN-10: 8120341716. ISBN-13: 978-8120341715.

[Gibb, 2008]

S. Gibb (2008). "*Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy*". *Reproductive Toxicology*. Vol. 25, No. 1, pp. 136–138. DOI:10.1016/j.reprotox.2007.10.013.

[Gil et al., 2010]

V. Gil, Z. Bichler, J. K. Lee, O. Seira, F. Llorens, A. Bribian, R. Morales, E. Claverol-Tinturé, E. Soriano, L. Sumoy, B. Zheng & J. A. del Río (2010). "*Developmental Expression of the Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein in the Mouse Telencephalon*". *Oxford Journals. Cerebral Cortex*, Vol. 20, No. 8, pp. 1769-1779, DOI:10.1093/cercor/bhp246.

[Gillis et al., 2006]

J. A. Gillis, L. Zhang, & F. K. Skinner (2006). "*Deficiencies in traditional measures of in vitro hippocampal rhythms*". *Neurocomputing*. Vol. 69, No. 10-12, pp.1385-1390. ISSN: 0925-2312. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.neucom.2005.12.112.

[Gingell, 2005]

S. M. Gingell (2005). "*Thesis: On the role of the hippocampus in the acquisition, long-term retention and semanticisation of memory*". Institute for Adaptive and Neural Computation. School of Informatics. University of Edinburgh.

[Gomes et al., 2008]

A. R. Gomes, J. S. Ferreira, A. V. Paternain, J. Lerma, C. B. Duarte & A. L. Carvalho (2008). "*Characterization of alternatively spliced isoforms of AMPA receptor subunits encoding truncated receptors*". *Molecular and Cellular Neuroscience*. Vol. 37, No. 2, pp. 323-334. DOI:10.1016/j.mcn.2007.10.008.

[Gomperts et al., 2000]

S. N. Gomperts, R. Carroll, R. C. Malenka, & R. A. Nicoll (2000). "*Distinct Roles for Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptors in the Maturation of Excitatory Synapses*". *The Journal of Neuroscience*. Vol. 20, No. 6, pp. 2229–2237.

[Gross & Rhoades, 1995]

G. W. Gross & B. K. Rhoades (1995). “*The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors*”. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol. 10, pp. 553-567, DOI:10.1016/0956-5663(95)96931-N.

[Ham et al., 2008]

M. I. Ham, L. M. Bettencourt, F. D. McDaniel & G. W. Gross (2008). “*Spontaneous coordinated activity in cultured networks: Analysis of multiple ignition sites, primary circuits, and burst phase delay distributions*”. *Journal of Computational Neuroscience*. Vol. 24, No. 3, pp. 346–357, DOI 10.1007/s10827-007-0059-1.

[Hammarström & Gage, 1998]

A. K. M. Hammarström & P. W. Gage (1998). “*Inhibition of oxidative metabolism increases persistent sodium current in rat CA1 hippocampal neurons*”. *The Journal of Physiology*. Vol. 510, No. 3, pp.735-741. DOI:10.1111/j.1469-7793.1998.735bj.x.

[Harper, 2006]

C. A. Harper (2006). “*Handbook of Plastics Technologies*”. McGraw-Hill Professional. 2nd Edition. ISBN: 0071460683 / 9780071460682. DOI:10.1036/0071460683.

[Hartmann et al., 2008]

J. Hartmann, C. Kiewert, E. G. Duysen, O. Lockridge & Jochen Klein (2008) “*Choline availability and acetylcholine synthesis in the hippocampus of acetylcholinesterase-deficient mice*”. *Neurochemistry International*. Vol. 52, No. 6, pp. 972–978. DOI:10.1016/j.neuint.2007.10.008.

[Hecke et al., 2001]

Hecke, Gerlach, Guber & Schaller (2001). “*Large area polymer replication for microstructured fluidic devices*”. *Proceedings SPIE*. Vol. 4408, pp. 469-477. DOI:10.1117/12.425380.

[Hirai et al., 2002]

Y. Hirai, S. Harada, S. Isaka, M. Kobayashi & Y. Tanaka (2002).

“*Nano.-Imprint Lithography Using Replicated Mold by Ni Electroforming*”. Japanese Journal of Applied Physics (JJAP). Vol. 41, pp. 4186-4189. DOI:0.1143/JJAP.41.4186.

[Hok et al., 2007]

V. Hok, P.-P. Lenck-Santini, S. Roux, E. Save, R. U. Muller & B. Poucet (2007). “*Goal-Related Activity in Hippocampal Place Cells*”. The Journal of Neuroscience, Vol. 27, No. 3, pp. 472-482, DOI:10.1523/JNEUROSCI.2864-06.2007.

[Huang et al., 2001]

R.-Q. Huang, C. L. Bell-Horner, M. I. Dibas, D. F. Covey, J. A. Drewe & G. H. Dillon (2001). “*Pentylentetrazole-Induced Inhibition of Recombinant gamma-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors: Mechanism and Site of Action*”. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 298, No. 3, pp. 986-995.

[Invitrogen]

Invitrogen Company {<http://www.invitrogen.com>} (consultado junio 2012).

[Izhikevich, 2006]

Eugene M. Izhikevich (2006). “*Bursting*”. Scholarpedia. Vol.1, No. 3, pp.1300, revision #76811, ISSN: 1941-6016, DOI:10.4249/scholarpedia.1300.

[Izhikevich, 2007]

E. M. Izhikevich (2007). “*Dynamical Systems in Neuroscience: The Geometry of Excitability and Bursting*”. Editorial: The Massachusetts Institute of Technology Press. London, England. ISBN: 978-0-262-09043-8.

[Jennings et al., 2004]

P. Jennings, C. Koppelstaetter, W. Pfaller, J.-P. Morin, T. Hartung & M. P. Ryan (2004). “*Assessment of a new cell culture perfusion apparatus for in vitro chronic toxicity testing Part 2: toxicological evaluation*”. ALTEX. Vol. 21, No. 2, pp. 61–66.

[Johnston, 1999]

D. Johnston (1999). “*Dendritic Signaling: Functional Properties of Hippocampal Dendrites Developmental*”. Neuropsychology. Vol. 16, No. 3, pp. 309-310. DOI:10.1207/S15326942DN1603_1.

[Johnstone et al., 2010]

A. F. M. Johnstone, G. W. Gross, D. G. Weiss, O. H.-U. Schroeder, A. Gramowski & T. J. Shafer (2010). “*Microelectrode arrays: A physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century*”. *NeuroToxicology*. Vol. 31, No. 4, pp. 331–350, DOI:10.1016/j.neuro.2010.04.001.

[Joshua et al., 2007]

M. Joshua, S. Elias, O. Levine & H. Bergman (2007). “*Quantifying the isolation quality of extracellularly recorded action potentials*”. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 163, pp. 267–282, DOI:10.1016/j.jneumeth.2007.03.012

[Joye et al., 2008]

N. Joye, A. Schmid & Y. Leblebici (2008). “*An Electrical Model of the Cell-Electrode Interface for High-density Microelectrode Arrays*”. *Neurocomputing*, Vol. 73, pp. 559 - 562. ISSN: 1557-170X. ISBN: 978-1-4244-1814-5. DOI:10.1109/IEMBS.2008.4649214

[Jun et al., 2007]

S. B. Jun, M. R. Hynd, N. Dowell-Mesfin, K. L. Smith, J. N. Turner, W. Shain & S. J. Kim (2007). “*Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-l-lysine on microelectrode arrays*”. *Journal Neuroscience Methods*. Vol. 160, No. 2, pp. 317-326. DOI:10.1016/j.jneumeth.2006.09.009.

[Kane et al., 1999]

R. S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber & G. M. Whitesides (1999). “*Patterning proteins and cells using soft lithography*”. *Biomaterials*. Vol. 20, No. 23-24, pp. 2363-76. DOI:10.1016/S0142-9612(99)00165-9.

[Keefer et al., 2001]

E. W. Keefer, A. Gramowski & G. W. Gross (2001). “*NMDA Receptor-Dependent Periodic Oscillations in Cultured Spinal Cord Networks*”. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 86, No. 6, pp.3030-3042.

[Kelly & Yang, 2001]

J. J. Kelly & N. Y. C. Yang (2001). “*Electrodeposition of Ni from a sulfamate electrolyte*”. Sandia National Laboratories. SAND2001-8609.

[Kim & Kim, 2000]

K. H. Kim & S. J. Kim (2000). “*Neural spike sorting under nearly 0-db signal to- noise ratio using nonlinear energy operator and artificial neuralnetwork classifier*”. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on. Vol. 47, No. 10, pp. 1406–1411. DOI:10.1109/10.871415.

[Kimura et al., 1997]

F. Kimura, Y. Otsu, & T. Tsumato (1997). “*Presynaptically Silent Synapses: Spontaneously Active Terminals Without Stimulus-Evoked Release Demonstrated in Cortical Autapses*”. The Journal of Neurophysiology. Vol. 77, No. 5, pp. 2805-2815.

[Kinnamon et al., 1988]

S. C. Kinnamon, V. E. Dionne, & K. G. Beam (1988). “*Apical localization of K⁺ channels in taste cells provides the basis for sour taste transduction*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 85, No. 18, pp. 7027-7027.

[Kirkness et al., 2003]

K. Remington, C. M. Fraser, A. L. Deicher, E. F. Kirkness, D. B. Rusch, V. Bafna, W. Wang, M. Pop, A. L. Halpern, J. Craig Venter & S. Levy (2003). “*The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis*”. Science. Vol. 301, No. 5641, pp. 1898-1903. ISSN: 0036-8075. DOI:10.1126/science.1086432.

[Kleinfeld et al., 1988]

D. Kleinfeld, K. H. Kahler & P. E. Hockberger (1988). “*Controlled Outgrowth of Dissociated Neurons on Patterned Substrates*”. The Journal of Neuroscience. Vol. 8, pp. 4098-4120.

[Kukharenka & Kraft, 2003]

E. Kukharenka & M. Kraft (2003). “*Realization of electroplating molds with thick positive SPR 220-7 photoresist*”. Journal of Materials Science: Materials in Electronics. Vol. 14, No. 5-7, pp. 319-322. DOI:10.1023/A:1023923911921.

[Lee & Jiang, 2008]

C. H. Lee & K. Jiang (2008). “*Fabrication of thick electroforming micro mould using a KMPR negative tone photoresist*”. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. Vol. 18, No. 5. DOI:10.1088/0960-1317/18/5/055032.

[Lewicki, 1998]

M. S. Lewicki (1998). “*A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials*”. TOPICAL REVIEW. *Network: Computation in Neural Systems*. Vol. 9, No. 4, pp. 53-78.

[Lim et al., 2007]

J. H. Lim, E. C. Park, S. Y. Lee, J. W. Yoon, S. S. Ha, J. Joo, H. J. Lee, S. B. Jung & K. Song (2007). “*Fabrication of Ni Metal Mask by Electroforming Process Using Wetting Agents*”. *Journal of Electronic Materials*. Vol. 36, No. 11, pp. 1510-1515.
DOI:10.1007/s11664-007-0211-8.

[Liu et al., 2002]

V. A. Liu, W. E. Jastromb & S. N. Bhatia (2002). “*Engineering protein and cell adhesivity using PEO-terminated triblock polymers*”. *Journal of Biomedical Materials Research*. Vol. 60, No. 1, pp. 126-34, DOI:10.1002/jbm.10005.

[Liu et al., 2009]

H. Liu, C. Dean, C. P. Arthur, M. Dong & E. R. Chapman (2009). “*Autapses and Networks of Hippocampal Neurons Exhibit Distinct Synaptic Transmission Phenotypes in the Absence of Synaptotagmin*”. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 29, No. 23, pp. 7395–740, ISSN: 0270-6474. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1341-09.2009.

[Lorenz et al., 1997]

H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud & P. Vettiger (1997). “*SU-8: a low-cost negative resist for MEMS*”. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. Vol. 7, No.3. DOI:10.1088/0960-1317/7/3/010.

[Magistretti & Ranson, 2002]

P.J. Magistretti & B. R. Ransom (2002). “*Astrocytes*”. Editors: K. L. Davis, D. Charney, J. T. Coyle, C. Nemeroff. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation Of Progress*.

Lippincott Williams and Wilkins, New York. Ch 10, pp 133-145.

[Mahalik, 2006]

N. P. Mahalik (2006). "*Micromanufacturing and Nanotechnology*". Editorial Springer. ISBN-10 3-540-25377-7.

[Maher et al., 1999]

M. P. Maher, J. Pine, J. Wright & Y.-C. Tai (1999). "*The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from culture neurons*". *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 87, pp. 45–56.

[Mahoney et al., 2004]

M. J. Mahoney, R. R. Chen, J. Tan & W. M. Saltzman (2004). "*The influence of microchannels on neurite growth and architecture*". *Biomaterials*. Vol. 26, No. 7, pp. 771–778. ISSN: 0142-9612. DOI:10.1016/j.biomaterials.2004.03.015.

[Marrero & Lemos, 2003]

H. G. Marrero, & J. R. Lemos (2003). "*Loose-patch clamp currents from the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat*". *Pflügers Archive European Journal of Physiology*. Vol. 448, No. 6, pp. 702-713. DOI:10.1007/s00424-003-1120-1.

[Mata et al., 2005]

A. Mata, A. J. Fleischman & S. Roy (2005). "*Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems*". *Biomedical Microdevices*. Vol 7, No. 4, pp. 281-293. DOI:10.1007/s105.

[Mekaru et al., 2004]

H. Mekaru, T. Yamada, S. Yan & T. Hattori (2004). "*Microfabrication by hot embossing and injection molding at LASTP*". *Microsystem Technologies*. Vol. 10, No. 10, pp. 682-688. DOI:10.1007/s00542-004-0401-8.

[Mennerick et al., 1995]

S. Mennerick, J. Que, A. Benz & C. F. Zorumski (1995). "*Passive and synaptic properties of hippocampal neurons grown in microcultures and in mass cultures*". *Journal of Neurophysiology*. Vol. 73, No. 1, pp. 320-332.

[Meyer-Masseti et al., 2010]

C. Meyer-Masseti, C. M. Cheng, B. A. Sharpe, C. R. Meier & B. J. Guglielmo (2010).

“*The FDA Extended Warning for Intravenous Haloperidol and Torsades de Pointes: How Should Institutions Respond?*”. FDA-warning for IV Haloperidol: A Review.

Journal of Hospital Medicine. Vol. 5, No. 4, DOI:10.1002/jhm.691.

[Milton & Caldwell, 1990]

R. L. Milton & J.H. Caldwell (1990). “*Na current in membrane blebs: implications for channel mobility and patch clamp recording*”. The Journal of Neuroscience. Vol. 10, No. 3, pp. 885-893.

[Moises et al., 2002]

H. W. Moises, T. Zoega I. & I. Gottesman (2002). “*The glial growth factors deficiency and synaptic destabilization hypothesis of schizophrenia*”. BMC Psychiatry, Vol. 2, No. 8, DOI:10.1186/1471-244X-2-8.

[Monzón et al., 2007]

M. Monzón Verona, P. Hernández Castellano, M^a D. Marrero Alemán & A. Benítez Vega (2007) “*Aplicaciones del electroconformado a la fabricación rápida de herramientas*”. 8^o Congreso Iberoamericano de Ingeniería Mecánica.

[Morales et al., 2008]

R. Morales, M. Riss, L. Wang, R. Gavín, J. A. D. Río, R. Alcubillab & E. Claverol-Tinturé (2008). “*Integrating multi-unit electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience*”. Lab on a Chip. Vol. 8, No. 11, pp. 1896–1905, DOI:10.1039/b802165a.

[Mori et al., 2007]

M. Mori, B. H. Gähwiler & U. Gerber (2007). “*Recruitment of an inhibitory hippocampal network after bursting in a single granule cell*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). Vol. 104, No. 18, pp. 7640-7645, DOI:10.1073/pnas.0702164104.

[Morin et al., 2005]

F. O. Morin, Y. Takamura & E. Tamiya (2005). “*Investigating Neuronal Activity with Planar Microelectrode Arrays: Achievements and New Perspectives (Review)*”. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 100, No. 2, pp. 131-143. DOI:10.1263/jbb.100.131.

[Mtetwa & Smith, 2006]

N. Mtetwa & L. S. Smith (2006). “*Smoothing and thresholding in neuronal spike detection*”. Neurocomputing. Vol. 69, pp. 1366-1370. DOI:10.1016/j.neucom.2005.12.108.

[Mukhopadhyay & Ray, 1998]

S. Mukhopadhyay & G. C. Ray (1998). “*A new interpretation of the nonlinear energy operator and its efficacy in spike detection*”. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on. Vol. 45, No. 2, pp. 180–187, DOI:10.1109/10.661266.

[Nahmias & Odde, 2006]

Y. Nahmias & D. J. Odde (2006). “*Micropatterning of living cells by laser-guided direct writing: application to fabrication of hepatic-endothelial sinusoid-like structures*”. Nature Protocols. Vol. 1, No. 5, pp. 2288-96, DOI:10.1038/nprot.2006.386.

[Nakajima et al., 1986]

Y. Nakajima, S. Nakajima, R. J. Leonard & K. Yamaguchi (1986). “*Acetylcholine raises excitability by inhibiting the fast transient potassium current in cultured hippocampal neurons*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 83, pp. 3022-3026.

[Nenadic & Burdick, 2005]

Z. Nenadic & J. W. Burdick (2005). “*Spike detection using continuous wavelet transform*”. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on. Vol. 52, No. 1, pp. 74–87. ISSN: 0018-9294.

[Nunemaker et al., 2003]

C. S. Nunemaker, R. A. DeFazio & S. M. Moenter (2003). “*A targeted extracellular approach for recording long-term firing patterns of excitable cells: a practical guide*”. Springer Protocols. Vol. 5, pp. 53-62. DOI:10.1251/bpo46.

[Obeid et al., 2004]

I. Obeid, M. A. L. Nicolelis & P. D. Wolf (2004). “*A low power multichannel analog front end for portable neural signal recordings*”. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 133, No. 1-2, pp. 27-32, ISSN: 0165-0270, DOI:10.1016/j.jneumeth.2003.09.024.

[Odde & Renn, 2000]

D. J. Odde & M. J. Renn (2000). “*Laser-guided direct writing of living cells*”. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 67, No. 3, pp.312-8, DOI:10.1002/(SICI)1097-0290(20000205)67:3<312::AID-BIT7>3.0.CO;2-F.

[Otis & Sofroniew, 2008]

T. S. Otis & M. V. Sofroniew (2008). “*Glia get excited*” *News and Views. Nature Neuroscience*. Vol. 11, No. 4, pp. 379-80. DOI:10.1038/nn0408-379.

[Otsuka & Kawaguchi, 2008]

T. Otsuka & Y. Kawaguchi (2008). “*Firing-Pattern-Dependent Specificity of Cortical Excitatory Feed-Forward Subnetworks*”. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 28, No. 44, pp.11186–11195. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1921-08.2008.

[Oweiss, 2010]

K. G. Oweiss (2010). “*Statistical Signal Processing for Neuroscience and Neurotechnology*”. Editorial Elsevier. ISBN: 978-0-12-3750-273.

[Padmashri et al., 2006]

R. Padmashri, A. Ganguly, P. P. Mondal, K. Rajan & S. K. Sikdar (2006). “*Kynurenate treatment of autaptic hippocampal microcultures affect localized voltage-dependent calcium diffusion in the dendrites*”. *Cell Calcium*. Vol. 39, No. 3, pp. 247-258, ISSN: 0143-4160, DOI:10.1016/j.ceca.2005.11.003.

[Pai, 2001]

R. S. Pai (2001). “*Nickel Electroplating using Shipley Megaposit SPR 220 Positive Resist as a Mold*”. University of Louisville.

[Patolsky et al., 2006]

F. Patolsky, B. P. Timko, G. Yu, Y. Fang, A. B. Greytak, G. Zheng, C. M. Lieber (2007). “*Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-density nanowire transistor arrays*”. *Science*. Vol. 313, No. 5790, pp. 1100-4. DOI:10.1126/science.1128640.

[Pelt et al., 2004]

J. V. Pelt, P. S. Wolters, M. A. Corner, W. L. C. Rutten, & G. J. A. Ramakers (2004). “*Long-Term Characterization of Firing Dynamics of Spontaneous Bursts in Cultured Neural Networks*”. *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*. Vol. 51, No. 11, pp. 2051-2062, ISSN: 0018-9294, DOI:10.1109/TBME.2004.827936.

[Pérez, 2006]

K. Pérez Capote (2006). “*Tesis: Respuesta de las células gliales al daño neuronal "in vitro"*”. Universitat de Barcelona. ISBN: 8469005898.

[Perkins, 2006]

K.L. Perkins (2006). “*Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices*”. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 154, No. 1-2, pp. 1-18, ISSN: 0165-0270. DOI:10.1016/j.jneumeth.2006.02.010.

[Piccolino, 1998]

M. Piccolino (1998). “*History of Neuroscience. Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani*”. *Brain Research Bulletin*. Vol. 46, No. 5, pp. 381–407, DOI:10.1016/S0361-9230(98)00026-4.

[Pine & Chow, 2009]

J. Pine & G. Chow (2009). “*Moving Live Dissociated Neurons With an Optical Tweezer*”. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 56, No. 4, pp. 1184 - 1188, ISSN: 0018-9294. DOI:10.1109/TBME.2008.2005641.

[Piner et al., 1999]

R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. H. Hong & C. A. Mirkin (1999). “*“Dip-pen” Nanolithography*”. *Science*. Vol. 283, No. 5402, pp. 661-3, DOI:10.1126/science.283.5402.661.

[Piotter et al., 1997]

V. Piotter, T. Hanemann, R. Ruprecht & J. Haußelt (1997). “*Injection molding and related techniques for fabrication of microstructures*“. *Microsystem Technologies*. Vol.3, No. 3, pp.129-133. DOI:10.1007/s005420050069.

[Poindron et al., 2005]

P. Poindron, P. Piguet & Eckart Forster (2005). “*New Methods for Culturing Cells from Nervous Tissues*“. *BioValley Monographs*. Vol. 1, pp. 82-95. DOI:10.1159/000083444.

[Potter & DeMarse, 2001]

S. M. Potter & T. B. DeMarse (2001). "A new approach to neural cell culture for long-term studies", *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 110, No. 1-2, pp. 17-24, ISSN 0165-0270. DOI:10.1016/S0165-0270(01)00412-5.

[Prasad et al., 2003]

S. Prasad, M. Yang, X. Zhang, C. S. Ozkan & M. Ozkan (2003). “Electric field assisted patterning of neuronal networks for the study of brain functions”. *Biomedical Microdevices*. Publisher: Springer Netherlands. Vol. 5, No. 2, pp. 125-137, ISSN: 1387-2176. DOI:10.1023/A:1024587112812.

[Rambani et al., 2009]

K. Rambani, J. Vukasinovic, A. Glezer, & S. M. Potter (2009). “*Culturing thick brain slices: An interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability*“. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 180, No. 2, pp. 243-254, ISSN 0165-0270. DOI:10.1016/j.jneumeth.2009.03.016.

[Rametti, 2008]

G. Rametti (2008). “*Anomalías de la estructura y función del hipocampo en la esquizofrenia en la relación a los déficits de memoria declarativa*“. Departamento de Psiquiatría y Psicobiología Clínica, Universidad de Barcelona. Referencia: Tesis. ID: 38647425. ISBN: 9788469216590.

[Rao et al., 2000]

A. Rao, E. M. Cha & A. M. Crai (2000). “*Mismatched Appositions of Presynaptic and Postsynaptic Components in Isolated Hippocampal Neurons*“. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 20, No. 22, pp. 8344–8353.

[Rolston et al., 2007]

J. D. Rolston, D. A. Wagenaar & S. M. Potter (2007). “*Precisely timed spatiotemporal patterns of neural activity in dissociated cortical cultures*”. *Neuroscience*. Vol. 148, pp. 294-303. DOI:10.1016/j.neuroscience.2007.05.025.

[Rolston et al., 2009]

J. D. Rolston, R. E. Gross & S. M. Potter (2009). “*A low-cost multielectrode system for data acquisition enabling real-time closed-loop processing with rapid recovery from stimulation artifacts*”. *Frontiers in Neuroengineering*. Vol. 2, No. 12, DOI:10.3389/neuro.16.012.2009.

[Roth et al., 2004]

E. A. Roth, T. Xu, M. Das, C. Gregory, J.J. Hickman & T. Boland (2004). “*Inkjet printing for high-throughput cell patterning*”. *Biomaterials*. Vol. 25, No. 17, pp. 3707-3715, DOI:10.1016/j.biomaterials.2003.10.052.

[Ruardij et al., 2001]

T. G. Ruardij, M. H. Goedbloed & W. L. C. Rutten (2001). “*Survival of adhering cortical neurons on polyethylenimine micropatterns*”. 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Isyanbul, Turkey. IEEE. Vol. 1, pp. 749-752.

[Rutten et al., 2001]

W. Rutten, J. Mouveroux, J. Buitenweg, C. Heida, T. Ruardij, E. Marani & E. Lakke (2001). “*Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a cultured probe*”. *Proceedings of the IEEE*, Vol. 89, No.7, pp. 1013-1029, ISSN: 0018-9219.

[Ryan, 2008]

J. A. Ryan (2008). “*Introduction to Animal cell Culture*”. Corning Incorporated. Technical Bulletin.
{http://catalog2.corning.com/Lifesciences/media/pdf/intro_animal_cell_culture.pdf}
(consultado julio 2012).

[Salganicoff et al., 1998]

M. Salganicoff, M. Sarna, L. Sax, & G. L. Gerstain (1998). “*Unsupervised waveform classification for multi-neural recording: a real-time software-based system I*”. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 25, pp. 181–188. DOI:10.1016/j.neucom.2005.12.108.

[Sanjana & Fuller, 2004]

N. E. Sanjana & S. B. Fuller (2004). “*A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture*”. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 136, No. 2, pp. 151–163 DOI:10.1016/j.jneumeth.2004.01.011.

[Scanziani & Häusser, 2009]

M. Scanziani & M. Häusser (2009). “*Electrophysiology in the age of light*”. *Insight Review*. *Nature*. Vol. 461, No. 15, pp. 930 - 939. DOI:10.1038/nature08540.

[Segal, 1991]

M. M. Segal (1991). “*Epileptiform activity in microcultures containing one excitatory hippocampal neuron*”. *Journal of Neurophysiology*. No. 65, No. 4, pp. 761–770.

[SfN, 2012]

Society for Neuroscience (2012). “*Brain Facts: A Primer on the brain and nervous system*”
Society for Neuroscience. Seventh Edition.

{<http://brainfacts.org/about-neuroscience/brain-facts-book/>} (consultado julio 2012).

[Shadlen & Newsome, 1998]

M. N. Shadlen & W. T. Newsome (1998). “*The Variable Discharge of Cortical Neurons: Implications for Connectivity, Computation, and Information Coding*”.
Journal of Neuroscience. Vol. 18, No. 10, pp. 3870-3896.

[Shafer et al., 2008]

T. J. Shafer, S. O. Rijal & G.W. Gross (2008). “*Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin*”. *NeuroToxicology*. Vol. 29, No. 2, pp. 203-212. ISSN: 0161-813X. DOI:10.1016/j.neuro.2008.01.002.

[Shahaf & Marom, 2001]

G. Shahaf & S. Marom (2001). “*Learning in Networks of Cortical Neurons*”. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 21, No.22, pp. 8782-8788.

[Shein et al., 2008]

M. Shein, V. Volman, N. Raichman, Y. Hanein & E. Ben-Jacob (2008). “*Management of synchronized network activity by highly active neurons*”. *Physical Biology*. Vol. 5, No. 3, pp. 036008. DOI:10.1088/1478-3975/5/3/036008.

[Silberberg et al., 2004]

G. Silberberg, C. Wu & H. Markram (2004). “*Synaptic dynamic control the timing of neuronal excitation in the activated neocortical microcircuit*”. *Journal of Physiology*, Vol. 556, No. 1, pp. 19-27, DOI:10.1113/jphysiol.2004.060962.

[Srinivas et al., 2007]

K. V. Srinivas, R. Jain, S. Saurav & S. K. Sikdar (2007). “*Small-world network topology of hippocampal neuronal network is lost, in an in vitro glutamate injury model of epilepsy*”. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 25, No. 11, pp. 3276–3286. DOI:10.1111/j.1460-9568.2007.05559.x.

[Stenger et al., 1992]

D. A. Stenger, J. H. Georger, C. S. Dulcey, J. J. Hickman, A. S. Rudolph, T. B. Nielsen, S. M. McCort & J. M. Calvert (1992). “*Coplanar molecular assemblies of amino- and perfluorinated alkylsilanes: characterization and geometric definition of mammalian cell adhesion and growth*”. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 114, No. 22, pp. 8435–8442. DOI:10.1021/ja00048a013.

[Strowbridge, 1999]

B. W. Strowbridge (1999). “*Glutamate Receptors Mediate TTX-Resistant Synchronous Activity in the Rat Hippocampus*”. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 19, No. 14, pp. 5758–5767.

[Subramanian et al., 2001]

A. Subramanian, K. N. Srinivasan, S. John & T. Vasudevan (2001). “*Recovery of activated nickel from residues for electroforming applications*”. *Journal of Applied Electrochemistry*. Vol. 31, pp. 35-40. DOI:10.1023/A:1004149613429.

[Suzuki & Yasuda, 2007]

I. Suzuki & K. Yasuda (2007). “*Constructive Formation and Connection of Aligned Micropatterned Neural Networks by Stepwise Photothermal Etching during Cultivation*”. Japanese Journal of Applied Physics. Vol. 46, No. 9B, pp. 6398–6403, DOI:10.1143/JJAP.46.6398.

[Svensson & Coombes, 2009]

C.-M. Svensson & S. Coombes (2009). “*Mode locking in a spatially extended neuron model: active soma and compartmental tree*”. International Journal of Bifurcation and Chaos (IJBC). Vol. 19, No. 8, pp. 2597-2607. DOI:10.1142/S0218127409024347.

[Tablada & Torres, 2009]

C. J. Tablada & G. A. Torres (2009). “*Redes Neuronales Artificiales*”. Revista de Educación Matemática. Facultad de Matemática, Astronomía y Física, Universidad Nacional de Córdoba: Unidad Matemática Argentina. Vol. 27, pp. 22-30. ISSN: 0326-8780.

[Takada et al., 2005]

N. Takada, Y. Yanagawa & Y. Komatsu (2005). “*Activity-dependent maturation of excitatory synaptic connections in solitary neuron cultures of mouse neocortex*”. European Journal of Neuroscience. Vol. 21, No. 2, pp. 422–430, DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.03881.x.

[Taketani & Baudry, 2006]

M. Taketani & M. Baudry (2006). “*Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays*”. Editorial Springer Science+Business Media, Inc. ISBN 10: 0-387-25857-4, ISBN 13: 978-0387-25857-7.

[Tan & Desai, 2003]

W. Tan & T. A. Desai (2003). “*Microfluidic patterning of cells in extracellular matrix biopolymers: effects of channel size, cell type, and matrix composition on pattern integrity*”. Tissue Engineering. Vol. 9, No. 2, pp. 255-67, DOI:10.1089/107632703764664729.

[The Axon Guide, 2008]

The Axon Guide (2008). “*A Guide to Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques*”. Third Edition, MDS Analytical Technologies.

[Tokker et al., 2006]

A. Tooker, J. Erickson, G. Chow, Y.C. Tai & J. Pine (2006) “*Parylene Neurocages for Electrical Stimulation on Silicon and Glass Substrates*”. Engineering in Medicine and Biology Society. EMBS '06. 28th Annual International Conference of the IEEE 2006. Vol. 1, pp. 4322-4325. DOI:10.1109/IEMBS.2006.260472.

[Traub & Miles, 1991]

R. D. Traub & R. Miles (1991). “*Neuronal Networks of the Hippocampus*”. Cambridge University Press. ISBN-13: 9780521364812 | ISBN-10: 0521364817.

[Ueno et al., 1997]

H. Ueno, M. Hosaka, Y. Zhang, O. Tabata, S. Konishi & S. Sugiyama (1997). “*Study on fabrication of high aspect ratio microparts using the LIGA process*”. Micromechatronics and Human Science, 1997. Proceedings of the 1997 International Symposium on, pp. 49-54. DOI:10.1109/MHS.1997.768856.

[Valentino & Dingledine, 1981]

R.J. Valentino & R. Dingledine (1981). “*Presynaptic inhibitory effect of acetylcholine in the hippocampus*”. The Journal of Neuroscience. Vol. 1, No. 7, pp. 784-792.

[Vogt, 2003]

A. G. Vogt (2003). “*Synaptic connectivity in micropatterned networks of neuronal cells*”. Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Biologie. Ref Type: Thesis/Dissertation. Chapter 5 & 6.

[Wagenaar et al., 2005]

D. Wagenaar, T. B. DeMarse & S. M. Potter (2005) “*MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis*”. Neural Engineering, 2005. Conference Proceedings. 2nd International IEEE EMBS Conference on, pp. 518-521, ISBN: 0-7803-8710-4, DOI:10.1109/CNE.2005.1419673.

[Wagenaar et al., 2006]

D. A. Wagenaar, J. Pine & S. M Potter (2006) “*An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures*”. BMC Neuroscience. Vol. 7, No. 1, pp. 11, DOI:10.1186/1471-2202-7-11.

[Walz, 2007]

Wolfgang Walz (2007). *“Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques”*. Second Edition. Chapter 14. Neuromethods Series. Vol. 38. Publisher: Humana Press. ISBN: 1588297055.

[Waterston et al., 2002]

RH Waterston, K Lindblad-Toh, E Birney, J Rogers, JF Abril, P Agarwal, R Agarwala, R Ainscough, M Alexandersson, P An, SE Antonarakis, J Attwood, R Baertsch, J Bailey, K Barlow, S Beck, E Berry, B Birren, T Bloom, P Bork, M Botcherby, N Bray, Brent, DG Brown, SD Brown, C Bult, J Burton, J Butler, RD Campbell, P Carninci, S Cawley, F Chiaromonte, AT Chinwalla, DM Church, M Clamp, C Clee, FS Collins, LL Cook, RR Copley, A Coulson, O Couronne, J Cuff, V Curwen, T Cutts, M Daly, R David, J Davies, KD Delehaunty, J Deri, ET Dermitzakis, C Dewey, NJ Dickens, M Diekhans, S Dodge, I Dubchak, DM Dunn, Eddy, L Elnitski, RD Emes, P Eswara, E Eyraes, A Felsenfeld, GA Fewell, P Flicek, K Foley, WN Frankel, LA Fulton, RS Fulton, TS Furey, D Gage, RA Gibbs, G Glusman, S Gnerre, N Goldman, L Goodstadt, D Grafham, TA Graves, ED Green, S Gregory, R Guigo, M Guyer, RC Hardison, D Haussler, Y Hayashizaki, LW Hillier, A Hinrichs, W Hlavina, T Holzer, F Hsu, A Hua, T Hubbard, A Hunt, I Jackson, DB Jaffe, LS Johnson, M Jones, TA Jones, A Joy, M Kamal, EK Karlsson, D Karolchik, A Kasprzyk, J Kawai, E Keibler, C Kells, WJ Kent, A Kirby, DL Kolbe, I Korf, RS Kucherlapati, EJ Kulbokas, D Kulp, T Landers, JP Leger, S Leonard, I Letunic, R Levine, J Li, M Li, C Lloyd, S Lucas, B Ma, Maglott, ER Mardis, L Matthews, E Mauceli, JH Mayer, M McCarthy, WR McCombie, S McLaren, K McLay, JD McPherson, J Meldrim, B Meredith, JP Mesirov, W Miller, TL Miner, E Mongin, KT Montgomery, M Morgan, R Mott, JC Mullikin, DM Muzny, WE Nash, JO Nelson, MN Nhan, R Nicol, Z Ning, C Nusbaum, MJ O'Connor, Y Okazaki, K Oliver, EO Larty, L Pachter, G Parra, KH Pepin, J Peterson, P Pevzner, R Plumb, CS Pohl, A Poliakov, TC Ponce, CP Ponting, S Potter, M Quail, A Reymond, BA Roe, KM Roskin, EM Rubin, AG Rust, R Santos, V Sapojnikov, B Schultz, J Schultz, Schwartz, S Schwartz, C Scott, S Seaman, S Searle, T Sharpe, A Sheridan, R Shownkeen, S Sims, JB Singer, G Slater, A Smit, Smith, B Spencer, A Stabenau, NS Strange-Thomann, C Sugnet, M Suyama, G Tesler, J Thompson, D Torrents, E Trevaskis, J Tromp, C Ucla, AU Vidal, JP Vinson, AC Von Niederhausern, CM Wade, M Wall, RJ Weber, RB Weiss, MC Wendl, AP West, K Wetterstrand, R Wheeler, S Whelan, J Wierzbowski, D Willey, S Williams, RK Wilson, E Winter, KC Worley, D Wyman, S Yang, SP Yang, EM Zdobnov, MC Zody, ES Lander

& Mouse Genome Sequencing Consor (2002). “*Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*”. Nature. Vol. 420, No. 6915, pp.520-562. DOI:10.1038/nature01262.

[Weibel et al., 2007]

D. B. Weibel, W. R. DiLuzio & G. M. Whitesides (2007). “*Microfabrication meets microbiology*”. Nature Reviews Microbiology. DOI:10.1038/nrmicro1616.

[WHO, 2004]

World Health Organization (2004). “*Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence*”. ISBN: 9241562358.

[Wilson et al., 2001]

D. L. Wilson, R. Martin, S. Hong, M. Cronin-Golomb, C. A. Mirkin & D. L. Kaplan (2001). “*Surface organization and nanopatterning of collagen by dip-pen nanolithography*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 98, No. 24, pp. 13660–4, DOI:10.1073/pnas.241323198.

[Yang et al., 2002]

H.-J. Yang, S.-J. Hu, S. Han, G.-P. Liu, Y. Xie, & J.-X. Xu (2002). “*Relation between Responsiveness to Neurotransmitters and Complexity of Epileptiform Activity in Rat Hippocampal CA1 Neurons*”. Blackwell Publishing, Inc. Epilepsia. Vol. 43, No. 11, pp. 1330-1336. DOI:10.1046/j.1528-1157.2002.15702.x.

[Yu et al., 2009]

Z. Yu, O. Graudejus, C. Tsay, S. P. Lacour, S. Wagner & B. Morrison III (2009). “*Monitoring Hippocampus Electrical Activity In Vitro on an Elastically Deformable Microelectrode Array*”. Journal of Neurotrauma. Vol. 26, No. 7, pp. 1135–1145. DOI:10.1089/neu.2008.0810.

[Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011]

Cecilia Zavala-Tecuapetla y María Leonor López-Meraz (2011). “*Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo*”. Artículo de Revisión. Revista electrónica, Neurobiología. Vol. 2, No. 4. ISBN: 190811.

[Zeck & Fromherz, 2001]

G. Zeck & P. Fromherz (2001). “*Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). Vol. 98, No. 18, pp. 10457–10462, DOI:10.1073/pnas.181348698.

[Zhang et al., 1999]

S. Zhang, L. Yan, M. Altman, M. Lasse, H. Nugent, F. Frankel, D. A. Lauffenburger, G. M. Whitesides & A. Rich (1999). “*Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation*”. Biomaterials, Vol. 20, No. 13, pp. 1213–20, DOI:10.1016/S0142-9612(99)00014-9.

[Zhu et al., 2006]

X. Zhu, G. Liu, Y. Xiong, Y. Guo & Y. Tian (2006). “*Fabrication of PMMA Microchip of Capillary Electrophoresis by Optimized UV-LIGA Process*”. Journal of Physics: Conference Series. Vol. 34. DOI:10.1088/1742-6596/34/1/145.

Publicaciones derivadas de la tesis

R. Morales, M. Riss, L. Wang, R. Gavín, J.A. del Río, R. Alcubilla & E. Claverol-Tinturé (2008). “*Integrating multi-unit electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience*”. *Lab on a Chip*, Vol. 8, No. 11, pp. 1896 - 1905. DOI:10.1039/B802165A.

V. Gil, Z. Bichler, J. K. Lee, O. Seira, F. Llorens, A. Bribian, R. Morales, E. Claverol-Tinturé, E. Soriano, L. Sumoy, B. Zheng & J. A. del Río (2010). “*Developmental Expression of the Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein in the Mouse Telencephalon*”. *Oxford Journals. Cerebral Cortex*, Vol. 20, No. 8, pp. 1769-1779, DOI:10.1093/cercor/bhp246.

Congreso

Participación y presentación del poster “*All-polymeric low-cost multielectrode arrays for recording of neuronal activity in vitro*” en el “13 Congreso Europeo en Biotecnología”, en Barcelona, España (2007).

ANEXOS

Anexo A: Moldes Adicionales para la Técnica de Elastomer Casting

Durante el trabajo de tesis se han estudiado varias estrategias para la producción de los dispositivos poliméricos. Una de ellas se basa en la creación de másteres plásticos (ejemplo de ello son resinas MMA y resinas epoxi) que incluyen el negativo de los compartimientos y microcanales, con el objetivo de producir, por colada y en un solo paso, las piezas elastoméricas.

- Molde de MMA.

Primeramente se parte de una pieza fabricada de PDMS con dos pozos y un microcanal para utilizarlo como molde y curar sobre él la resina autopolimerizante para ortodoncia (MMA).

El problema que ha presentado este tipo de pieza creada, es que la estructura está convexa (y no plana) en la sección del microcanal; esto ocurre porque la superficie del molde de PDMS forma un arco cóncavo al estar en contacto con la resina.

Otra desventaja que presenta el molde de MMA como posible molde maestro, es que la silicona solo se cura de manera parcial y se observa formación de burbujas.

- Molde de epoxi.

Otro tipo de molde que se puede fabricar, siguiendo el protocolo anterior, es utilizando la resina epoxi “Embed.812” (figura A.1).

El problema que se presenta, es que la silicona PDMS también reacciona con esta resina de manera como lo hace con la resina MMA, provocando una curvatura cóncava en su superficie; esto trae como consecuencias que al curar una nueva pieza PDMS sobre este molde de resina epoxi, la nueva pieza de PDMS no sea completamente plana y los bordes del microcanal no hagan buen contacto sobre la placa de Petri donde se desea depositar.

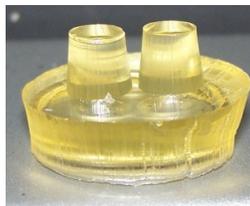


Figura A.1 Molde de resina epoxi. Pieza formada con base, columnas y una micropista de resina epoxi “Embed 812”. Nótese la curvatura de la base de las dos columnas, lo que hace poco útil la pieza resultante en PDMS tras la colada, curado y desmoldeado. La curvatura hace imposible una buena adherencia para el cultivo y registros electrofisiológicos.

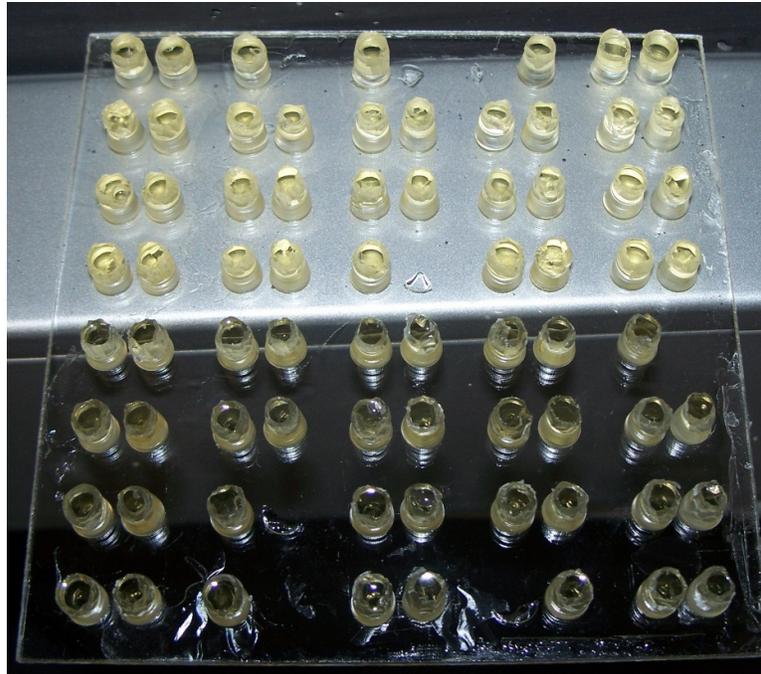


Figura A.2 Molde mixto de vidrio y epoxi. Este molde contiene columnas y micropistas de epoxi sobre una base de vidrio.

El problema de la concavidad del material puede ser solucionado si se utiliza una base de material sólido para crear el máster, como lo es el vidrio, y de esta manera solo es necesario que las micropistas y las columnas sean de resina (figura A.2).

Si se utiliza una matriz de PDMS con 80 perforaciones y 40 microcanales, y se coloca sobre una base cuadrada de vidrio de 100 x 100 x 3 mm, con la cara hacia abajo (microcanales en contacto con el sustrato de vidrio); se pueden rellenar fácilmente los microcanales con resina epoxi “Embed-812”, ya que su nivel de viscosidad baja permite acceder por capilaridad dentro de los microcanales.

Los pozos pueden ser rellenos con resina epoxi “Araldite 502”, ya que su viscosidad es superior a Embed-812. Al final se puede obtener una estructura como se muestra en la figura A.2.

Desafortunadamente los pozos de las matrices de PDMS (80 pares de pozos) no son completamente perpendiculares al plano de la matriz (efecto causado por la perforación del *puncher*, lo cual les da forma parcialmente cónica).

Aunque la superficie de las columnas puede ser limadas (por una herramienta tipo *Dremel*) para hacer homogénea su estructura, si se llega a curar nueva silicona sobre el molde, entonces se requerirá de un gran esfuerzo, tiempo y paciencia para remover la matriz de PDMS sin dañar

su estructura, ya que uno de los aspectos más críticos en esta pieza polimérica es que cada par de pozos están muy próximos entre sí (1 mm), por lo que si no se tiene cuidado con la fuerza aplicada, la zona del microcanal o la pared del pozo puede ser destruida.

Lamentablemente, también ocurre que ciertas columnas de resina no se adhieren del todo bien a la base del sustrato de vidrio, y por lo tanto llegan a desprenderse cuando se retira la matriz curada de PDMS.

Anexo B: Diseño para Inyección de Molde

Una alternativa para la fabricación del dispositivo polimérico es el uso de inyección de termoplásticos (como el poliestireno) produciendo una base con microcanales y una segunda pieza, que sería alineada y termosellada a la base, incluyendo los compartimientos para cultivo celular. Una tercera pieza que sería la tapadera ayudaría a cerrar la superficie de manera manual y a mantener las condiciones de esterilidad.

Modelos en 3D y diagrama esquemático de las piezas poliméricas a ser producidas mediante inyección. Las dos dificultades que afectan a la viabilidad de esta solución son la producción de los moldes metálicos de larga duración, el alineado y unión de la base y estructura con pozos (compartimientos).

Aunque el dispositivo polimérico final fue desarrollado mediante técnicas de soft-litografía (capítulo 3), en este anexo se incluyen los diseños destinados a la producción por inyección de poliestireno que han sido desarrollados en vistas a una futura industrialización en termoplástico.

Las piezas poliméricas sugeridas en este Anexo (figura B) son:

- Base.- Placa plana con los microcanales marcados.
- Estructura de pozos.- Pieza que contiene los 6 pares de pozos.
- Tapadera.- Pieza que sirve para proteger la superficie de los 6 pares de pozos.

Características volumétricas:

Tabla B-1

Volumen	Valor
Tapa	2,32 cm ³
Base	1,43 cm ³
Estructura de los pozos	3,67 cm ³
Total (conjunto de las 3 piezas)	7,42 cm ³

Tabla B-2

Densidad	Valor
Material PS	$1,07 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
Tapa	$2,48 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
Base	$1,53 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
Estructura de los pozos	$3,93 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
Total (conjunto de las 3 piezas)	$7,94 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$

- Base 
- Estructura de pozos 
- Tapa 
- Las 3 piezas juntas 

Figura B. Modelo de las piezas poliméricas para inyección molde.

Anexo C: Herramientas para la Fabricación de Matrices de dispositivo polimérico

En este anexo se presentan los diseños y modelos en 3D de varias piezas (figura C.1) que conforman el proceso de corte para la fabricación de estructuras de PDMS con 80 compartimientos y 40 microcanales.

La función de las herramientas (figura C.2) consisten en:

- En el proceso de colado, se deposita el material elastomérico (PDMS) para ser curado sobre un soporte que contiene al máster de vidrio y pistas de SU-8 (figura C.2 Pieza 1).
- Una vez curado el PDMS, se coloca un marco (figura C.2 Pieza 2) que sirve de referencia para cortar los bordes del PDMS. Una vez cortados los bordes, se quita el marco.
- Posteriormente se coloca un segundo marco más grueso (figura B.2 Pieza 3) que servirá de apoyo para cortar un segundo borde de la pieza polimérica; esto se hace con la intención de eliminar los meniscos formados en los extremos, durante el proceso de curado.
- Después que la pieza polimérica ha sido cortada por los bordes, se procede a extraer la pieza polimérica por medio de succión (figura C.2 Pieza 4 y Pieza 5).
- Se coloca la pieza 7 sobre la pieza polimérica (figura C.2 Pieza 7) y se utiliza como guía para descender los *punchers* (tubos afilados) contenidos por la Pieza 6 (figura C.2 Pieza 6), para perforar la pieza polimérica y crear los compartimientos. Cada par de compartimientos se encuentra a una distancia de 1mm de separación entre sí y están unidos por un microcanal.
- En caso de que se quieran realizar cortes sobre la pieza polimérica para crear pequeños bloques con dos pozos (compartimientos) y un microcanal, se pueden utilizar las piezas 7 y 8 (figura C.2 Pieza 7 y Pieza 8) para cortes longitudinales y transversales, respectivamente.
- Para facilitar la separación de los *punchers* del material elastómero, se utiliza como apoya la pieza 7 (figura C.2 Pieza 7).



Figura C.1 Modelos de las herramientas. Aquí se presentan el diseño en 3D de las piezas de aluminio para el cortado de las piezas poliméricas.

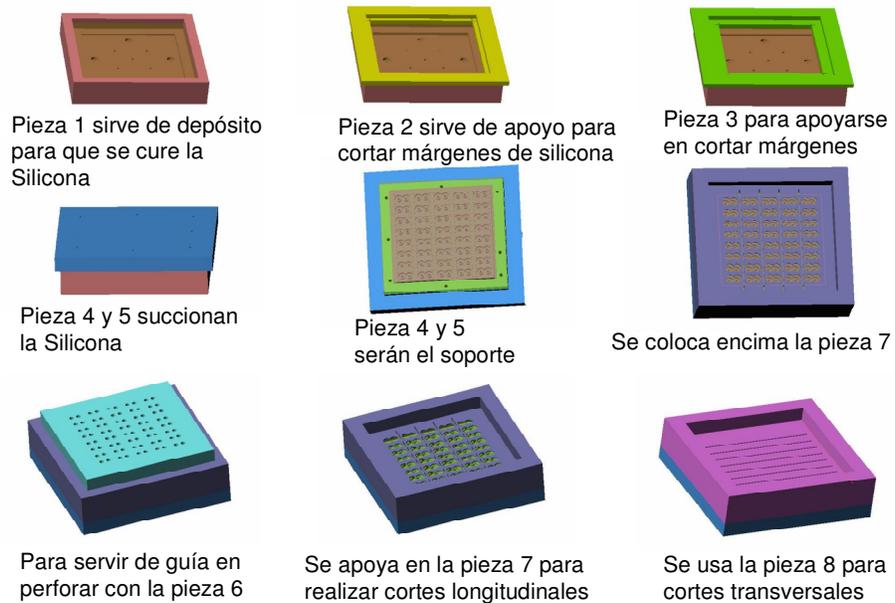


Figura C.2 Procedimiento de uso de las herramientas. Esta imagen explica la forma en que son utilizadas las piezas de aluminio como herramientas para el corte de las piezas poliméricas.

Anexo D: Microfabricación a Base de Fotorresinas

Anexo D-1 Fotorresina AZ 9260

Protocolo para la creación de un máster constituido por un sustrato de acero recubierto por fotorresina AZ con trincheras (10 mm de largo por 20 μm de ancho por 5 μm de espesor):

- Se limpia el sustrato de acero con acetona, alcohol y una toalla de sala blanca.
- Se pone la muestra sobre la máquina del “*spinner*”, se añade la fotorresina (AZ 92615) sobre el sustrato y se configura la máquina de acuerdo a los valores de la tabla D-1, para obtener alrededor de 5 μm de espesor.
- Se deposita el sustrato en el *hot-plate* por 2,5 min a 95 °C.
- Se coloca el sustrato y la máscara (figura 3.1) en la máquina de fotolitografía por solo un ciclo, con la configuración de “*soft-contact*”, por un tiempo de exposición de 20 s.
- Se utiliza el revelador “AZ726WF *developer*” de 3 min a 4 min para remover la parte de la fotorresina que fue expuesta.
- Se limpia con agua los residuos.

Anexo D-2 Fotorresina SPR220

Protocolo para la creación de un máster constituido por un sustrato de acero o níquel, recubierto por fotorresina 220-7.0 con trincheras de valores de 10 mm de largo por 20 μm de ancho por 5 μm de espesor:

- Se limpia el sustrato con acetona, alcohol, agua y una toalla de sala blanca.
- Se deposita en el horno por un tiempo mínimo 30 min a una temperatura de 180 °C, con el fin de eliminar la humedad del sustrato.
- Se utiliza Hexametildisiloxano (HMDS) sobre el sustrato como promotor de adherencia entre la fotorresina y el sustrato.
- Se coloca el sustrato en el “*spinner*” usando los parámetros que aparecen en la tabla D-2.

Tabla D-1

Tiempo	Velocidad
5 s	500 RPM
40 s	4000 RPM

Tabla D-2

Tiempo	Velocidad
10 s	500 RPM
40 s	3000 RPM

- Se deposita la fotorresina SPR sobre el sustrato y se repite nuevamente el ciclo de la tabla 2 en el “*spinner*”.
- Se coloca el sustrato en el horno por 15 min a una temperatura de 150 °C.
- Se pone el sustrato en la máquina de fotolitografía para una exposición de 90 s. La fotorresina SPR220-7.0 es positiva (todo lo que se expone se elimina), por lo cual se emplea la máscara de la figura 3.1.
- Se deja reposar dentro de una placa de Petri por 45 min.
- Se sumerge dentro de dos recipientes con el revelador “MF-24^a” para eliminar la parte de la fotorresina expuesta: un minuto en un recipiente y otro minuto en el otro recipiente.
- Los residuos se limpian con agua.

Anexo D-3 Fotorresina SU-8

Los trabajos que se realizan con la fotorresina SU-8 se basan en los protocolos de la compañía MICRO-CHEM. Por lo general para este tipo de proceso se utilizan sustratos (de silicio) con espesor de 1 mm, los cuales tienen la facilidad de conducir el calor:

- Se limpia el sustrato utilizando agua ionizada y una toalla especial de sala blanca (o pañuelo que no deje residuos).
- Se sitúa el sustrato en el horno a 80 °C por media hora para eliminar la humedad del objeto.
- Se deposita el sustrato de vidrio sobre el “*spinner*”. Después se coloca sobre la superficie de dicho sustrato la fotorresina SU-8 2005. Luego se procede a activar la máquina “*spinner*” a 3000 RPM por 30 s.
- Se coloca el sustrato en el *hot-plate* por 2 min a 95 °C.
- Se procede a posicionar el sustrato en la máquina de fotolitografía, con la máscara que se muestra en la figura 3.1, realizando una exposición por 99 s con una energía de $80 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$.
- Se coloca el sustrato en el *hot-plate* a la temperatura de 115 °C. En este caso en particular, manejamos una temperatura de 20 °C arriba de lo que el fabricante

indica, para compensar las propiedades no conductoras y el espesor de 3 mm del sustrato (vidrio).

- El material se revela sumergiéndolo completamente en un contenedor con revelador de SU-8, por un tiempo estimado de 2 a 3 min.
- Se lavan los residuos con isopropanol y se seca el sustrato con una pistola de nitrógeno.

Anexo D-4 PDMS

El protocolo para la preparación de silicona PDMS para generar un volumen de 10 cm por 10 cm por 7 mm:

- En un recipiente se vierten 100 g de agente base.
- Se añaden 10 g de agente curante.
- Se mezcla bien el agente base con el agente curante durante 5 min.
- Se colocan al vacío (etapa de desgasado) por al menos media hora para la eliminación de burbujas de aire.
- Se vierte el contenido en el máster.
- Se pone en el horno a una temperatura de 80 °C por 1 hora.
- Se quita del horno y se espera a que se enfríe por media hora.
- Se procede a retirar la matriz de PDMS curada. La pieza polimérica tendrá la copia negativa (forma invertida de la microestructura).
- Se realizan los cortes necesarios a la pieza elastómera para que tenga la forma y las perforaciones como en la figura 3.3 (D).

Anexo E: Protocolos para Cultivos Neuronales

Anexo E-1 Disección

El proceso de disección de embriones de ratón se realiza con ayuda de un técnico en biología. Mediante papaína (13 unidades por mililitro) y con ligeras agitaciones al medio, neuronas del hipocampo de ratón son obtenidas de la disección de ratones embrionarios con 18 días de gestación, para ser depositadas dentro de los pozos de los dispositivos, con una densidad cercana a las 50 mil células por pozo (28,27 mm²).

Anexo E-2 Protocolo para el criopreservamiento

Las neuronas que se extraen de una disección y no son sembradas en los cultivos neuronales, son criopreservadas para ser utilizadas para experimentos posteriores.

Cuando se requiere el uso de estas células criopreservadas, el protocolo para descongelarlas es el siguiente:

- Se esterilizan todos los dispositivos para contener a las células, con rayos UV de 15 a 20 min.
- Se transporta el vial con las células del contenedor de nitrógeno líquido a la sala de cultivo.
- Se coloca el vial en baño María por 2,5 min a 37 °C.
- Dentro de condiciones estériles se abre el vial y se extrae solo el crioprotector y se agrega 1 ml de neurobasal dentro del vial, se vacía el contenido en otro tubo con 2 ml de neurobasal extra.
- Con un pipeteador se agita varias veces el contenido (succionando y expulsando) para disgregar a las células.
- El índice de mortalidad con estas células es del 50%.

Anexo E-3 Recubrimiento de poli-L-lisina sobre placas

La poli-l-lisina es clave para poder sembrar los cultivos disgregados, en caso de que no se emplee este tipo de sustancia, las neuronas tienden a agregarse entre ellas mismas, formando grupos grandes, lo cual da como resultado que un 15% de los cultivos sean útiles para realizar registros; en cambio, cuando se utiliza poli-l-lisina el éxito supera al 50%.

Procedimiento:

- Se coloca el material dentro de la cabina de flujo y se esteriliza con UV por 20 min.

- Se toma poli-L-lisina con una pipeta y se deposita en la superficie de la placa de Petri.
- Se llena, aparte, una placa de Petri de 35 mm con agua estéril (1 ó 2 ml) y se coloca junto a las demás placas, esta servirá para mantener condiciones de humedad.
- Se guardan las placas dentro de la nevera por 24 horas.
- Después de 24 horas se toma de la nevera las placas con la poli-L-lisina.
- Se desecha la poli-L-lisina que se depositó en las cajas de Petri el día anterior.
- Mediante pipeteo y agua estéril, se lavan las cajas de Petri.
- Por 30 min se dejan secar las cajas de Petri con la tapa desplazada, dentro de la cabina de flujo para que el resto del agua estéril se evapore.
- Las cajas de Petri se guardan dentro de otras cajas de Petri (más grandes), para facilitar el transporte de los cultivos y ayudar a conservar las condiciones de esterilidad.

Nota: Cuando se utiliza un dispositivo polimérico de un par de pozos, éste se deposita dentro de una placa de Petri de 35 mm; si es de 6 pares de pozos, éste se deposita dentro de una placa de Petri de 60 mm; y si es de 40 pares de pozos, éste se deposita sobre una placa de PS de 100 cm², debido a que esta última es hidrofóbica, es necesario realizar un tratamiento con “*plasma cleaner*” o con “*UV Tip Cleaner*” para convertirla en hidrofílica (sólo entonces, pueden ser tratadas con poli-L-lisina).

Anexo E-4 Protocolo para el medio extracelular con Neurobasal

El medio extracelular que se utiliza para alimentar a las neuronas y ayudarlas en su desarrollo y crecimiento, está elaborado por una combinación de neurobasal con un suplementado del 5 % de *Horse Serum* de caballo, 2 % de suplemento B27, 2 mM de L-glutamina y 20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ de gentamicina.