



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**Microposicionador para registro
extracelular neuronal in vivo**

TESIS

Que para obtener el título de
Ingeniero Mecatrónico

P R E S E N T A

Leopoldo Emmanuel Polo Castillo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Xavier Sotres Bayón



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016

Agradecimientos.

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Alberto Caballero Ruiz del Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva, Digitalización 3D y Tomografía Computarizada. Este proyecto fue sustentado por los proyectos CONACT-LAB-2014-01-232719, CONACyT-INFR-2014-02-2305199 y UNAM-PAPIME PE103214.

Se agradece al grupo de Ingeniería de Precisión y Metrología por facilitar sus instalaciones, especialmente al M. en I. Sergio Padilla Olvera.

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Francisco Sotres Bayón y con el apoyo técnico de la Dra. Leticia Ramírez Lugo en el laboratorio AL 303 de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

La presente tesis constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo No. 176639 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por los donativos No. IA200313 y No. IA200715 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM).

Agradecimientos.

En esta etapa de mi vida hago una pausa necesaria, con una mirada retrospectiva a todo mi caminar.

He de dar gracias primera y primordialmente, a la Fuerza Superior que ha estado y sido en mí, aquella quien no posee artículo ni definición, aquella más allá de la ciencia, y que sobrepasa las mayores abstracciones de la mente humana ante su visión tan acotada.

Agradezco a esa esencia, que de lo más complejo, se comprende con la mayor simplicidad, al interiorizar.

Este es el origen del cual derivan la serie de situaciones y personas, a las cuales también agradezco y dedico el presente trabajo.

A mis padres Angela y Leopoldo, por el esfuerzo y amor dedicado en mi formación. Especialmente, gracias a mi madre por haberme inducido en la espiritualidad, y a mi padre, por mostrarme que los éxitos se alcanzan a través de los sueños y el trabajo en conjunto. De ambos estoy sumamente orgulloso.

A mi hermana Angélica, que con su personalidad opuesta a la mía me ha enseñado a valorar más la vida. Por compartir momentos de juego y ahora en la adultez, de comunicación.

A mi abuela Carmen, ya no presente en este mundo, pero a quien debo una casa desde pequeño.

A mi tía Martha P. K., por compartirme de su riqueza personal y mostrarme que a pesar de la distancia, tiempo y situaciones adversas, el amor incondicional puede resanar y unir.

A Priscila, la mujer amada que me ha demostrado cómo es posible salir de los abismos y renovarse como el ave fénix. Quien me ha acompañado en momentos tristes y alegres con una pasión extraordinaria.

Al P. José Antonio, por sus grandes enseñanzas, por su carácter y su por su debilidad. Quien me ayudó a impulsarme en la espiritualidad y a tomar decisiones en mi vida.

A la gente de las comunidades indígenas Atencuapa, Chichiltepec, Machetla y la Sierra de Oaxaca, en las que he tenido el gran privilegio de compartir momentos, y que desde su sencillez, me han enseñado la riqueza interior.

A la Fundación Mexicana de Sanación Pránica y amigos, por colaborar en expandir mi panorama más allá de lo tradicional.

A mis instructores de artes marciales José M. y Fidel, por enseñarme de la belleza, la elegancia, la contundencia, la firmeza y la disciplina en el arte marcial, también presentes en la vida.

A la pascua juvenil, por compartir momentos tan importantes, por las risas y las enseñanzas de cada uno de ellos.

A cada persona, que de manera directa o indirecta ha sido parte de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ingeniería y a todos mis profesores que han sido parte de mi formación académica. Especialmente, a profesores como la Dra. Sara Ríos Dordelly, una de las escasas personas en la academia con una visión que sale de la "linealidad" tan mecanizada.

Por supuesto, a mi director Alberto Caballero Ruíz y a mi co-director Francisco Sotres Bayón, por encaminarme y permitirme desarrollarme como profesional. Así como a todos los integrantes del MADiT y del laboratorio del IFC, lugares en que se ha llevado a cabo este proyecto. Además a cada uno de mis sinodales por sus aportes brindados.

Finalmente, a todos aquellos familiares, compañeros, amigos, instructores, y profesores que no menciono, y que sin embargo, también son parte fundamental en mi vida.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS.	I
ÍNDICE DE FIGURAS	I
GLOSARIO	III
<i>Términos de ingeniería.</i>	<i>iii</i>
<i>Términos de neurociencias.</i>	<i>vi</i>
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 <i>Electrofisiología.</i>	3
1.1.1 Neuroelectrofisiología y potencial de acción.	4
1.1.1.1 Registro extracelular neuronal de una unidad (<i>Single-unit extracellular recording</i>).....	5
1.1.1.2 Electroodos.	6
1.1.1.3 Sistemas de microposicionamiento en el registro extracelular:.....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
2.1 <i>Presentación de la problemática.</i>	21
2.2 <i>Hipótesis.</i>	22
2.3 <i>Objetivo.</i>	22
2.4 <i>Alcances.</i>	22
2.5 <i>Justificación.</i>	23
3. MARCO TEÓRICO	24
3.1 <i>Impedancia en electrodos.</i>	24
3.2 <i>Implantación de microdrives.</i>	26
4. DESARROLLO DEL SISTEMA	28
4.1 <i>Requerimientos y especificaciones.</i>	29
4.2 <i>Sistema de microposicionamiento</i>	30
4.2.1 Diseño del microposicionador.	31
4.2.1.1 Diseño de la base.....	31
4.2.1.2 Diseño del mecanismo.	32
4.2.1.3 Diseño del cuerpo del microposicionador (carcasa).....	34
4.2.1.4 Diseño de la protección de electrodos (cubierta).	35
4.2.2 Manufactura.....	37
4.2.2.1 Procesos de manufactura en el sistema.	37
4.2.2.2 Ajustes y tolerancias en el diseño.	38
4.2.3 Ensamble.	40
4.3 <i>Arreglo de electrodos.</i>	41
4.4 <i>Proceso para ajuste de impedancias</i>	44
(<i>Gold-plating electrode tip</i>).	44

5. PRUEBAS Y RESULTADOS	47
5.1 <i>Mediciones físicas.....</i>	47
5.2 <i>Evaluación de desvíos en la trayectoria y resolución de avance.....</i>	48
5.3 <i>Test y ajuste de impedancias.....</i>	50
5.4 <i>Prueba de implantación.....</i>	52
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES	56
8. TRABAJO A FUTURO	57
ANEXOS.....	58
A.1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE POSICIÓN DE LAS TOLERANCIAS (DESVIACIONES FUNDAMENTALES).	58
A.2. AJUSTES PREFERENTES.....	59
A.3. VALORES NUMÉRICOS DE LOS GRADOS DE TOLERANCIA NORMALIZADOS IT PARA MEDIDAS NOMINALES	60
REFERENCIAS.....	61

Índice de Tablas.

Tabla 1. Características de las piezas del microposicionador.	38
Tabla 2. Comparación de los parámetros físicos especificados contra los parámetros obtenidos. .	47
Tabla 3. Avance de la cánula por cada rotación de tornillo.	48

Índice de Figuras.

Figura 1. Sistemas invasivos y no invasivos en la medición de actividad neuronal	1
Figura 2. Fases del potencial de acción.....	4
Figura 3. El registro extracelular	5
Figura 4. Configuraciones de la punta de los electrodos usada en Nicolelis Lab.....	8
Figura 5. Arreglos de electrodos	9
Figura 6. Punta de tetrodo Thomas Recording	10
Figura 7. Principio del tetrodo. Ilustración sobre las investigaciones de Thomas Recording.....	10
Figura 8. Configuraciones estándar de neural probes	11
Figura 9. Estructura básica de un Neural Probe.....	11
Figura 10. Microdrive basado en mecanismo tornillo-tuerca (1979)	12
Figura 11. Diseño de microdrive de tres cilindros concéntricos (1979).....	13
Figura 12. Primer microdrive con 14 tetrodos independientes y sistema de sensado (1996)	13
Figura 13. Modelo Scribe. Mecanismo de tornillo y elemento de transmisión (1999)	14
Figura 14. Primer microdrive motorizado	14
Figura 15. Microdrives de canales múltiples.....	15
Figura 16. Microdrive basado en motor a pasos (CCADET 2009)	16
Figura 17. Microdrive accionado por energía hidráulica (2007).	17
Figura 18. Microdrive motorizado basado en el principio piezoeléctrico y sensor de efecto Hall... ..	18
Figura 19. Modelos inalámbricos de microdrives	19
Figura 20. Configuración de un sistema de microposicionamiento para registro neuronal retroalimentado	21
Figura 21. Principio básico del proceso de electrólisis.....	25
Figura 22. Tetrodos. A. Antes de electroplating. B. Después de electroplating	25
Figura 23. Estereotáxico utilizado en el IFC UNAM.....	26
Figura 24. Cráneo de una rata Wistar. A. Vista dorsal. B. Sección sagital.....	27

Figura 25. Principales elementos del microdrive a desarrollar.....	28
Figura 26. Zona para el registro extracelular.	29
Figura 27. Microdrive motorizado realizado en el CCADET	30
Figura 28. Base del microdrive.....	32
Figura 29. Componentes del mecanismo de microposicionamiento.....	32
Figura 30. Diseño de la tuerca.....	33
Figura 31. Especificaciones del conector Mill Max, unidades en [mm]	34
Figura 32. Modelo final del cuerpo	35
Figura 33. Diseño de la cubierta.....	35
Figura 34. Vista explosiva del diseño final.	36
Figura 35. Máquina CNC Suzhou Baoma.....	37
Figura 36. Medición de piezas fabricadas con el proyector de perfiles NIKON Profile Projector V-16D (Laboratorio de Metrología CCADET).	39
Figura 37. Piezas manufacturadas.....	40
Figura 38. Proceso de ensamble y soldadura.....	41
Figura 39. Carrete de alambre de acero inoxidable, AM Systems	42
Figura 40. Electrodo después de haber sido enderezado.....	42
Figura 41. Colocación de los electrodos.....	42
Figura 42. Proceso de soldadura entre conector Mill Max y electrodos	43
Figura 43. Ensamble final con los 16 electrodos.....	43
Figura 44. Dispositivos del sistema de reducción de impedancias	44
Figura 45. Montaje del proceso gold-plating electrode tip.	45
Figura 46. Ambiente de control del NanoZ en modo probador de impedancias (Test Impedances)45	
Figura 47. Ambiente de control del NanoZ en modo DC Electroplate.....	46
Figura 48. Orientación de la cánula proyectada en el proyector de perfiles NIKON	48
Figura 49. Gráficas de dispersión de la posición teórica contra la posición real	49
Figura 50. Tablas de las impedancias antes de electroplating para distintas frecuencias.....	50
Figura 51. Gráfica de Impedancia vs Frecuencia.....	51
Figura 52. Tablas de las impedancias después de electroplating para distintas frecuencias.....	51
Figura 53. Rata en proceso de cirugía, Instituto de Fisiología Celular.	52
Figura 54. Implantación del microposicionador.....	53

GLOSARIO

Términos de ingeniería.

Actuador. Elemento que realiza trabajo o movimiento dentro de un sistema o proceso.

Agujero. Término utilizado por acuerdo para designar todo elemento interior de una pieza incluso no cilíndrica. Es el elemento que contiene a un eje.

Ajuste. Relación mecánica que existe entre dos piezas de la misma dimensión nominal pertenecientes a un ensamble.

Amplificador. En el acondicionamiento de señales, elemento que se encarga de amplificar una señal eléctrica.

Buje. Cojinete o revestimiento cilíndrico para un eje o pistón.

CAD (Computer Aided Design). Sistema que asiste en la creación, modificación y análisis de un diseño mecánico.

Centro de masa. Es el punto de un cuerpo en el que la masa es concentrada. Al aplicarse una fuerza en este punto, el objeto se moverá en la dirección de la acción sin efectos de rotación.

CNC (Control Numérico por Computadora). Forma de automatización programable, en la cual, mediante un programa que contiene un conjunto de instrucciones, se transforma una pieza de trabajo inicial en una pieza terminada.

Desviación inferior. Diferencia entre la medida mínima y la medida nominal de una pieza.

Desviación superior. Diferencia entre la medida máxima y la medida nominal de una pieza.

Dimensión nominal. Medida de una pieza definida por las especificaciones de un dibujo.

Dimensión real. Medida de una pieza obtenida por medición.

Diseño. Proceso innovador y altamente iterativo. La función de diseño desempeña el papel principal en definir la forma física del producto para que satisfaga mejor las necesidades del cliente. En este contexto, la función de diseño incluye crear el diseño de ingeniería

(mecánico, eléctrico, software, etc.) y el diseño industrial (estético, ergonómico, interfaces de usuarios).

Eje. Término utilizado por acuerdo para designar todo elemento exterior de una pieza incluso no cilíndrica. Es el elemento contenido por un agujero.

Electrólisis. Proceso químico por medio del cual una sustancia o un cuerpo inmersos en una disolución se descomponen por la acción de la una corriente eléctrica continua.

Ensamble mecánico. Método de sujeción para sostener juntas en forma mecánica dos o más piezas. Los métodos de sujeción se pueden dividir en dos clases principales, los que permiten desensamble y los que crean una unión permanente.

Filtro. Elemento que se encarga de atenuar ruido eléctrico bajo ciertos rangos de frecuencia.

Frecuencia. Velocidad de un evento repetitivo. Si T es el periodo de tal evento, entonces la frecuencia f es su recíproco ($1/T$), donde el periodo es un intervalo de tiempo expresado en segundos. La unidad de la frecuencia es el hertz (Hz).

Galvanómetro. Instrumento que sirve para determinar la intensidad y el sentido de una corriente eléctrica mediante la desviación que esta produce en una aguja magnética.

Impedancia. Oposición en un dispositivo o circuito eléctrico al flujo de corriente alterna (AC) a cierta frecuencia. Tiene dos componentes, resistencia R (dominio de los reales) y reactancia X (dominio de los imaginarios).

Manufactura. Derivada de las palabras latinas *manus* (mano) y *factus* (hacer). En el contexto moderno, la manufactura se puede definir de dos maneras, una tecnológica y otra económica. En el sentido tecnológico, es la aplicación de procesos físicos y químicos para alterar la geometría, propiedades o apariencia de un material de inicio dado para fabricar piezas o productos. En el sentido económico, es la transformación de materiales en artículos de mayor valor por medio de una o más operaciones.

Mecanismo. Conjunto de elementos, tales como eslabones y engranes capaces de transmitir movimiento a partir de una acción de entrada.

MEMS (Micro-Electro-Mechanical-Systems). Tecnología definida como elementos mecánicos y electro-mecánicos en miniatura, elaborados mediante técnicas de microfabricación.

Motor. Máquina que produce movimiento, comúnmente a través de corriente eléctrica o alguna otra fuente como la neumática o la hidráulica.

PCB (Printed Circuit Board). Tarjeta que soporta mecánicamente y conecta eléctricamente componentes electrónicos mediante pistas conductoras.

Perno. Sujetador con rosca externa que se inserta a través de orificios en las piezas y se atornilla con una tuerca en el lado opuesto.

Piezo-eléctrico. Fenómeno en el que se genera un movimiento al producirse un campo eléctrico.

Pistón. Elemento cilíndrico capaz de desplazarse longitudinalmente a través de un revestimiento.

Reactancia. Combinación de capacitancia e inductancia, la cual se opone al flujo de corriente alterna de manera dependiente a la frecuencia.

Resistencia eléctrica. La resistencia por sí misma es la oposición al flujo de corriente directa (DC) y en términos de impedancia, es la oposición al flujo de corriente alterna sin depender de la frecuencia.

Resorte. Elemento mecánico capaz de almacenar y liberar energía.

Sensor. Elemento que provee información sobre el estado de un sistema.

Señal. Una variable o cantidad física que provee información sobre el estado de un sistema.

Señal analógica. También conocida como señal continua. Definidas para cualquier valor del dominio de los números reales, tomando valores en un intervalo continuo. Son las que se presentan en el mundo real.

Señal digital. Señal discreta representada digitalmente. Es definida sólo para ciertos puntos del dominio de los reales.

Sistema retroalimentado

SNR (Signal-to-noise ratio). Relación entre la intensidad de una señal y el ruido, medida en decibeles (dB).

Tolerancia. Variación máxima que puede tener la medida real de una pieza; es decir, la diferencia entre las dimensiones reales límite (máxima y mínima).

Tornillo. Sujetador con rosca externa que, por lo general, se ensambla en un orificio roscado ciego.

Tuerca. Sujetador con rosca interna que coincide con la del perno del mismo diámetro, paso y forma de rosca.

Términos de neurociencias.

Amígdala cerebral. Conjunto de núcleos neuronales situados en la cara interna de los lóbulos temporales del cerebro. La amígdala forma parte del sistema límbico y su función principal es participar en la activación y gestión de las emociones.

Astroцитos. Células nerviosas de forma estrellada presente en el cerebro.

Biocompatibilidad. Condición de ser compatible con un tejido o un sistema vivo. No es perjudicial ni causa rechazo inmunológico.

Bregma. Punto en el cerebro donde la sutura coronal se interseca perpendicularmente con la sutura sagital.

Cánula. Elemento cilíndrico hueco que contiene un conjunto de electrodos.

Célula. Unidad fundamental de los organismos vivos, generalmente de tamaño microscópico, capaz de reproducción independiente y formada por un citoplasma y un núcleo rodeados por una membrana.

Electrodo. En aplicaciones de electrofisiología, alambre conductor con diámetros en el orden de micrómetros, cuyo propósito es registrar la actividad eléctrica en el cerebro.

Electrofisiología. Ciencia que estudia los fenómenos eléctricos en los animales y en el hombre.

Estereotáxico. Sistema coordinado XYZ utilizado para ubicar puntos de interés en las cirugías llevadas a cabo en neurociencias.

Extracelular. Que está ubicado o que ocurre fuera de la célula.

Fisiología. Ciencia que tiene por objeto el estudio de las funciones de los seres orgánicos.

Gliosis. Proliferación de astroцитos en regiones lesionadas del sistema nervioso central (SNC) y que por lo general deja como saldo la formación de una cicatriz glial.

In vivo. (Latín: dentro de lo vivo). En ciencia, se refiere a las experimentaciones realizadas dentro del tejido vivo de un organismo.

Intracelular. Que está ubicado o que ocurre dentro de la célula.

Microdrive. Sistema de microposicionamiento de electrodos aplicado en electrofisiología.

Neurociencia. Ciencia que se ocupa del sistema nervioso o de cada uno de sus diversos aspectos y funciones especializadas.

Neuropatología. Disciplina que estudia las enfermedades propias del sistema nervioso.

Órgano. Conjunto de tejidos que forman una unidad estructural encargada del cumplimiento de una función determinada en el seno de un organismo pluricelular.

Potencial de acción. Señal bioeléctrica conocida también como espiga, que ocurre debido a cambios en el potencial eléctrico de membrana.

Potencial de membrana. Cambios registrados en la membrana de una célula debidos a las cargas contrarias en el líquido extracelular y el líquido intracelular.

Spike sorting. En español, clasificación de espigas. Algoritmos aplicados para mejorar el rendimiento de la adquisición de actividad neuronal.

Stereotrodes. Electrodo formado por dos alambres roscados o núcleos conductores aislados por materiales como vidrio de cuarzo.

Tejido. Estructuras constituidas por un conjunto organizado de células.

Tetrodes. En español, tetrodos. Electrodo formado por cuatro alambres roscados o núcleos conductores aislados por materiales como vidrio de cuarzo.

RESUMEN.

El registro extracelular *in vivo* en animales en libre movimiento es una herramienta fundamental para la neurociencia, pues permite correlacionar la actividad eléctrica neuronal con diferentes conductas. Esta herramienta se ha usado tradicionalmente en neurociencia para entender cómo se representan procesos sensoriales, percepción, memoria y hasta toma de decisiones. Para llevar a cabo esta tarea, es necesario utilizar dispositivos de microposicionamiento (o *microdrives* en inglés) que se requieren para desplazar electrodos (alambres de diámetro pequeño) en el tejido cerebral hasta regiones de interés y lograr cercana proximidad con las neuronas.

Se han desarrollado una gran variedad *microdrives* en los últimos años, incluyéndose sistemas de control en lazo cerrado, así como inalámbricos. Sin embargo, el desarrollo de *microdrives* continúa siendo un reto debido a que se requiere de manera conjunta, dimensiones pequeñas, pesos ligeros, bajo costo, estabilidad en el registro, que su construcción sea de fácil ensamble y que los movimientos sean de alta resolución.

En México, existen varios grupos de investigación que requieren del uso de estos *microdrives*. Aquí se presenta el diseño de un *microdrive* con las características necesarias para cumplir con esta demanda.

El presente trabajo consiste en el desarrollo de un *microdrive*, en el cual se hace uso de electrodos de baja impedancia, utilizando un conector de 16 canales. Las piezas son fabricadas mediante manufactura convencional y manufactura aditiva. El diseño propuesto contempla geometrías y requerimientos para una futura integración de un micromotor piezo eléctrico ultrasónico y un sensor de posición.

ABSTRACT

Extracellular single unit recording in freely behaving animals is an essential tool for neuroscience, which enables us to obtain correlations between electrical activity and different conducts. To understand the representation of sensory processes, memory and decision making, this tool has been fairly used in neuroscience. In order to carry out this task, micropositioning systems able to move electrodes (micro wires) into the brain tissue, called microdrives, are widely needed. In this way, it is possible to approach a neuron in a desired area.

In recent years, a large number of microdrives has been developed, including closed loop and wireless systems. However, as a result of the specific requirements, such as small size, small weight, low cost, recording stability, easy assembly and high resolution in motion, development of microdrives are a remaining challenge.

In Mexico, these systems are required by many research groups. Therefore, in order to deliver on the mentioned demands, the design of a micropositioning system is presented.

This work consists in the development of a low impedance 16-channel microdrive, and in order to record neural signals, stainless steel wires are used. By means of conventional and additive manufacture techniques, the pieces of the assembly are fabricated.

INTRODUCCIÓN

Gran parte de lo que actualmente se conoce sobre el cerebro, es gracias a la implementación de distintas técnicas de adquisición de actividad neuronal, dividiéndose en dos ramas, los sistemas invasivos y los sistemas no invasivos. En los primeros, se establece contacto con el tejido cerebral para registrar actividad en la célula, mediante la medición de los cambios en el potencial de membrana; mientras tanto, los sistemas no invasivos miden actividad de manera indirecta (sin contacto con el tejido cerebral), a través del registro de señales relacionadas por ejemplo, con el campo magnético, flujo sanguíneo, oxigenación de la sangre y algunos tipos de tomografías. Cada método tiene sus ventajas y desventajas; para el caso de los métodos no invasivos, la resolución es insuficiente para el estudio de procesos cerebrales más complejos [1], pero por otra parte, a diferencia de los sistemas invasivos, se puede obtener información de actividad de poblaciones de neuronas más grandes; sin embargo, con los sistemas invasivos se obtienen mejores resoluciones espaciales y temporales al mismo tiempo [2]. De esta manera, el utilizar ambas técnicas en complemento, brinda una favorable fuente de información [3]. En la Figura 1 se ilustra la implementación de sistemas invasivos y no invasivos de izquierda a derecha, respectivamente.

Existen aplicaciones en diversos campos sobre la adquisición de actividad neuronal, por lo cual es de gran interés la mejora continua tanto de los sistemas invasivos como de los no invasivos. En las aplicaciones, se incluye desde el estudio de respuestas emocionales, desórdenes de ansiedad y respuestas conductuales [4] , [5] estudio de modelos de enfermedades neurodegenerativas [6], desarrollo de neuroprótesis visuales y cocleares [7], y hasta interfaz cerebro computadora [8]-[9].

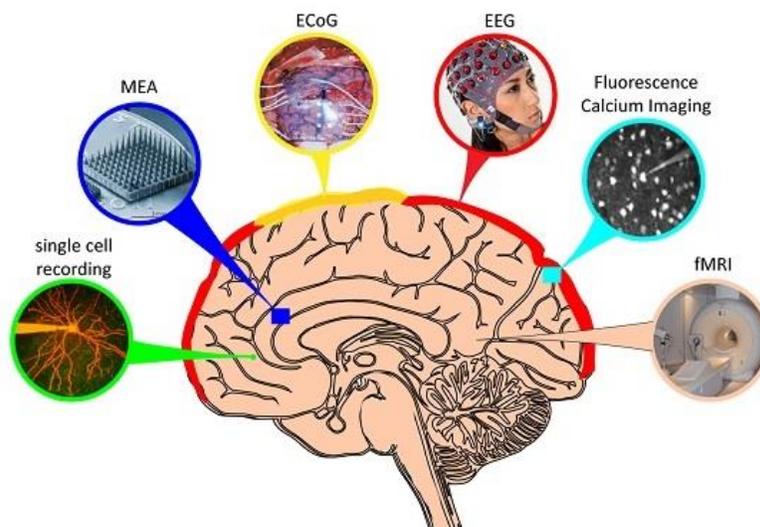


Figura 1. Sistemas invasivos (Single-Unit Recording, MEA, ECoG) y no invasivos (EEG, Fluorescence Calcium Imaging, fMRI) en la medición de actividad neuronal [11].

El presente trabajo consiste en la implementación de un dispositivo invasivo para investigación en electrofisiología, por medio de la cual se obtendrán señales eléctricas neuronales de manera extracelular. Ante la necesidad de experimentar con animales en libre movimiento, es que se trabajará con registro extracelular neuronal de una unidad (single-unit extracellular recording), ya que si se utilizara el método intracelular, los resultados de las experimentaciones no serían favorables. Para comprender más acerca de las técnicas de registro extracelular e intracelular, en el apartado de Antecedentes se describe el proceso cronológico de la electrofisiología como ciencia, hasta llegar a los métodos utilizados en la actualidad.

La aplicación se llevará a cabo mediante un sistema de microposicionamiento de electrodos, por lo cual, se realiza una investigación sobre dichos sistemas, donde se analizan los distintos mecanismos y actuadores que han sido desarrollados desde sus comienzos hasta la actualidad, aunándose con la teoría de los electrodos.

Posteriormente, en la sección II, se describe el planteamiento del problema, cuyas necesidades son recabadas de la literatura, así como de las investigaciones realizadas por instituciones de investigación en neurociencias. Se muestran los objetivos y alcances del trabajo, los cuales están limitados a resolver una parte de la problemática, puesto que los *microdrives* se conforman por distintos subsistemas que requieren especial investigación y desarrollo.

El marco teórico se presenta en la sección III, en el cual, para entender más acerca del desarrollo de un producto, se da una introducción a los procesos y sistemas de manufactura, relacionándolos con los ajustes y tolerancias de la Norma Internacional ISO 286. Por otra parte, se habla acerca de la impedancia en los electrodos, puesto que es de particular importancia para el desarrollo de este trabajo, ya que es un parámetro que se debe ajustar con el fin de capturar señales más definidas, para lo cual se ejecuta un proceso de electrólisis basado en protocolos ya implementados (*gold-plating electrode tips*).

La sección IV es destinada para el desarrollo del sistema, donde también son planteados los requerimientos y especificaciones.

Las pruebas y resultados se presentan en la sección V, apartado en el que se evalúan las características físicas del diseño, desplazamiento, test y ajuste de impedancias y las pruebas de implantación.

La discusión y las conclusiones se ubican en las secciones VI y VII, respectivamente, mientras que el trabajo a futuro le procede en la sección VIII.

ANTECEDENTES

1.1 Electrofisiología.

La electrofisiología es el campo que se encarga del estudio de la actividad eléctrica en el cuerpo, ya sea en células, tejidos u órganos, cuyos comienzos parten con los trabajos realizados por el fisiólogo y físico Luigi Galvani en el siglo XVIII, sobre la estimulación eléctrica en los músculos de ranas. Posteriormente, Giovanni Aldini, continúa estas investigaciones en 1803, empleando los principios de la electricidad bimetálica del físico Alessandro Volta. Carlo Matteucci y Emil Du Bois-Reymond, describen el fenómeno llamado “variación negativa”, cuando en un galvanómetro notan un inesperado decremento de la intensidad de corriente durante la contracción de un músculo [12]. El estudio de la electrofisiología del sistema nervioso, comenzó cuando Julius Bernstein propuso su teoría sobre el impulso nervioso como una onda con negatividad. Más adelante, utilizando un galvanómetro con electrodos en distintos puntos de la superficie externa del cerebro y otro en la superficie del cráneo, Richard Caton pudo registrar una pequeña corriente en el cerebro. Posteriormente y por primera vez, Gustav Fritsch y Eduard Hitzig, introdujeron un electrodo en la duramadre del cerebro de un perro y estimularon su área motora, generando movimiento en el lado contralateral del cuerpo.

De esta manera, fue originándose la neuroelectrofisiología, abriendo las puertas a la posibilidad de estimular diferentes áreas del cerebro y registrar actividad eléctrica [13]. Las primeras investigaciones fueron desarrolladas utilizando rebanadas de cerebro, para posteriormente, emplear animales anestesiados, pero fue hasta después de 1950 que se empezó a trabajar con animales en estado consciente, donde Jasper, Ricci y Doane manifiestan uno de los trabajos pioneros como primer intento de correlacionar la actividad de las neuronas con un patrón particular de comportamiento, lo que representó eliminar las limitaciones en los primeros estudios [14]. Por su parte, el filósofo, ingeniero y neurocientífico John O’Keefe trabajó por más de 30 años en técnicas de *single-unit recording*, gracias a lo cual junto con May-Britt Moser y Edvard I. Moser, obtuvieron el premio Nobel en 2014 por sus investigaciones sobre como el cerebro recrea mapas y se establece un sentido espacial [15].

1.1.1 Neuroelectrofisiología y potencial de acción.

Las neuronas, así como el resto de las células, mantienen una diferencia de potencial eléctrico a través de su membrana, debido a la distribución de cargas entre ambos lados de la misma, carga positiva fuera de la célula (líquido extracelular) y carga negativa dentro de ésta (líquido intracelular), por lo tanto es posible obtener señales nerviosas por medio de elementos conductores, conocidos como electrodos. Tales señales se transmiten mediante potenciales de acción, también conocidos como espigas, que son cambios en diezmilésimas de segundo del potencial de membrana. El ancho de banda de este potencial de acción se encuentra típicamente en el rango de frecuencias mayores a 50[Hz], para frecuencias menores a 50[Hz], el potencial extracelular es llamado potencial de campo local (*Local Field Potential LFP*) [16].

Es posible registrar el potencial de membrana de manera directa con electrodos en el líquido intracelular gracias al desarrollo de electrodos de vidrio, pero en muchos casos basta con registrar extracelularmente, aproximándose lo más posible a la célula [2].

En la Figura 2, se puede apreciar el potencial de acción para un registro intracelular, el cual comienza con un cambio súbito desde el potencial de membrana negativo (aproximadamente -70 mili-volts) en reposo normal, hasta un potencial positivo (aproximadamente 30 mili-volts), terminando en un cambio casi igual de rápido de regreso al potencial negativo.

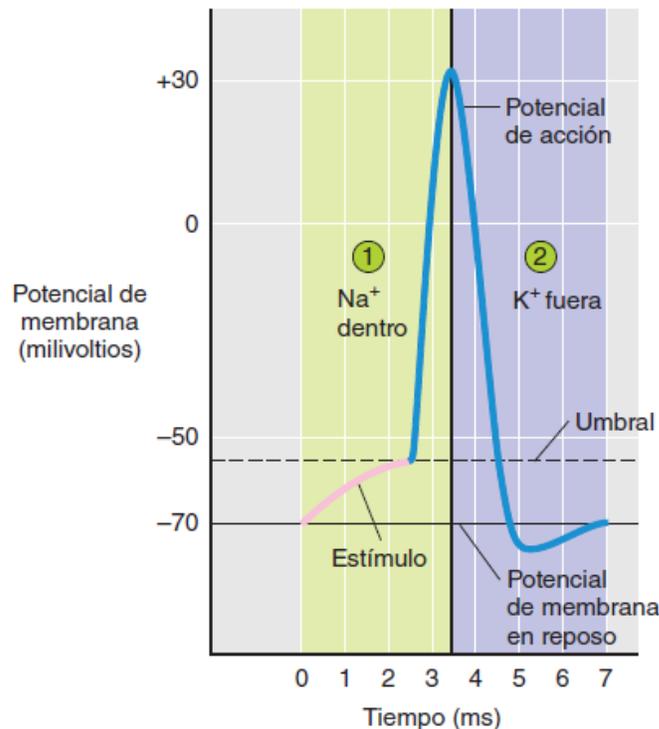


Figura 2. Fases del potencial de acción (registro intracelular) [17].

1.1.1.1 Registro extracelular neuronal de una unidad (*Single-unit extracellular recording*).

El registro intracelular, tiene la cualidad de reducir el número de animales de experimentación requeridos para brindar información con un alto grado de confiabilidad; sin embargo, cuando se trata de experimentar con animales en libre movimiento, esta herramienta queda descartada, ya que la información que ofrece es difícil de monitorear [14], afortunadamente, como ya fue mencionado, el registro extracelular también es capaz de brindar información útil.

El proceso llevado a cabo para el registro extracelular, consiste en la colocación de un electrodo cercanamente a una neurona, tomándose el cráneo como referencia eléctrica. Se observa que el sentido del potencial de acción en este tipo de registro, es inverso al del registro intracelular (ver Figura 3), debido a que la carga en el exterior es contraria a la carga interior. Las señales obtenidas por medio del electrodo, son convertidas digitalmente por un convertidor analógico-digital, para posteriormente ser procesadas, mediante etapas de filtrado y amplificación. Adicionalmente, por medio de algoritmos de separación de espigas (*spike sorting algorithm*), se puede mejorar el rendimiento de la adquisición de actividad neuronal.

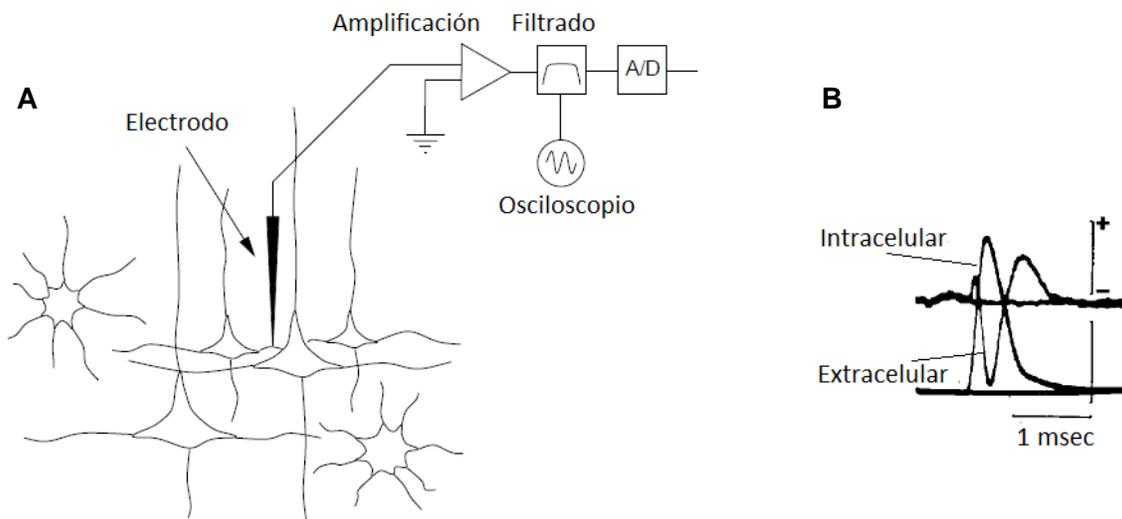


Figura 3. El registro extracelular. A. Proceso llevado a cabo en el registro extracelular [18]. B. Comparación del potencial de acción entre el registro extracelular y el registro intracelular [14].

Por otra parte, el registro extracelular, presenta dos vertientes para su implementación, el registro de una unidad (*single-unit recording*) y el registro de múltiples unidades (*multiple-unit recording*). El primer método, consiste en aproximarse un electrodo a una neurona y aislar una unidad, con lo cual, no se obtienen todas las cualidades de una neurona en particular, pero sí se revelan aspectos críticos que contribuyen en distintos comportamientos [14]. Obtener información de la actividad eléctrica de una sola neurona es un reto, debido a la gran cantidad de ruido inherente, así como por las características similares con los potenciales de acción de neuronas vecinas, con los que cotidianamente existen traslapes, es aquí que el *spike-sorting* toma importancia, el cual es capaz en muchos casos de mejorar considerablemente el aislamiento de una neurona y, en esta medida, la técnica *single-unit* aumenta su rendimiento [18]. Mientras tanto, cuando se trabaja con registro de múltiples unidades, se busca obtener información de varias neuronas en una región dada, por lo tanto, el procesamiento resulta más complicado y los resultados menos confiables, en este sentido es que el método más utilizado es *single-unit recording*; sin embargo, una deficiencia que presenta esta técnica, es que a pesar del uso de algoritmos para aislar una neurona, el tiempo en que se mantienen registros estables es corto.

Ante las ventajas que presenta esta clase de registro, se ha buscado la manera de contrarrestar sus deficiencias, es así que surgen los *microdrives*, con el objetivo de encontrar más neuronas al haberse perdido contacto con la que se había estado registrando, y de esta forma, también se podrá tener una mayor amplitud de la señal en medida que los electrodos se posicionen más cerca a alguna neurona. Para esto, también será importante considerar ciertos requerimientos de los electrodos, lo cual es abordado a continuación.

1.1.1.2 Electroodos.

Como se mencionó previamente, el electrodo, también conocido como *neural probe* o *microprobe*, es la herramienta mediante la cual se transmite la actividad eléctrica neuronal, consistiendo básicamente en un material conductor de mínimo diámetro. Hasta la actualidad, han sido utilizados una gran variedad de electrodos, sobresaliendo los electrodos de metal y más recientemente los electrodos basados en Micro Sistemas Electro Mecánicos (*Micro Electro Mechanical Systems, MEMS*), ya sean fabricados con silicio o con polímeros. Desde la década de 1950, los microelectrodos de metal han sido comúnmente utilizados para el registro de actividad eléctrica en la zona extracelular, mientras que durante la década de 1970 las técnicas de micro fabricación reportaron los primeros trabajos de *microprobes* basados en silicio; por otra parte, los *microprobes* de polímeros representan un gran campo de desarrollo actualmente, debido a que sus propiedades (biocompatibilidad, flexibilidad y resistencia mecánica) implicarán la obtención de mejores registros [19].

Antes de describir a detalle las características de cada tipo de electrodo, a continuación se presentan las necesidades fundamentales que deben cubrir estos elementos:

- Favorecer registros estables con alta relación señal a ruido.
- Buena selectividad de neuronas.
- Registrar cualquier tipo de neurona.

- Ser suficientemente resistente para penetrar en el tejido.
- Tener flexibilidad para disminuir los daños neuronales.
- Evitar la formación de astrocitos en la punta del electrodo.
- Los electrodos deben tener un rango de impedancia cerrado.

Cuando una señal tiene una alta relación de señal al ruido o SNR (*Signal to Noise ratio*), significa que tendrá consigo mayor cantidad de información útil que ruido, en cierta medida, ligado proporcionalmente con la estabilidad mecánica que mantenga el electrodo o conjunto de electrodos, pero de manera inversa con la impedancia, puesto que los electrodos con altas impedancias mantendrán ruido constante, por lo que los potenciales de las pequeñas neuronas serán más difíciles de detectar, a pesar de que la lectura sea favorecida por una mayor cercanía a la célula. Para que los registros sean más fiables, es importante que el rango de impedancias se encuentre cerrado, del cual se habla más en el apartado del planteamiento del problema. En cuanto a la penetración de los electrodos, estos deben ser capaces de atravesar sin dificultad tanto el tejido como la duramadre, ya que si alguno se dobla, puede ocasionar daño en el tejido; sin embargo, al mismo tiempo es deseable que los alambres tengan cierta flexibilidad para que la penetración resulte menos invasiva, con lo que se puede disminuir la cantidad de astrocitos que se forman en la punta de los electrodos debido a la gliosis, pues de lo contrario, el flujo de corriente a través del conductor se verá interrumpido. Finalmente, la selectividad se refiere a la capacidad para registrar una unidad, siendo mayor cuando el rango de impedancias sea más bajo, de tal modo que exista el menor ruido posible debido a las unidades adyacentes [14].

Los microelectrodos de metal han contribuido desde los primeros estudios de ciencias neuronales, representando el *neural probe* más ampliamente utilizado a pesar de tener ciertas desventajas en comparación con los basados en *MEMS*, pues estos tienen la principal ventaja de una fabricación más simple. Típicamente, los materiales de esta clase de electrodos son, platino, iridio, platino-iridio, oro, acero inoxidable, tungsteno o molibdeno, los cuales tienen una capa de material aislante, ya sea vidrio de cuarzo, teflón, poliamida o parylene.

Miguel Nicolelis, uno de los pioneros en el campo de interfaz cerebro-computadora, así como su equipo de trabajo, se han especializado desde la década de 1990 en el desarrollo de arreglos de electrodos (*microwire array* o *microelectrode arrays*) para ser utilizados en distintas especies (ratones, ratas, monos), con particular esfuerzo en protocolos que demandan registro simultáneo en distintas áreas del cerebro. La configuración básica que utilizan ellos en el Centro de Neuroingeniería de la Universidad de Duke (DUCN), es un arreglo de microelectrodos que consisten en conductores metálicos, ya sea tungsteno o acero inoxidable con diámetros en el rango de 25 a 50 micrómetros [μm], con una separación entre centro y centro de electrodos de 200 a 1000 [μm], dependiendo de la zona objetivo. La punta de los alambres pueden ser cortadas de manera recta o a cierto ángulo (Figura 4), el cual permite una mayor exposición del conductor y consecuentemente disminuir la impedancia, además de facilitar la penetración sobre el tejido cerebral.

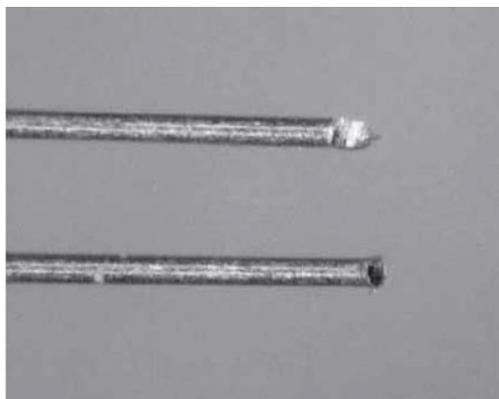


Figura 4. Configuraciones de la punta de los electrodos usada en Nicolelis Lab [20]. En la parte superior corte en ángulo y en la parte inferior corte recto.

Definir de manera correcta el material, forma del electrodo, así como la forma de las puntas, implica un desafío crucial para el desarrollo de los *microwire arrays* para registros crónicos (largo tiempo) [20]. Respecto al material de los electrodos, existen una serie de ventajas y desventajas que se han observado a través de distintas investigaciones; por ejemplo, el tungsteno resulta más rígido que el acero inoxidable y el platino-irido, lo cual se desea para una mejor penetración, además de obtenerse registros más estables, sin embargo también presenta mucho ruido para bajas frecuencias. El electrodo de platino también provee registros estables, alto SNR, pero también es mecánicamente frágil. El iridio es extremadamente rígido, resistente a la corrosión, sin embargo, químicamente no es favorable para un adecuado registro [21].

En este sentido, es que no existe el metal que favorezca en todo aspecto al registro extracelular, por lo tanto, es decisión del investigador elegir el que pudiera ser más conveniente para la tarea deseada.

Los arreglos de electrodos se encuentran comercialmente disponibles, y algunos ejemplos son los desarrollados por Plexon Neurotechnology Research Systems o por NeuroNexus [21], [22]. Los arreglos son ampliamente usados en estudios crónicos de animales en libre movimiento, apropiados tanto para animales grandes como animales pequeños; son configurados de acuerdo a las expectativas del investigador, ya sea en cuanto al número de electrodos, espacio entre los mismos, material del conductor, aislante y diámetro. En la Figura 5 se muestran dos arreglos de microelectrodos, uno de ellos fabricado por Plexon y el otro por NeuroNexus. La compañía Plexon suele añadir una capa de polietilenglicol (PEG) a los alambres, con el fin de asegurar el espaciamiento entre centro y centro y mantener una posición paralela mientras hay desplazamiento dentro del tejido. Vinculado al conjunto de electrodos, se encuentra un conector, gracias al cual se establece comunicación con el sistema de adquisición. Dentro de los conectores más extensamente empleados, están los Omnetics y los Mill-Max, los cuales varían en tamaño dependiendo de la cantidad de canales.

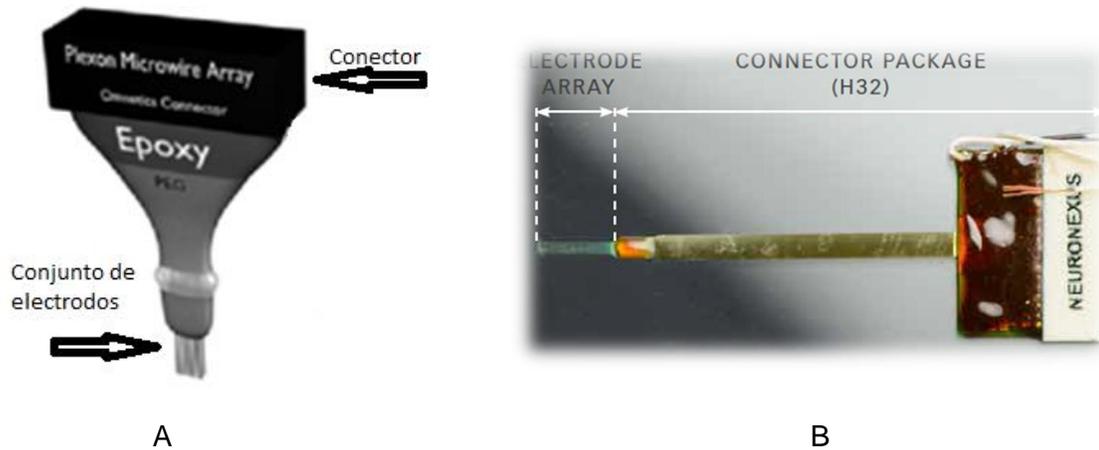


Figura 5. Arreglos de electrodos. A. Arreglo de Plexon [22]. B. Arreglo de NeuroNexus [23].

Las desventajas que presentan esta clase de electrodos son:

- Solamente se puede registrar actividad eléctrica en la parte inferior expuesta del alambre.
- El *spike sorting* tiene decremento en su rendimiento cuando la separación entre electrodo y electrodo no es uniforme.

Ante estas problemáticas, se fueron realizando cambios en la estructura del electrodo, por ejemplo, en 1983 McNaughton desarrolla electrodos formados por dos alambres roscados con diámetros de 12.5 [um] en cada alambre, y para 1993 desarrolla estos electrodos pero con cuatro alambres igualmente roscados. Los primeros son conocidos como *stereotrodes* y los segundos como *tetrodes* o tetrodos. De esta manera, al tener los electrodos más próximos entre sí, se establecen mejores criterios para el *spike sorting*, incrementando además el número de células que se puedan leer.

Bajo el principio de McNaughton y las consideraciones para establecer más de un punto de contacto en cada electrodo, compañías como Thomas Recording y NeuroNexus han desarrollado y comercializado sistemas para pruebas neuronales (*neural probe*) novedosos.

El tetrodo de Thomas Recording es hecho de vidrio de cuarzo, el cual actúa como aislante de cuatro núcleos de platino-tungsteno (Figura 6). La forma de este neural probe reduce el daño en el tejido a un mínimo, en comparación con los tetrodos enroscados.

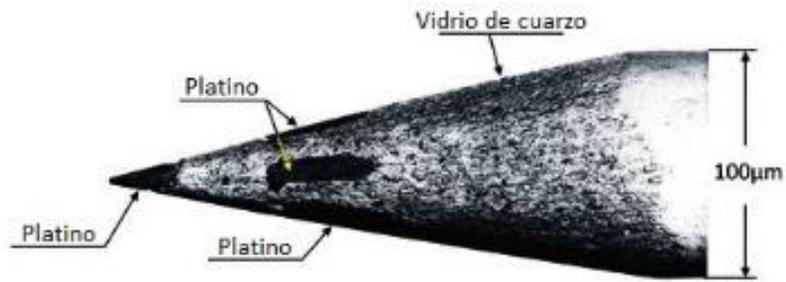


Figura 6. Punta de tetrodo Thomas Recording [24].

A continuación (Figura 7) se presenta un fotomontaje de la punta de un tetrodo de Thomas Recording cercano a dos neuronas, donde la neurona A se encuentra más cercana que B. Mediante estas experimentaciones, es que se ha corroborado la eficacia de usar tetrodes ante un electrodo sencillo.

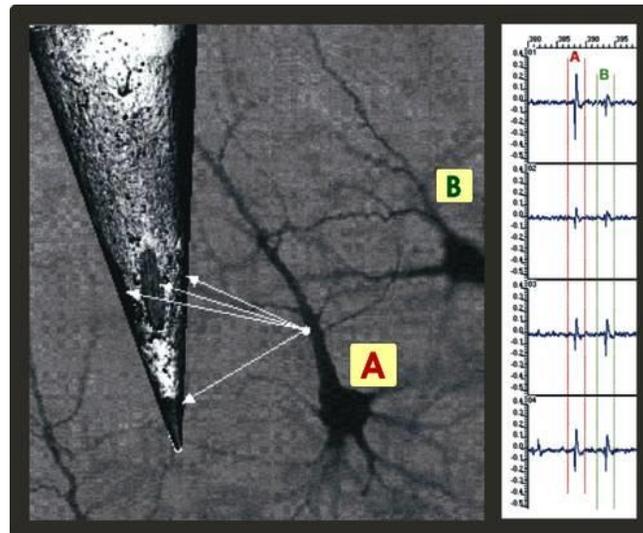


Figura 7. Principio del tetrodo. Ilustración sobre las investigaciones de Thomas Recording [24].

Los *neural probes* de NeuroNexus son fabricados mediante tecnología MEMS, los cuales son utilizados para *single-unit*, *multi-unit* y *LFP*. Algunos arreglos estándares son mostrados en la Figura 8.

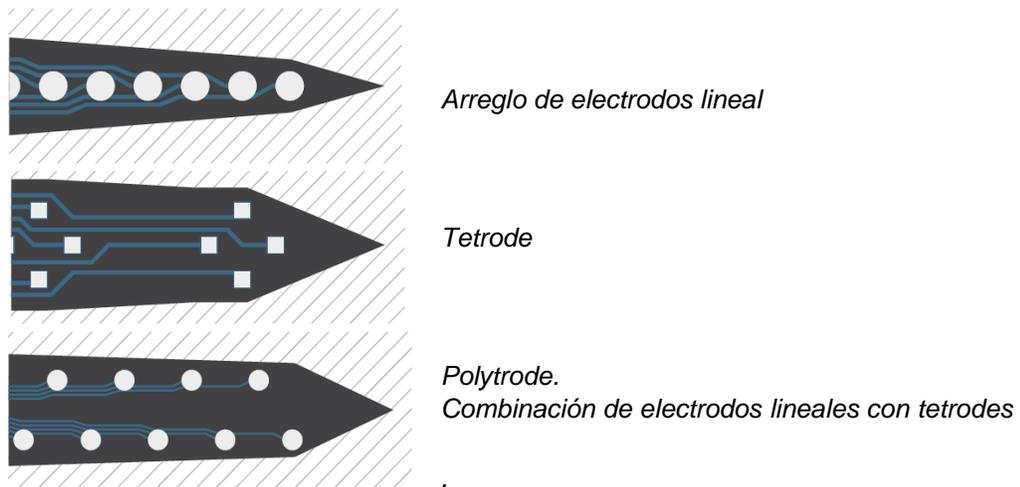


Figura 8. Configuraciones estándar de neural probes. NeuroNexus [23].

Con el fin de obtener mayor información de la actividad neuronal, se necesita incrementar el número de electrodos; sin embargo, las dimensiones de los mismos son una limitante, produciéndose además mayor daño cerebral. Por esta situación es que se han introducido neural probes basados en tecnología MEMS, a los cuales se les ha agregado nuevas características, por ejemplo, en [24] han sido propuestos *neural probes* flexibles, gracias a lo cual, se reduce el daño neuronal y a su vez, la gliosis. También materiales biodegradables como polietilenglicol o gel de sacarosa (*sucrose gel*) han sido usados sobre el conductor con el fin de permitir rigidez durante la inserción y mantener flexibilidad después de la misma.

Para visualizar la estructura básica de un *neural probe* basado en tecnología MEMS, las ilustraciones de la Figura 9, muestran estos arreglos, donde se puede apreciar que incluso se contempla la etapa del procesamiento de señales. Esta clase de diseños tienen ventajas en cuanto a sus dimensiones pequeñas, por lo que continúan en proceso de desarrollo.

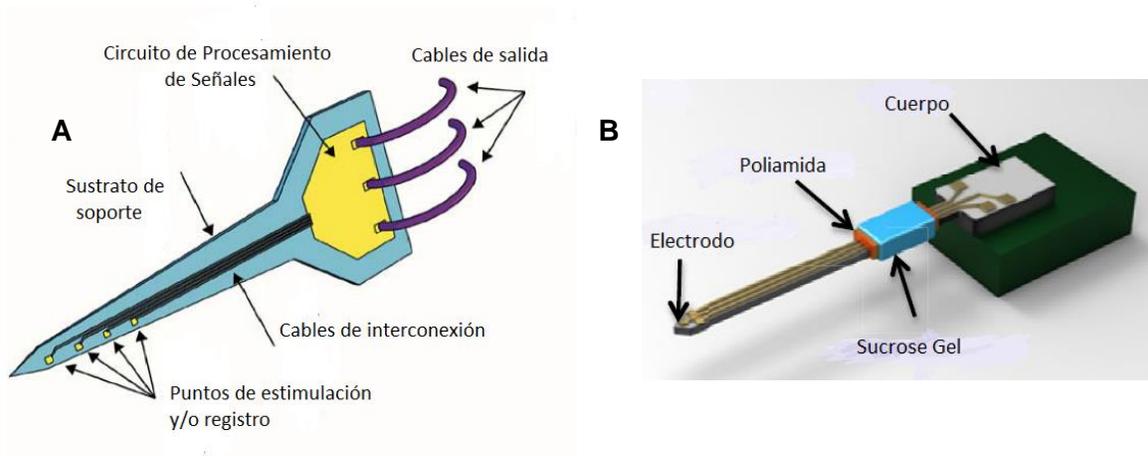


Figura 9. A. Estructura básica de un Neural Probe basado en tecnología MEMS [26]. B. Neural Probe flexible implementado con materiales biodegradables [25].

1.1.1.3 Sistemas de microposicionamiento en el registro extracelular: Pasado, presente y futuro.

El desarrollo de *microdrives* surge como necesidad fundamental en las investigaciones neurocientíficas, para la década de 1950 ya comenzaba a estudiarse el comportamiento de especies animales en libre movimiento, cuyas bases son consolidadas con Strumwasser en [27], realizándose los primeros registros de una sola neurona (*single unit recording*).

Para los siguientes años, ya se contemplaba la necesidad de *microdrives* móviles, con el fin de reposicionar los electrodos, debido a que al paso del tiempo la señal eléctrica se perdía ya sea por micro movimientos cerebrales o por la muerte de la célula.

Los primeros dispositivos elaborados para producir movimiento lineal, parten del mecanismo tornillo-tuerca; sin embargo, estos tenían la gran desventaja de que el electrodo además de ser desplazado linealmente, también rotaba en el sentido del tornillo, lo cual producía daños severos en el cerebro ya que se generaban movimientos laterales. En estas primeras investigaciones eran utilizados electrodos de alta impedancia entre 1 y hasta 10 [M Ω] con frecuencias de 200 [Hz] [28]. La siguiente figura ilustra un modelo de *microdrive* basado en el mecanismo tornillo-tuerca, donde se ve que además del tornillo principal, se cuenta con otro más para evitar posibles movimientos una vez posicionados a la profundidad deseada.

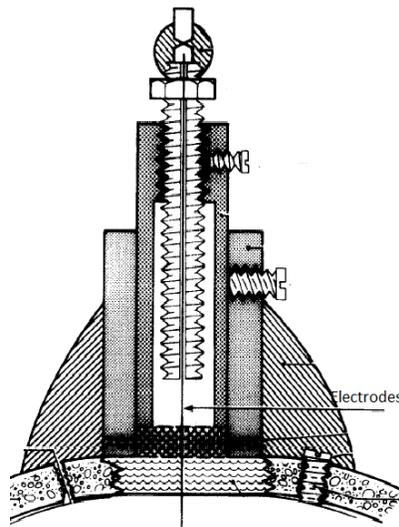


Figura 10. Microdrive basado en mecanismo tornillo-tuerca (1979) [28].

Fue a partir de 1979 y hasta 1995, que se reportaron trabajos en los que se utilizó un nuevo mecanismo para que el desplazamiento fuese únicamente longitudinal y no rotativo; el mecanismo consiste en tres cilindros concéntricos, de manera tal que al girar el cilindro externo, el cilindro interno era únicamente desplazado verticalmente. Estos *microdrives* son presentados en [29], [30] y [31], para los cuales ya se manejaban frecuencias de 1 [kHz], contando con resoluciones de hasta 200 [μ m] por rotación y masa de 115 [mg].

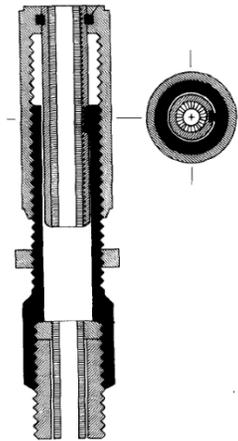


Figura 11. Diseño de microdrive de tres cilindros concéntricos (1979) [29].

Más adelante, se contemplan otras necesidades, como la implementación de stereotrodes y tetrodes [30], a lo que se suma la tarea de obtener registros de múltiples neuronas. Ante estas especificaciones, McNaughton y otros colaboradores, en 1996 ([32]) desarrollan un nuevo diseño de figura cónica, constando de 14 tetrodos desplazados por un tornillo y, por primera vez se utiliza un sistema para ubicar el posicionamiento mediante sensores infrarrojos, además se comienzan a utilizar electrodos de baja impedancia, mediante un proceso de electrólisis con oro (*gold plating*).

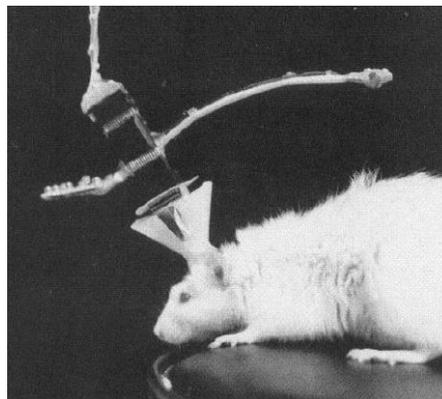


Figura 12. Primer microdrive con 14 tetrodos independientes y sistema de sensado (1996) [32].

El mecanismo del tornillo para generar movimiento lineal siguió estudiándose, con el fin de implementar diseños más compactos, por ejemplo, en [33] se crea el modelo 'Scribe', el cual consiste en la transmisión de movimiento lineal por medio de un punto de contacto entre un elemento rotativo (tornillo) y un elemento no rotativo. Esta configuración conlleva a un desplazamiento con poca fricción y con oscilaciones laterales poco significativas, además de tener mínimas dimensiones y poco peso, pero por otra parte, tiene la desventaja de que el movimiento solamente es de manera descendente.

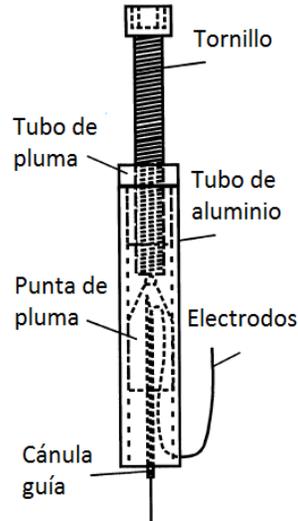


Figura 13. Modelo Scribe. Mecanismo de tornillo y elemento de transmisión (1999) [33].

Desde comienzos del presente siglo, la tecnología ha impulsado el desarrollo de *microdrives* más robustos. El uso de actuadores y sensores comenzó a ser esencial para crear sistemas automatizados, y de manera paralela la tecnología MEMS también ha creado un particular interés.

M. Fee y A. Leonardo son pioneros en el desarrollo de *microdrives* motorizados. En su diseño, utilizan 3 micro motores brushless DC, reducidos en velocidad por un sistema de engranes y conectados a un sistema lead screw, produciendo movimiento a un cuerpo que contiene los electrodos; el diseño en su totalidad, tiene 6 [mm] de diámetro y 17 [mm] de altura, con un masa de 1.5 [g]; se emplean electrodos de tungsteno a 3 [MΩ] con una separación de 100 a 200 [μm] entre electrodo y electrodo [34].

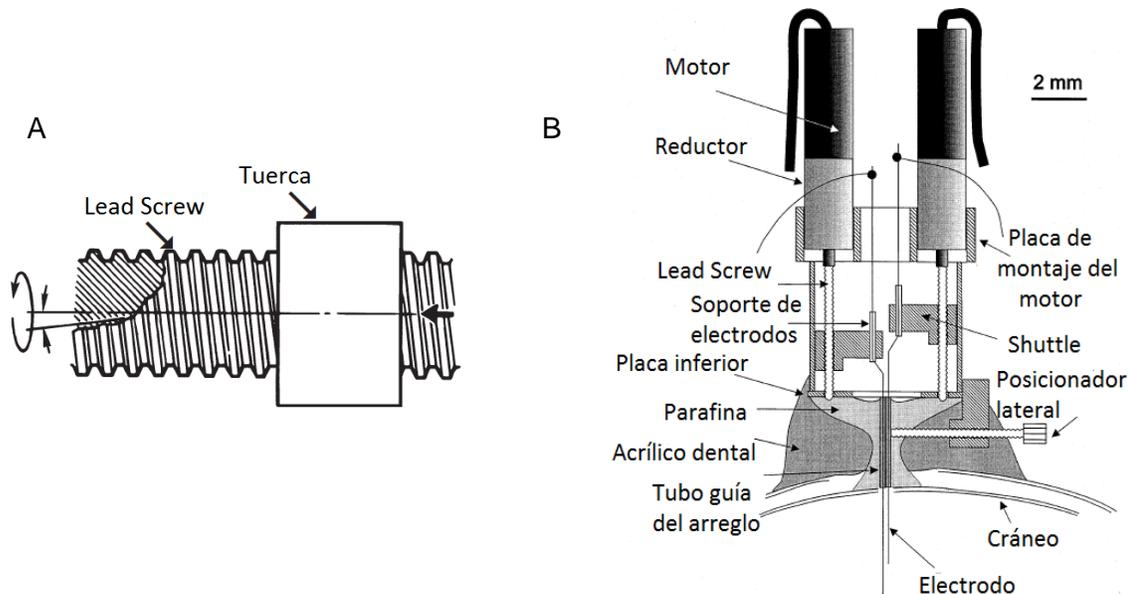


Figura 14. Primer *microdrive* motorizado. A. Sistema Lead Screw [35]. B. Diseño con 3 micro motores DC [34]. Bell Laboratories 2001.

El modelo cónico de múltiples electrodos presentado en [32] ha sido desarrollado en varios centros de investigación en las últimas dos décadas, entre los cuales se han implementado hasta 21 canales de registro, pero a pesar de haberse realizado esfuerzos en que el diseño sea más compacto y ligero, no ha resultado totalmente conveniente hacer uso de estos dispositivos porque el peso y volumen continúan siendo desventaja.

En [36], [37], [38] y [39] se describen más a fondo algunos de estos dispositivos; es a partir de entonces que la manufactura aditiva se torna importante en la fabricación de *microdrives*, a lo que se agrega la implementación de PCBs (*Printed Circuit Boards*), que sirven de soporte para los conectores de la etapa de pre amplificación.

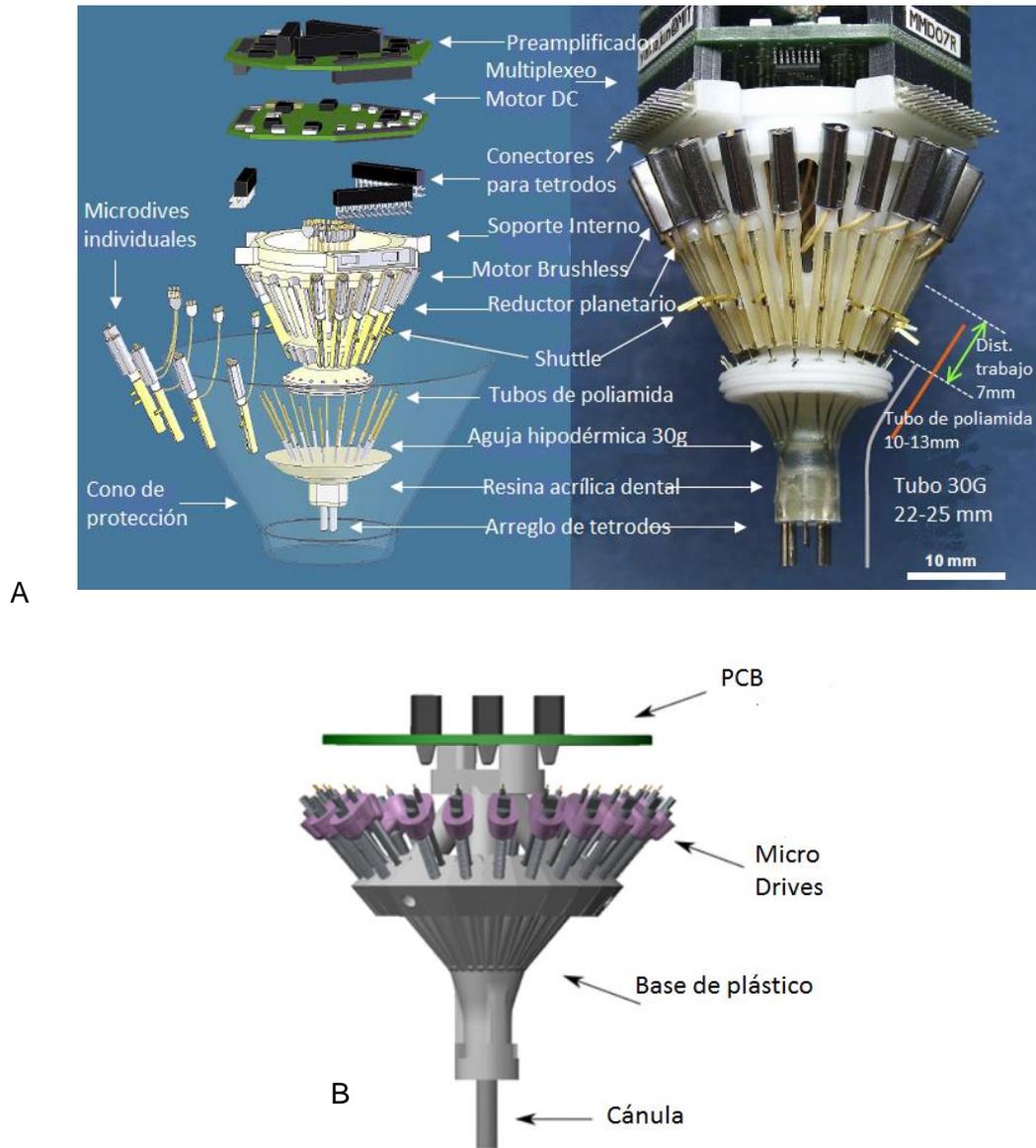


Figura 15. Microdrives de canales múltiples. A. Microdrive motorizado 21 canales (2008) [38].

B. Diseño manual del MIT con 21 canales (2009) [39].

En los últimos años, y sobre todo en la última década, se ha impulsado paralelamente el uso de sensores, nuevos microactuadores y sistemas inalámbricos. En la literatura se encuentra que los primeros actuadores utilizados son motores brushless de corriente directa, los cuales llegan a pesar hasta 100 [mg] y pueden alcanzar la fuerza suficiente para desplazar los electrodos. La principal desventaja es que estos motores cuentan con un sistema de reducción de engranes, que a pesar de ser importante para lograr desplazamientos más precisos, es preferible evitar estos motores por cuestiones de volumen.

En el 9º Congreso Iberoamericano de Ingeniería Mecánica (CIBM9), el grupo de Micromecánica y Mecatrónica del CCADET, presentó un sistema basado en un micromotor a pasos con sistema de control en lazo abierto, obteniéndose desplazamientos de aproximadamente 5.47[$\mu\text{m}/\text{paso}$], cuyas dimensiones son de 20x20.5x20.2 [mm]; sin embargo, su peso de 10[g] es una gran desventaja para su implementación.

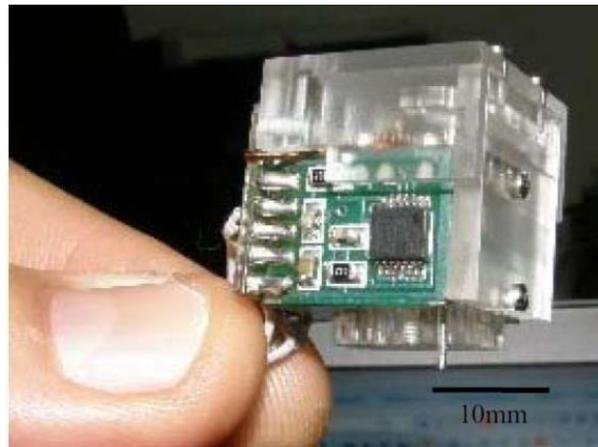


Figura 16. Microdrive basado en motor a pasos (CCADET 2009) [40].

En la búsqueda de nuevos actuadores, la Universidad de Tokio ha hecho uso de la energía hidráulica, con el fin de evitar las imprecisiones de los sistemas de engranes y lead screws [41]. Su trabajo consta de un arreglo de 22 electrodos independientes, al que se aplica un algoritmo para el control del fluido; las dimensiones totales son 23.5 [mm] de diámetro y 37 [mm] de altura, con una masa de 15 [g]. El prototipo final con cada una de las partes se muestra en la Figura 17.

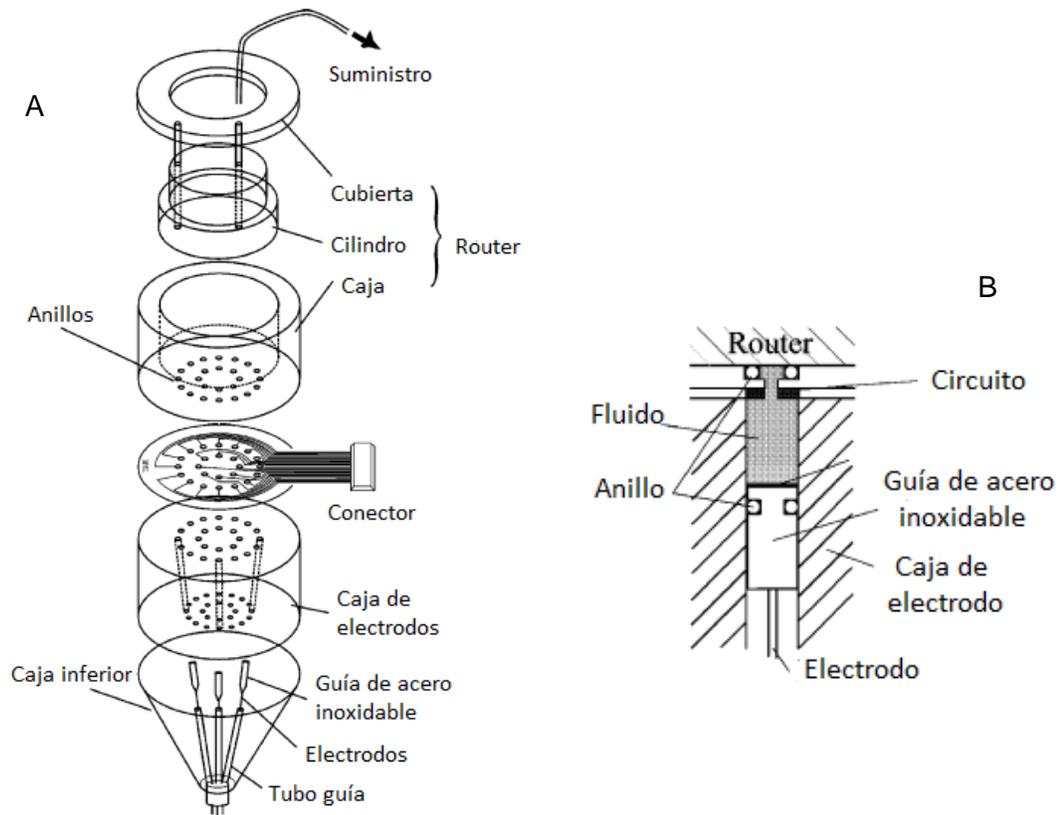


Figura 17. Microdrive accionado por energía hidráulica (2007). A. Partes del sistema. B Pistón de cada electrodo [41].

Otro nuevo actuador, se basa en el fenómeno piezoeléctrico inverso, en el que al producirse un campo eléctrico a un material piezoeléctrico, se genera movimiento. La Figura 18 ilustra un microdrive basado en este principio, el cual también cuenta con retroalimentación mediante un sensor de efecto Hall y un procesador digital de señales (DSP). Esta clase de motores tiene más ventajas en comparación con motores DC, motores a pasos y actuadores hidráulicos, ya que las dimensiones son considerablemente menores, además de que el error de desplazamiento generado es mínimo, con precisión de hasta 1 μm y, por otra parte, no hay ruido eléctrico que pudiera intervenir en las señales obtenidas.

Este diseño desarrollado en [42], consta de cuatro tetrodos, presenta dimensiones de 15 [mm] de diámetro por 26 [mm] de altura y su masa es de 1.82 [g].



Figura 18. Microdrive motorizado basado en el principio piezoeléctrico y sensor de efecto Hall. Korea 2011 [42].

En 2004 ya se había presentado un sistema con motor piezoeléctrico, aunque no incluía las mismas ventajas que el desarrollado por Korea en 2011; sin embargo, por primera vez se plantea la implementación de un algoritmo para registro “inteligente”, gracias al cual el mismo sistema detectaría la pérdida del registro de una neurona y automáticamente el electrodo se repositionaría [43]. Hasta el momento, estos algoritmos no han sido aplicados, pero convendría considerar esta necesidad para futuras implementaciones.

El desarrollo de dispositivos inalámbricos también ha influenciado en los sistemas de microposicionamiento de electrodos, puesto que las investigaciones requieren que los animales se encuentren en libre movimiento total, sin la existencia de alambres que pudieran intervenir en su comportamiento. Con M. Nicolelis se presentan unos de los primeros trabajos inalámbricos [44], pero es en [45], [46], [47] y [48] que se trabaja con sistemas para ratas. Los rangos de transmisión están entre los 4 y hasta 60 [m], pero el que presenta más ventajas es el desarrollado por Japón en 2015, que además de ser inalámbrico también es motorizado; la Figura 19 presenta algunos de estos dispositivos.

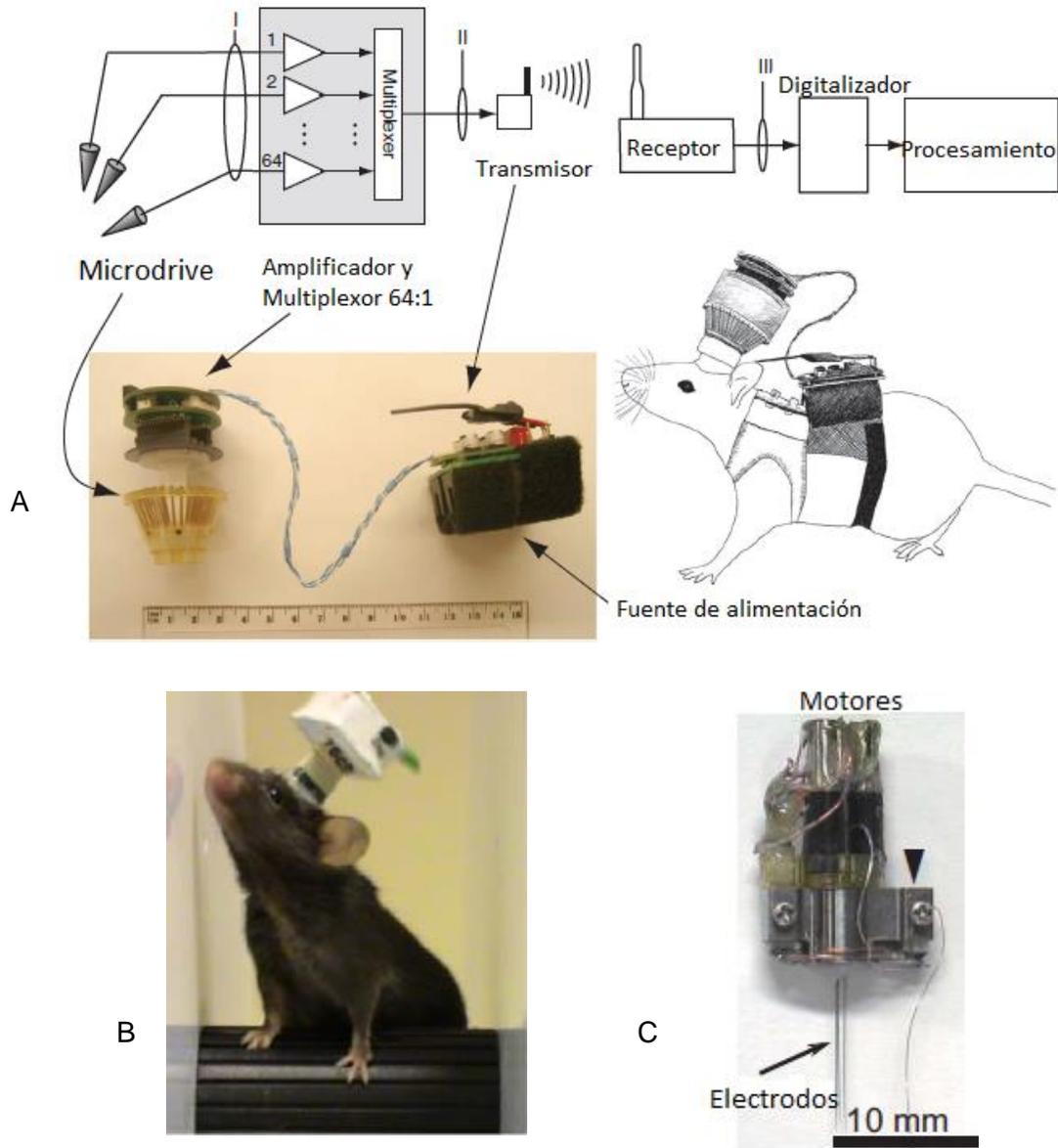


Figura 19. Modelos inalámbricos de microdrives. A. Sistema implementado con dispositivos Neuralynx con 60 metros de alcance (2011) [45]. B. Microdrive compacto implantado en ratas y ratones (2011) [46]. C. Microdrive motorizado e inalámbrico desarrollado en Japón (2015) [48].

Hasta el momento, se han creado *microdrives* motorizados, inalámbricos, de múltiples canales, ya sea utilizando electrodos, stereotrodes o tetrodos, cuyos alcances han sido satisfactorios; sin embargo, aún es deseable la implementación de sistemas mucho más pequeños y con los que se pueda obtener registros de múltiples regiones al mismo tiempo.

Ante el problema del tamaño, la tecnología MEMS ha ofrecido prometedoras soluciones [49], creándose desde *neural probes* hasta microactuadores, pero todavía faltan más avances en este campo para aproximarse al sistema de microposicionamiento ideal.

Se entiende que para desarrollar *microdrives*, es importante la colaboración de múltiples disciplinas, como la biología, medicina, mecánica de precisión, electrónica, procesamiento de señales y técnicas de microfabricación. Por otra parte, se trata de un proceso en evolución y que a pesar de haber transcurrido más de medio siglo desde su origen, será trascendental dar seguimiento, puesto que los resultados en las investigaciones citadas en un comienzo han sido favorables para la humanidad. Como caso particular, en el Departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC), se ha desarrollado investigación sobre la regulación de las respuestas emocionales en la corteza prefrontal, así como el papel que desempeñan la amígdala y el hipocampo, mediante el registro de potenciales de acción intracelulares, obtenidos por medio de *microdrives*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Presentación de la problemática.

En el Departamento de Neuropatología Molecular (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), surge como necesidad localizada el desarrollo de un sistema de microposicionamiento para registro extracelular en ratas en libre movimiento.

Se desea emplear electrodos metálicos entre 25 y 50 $[\mu\text{m}]$ de diámetro, en un rango de impedancia de 250 a 350 $[\text{k}\Omega]$. Se cuenta con equipo de cómputo especializado en adquisición de actividad neuronal, con etapa de preamplificación de 16 canales, por lo que es necesario establecer comunicación entre 16 electrodos con los 16 canales. El prototipo final debe ser ligero, de mínimo volumen y tener alta resolución en el desplazamiento, además de proveer registros estables y contar con vida útil de varias semanas.

Para que las investigaciones de actividad neuronal sean más exitosas, el animal debe estar libre de interrupciones externas, por lo que es de especial interés que el sistema sea monitoreado y controlado remotamente de manera inalámbrica.

De esta manera, se estarán cubriendo la necesidad que comparten distintas instituciones que realizan investigación mediante registro extracelular.

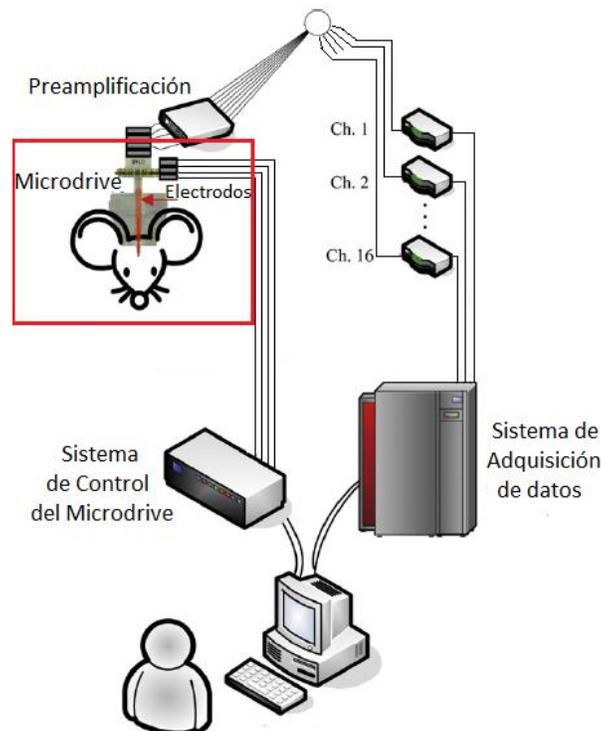


Figura 20. Configuración de un sistema de microposicionamiento para registro neuronal retroalimentado [42].

En la Figura 20 se muestra la configuración del sistema de microposicionamiento, incluyendo etapa de preamplificación, amplificación, adquisición de datos y sistema de control; sin embargo, como primera etapa, el presente trabajo es delimitado al área encerrada en rojo, consistiendo en un sistema manual y sin retroalimentación, con el objetivo de avanzar gradualmente en el proyecto.

2.2 Hipótesis.

Gracias al desarrollo de la micromecánica y la integración de la manufactura convencional y la manufactura aditiva, actualmente es posible desarrollar sistemas de alta precisión. De esta manera, se puede favorecer en el mejoramiento de *microdrives*, reduciendo tamaño, peso, costo, así como alcanzar un mejor desempeño en el mecanismo.

2.3 Objetivo.

Desarrollar un sistema de microposicionamiento de resolución micrométrica para registro extracelular neuronal en ratas en libre movimiento, con zona de registro en la amígdala.

2.4 Alcances.

- Realizar investigación y análisis en la literatura sobre el registro extracelular, así como sus aplicaciones y los distintos sistemas empleados.
- Proponer un sistema de microposicionamiento para registro extracelular neuronal *single-unit*.
- Evaluar el desplazamiento de la cánula, mediante prueba de desviaciones y obtención de la resolución.
- Realizar medición y ajuste de impedancias en los electrodos.
- Implantar el *microdrive* en la rata y acoplarlo al sistema de adquisición, así como verificar su correcta adaptación.
- Plantear trabajo a futuro.

2.5 Justificación.

Es conocida la importancia que tienen las neurociencias en diversos estudios, entre otros, el estudio del comportamiento y enfermedades en el ser humano; se trata de un área multidisciplinaria, en la que se interrelacionan la biología, la medicina, la psicología, la física y también la ingeniería. Ésta última, en apoyo con los avances tecnológicos, favorece en la optimización de los procesos de investigación.

Como ya ha sido mencionado, los trabajos realizados en el Departamento de Neuropatología Molecular, entre otros, los concernientes al estudio de la amígdala, requieren de la implementación de *microdrives*, capaces de satisfacer las necesidades particulares del laboratorio, las cuales no pueden ser cubiertas en su totalidad por los dispositivos comerciales, por lo tanto, los investigadores prefieren desarrollarlos por su cuenta, lo que además implica menor costo. De manera que, son de especial interés las aportaciones de la ingeniería en el diseño y la manufactura para obtener un producto final funcional, confiable, con el menor costo posible y adaptado a las necesidades.

MARCO TEÓRICO

3.1 Impedancia en electrodos.

La impedancia (Z) es definida como la oposición en un dispositivo o circuito al flujo de corriente alterna (AC) a cierta frecuencia. Tiene dos componentes, resistencia R (dominio de los reales) y reactancia X (dominio de los imaginarios). La resistencia por sí misma es la oposición al flujo de corriente directa (DC) y en términos de impedancia, es la oposición al flujo de corriente alterna sin depender de la frecuencia. Reactancia es la combinación de capacitancia e inductancia, la cual se opone al flujo de corriente alterna de manera dependiente a la frecuencia [51]. En la realidad, no existen componentes puramente inductivos, capacitivos o resistivos, sino que se manifiestan como una combinación, lo cual se conoce como elementos parásitos. De esta manera, será distinto el valor de la impedancia ideal contra el valor medido, ya que además existen inexactitudes en los dispositivos de medición de forma inherente [52].

Las señales bioeléctricas, tales como el potencial de acción, se presentan en AC, por lo tanto se mide impedancia en vez de puramente resistencia.

Al registrar una señal se necesita que contenga la menor cantidad posible de ruido; es decir, un alto SNR, lo que está relacionado con la impedancia en los electrodos. Para esto, desde los comienzos del *microdrive*, se han realizado distintas experimentaciones a distintos valores de impedancias, con el fin de definir los rangos en que se obtienen mejores registros. En [28], [31], [33], [34], [41], [43], [53] y [54] se trabajó con electrodos de alta impedancia, en el orden de mega ohms ($M\Omega$), mientras que en [36], [37], [38], [41], [42], [55] y [56] se reportaron bajas impedancias, en el orden de kilo ohms ($k\Omega$). En los últimos años, la mayor parte de las experimentaciones se han realizado con electrodos a bajas impedancias y así mismo, se ha demostrado en investigaciones, que en estos rangos son más favorables los resultados que a altas impedancias. Para obtener bajas impedancias se necesita que los electrodos aumenten su área de contacto, y esto se ha logrado mediante técnicas como la electrólisis.

En la electrólisis se tiene un cátodo (arreglo de electrodos o alambre de platino) y un ánodo (alambre de platino o arreglo de electrodos), estos son sumergidos en baño de alguna sustancia llamado electrolito, por ejemplo oro. Se suministra una cantidad de corriente, produciéndose una reacción química tal que, partículas de oro se adhieren al arreglo de electrodos (Figura 22), provocando un aumento en la superficie de contacto, lo que provoca una disminución de impedancia. Este proceso se conoce como *gold-plating electrode tip* (Figura 21). Es importante considerar el diámetro y separación de los electrodos en relación a la corriente suministrada e impedancia objetivo. Si se trabaja por ejemplo con electrodos con diámetros de alambre de 10 a 30 $[\mu m]$, es preferible que las impedancias objetivo se encuentren entre los 200 y 500 $[k\Omega]$ a una frecuencia de 1 $[kHz]$, pues si se

trabaja por debajo de 100 [k Ω] se producen cortos [57], mientras tanto, en [58] se encontró que para alambres de 50 [μm] de diámetro el mejor desempeño fue alcanzado con rangos de impedancias entre 40 y 150 [k Ω].

Faraday, en 1833 desarrolló investigación sobre el proceso de electrólisis, lo cual fue plasmado en sus dos leyes de electrólisis, donde entre otros enunciados, menciona que la cantidad de material depositado en el electrodo es proporcional a la corriente. Estos estudios nos brindan una aproximación teórica; sin embargo, en la aplicación real hay más factores que influyen. Un factor importante es la eficiencia de la corriente, que se encuentra dada en función del peso real de material depositado y su valor teórico; también es importante, la densidad de corriente, definida como la corriente por unidad de área, así como la distribución, pues esta se concentra más en los bordes del electrodo [59].

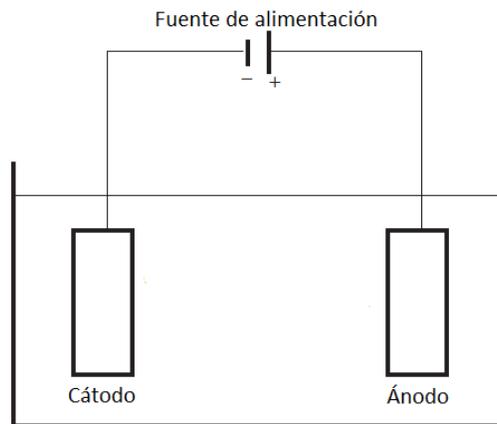


Figura 21. Principio básico del proceso de electrólisis (modificado de [59]).

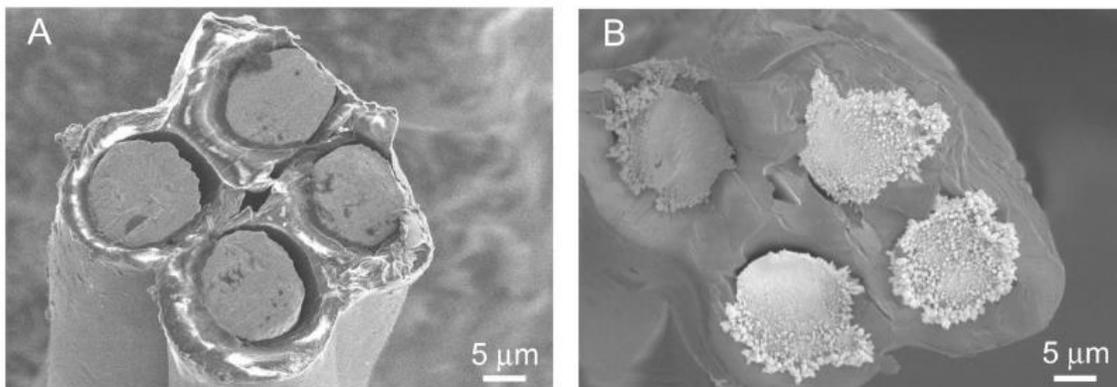


Figura 22. Tetrodos. A. Antes de electroplating. B. Después de electroplating [57].

Se han elaborado protocolos para facilitar el proceso de electroplating con el fin de favorecer la fabricación de *microdrives*. Neuralynx cuenta con un equipo especializado [60], el NanoZ Impedance Tester™, con el cual se puede realizar tanto medición de impedancias como *electroplating*. En [61] se presentan recomendaciones para el proceso y en [55] se reporta un trabajo en el que se utiliza este procedimiento. Mientras tanto, en [57] se reporta un método en el que añade polietilenglicol (PEG) y MWCNT a la solución de *gold-plating*, alcanzando impedancias más bajas que con el procedimiento estándar.

3.2 Implantación de *microdrives*.

Para la implantación de *microdrives*, primeramente se realiza una cirugía, con el fin de perforar la zona donde se desplazará la cánula, además de los barrenos para los tornillos que sujetarán el dispositivo al cráneo de la rata, lo cual es descrito a más detalle en el desarrollo del sistema. Para tal cometido, es importante tener precisión en el posicionamiento de los puntos de interés, puesto que podría registrarse alguna estructura no deseada, es así que en neurociencias es utilizado un sistema coordinado XYZ, conocido como estereotáxico (ver Figura 23), apoyándose de los diagramas de las secciones del cerebro (atlas estereotáxico, Figura 24). En el atlas se toman como referencia lamda y bregma para posicionar un punto en el plano, mientras que la vista seccional ayuda en la ubicación de la profundidad deseada.

El Dr. George Paxinos fue quien allanó el terreno para la investigación neurocientífica, por ser el primero en producir un atlas estereotáxico 3D con precisión para la colocación de electrodos y suministros en el cerebro de animales en experimentación. Sus atlas son ahora estándares internacionales [62].

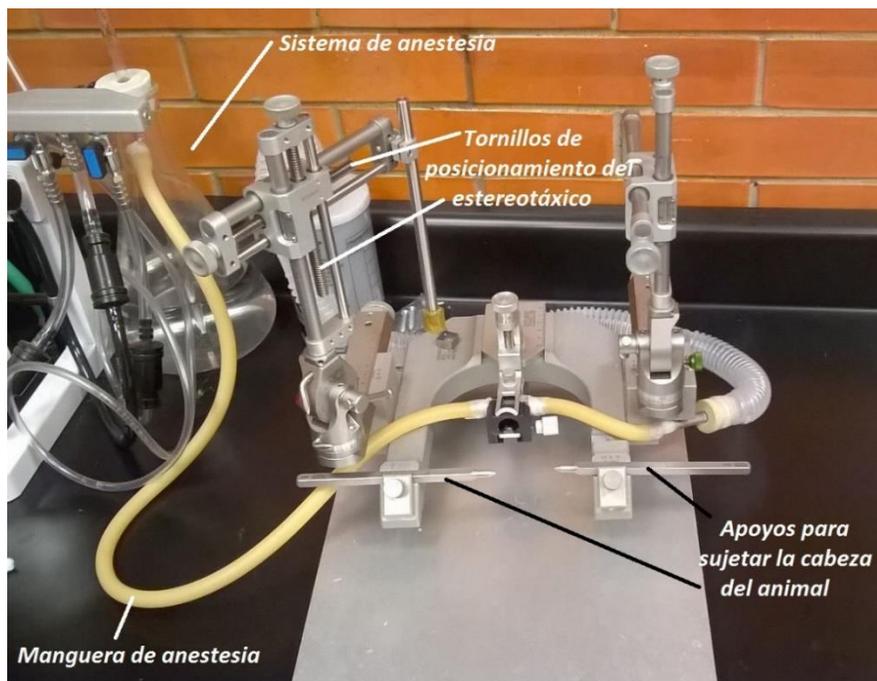


Figura 23. Estereotáxico utilizado en el Departamento de Neuropatología Molecular, IFC UNAM.

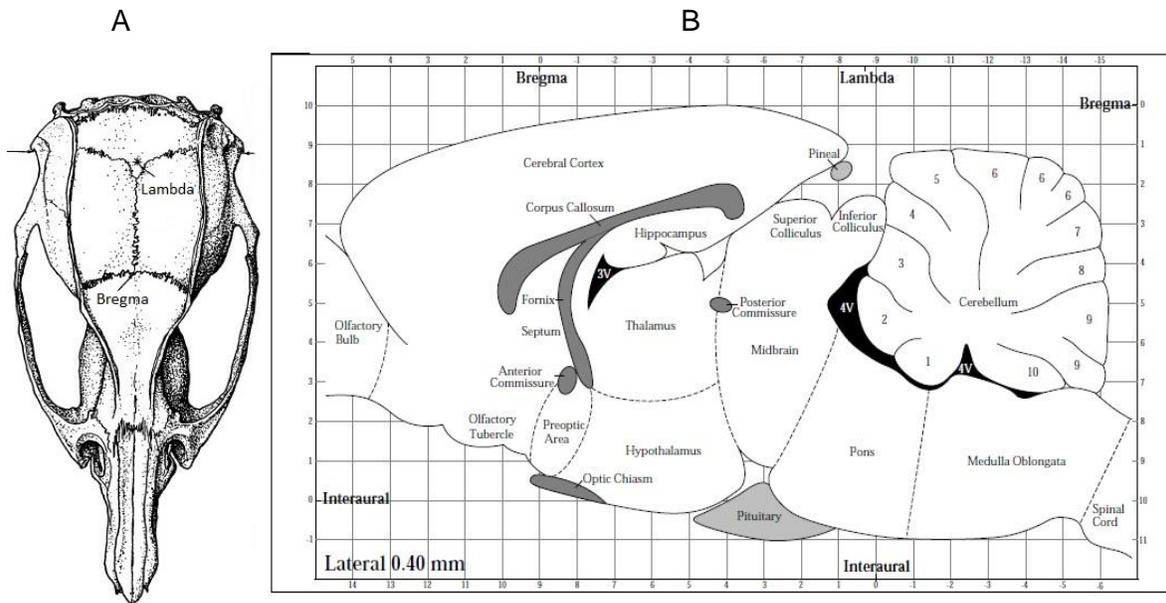


Figura 24. Cráneo de una rata Wistar. A. Vista dorsal. B. Sección sagital [63].

Con base en la literatura [13] y en el procedimiento llevado a cabo en el IFC, a continuación se describen de manera breve los pasos que se siguen en el proceso de cirugía:

- Se administra anestesia a la rata y se coloca en el estereotáxico.
- El área de cirugía es afeitada y, se procede con la incisión por medio de un bisturí, tomando los cuidados necesarios para evitar infecciones.
- Con ayuda del estereotáxico, es ubicado el punto para el registro (cánula), y a partir de este, los puntos donde se colocarán los tornillos de sujeción. Posteriormente se realizan los agujeros.
- Es colocado y asegurado el microposicionador de acuerdo a los lugares de interés.
- Se sutura la piel a manera de quedar más protegido el cráneo.
- Posterior a la cirugía, se monitorea el estado de la rata, asegurando que la operación haya sido exitosa.

DESARROLLO DEL SISTEMA

El desarrollo del presente trabajo, tiene fundamento en las necesidades manifestadas en el Departamento de Neuropatología Molecular del IFC UNAM, así como a través de la investigación realizada sobre los distintos prototipos elaborados a lo largo de la historia.

Como fue mencionado en el planteamiento del problema, este proyecto es acotado al desarrollo de un *microdrive* manual sin retroalimentación, con un arreglo de electrodos, para lo cual se da continuidad al trabajo realizado sobre un sistema de microposicionamiento motorizado en el CCADET (ver Figura 27).

El diagrama de la Figura 25, manifiesta los principales elementos que componen el *microdrive* que se desarrolla en este trabajo, los cuales son descritos con más detalle en los posteriores apartados:

- Arreglo de electrodos.
- Conector de 16 canales.
- Mecanismo de microposicionamiento.

El *microdrive* incluirá, además de un mecanismo de microposicionamiento, un arreglo de 16 electrodos para los 16 canales respectivos de un conector, el cual será vinculado a la etapa de preamplificación (*headstage*) del sistema de adquisición de datos. Por lo tanto, es necesario configurar el diseño de forma tal, que el conector esté soldado con los electrodos, y estos, sean capaces de desplazarse junto con el mecanismo de microposicionamiento. Finalmente, para obtener los registros neuronales, se ajustarán las impedancias de los alambres mediante el proceso *gold-plating electrode tip*, para posteriormente realizar la implantación.

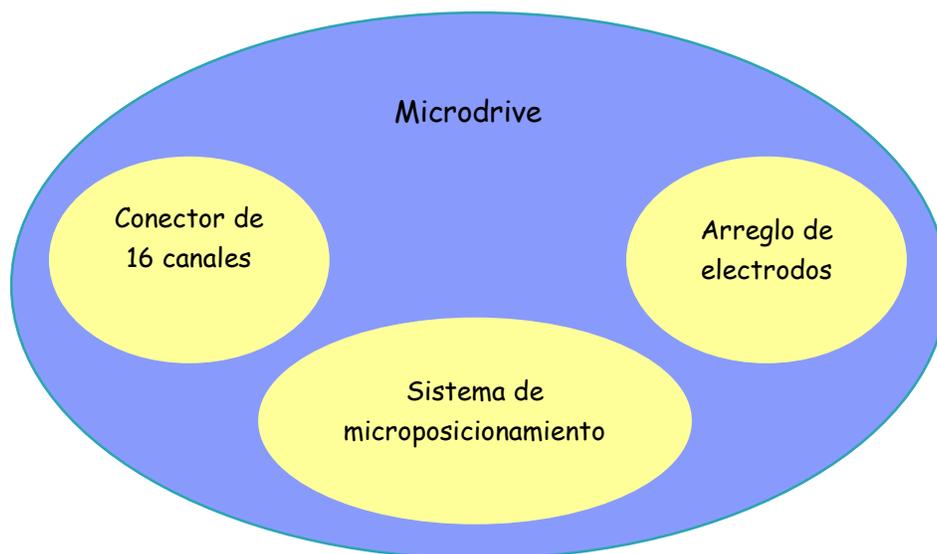


Figura 25. Principales elementos del *microdrive* a desarrollar.

4.1 Requerimientos y especificaciones.

De acuerdo al objetivo, se registrará actividad neuronal en la región de la amígdala, la cual se ubica respecto al bregma 3 [mm] hacia adelante y 1 [mm] a la derecha (ver Figura 26).

A partir de este punto, y con los requerimientos y especificaciones a continuación citadas, se procederá con la elaboración de distintos diseños conceptuales.

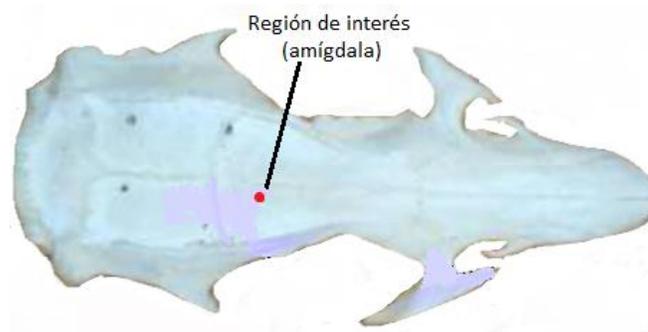


Figura 26. Zona para el registro extracelular.

Requerimientos:

- Se solicita un *microdrive* de pequeñas dimensiones.
- De peso ligero.
- Desplazamiento vertical bidireccional.
- De alta precisión.
- 16 electrodos contenidos en una cánula.
- Los registros neuronales deben ser estables.
- De fácil ensamble.
- Reutilizable.

Especificaciones:

- Dimensiones < 20x10 (base) x10 (altura) [mm].
- Masa < 25 [g].
- Avance lineal de 0 a 3 [mm].
- Cánula calibre 20G.
- Resolución de 10 [μ m].
- Impedancia de electrodos entre 250 y 350 [k Ω].

4.2 Sistema de microposicionamiento.

El trabajo previamente desarrollado en el CCADET [64], consiste en un sistema motorizado y retroalimentado, el cual produce movimiento lineal por medio de un micro motor ultrasónico (piezoeléctrico). El mecanismo se conforma por un buje, un resorte y un pistón; cuando el motor transmite movimiento lineal descendente sobre el pistón, este se desplaza a lo largo de una cavidad cilíndrica en la base, y cuando el motor retrocede, el pistón asciende en función de la fuerza opuesta del resorte, de manera tal que una cánula se mueve junto con el pistón. En el mismo pistón, fue colocado un imán, del cual se obtiene posición gracias a un sensor de efecto Hall ubicado en la carcasa.

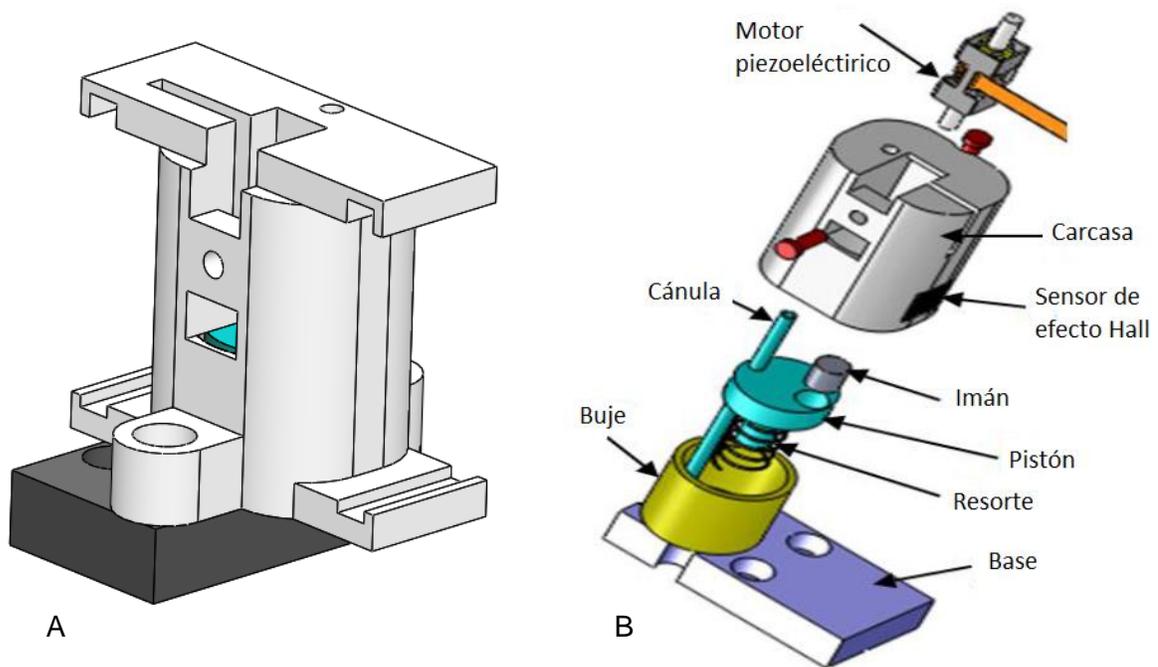


Figura 27. Microdrive motorizado realizado en el CCADET [64]. A. Vista isométrica. B. Vista explosiva.

Se decide utilizar dicho mecanismo, debido a que presenta ventajas en comparación a los encontrados en la literatura, en el cual se reportaron oscilaciones laterales entre 12 y 16 μm y una resolución calculada de 1.33 μm . Éste diseño se toma como base para satisfacer las necesidades en el IFC mediante las modificaciones que a continuación se presentan, así como sus respectivos procesos de manufactura.

4.2.1 Diseño del microposicionador.

De manera general, el sistema microposicionador se compone de tres estructuras principales:

- Base.
- Mecanismo.
- Cuerpo o carcasa.

El mecanismo es el encargado de producir el avance lineal, mientras que una estructura de fácil ensamble, nombrada como cuerpo o carcasa, es la encargada de contener cada una de las partes del mecanismo. Este último, se monta sobre una base, y ésta, es fijada al cráneo de la rata mediante tornillos, con aproximadamente 2 [mm] de cuerda saliente, lo suficiente para anclarse al cráneo y no dañar tejido cerebral.

Con base en el punto objetivo de registro (amígdala) y el diámetro de la cánula, cada una de las piezas es modificada en su orientación respecto al prototipo referencia. Para esto, a continuación se describe de manera detallada las consideraciones de diseño de cada una de estas.

4.2.1.1 Diseño de la base.

Una vez ubicada la zona de interés para el registro, se procede al diseño de la base. La Figura 28 muestra su estructura, donde se ubica cada una de las partes que la conforman.

Se observa que cuenta con cuatro barrenos en los extremos, que sirven para sujetarla al cráneo con tornillos; la cavidad cilíndrica central es destinada para el avance del pistón, el cual por cuestiones de no dañar al tejido, no debe sobrepasar el espesor de la base, que es de 3 [mm], por lo tanto, la profundidad de este barreno se estableció a 2.7 [mm]; la cavidad guía para la cánula, al igual que los cuatro barrenos de sujeción al cráneo, sobrepasa el espesor de la base, ya que será necesario para que la cánula pueda posicionarse a la profundidad deseada; para ensamblar el cuerpo del microposicionador con la base de manera sencilla y segura, se manufacturó una caja en la base a manera de que una pestaña del cuerpo se ensamble por ajuste mecánico a dicha caja, además de un tornillo en la parte opuesta para garantizar una mejor sujeción.

El propósito de la base es orientar la cavidad de la cánula en la zona de registro y posteriormente ensamblar el microdrive junto con el conector, de manera tal, que implantación resulte sencilla y además, el dispositivo se pueda desensamblar. Es importante aclarar que respecto a la amígdala, fueron colocados cada uno de los barrenos, de manera que los tornillos de sujeción estuvieran dentro de la región craneal; adicionalmente, se tomó cuidado en las esquinas de la base, siendo manufacturadas con cierta curvatura para evitar posibles daños a la rata.

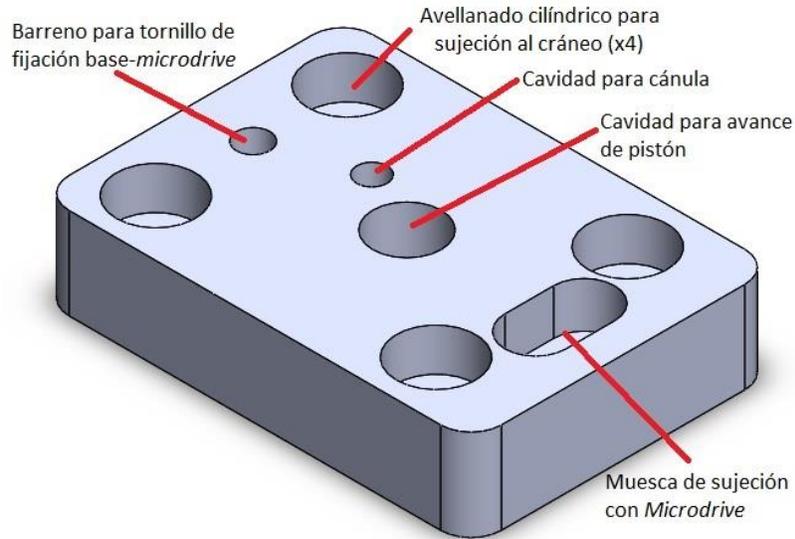


Figura 28. Base del microdrive.

4.2.1.2 Diseño del mecanismo.

Las piezas del mecanismo, se ilustran en la Figura 29, donde además se superponen cada una de éstas en conjunto con la cánula.

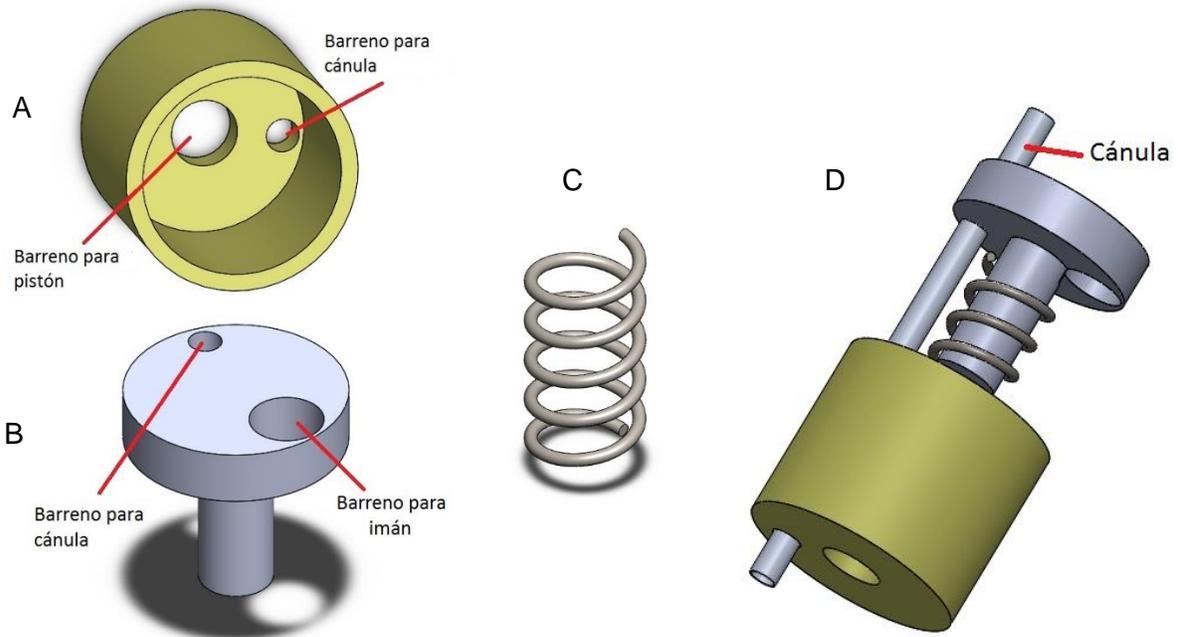


Figura 29. Componentes del mecanismo de microposicionamiento. A. Buje. B. Resorte. C. Pistón. D. Superposición del ensamble.

La cánula es el elemento que contendrá en su interior un conjunto de 16 electrodos, brindando soporte mecánico a éstos mismos. Consiste en una aguja hipodérmica 20G cuyo diámetro nominal externo mide 0.9 [mm] y su diámetro nominal interno mide 0.6 [mm], la cual fue elegida al calcular el área aproximada que cubrirían los 16 electrodos de 50[μ m] de diámetro.

En [64], se realizaron cálculos teóricos para obtener los parámetros del resorte adecuado, empleando gelatina como un medio sustituto del tejido cerebral, y así encontrar la fuerza aproximada de penetración. Sin embargo, para la manufactura, el parámetro de utilidad fue el rango de dimensiones deseadas, puesto que el fabricante obtiene los resortes de manera experimental, y el material es acorde a la aplicación.

Para que el dispositivo fuese manipulado de forma manual, se utilizó el mecanismo tornillo-tuerca, con un tornillo M1 con paso de 0.25, generando un movimiento lineal de 250 [μ m] por cada vuelta completa; para el diseño de la tuerca, se recurrió a la geometría del motor que se implementará en el futuro diseño (ver Figura 30), sirviendo de base para diseñar un cuerpo prismático con rosca interna. Más adelante, en el diseño del cuerpo del *microdrive*, se aprecia la cavidad para el motor, al que se le agrega un tornillo para mantenerlo fijo.

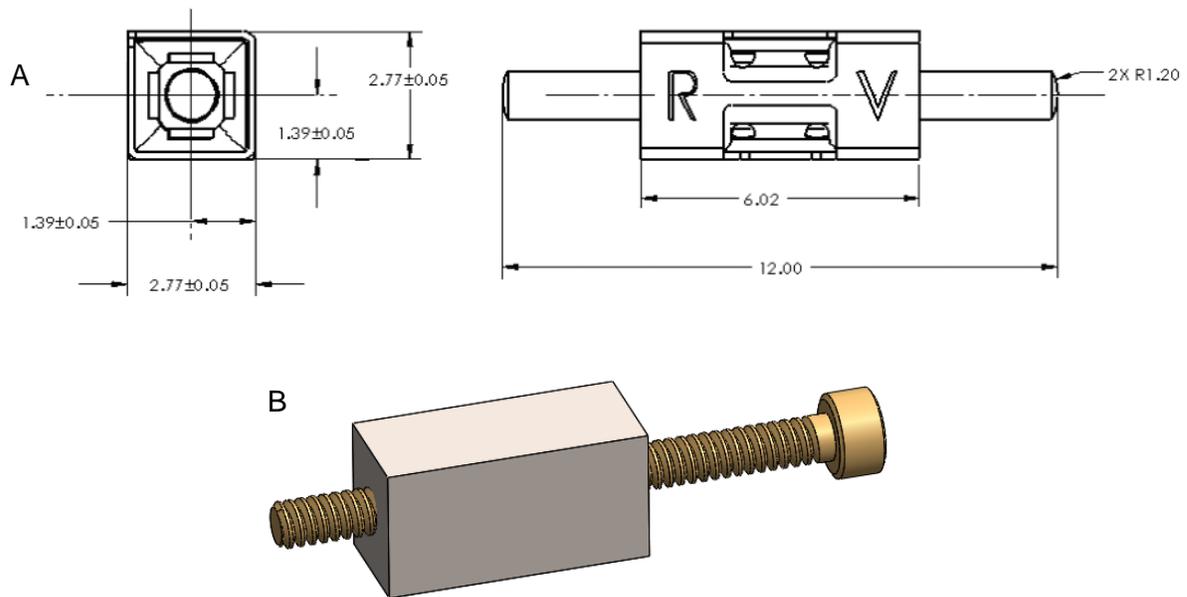


Figura 30. Diseño de la tuerca. A. Dimensiones del motor ultrasónico New Scale Tech [65]. B. Cuerpo roscado.

4.2.1.3 Diseño del cuerpo del microposicionador (carcasa).

El cuerpo, es la pieza que sufrió mayores modificaciones en sus geometrías, puesto que es de interés que sobre este mismo se coloque una plataforma que contenga el conector de 2x9 pines de manera fija, con el propósito de que la cánula junto con el pistón, sea el único elemento desplazado y así obtener un movimiento prácticamente lineal, manteniendo el conector estable para unirse al *headstage*. Para diseñar la plataforma, se tomaron en cuenta las dimensiones del conector Mill Max (ver Figura 31), el cual tiene un ancho de 3.05 [mm] y un espesor de 4.01 [mm], mientras que a través de la fórmula establecida en [66], se obtiene una longitud de 11.811 [mm].

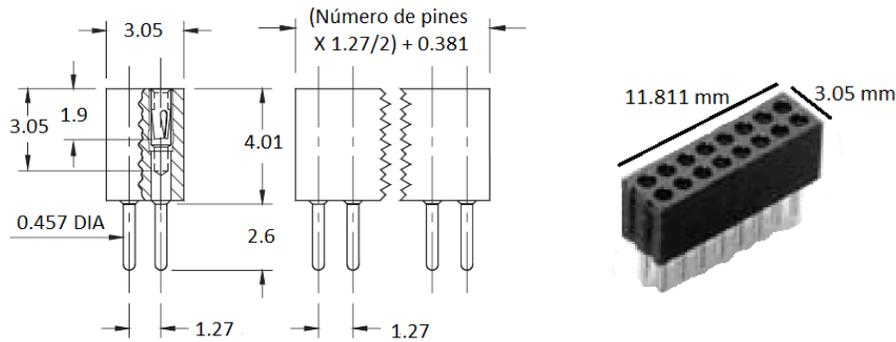


Figura 31. Especificaciones del conector Mill Max, unidades en [mm] [66].

Con las medidas definidas del conector, se prosiguió con una serie de iteraciones en el diseño del cuerpo, hasta llegar a la configuración mostrada en la Figura 32. En este diseño, los electrodos pasan a través de dos conductos (8 electrodos por cada conducto) de 0.7 [mm] de diámetro cada uno, para finalmente salir por la parte inferior del cuerpo, y ser soldados directamente al conector. La zona donde se facilitó la colocación de los conductos, fue en los extremos laterales del cuerpo, por lo que la cavidad del sensor, tuvo que colocarse en la parte frontal, en la que se diseñaron pestañas de acuerdo a la geometría del circuito encapsulado y así poderse montar adecuadamente, de acuerdo a la distancia caracterizada en [64] entre el sensor y el imán. Adicionalmente, se agregaron dos muescas en la parte superior, las cuales sirven para colocar una cubierta para proteger los electrodos.

Además, se agregó un canal para cada pin del sensor, que desemboca a un canal principal hacia la parte posterior del cuerpo, donde se pretende colocar posteriormente el circuito del sistema.

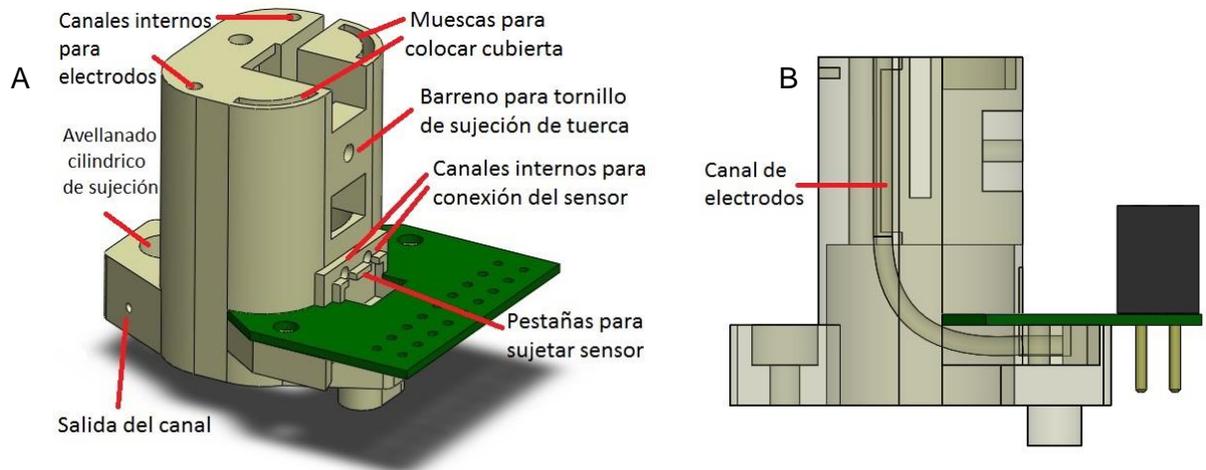


Figura 32. Modelo final del cuerpo. A. Estructura general. B Vista lateral izquierda.

4.2.1.4 Diseño de la protección de electrodos (cubierta).

A pesar de que el cuerpo está diseñado para proteger los electrodos, en la parte superior no quedan protegidos totalmente, bajo esta deficiencia se tuvo que diseñar una protección, considerando que no se caiga, aun estando sometido a golpes el microposicionador. Con las necesidades abordadas, la cubierta (Figura 33) contiene tres pestañas, en orden tal, que se evitan movimientos laterales y verticales.

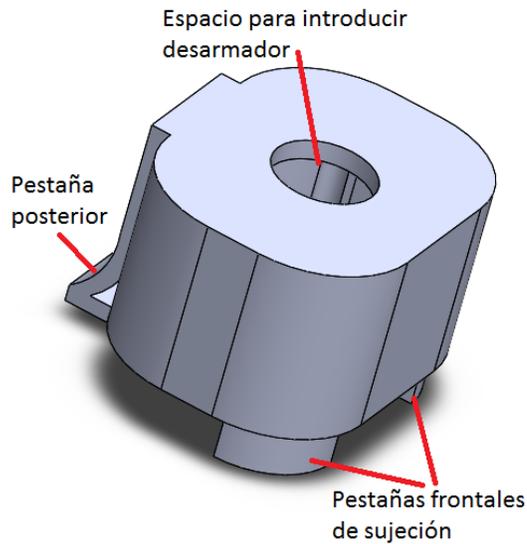


Figura 33. Diseño de la cubierta.

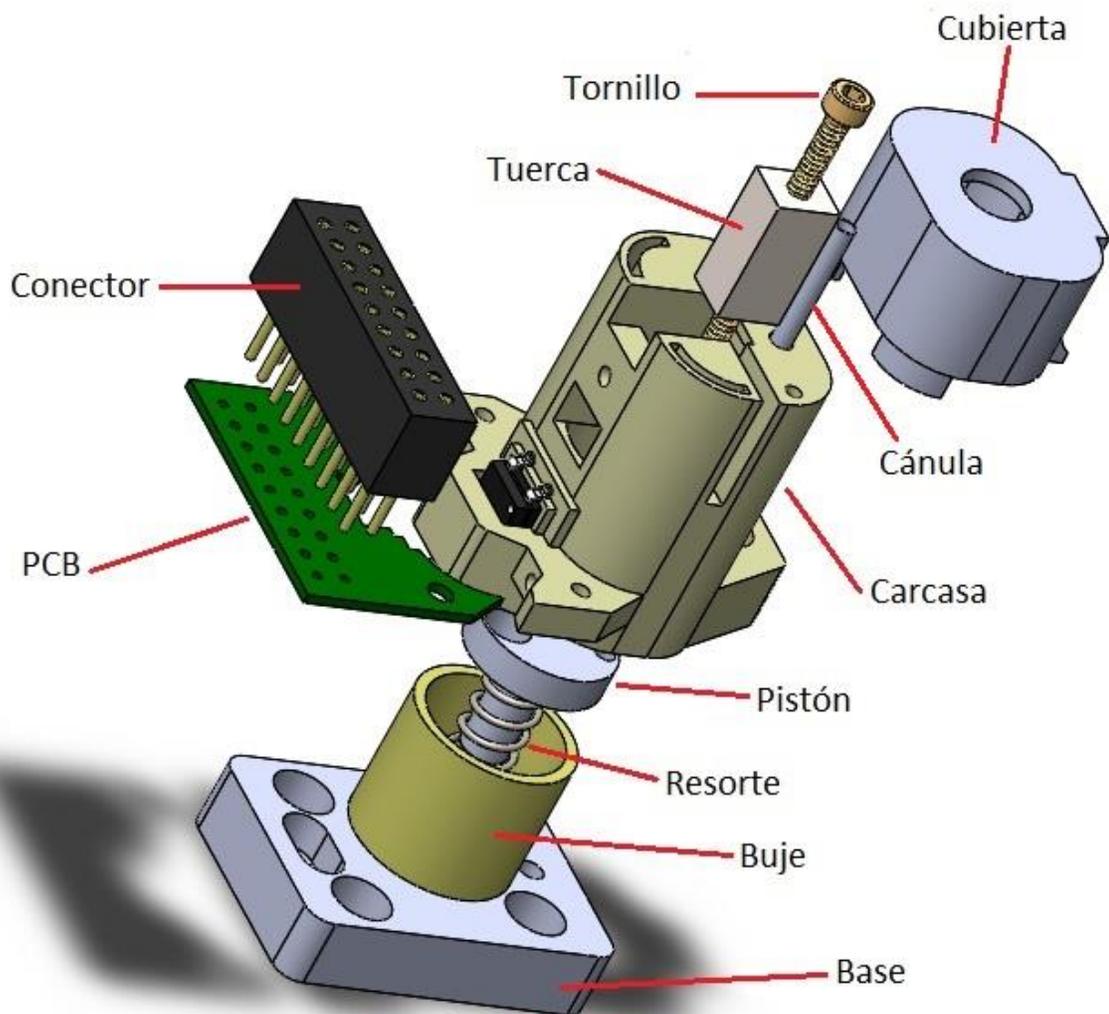


Figura 34. Vista explosiva del diseño final.

4.2.2 Manufactura.

Para la fabricación se trabajó con manufactura convencional (conformado por eliminación de material) y manufactura aditiva. El proceso de conformado que se utilizó fue fresado en CNC (Control Numérico por Computadora), el cual es capaz de ofrecer altas resoluciones; por otra parte, la manufactura aditiva facilita la fabricación de piezas con geometrías complejas. De esta manera, se combinaron ambos procesos para cubrir las necesidades del diseño.

4.2.2.1 Procesos de manufactura en el sistema.

Posterior a la etapa de diseño, se continuó con el maquinado de las piezas; para el proceso de fresado se utilizó el software VISI CAM de Vero Software, con el cual se configuraron las herramientas con sus respectivas operaciones y, finalmente se generó el código de instrucciones (código G). El proceso de fresado se llevó a cabo en una máquina de tres ejes (ver Figura 35), fabricándose la base, el pistón, el buje y la PCB, con un tiempo total estimado entre 3 y 4 horas de operación.

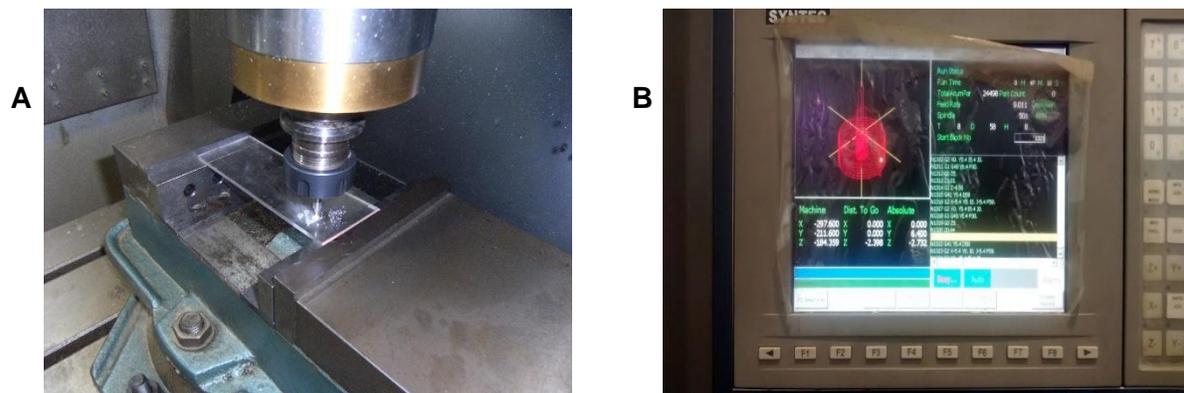


Figura 35. Máquina CNC Suzhou Baoma. A. Proceso sobre acrílico. B. Pantalla de control.

Para la manufactura aditiva se empleó material DM210 de Digital Wax Systems, para el cual, se utilizó el proceso de estereolitografía con el equipo DWS 020X. Por medio de este proceso, se fabricaron la carcasa, la cubierta y la tuerca.

En la Tabla 1, se encuentran asentados los procesos utilizados en la fabricación de cada una de las piezas, así como el tipo de material y masa.

Componente	Descripción	Material	Manufactura	Masa
1	Base	Acrílico	Fresado CNC	0.4 [g]
2	Pistón	Acrílico	Fresado CNC	0.1 [g]
3	Resorte	Acero inoxidable	Convencional	
4	Cánula	Acero inoxidable	Información no disponible	
5	Buje	Latón	Fresado CNC	0.5 [g]
6	Tuerca	DM210 Moulding Resin DWS	Aditiva	0.1 [g]
7	Cuerpo	DM210 Moulding Resin DWS	Aditiva	0.9 [g]
8	PCB	Información no disponible	Información no disponible	0.1 [g]
9	Conector		Fresado CNC	0.5 [g]
10	Cubierta	DM210 Moulding Resin DWS	Aditiva	0.3 [g]
				Total (sin tornillos) 2.9 [g]
				Total (con tornillos) 3.2 [g]

Tabla 1. Características de las piezas del microposicionador.

4.2.2.2 Ajustes y tolerancias en el diseño.

Han sido discutidas las necesidades de un sistema con alta precisión y al mismo tiempo un sistema confiable, que permita su operación durante varias semanas. Contemplando tales expectativas, fue necesario estudiar las tolerancias de las piezas fabricadas y el tipo de ajuste requerido, lo cual fue llevado a cabo de forma experimental y teórica, en apoyo con la norma ISO 286 [50], [67].

Dado que para el subsistema de posicionamiento se necesita alta precisión pero insignificante movimiento lateral, las piezas son diseñadas para ajuste con mínimo juego; por otra parte, el cuerpo que protege al mecanismo y contiene al conector, necesita tener ajuste con apriete en acoplamiento con la base, permitiendo que el ensamble prevalezca durante todo el tiempo de operación.

El prototipo desarrollado en [64], presenta un desplazamiento vertical suave y con mínimas desviaciones laterales, por lo que su juego se tomó como referencia para el microposicionador desarrollado en este trabajo. El ajuste entre el pistón y su respectivo

agujero en la base, una vez ensamblado el dispositivo en su totalidad, se obtuvo de manera experimental.

El ajuste entre el buje y el pistón implicó mayor rigurosidad en su diseño. Para el acoplamiento entre el eje del pistón y el agujero del buje, se optó por el sistema agujero normal, para lo cual con ayuda de la gráfica de posición de tolerancias (A.1) para un ajuste con poco juego y la tabla de ajustes preferentes (A.2), se obtuvo el diámetro del pistón para ser manufacturado.

En el laboratorio de Metrología del CCADET se realizaron mediciones de las piezas fabricadas, registrándose las que implicaron mayor interés en su ajuste. Las capturas de la Figura 36, ilustran el proyector de perfiles utilizado (lado izquierdo) y algunas piezas colocadas sobre la platina (lado derecho); gracias a este equipo se pudieron obtener las dimensiones límite, con lo cual fueron posteriormente calculadas la tolerancias, alcanzándose una calidad IT7 (ver A.3) por el pistón.

Se comprobó que el ajuste establecido entre el eje del pistón y el agujero del buje resultó adecuado, evitándose desviaciones laterales relevantes. Con base en esto, teóricamente para el ajuste entre el diámetro mayor del pistón y el diámetro interno del buje, bastaría un pequeño juego, con el fin de evitar fricciones significativas y que la fuerza del resorte fuese suficiente para que el pistón retrocediese libremente. Debido a la geometría del pistón, su diámetro mayor no pudo ser disminuido, por lo que se recurrió al sistema de ajuste de eje normal, y para esto, se fabricaron varios bujes con distintos diámetros internos, hasta que se alcanzó un movimiento más suave en el mecanismo.



Figura 36. Medición de piezas fabricadas con el proyector de perfiles NIKON Profile Projector V-16D (Laboratorio de Metrología CCADET).

Finalmente, para el acoplamiento entre la cánula y el pistón, se eligió ajuste con apriete, tomando el mismo diámetro tanto para el agujero como para el eje, mientras que para el acoplamiento entre cánula y buje, se empleó el mismo juego designado en [64].

En cuanto a la carcasa, hay dos zonas de interés sobre sus ajustes, la geometría de sujeción con la base y el acoplamiento con la tuerca. Se sabe que el ensamble de la base con la carcasa debe mantenerse a pesar de los movimientos de la rata, por lo tanto, se decidió fabricar la muesca de la base y la pestaña de la carcasa con las mismas dimensiones y con base en el ensamble, se procedió a eliminar material de la pestaña en medida que se fuera obteniendo un ajuste sin juego pero de fácil acoplamiento; por otra parte, de manera experimental se estableció un juego entre la tuerca y la carcasa.

Después de haber obtenido ajustes y tolerancias adecuados, se procedió con el ensamble de acuerdo al orden que fue descrito en la etapa de diseño.

4.2.3 Ensamble.

El ensamble consta de las piezas enlistadas en la Tabla 1, de las cuales, siete piezas fueron manufacturadas (ver Figura 37) y tres fueron adquiridas (resorte, cánula, conector).

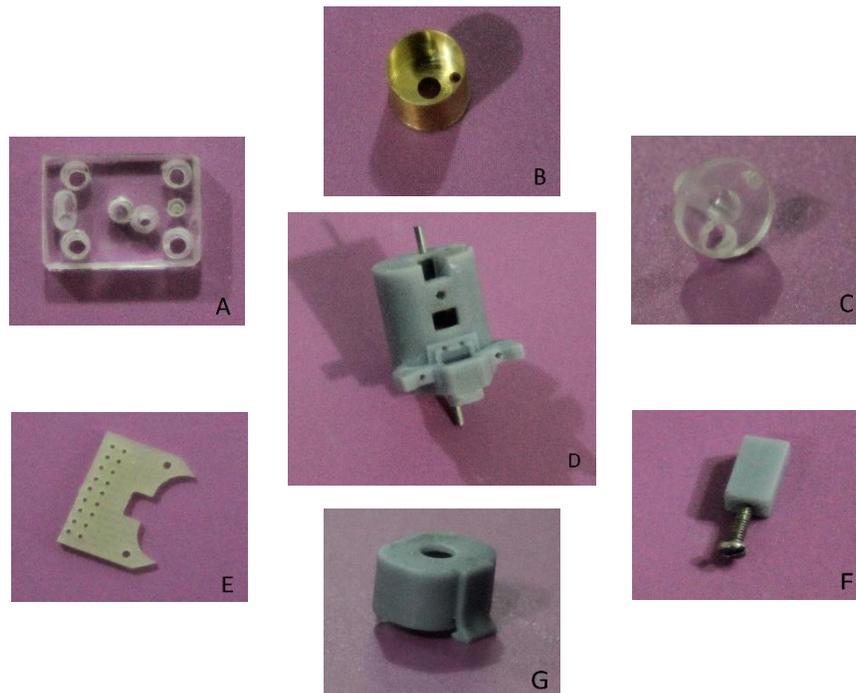


Figura 37. Piezas manufacturadas. A. Base. B. Buje. C. Pistón. D. Carcasa. E. PCB. F. Tuerca. G. Cubierta.

La primera etapa consistió en el ensamble del mecanismo, es decir, el buje con el pistón, resorte y cánula, de lo que se verificó que el pistón junto con la cánula se desplazara libremente a través del buje. Posteriormente, el mecanismo se acopló a la carcasa, corroborando nuevamente que la cánula estuviera libre de fricciones significativas. Una vez concluida esta etapa, se montó la carcasa sobre la base, manteniéndose fija por medio de su tornillo de sujeción, de acuerdo a lo estudiado en la etapa de diseño. Por tercera vez se comprobó que no existieran fricciones que limitaran el desplazamiento de la cánula. Como último paso de ensamble, se colocó la PCB con el conector.

Este proceso se puede apreciar en la Figura 38.

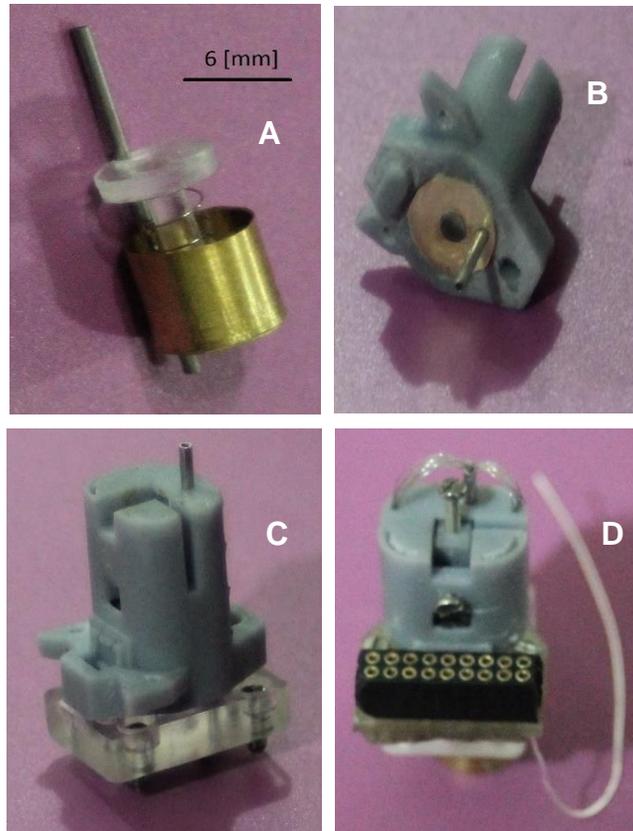


Figura 38. Proceso de ensamble y soldadura. A. Ensamble del mecanismo. B. Acoplamiento del mecanismo con la carcasa. C. Colocación de la base. D. Sujeción de la PCB y conector.

4.3 Arreglo de electrodos.

Como ha sido mencionado, se necesita de un arreglo de 16 electrodos soldado a un conector Mill Max de 2x9 pines, para lo cual ya ha sido definido el uso de una cánula 20G.

El tipo de electrodo elegido para este trabajo, consiste en alambre de acero inoxidable de 50 [μm] de diámetro, con aislante de teflón, teniendo un diámetro total de 114 [μm]; el alambre se adquirió en carrete (ver Figura 39), por lo que se recurrió a la tarea de enderezar pequeños segmentos de aproximadamente 80 [mm] de longitud.



Figura 39. Carrete de alambre de acero inoxidable, AM Systems [68].

El procedimiento de enderezamiento fue basado en el trabajo realizado en [69], para lo cual, en la Figura 40 se muestra un alambre después del procedimiento realizado.

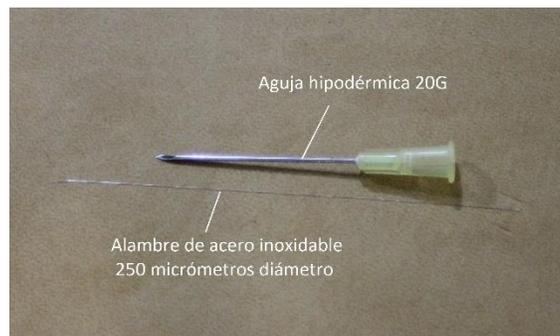


Figura 40. Electrodo después de haber sido enderezado.

Una vez enderezados los electrodos, se introdujo uno a uno desde la parte inferior de la cánula hasta salir por la parte superior, para después ser introducidos equitativamente por los dos conductos de la carcasa, y finalmente poder ser soldados al conector al salir de la parte inferior de los conductos.

La Figura 41 muestra cómo quedó el arreglo de electrodos ya enderezados e introducidos en la cánula, los cuales fueron cortados a 1 [mm] respecto al extremo inferior de ésta última.

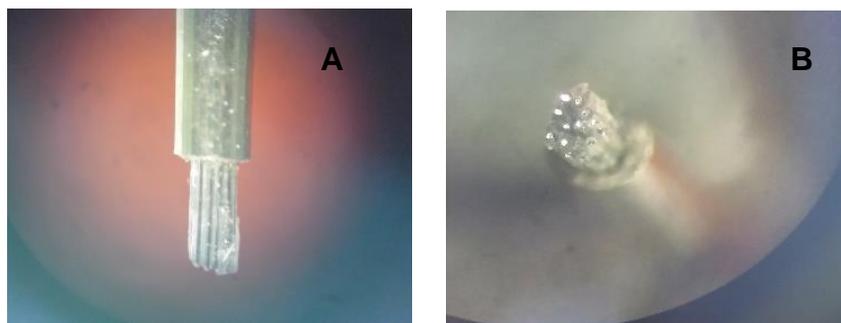


Figura 41. Colocación de los electrodos. A. Vista lateral de la cánula. B. Vista inferior de la cánula. C. Ensamble del microdrive con electrodos.

Para soldar los electrodos al conector, se tomó como base el diagrama de conexión que se ilustra en la Figura 42 (lado izquierdo), en el cual los pines están apuntando hacia afuera de la hoja. Con ayuda de un microscopio, se soldaron los 16 alambres de acero inoxidable mediante la aplicación de un flux para trabajar sobre acero inoxidable y un alambre de plata como referencia. En la misma figura (lado derecho) se aprecia una fotografía de un conector montado sobre la PCB después de haber sido soldado, al que posteriormente se le agregó una capa de epóxica para proteger a los electrodos de otras sustancias y evitar posibles desprendimientos de los mismos.

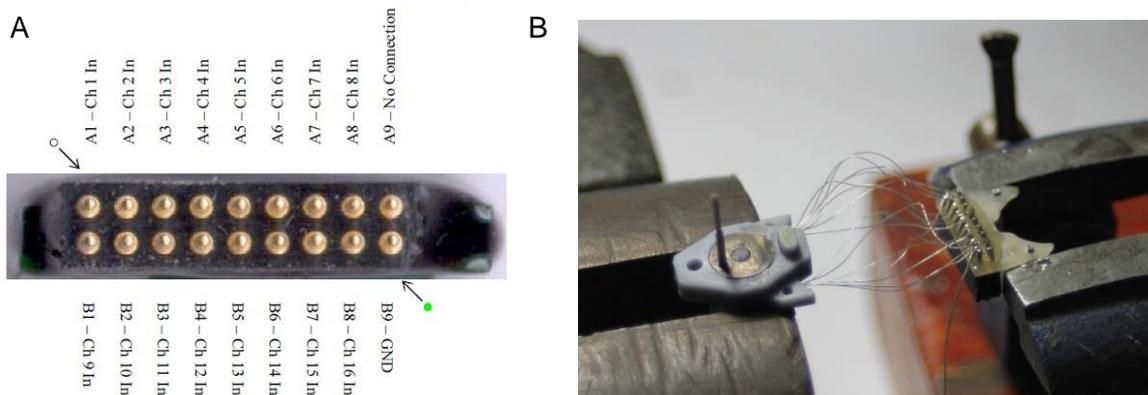


Figura 42. Proceso de soldadura entre conector Mill Max y electrodos. A. Diagrama de conexión. B. Conector montado sobre PCB después del proceso de soldado.

Finalmente, después del proceso de soldadura, el ensamble queda como es apreciado en la Figura 43, donde se ve cómo los electrodos salen de la cánula y entran a través de los conductos de la carcasa.

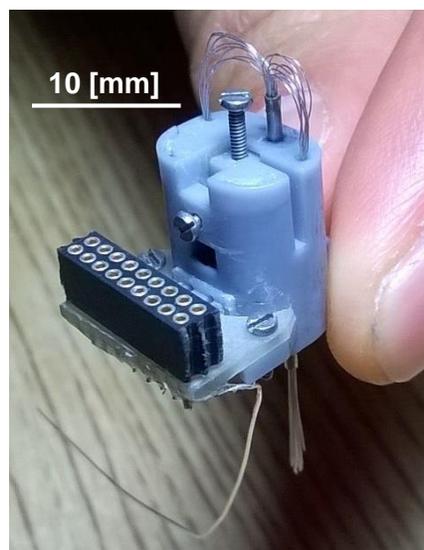


Figura 43. Ensamble final con los 16 electrodos.

4.4 Proceso para ajuste de impedancias

(*Gold-plating electrode tip*).

Para alcanzar el rango de impedancias entre 250 y 350 [k Ω], establecido en las especificaciones, se emplea el proceso de *gold-plating electrode tip* estándar, llevándolo a cabo de la manera a continuación planteada.

El equipo utilizado para el proceso es el NanoZ Impedance Tester [70], diseñado específicamente para arreglos de microelectrodos multicanal. Algunas de sus características son citadas a continuación:

- 64 canales
- Rango de trabajo de 1[k Ω] hasta 100 [M Ω]
- Frecuencias de medición de 1 [Hz] hasta 5 [kHz]
- Resolución de 1 [k Ω] para frecuencias menores a 2 [kHz]
- Corriente de electroplating de -12 [μ A] a +12 [μ A]

El NanoZ es conectado a un adaptador, conteniendo éste última cierta cantidad de canales en función del tipo de arreglo de electrodos. El laboratorio del IFC cuenta con un adaptador universal, y éste incluye 18 pines, de los cuales 16 son destinados para los electrodos, uno para la tierra y el último no tiene relevancia.

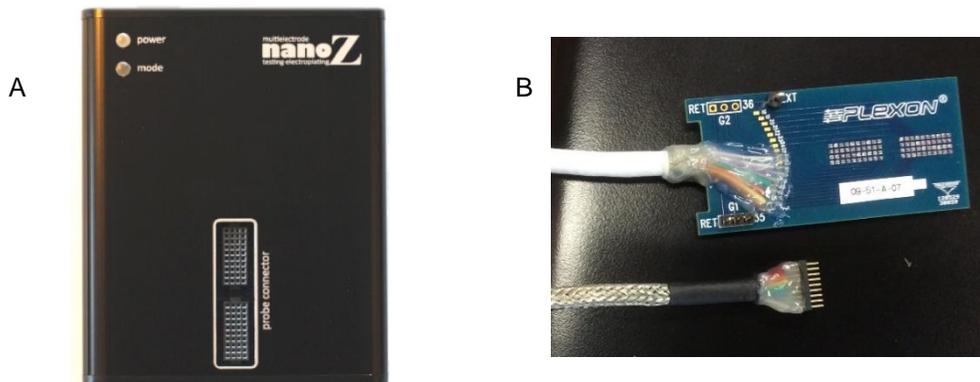


Figura 44. Dispositivos del sistema de reducción de impedancias. A. NanoZ Impedance Tester. B. Adaptador Universal PLEXON.

En la Figura 44 se muestra el probador de impedancias NanoZ y el adaptador universal utilizado. Adicionalmente, se utilizó un cable de platino al 99.9%, el cual fue conectado al adaptador por medio de un cable caimán.

La solución líquida para el electroplating fue oro libre de cianuro (SIFCO 5355), en el que se introdujo la punta del arreglo de electrodos del *microdrive* y el alambre de platino, actuando estos como ánodo y cátodo en el proceso de la electrólisis. El *microdrive* fue sujetado con ayuda de un soporte universal y, finalmente, se estableció comunicación entre el NanoZ y una computadora por medio de un cable USB. Este proceso se observa en la Figura 45.

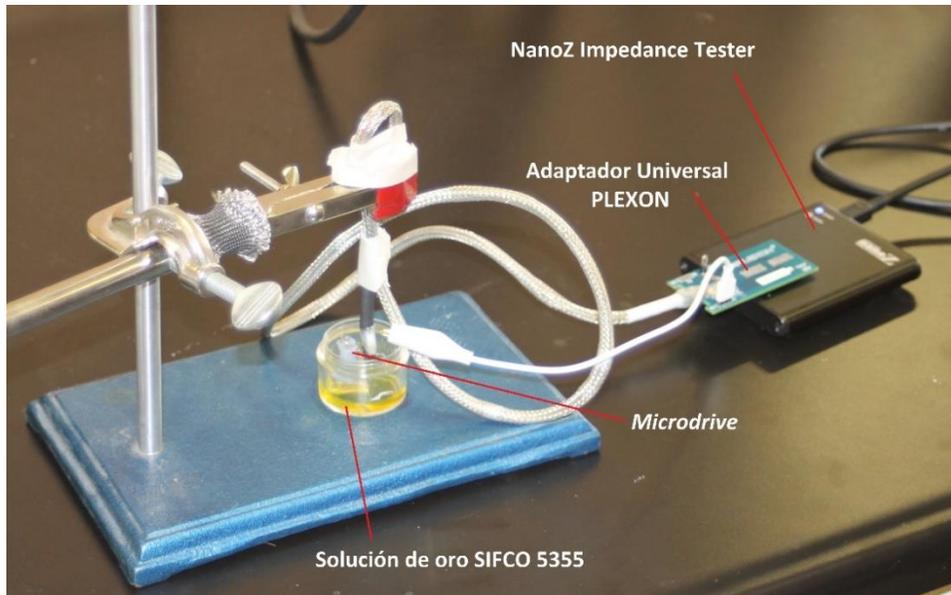


Figura 45. Montaje del proceso gold-plating electrode tip.

Después de haber sido montado el sistema, se procedió con la lectura de impedancias, y dado que el adaptador es universal, en la pantalla de control (Figura 46) del NanoZ se seleccionaron las opciones “No adaptor” y “Probe not selected”.

De acuerdo a la literatura, se ha encontrado que para registro extracelular es recomendable trabajar con electrodos con una frecuencia de 1 [kHz]. Consultando el manual del probador de impedancias, se recomienda realizar la prueba de medición a 40 ciclos, pero si se quiere mayor precisión se puede aumentar la cantidad; el *delay* normalmente utilizado es de 0 [s], pero si en la experimentación algunos canales no se pueden medir, significa que la capacitancia de los electrodos es elevada, y por lo tanto se podrá incrementar el *delay*.

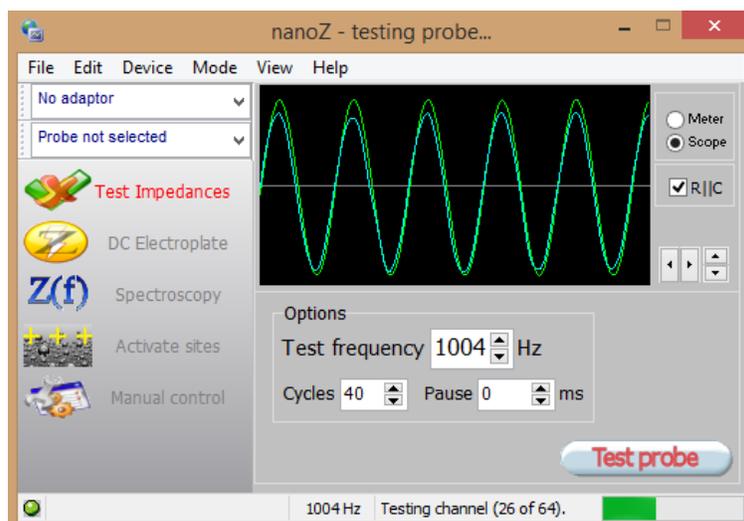


Figura 46. Ambiente de control del NanoZ en modo probador de impedancias (Test Impedances)

El siguiente proceso realizado es el *electroplating*, para el cual, en la pantalla de control (Figura 47) se seleccionó el modo “*Match impedances*” en *DC Electroplate*, que de acuerdo al trabajo realizado en [55], se necesitan corrientes negativas para reducir impedancias, siendo recomendado $-1 \mu\text{A}$.

Los parámetros utilizados fueron los recomendados en el manual del NanoZ, seleccionado un intervalo de 5 [s], un *delay* de 3 [s] con 5 carreras. El intervalo indica el tiempo durante el cual será aplicada la corriente seleccionada, seguido del retardo indicado, ocurriendo este proceso hasta llegar a la impedancia objetivo. El tiempo total del proceso estará en función del número de corridas.

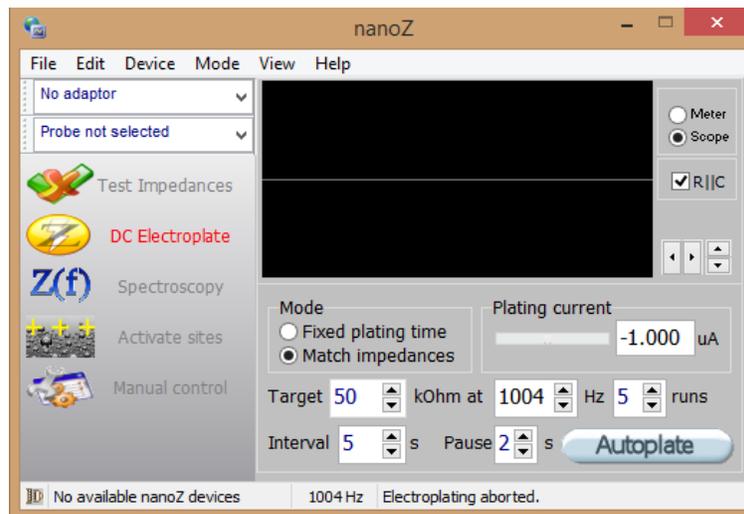


Figura 47. Ambiente de control del NanoZ en modo DC Electroplate.

En el apartado de pruebas y resultados se muestran los valores obtenidos en el test de impedancias y en el proceso de *electroplating*.

PRUEBAS Y RESULTADOS

Para que los resultados en el registro extracelular sean favorables, es de interés evaluar las características del *microdrive*, realizando una comparación con la literatura y los parámetros establecidos en las especificaciones. Para esto, primeramente se verifica si las mediciones físicas son adecuadas para el sistema, evaluando posteriormente el movimiento de la cánula a través de la obtención de su resolución y el estudio de desviaciones laterales; enseguida, se valora el test de impedancias, pues ello será crucial para conseguir la medición de actividad neuronal; para concluir, se aborda también la implantación del dispositivo así como el comportamiento de la rata después de ésta.

5.1 Mediciones físicas.

Ha sido enfatizado que el volumen y el masa del *microdrive* son parámetros que deben estar en ciertos rangos preferentes. De esta manera, en la Tabla 1 se presentó un concentrado con el peso de cada pieza y el peso del ensamble final.

Para comparar los valores obtenidos físicamente con los valores de las especificaciones, en la Tabla 2 se muestran los pesos, así como las dimensiones y volumen total, éste último obteniéndose por medio del software utilizado para el CAD.

Se concluye que el peso neto conseguido se encuentra muy por debajo del peso teórico máximo, y por otra parte, a pesar de que el volumen real también es menor que el especificado, las dimensiones reales son mayores; sin embargo, se encontró que en otros prototipos con dimensiones mayores a las que aquí se presentan, no se manifestaron problemas significativos en la implantación.

Parámetro	Valor especificado	Valor obtenido
Masa (g)	< 25	3.2
Dimensiones (mm)	< 20x10 (base) x10 (altura)	12.8 x 17.6 (base) x 21.3 (altura)
Volumen (mm ³)	2000	1550.8

Tabla 2. Comparación de los parámetros físicos especificados contra los parámetros obtenidos.

5.2 Evaluación de desvíos en la trayectoria y resolución de avance.

Para la evaluación del movimiento de la cánula, se empleó el proyector de perfiles del laboratorio de Metrología, con el que se consiguieron la carrera real, la resolución del avance y la valoración de desviaciones.

La carrera del diseño se había establecido de 0 a 2.7 [mm]; sin embargo, la carrera obtenida por el proyector fue de 2.4 [mm].

Definiéndose la resolución del sistema como el mínimo avance debido a la manipulación del tornillo, experimentalmente se alcanzaron avances de aproximadamente 31 [μm] al rotar el tornillo 1/8 de vuelta, con lo que se estima que se pueden alcanzar resoluciones más bajas en medida de cuanto se rote el tornillo.

A lo largo del desplazamiento de la cánula, mediante su proyección en el sistema de referencia del proyector (Figura 48), se pudo observar que no se presentaron desviaciones laterales aparentes.



Figura 48. Orientación de la cánula proyectada en el sistema de referencia del proyector de perfiles NIKON Profile Projector V-16D

Para cerrar esta etapa de pruebas, con el fin de estudiar la linealidad de avance, se registraron mediciones para cada vuelta de tornillo, el cual como fue descrito, es capaz de avanzar teóricamente 250 [μm/rotación]. Estos resultados son ubicados en la Tabla 3, llevados a cabo para las vistas posterior y lateral del microdrive.

Posición teórica (μm)	Posición Experimental (μm)	
	Vista posterior	Vista lateral
250	246	251
500	493	507
750	743	753
100	991	1001
1250	1245	1265
1500	1491	1507
1750	1744	1726
2000	1995	1992
2250	2236	2245
2375	2385	2369

Tabla 3. Avance de la cánula por cada rotación de tornillo.

Con los resultados obtenidos, se realizaron las gráficas de dispersión de las posiciones esperadas contra las posiciones reales (Figura 49), incluyendo su respectiva recta de ajuste lineal. Mediante cálculo, para la vista posterior se obtuvo un coeficiente de determinación R^2 de 0.9999 y para la vista lateral de 0.9998, concluyéndose que los valores reales son muy próximos a los teóricos.

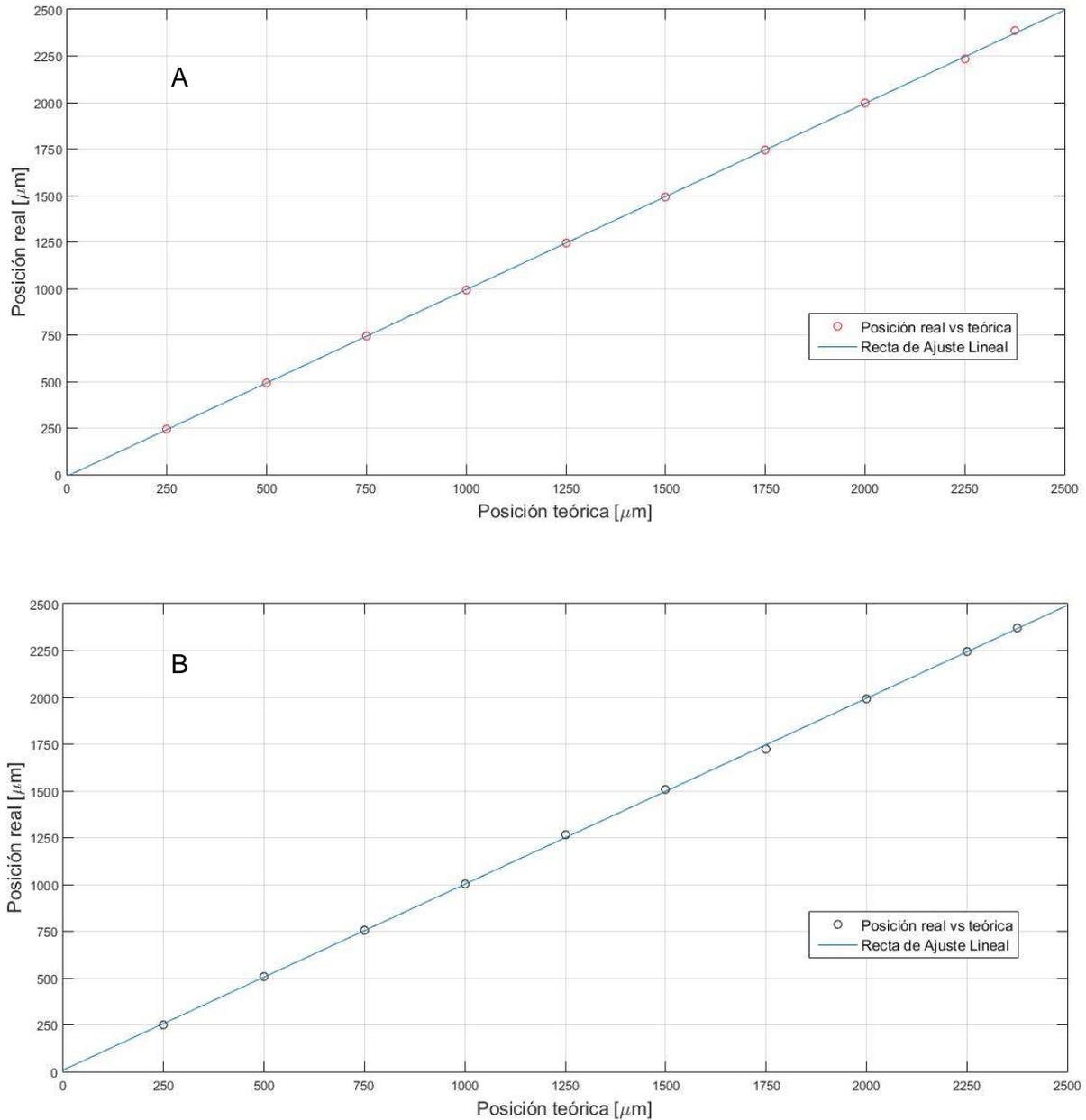


Figura 49. Gráficas de dispersión de la posición teórica contra la posición real para las vistas posterior (A) y lateral (B) del microdrive.

5.3 Test y ajuste de impedancias.

Para saber en qué rango de frecuencias se encontraban los electrodos, primeramente se realizaron pruebas en modo *Test Impedance* del NanoZ; dado que la frecuencia recomendada para trabajar con electrodos en el registro extracelular es de 1000 [Hz], inicialmente se tomaron mediciones de impedancia a esta misma frecuencia, pero para fines de análisis, también se consideraron mediciones a frecuencias de 10 [Hz], 100 [Hz] y 5000 [Hz]. En la Figura 50 se encuentran los resultados arrojados por el sistema.

Durante el proceso de soldadura dos electrodos no quedaron conectados, por lo que teóricamente se tendrían 14 en uso; sin embargo, al obtenerse las tablas se aprecia que en dos canales más tampoco se estableció conexión, ya que las impedancias estaban muy por encima del resto. También, en los canales del 17 en adelante, se puede ver que el valor de las impedancias es muy elevado, esto debido a que se encuentran en circuito abierto por no existir conexión con algún electrodo.

El rango de impedancias que se buscaba está entre 250 [kΩ] y 350 [kΩ], pero en algunas investigaciones se han conseguido buenos resultados para rangos entre 30 [kΩ] y 70 [kΩ], por lo tanto, el siguiente paso fue seleccionar los canales en que las impedancias fueran mayores a los 30 [kΩ] a una frecuencia 1 [kHz]. De esta manera, se detectaron 10 canales funcionales. Con estos, se realizó una comparación de impedancia contra frecuencia (Figura 51), coincidiendo con la teoría, en que a menor frecuencia mayor impedancia y a mayor frecuencia menor impedancia.

	10.02 Hz		100.2 Hz		1004 Hz		5000 Hz	
	Mag (MΩm)	Phase(°)						
1	13.209	-18.0	8.349	-42.0	1.849	-75.7	0.484	-83.2
2	2.168	-69.7	0.305	-75.7	0.050	-64.0	0.021	-51.2
3	1.328	-73.1	0.171	-75.5	0.033	-56.1	0.015	-45.7
4	9.265	-10.4	7.132	-28.5	1.865	-72.5	0.488	-82.1
5			7.753	-32.0	1.743	-75.2	0.454	-82.2
6	2.754	-66.6	0.390	-75.7	0.056	-67.9	0.021	-53.4
7	2.027	-67.0	0.302	-71.2	0.045	-60.1	0.020	-50.2
8	1.917	-58.2	0.332	-65.6	0.071	-55.7	0.029	-59.0
9	30.907	-19.5	13.586	-50.9	1.909	-79.5	0.494	-83.7
10	0.780	-71.0	0.144	-61.5	0.026	-56.6	0.012	-51.7
11	2.486	-71.9	0.349	-70.8	0.060	-58.6	0.027	-49.6
12	2.949	-68.2	0.405	-74.4	0.065	-61.6	0.025	-54.8
13	0.494	-72.3	0.084	-53.5	0.020	-44.9	0.012	-36.7
14	1.076	-72.9	0.137	-64.4	0.034	-45.3	0.018	-44.4
15	1.428	-37.8	0.344	-63.1	0.058	-61.2	0.024	-53.4
16	1.593	-67.2	0.246	-66.0	0.045	-60.5	0.019	-50.1
17	157.850	169.0	205.060	160.0	51.751	-88.2	8.397	92.3
18	329.180	25.3	957.360	-111.0	62.926	-96.7	8.530	101.0
19	284.700	32.4	2394.600	174.0	68.554	-92.5	8.001	98.5
20	261.500	33.5	4728.300	33.5	66.059	-91.9	7.470	99.7

Figura 50. Tablas de las impedancias obtenidas antes de electroplating para distintas frecuencias.

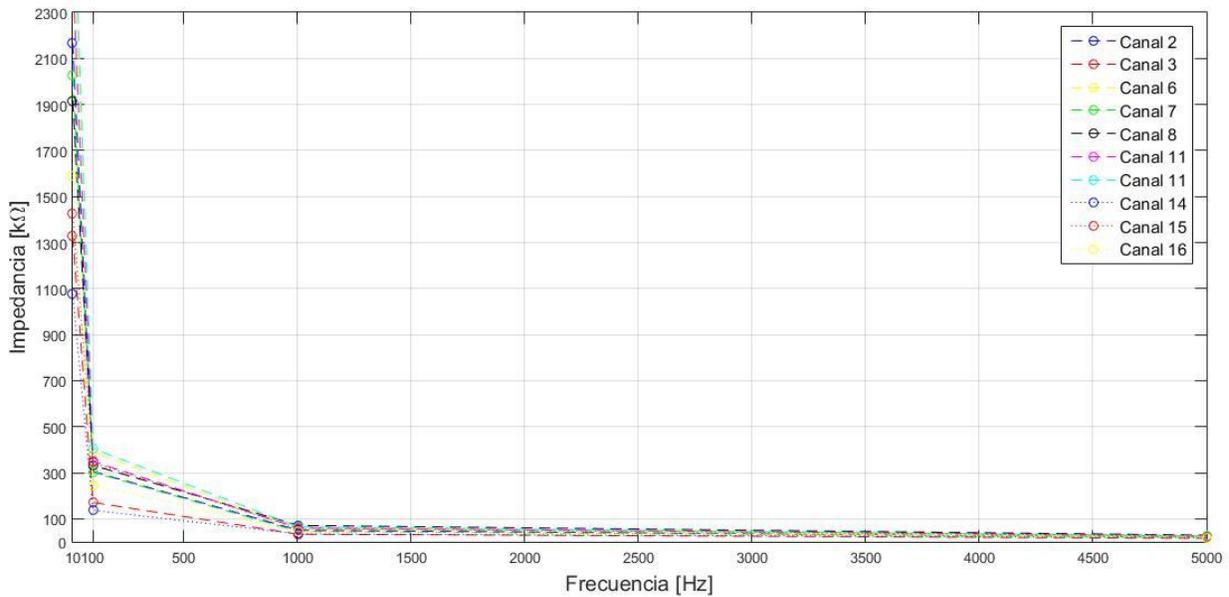


Figura 51. Gráfica de Impedancia vs Frecuencia.

Los canales seleccionados se encontraron entre 33 [kΩ] y 71 [kΩ], se procedió entonces con pruebas de *electroplating* para cerrar más el rango y llegar hasta máximo 50 [kΩ]. Con esto se podría constatar el correcto funcionamiento del equipo y el proceso. Estos resultados son mostrados en las tablas de la Figura 52. Se observa que las impedancias disminuyeron considerablemente, quedando fuera de uso 3 canales. Se aplicó el proceso inverso con corriente positiva para volver a subir las impedancias, pero no se logró incrementar en gran medida las magnitudes

	10.02 Hz		100.2 Hz		1004 Hz		5000 Hz	
	Mag (MΩm)	Phase(°)						
1	6.885	-7.9	4.826	-23.4	1.759	-67.7	0.479	-81.0
2	0.707	-71.8	0.104	-67.6	0.017	-62.5	0.007	-36.5
3	0.399	-76.9	0.059	-65.6	0.016	-42.0	0.009	-32.7
4	4.469	-4.5	3.654	-13.0	1.694	-61.8	0.485	-79.1
5	4.845	-7.0	4.273	-18.5	1.653	-67.9	0.451	-81.3
6	1.093	-65.7	0.166	-68.7	0.026	-53.9	0.013	-43.1
7	1.539	-60.2	0.257	-68.1	0.044	-59.1	0.020	-43.1
8	1.626	-47.3	0.359	-62.8	0.075	-52.9	0.037	-48.5
9	10.482	-9.8	8.960	-31.7	1.870	-76.3	0.487	-83.7
10	0.669	-69.0	0.121	-64.2	0.026	-57.8	0.011	-45.5
11	2.040	-68.1	0.303	-70.0	0.058	-51.7	0.029	-47.0
12	1.448	-68.4	0.195	-77.6	0.034	-60.8	0.016	-40.7
13	0.422	-66.2	0.090	-64.6	0.022	-38.5	0.013	-38.4
14	1.253	-71.9	0.173	-65.0	0.039	-47.1	0.021	-44.2
15	1.224	-37.5	0.297	-66.0	0.058	-57.1	0.024	-46.9
16	1.478	-60.3	0.242	-66.1	0.042	-57.5	0.018	-52.5

Figura 52. Tablas de las impedancias después de electroplating a 50 [kΩ] para distintas frecuencias.

5.4 Prueba de implantación.

La cirugía para la implantación fue llevada a cabo en el Departamento de Neuropatología Molecular por personal experto en la materia, ejecutándose de manera relativamente rápida y sencilla. Los protocolos para las cirugías son aprobados por un comité interno del IFC, de acuerdo al *Institutional Animal Care and Use Committee* de la Universidad Nacional Autónoma de México, en cumplimiento con los lineamientos de cuidado de animales de laboratorio del *National Ministry of Health*.

En el procedimiento, se ubicaron las coordenadas de los cuatro tornillos de sujeción con el estereotáxico (ver Figura 53). Posteriormente fue agregada una sustancia para evitar infecciones y finalmente se realizaron suturas.

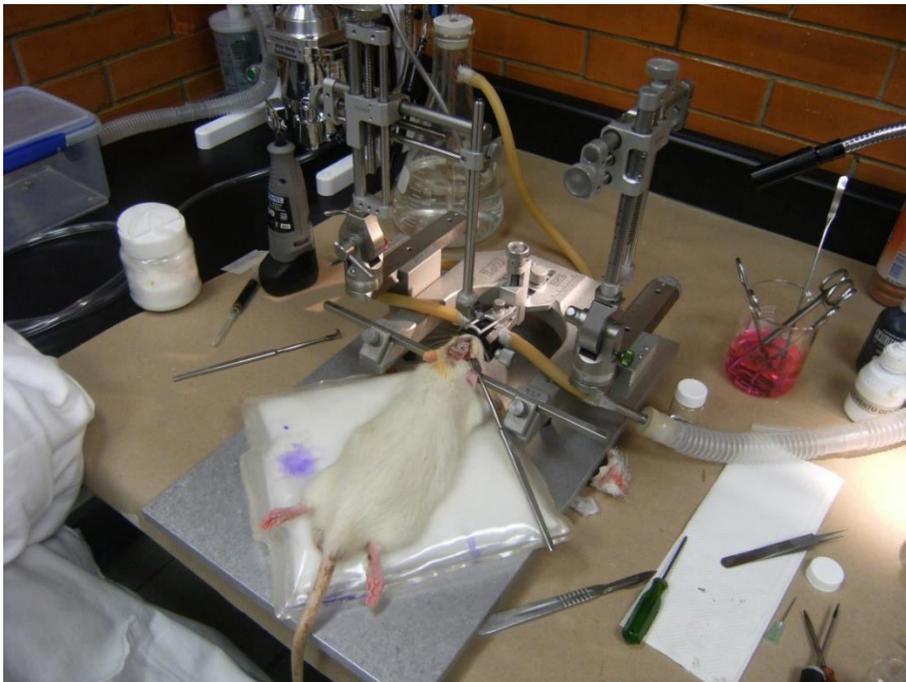


Figura 53. Rata en proceso de cirugía, Instituto de Fisiología Celular.

Durante la montura (Figura 54) del *microdrive* al cráneo, se realizaron observaciones para modificar la geometría de la base, con el fin de evitar posibles daños en la rata debido a las esquinas, además se planteó la implementación de un acoplamiento en el estereotáxico. Este acoplamiento consiste en un cuerpo capaz de sujetar al *microdrive*, y así poder bajarlo de manera suave hasta el cráneo, evitando de esta manera la menor cantidad de gliosis formada alrededor de los electrodos; finalmente sería liberado el *microdrive*. Tanto la sujeción como la liberación deben ser realizadas de manera sencilla.

El laboratorio mantiene a las ratas en contenedores, de los cuales se observó que sus tapas deben ser cambiadas por otras que permitan el libre movimiento del animal sin que existan estancamientos del *microdrive* con las rejillas.

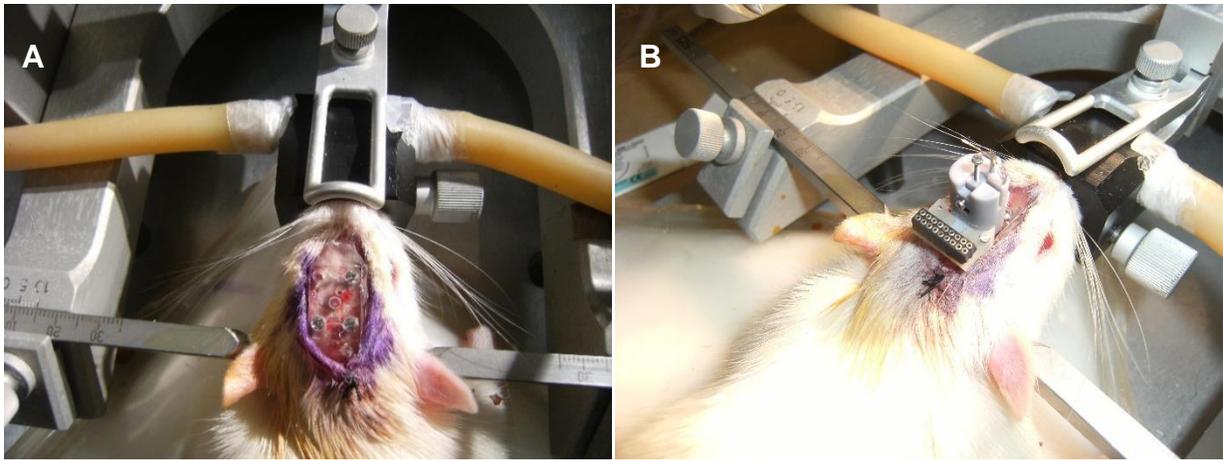


Figura 54. Implantación del microposicionador. A. Base colocada sobre el cráneo. B. Montura del dispositivo.

Después de la cirugía, la rata duró con el dispositivo 17 días, reportándose un comportamiento normal en esta. Durante este tiempo se notó que las dimensiones y el peso son adecuados, por lo tanto, a pesar de que las dimensiones fueron mayores a las deseadas, no representaron problema alguno. Lo que sí es importante considerar es el mejoramiento del ensamble, para que el microposicionador se mantenga fijo al cráneo durante más tiempo, y por ende tener más experimentaciones.

La lectura de actividad eléctrica implica haber trabajado con las ratas en pruebas conductuales, implicando algunas semanas de actividad. Añadiendo el tiempo para las tareas pendientes para el implante, es que para este trabajo no se incluyen registros extracelulares.

DISCUSIÓN

Con base en cada etapa de pruebas, a continuación se presenta un resumen con los resultados obtenidos, los cuales son comparados con las características del diseño planteadas en un principio.

Sobre las mediciones físicas, de acuerdo a la Tabla 2 se observa que la masa final de 3.2[g] representa casi un 13% de la masa establecida como máximo (25 [g]). En cuanto a las dimensiones, se obtuvo una base de 225.28 [mm²] y una altura de 21.3 [mm], lo que representa un 12% y 113% más, respectivamente, en comparación a las dimensiones inicialmente establecidas. En conclusión, la masa se logró reducir considerablemente; sin embargo, las dimensiones no, pero tras las observaciones después de la implantación se concluye que estas dimensiones no representaron problema alguno en la actividad de la rata.

Es importante resaltar que el correcto desempeño del posicionamiento es una de las principales exigencias en el diseño, siendo este favorecido al alcanzarse desplazamientos de bajas resoluciones, con coeficientes de determinación de 0.9999 y 0.9998, lo cual indica que el avance real fue muy próximo al teórico, (ver tabla de dispersión en la Figura 49), además, las desviaciones laterales son insignificantes al haberse observado el movimiento en el comparador óptico.

Se obtuvo un rango de impedancias entre 30[k Ω] y 70[k Ω], lo cual está fuera del rango establecido entre 250[k Ω] y 350[k Ω]; sin embargo, de acuerdo a las investigaciones realizadas en [57], los resultados obtenidos del registro para impedancias entre 30[k Ω] y 70[k Ω] también son favorables. Por otra parte, analizando más a fondo esta etapa, se sabe que los valores de impedancias alcanzados se deben al calibre del electrodo, por lo tanto, será necesario implementar un diseño que contemple alambres de menor diámetro si se desean mayores impedancias. Para el proceso de *electroplating*, de acuerdo a la Ley de Faraday, la cantidad de material depositado está en función de la cantidad de corriente aplicada, por lo que también será necesario experimentar en el comportamiento del ajuste de impedancias para distintas corrientes, así como para distintos tipos de materiales, con lo cual se podrán realizar ajustes más exactos, puesto que la aplicación de -1 [μ A] para reducir impedancias en el orden de [k Ω] no fue la más adecuada. Estas experimentaciones serán importantes, puesto que los resultados en el registro de actividad neuronal, están en función del correcto ajuste de impedancias.

Finalmente, durante la implantación del dispositivo, se observó una complicación al colocar la base sobre la superficie del cráneo, ya que este presenta irregularidades, por lo tanto, para mantener fijo el *microdrive*, se requiere ser lo más exacto posible para que los tornillos coincidan con sus respectivos agujeros. Pero por otra parte, en caso de que se tenga que sustituir la rata en estudio, el uso de dicha base posibilita la reutilización del sistema. Es necesario además, que se diseñe un elemento que se vincule al estereotáxico y sujete al *microdrive*, con el fin de que la colocación sobre la base sea muy suave. De esta manera, las correcciones brindarán mejores resultados durante y después de la cirugía, con lo cual, se podrá dar paso a la adquisición de actividad neuronal, y posteriormente a la implementación de un sistema motorizado.

Algunos autores, desde la década de 1950, trabajaron con sistemas basados en el mecanismo de un tornillo para producir movimiento lineal, tales como los encontrados en [28]-[33], en los que fueron reportadas resoluciones de hasta 200 [μm]. Fue hasta 1996 con McNaughton y sus colaboradores [32], que se comenzaron a utilizar electrodos de baja impedancia y sensores de posicionamiento. Para 2001, en Bell Laboratories, se desarrolló el primer *microdrive* con motores de corriente directa, con una masa de 1.5 [g]. En 2008 se construyó un sistema con 21 tetrodos independientes; sin embargo, la masa se incrementó hasta 40 [g]. Posteriormente, en 2011, Korea desarrolló un *microdrive* con motor piezoeléctrico, el cual alcanzó una resolución de 1 [μm], con masa de 1.82 [g] y dimensiones de 15 [mm] de diámetro por 26 [mm] de altura [42]. Más recientemente, Japón reunió en un mismo dispositivo, un sistema con motor *brushless* de corriente directa e inalámbrico, con resolución de 1.2 [μm], con masa de 3.1 [g], dimensiones de 16x20x7 [mm], y con una capacidad de 5 [m] de transmisión en su sistema de control inalámbrico [48].

Este trabajo presenta un diseño en el que se mejoran las características de los diseños encontrados en la literatura, con el cual ha sido posible llegar a etapa de implementación, y gracias a lo cual se ha establecido la configuración requerida para implementar un micromotor piezo-eléctrico con sistema de retroalimentación. De modo tal, que será posible superar las características del trabajo desarrollado por Japón, puesto que éste incluye un motor brushless de corriente directa; sin embargo, resulta más factible utilizar motores piezo-eléctricos por cuestiones de eliminar ruido eléctrico.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un sistema de microposicionamiento de alta resolución, capaz de desplazar un conjunto de electrodos con excelentes resultados en su trayectoria, adecuado para las experimentaciones que se realizan en distintas instituciones sobre registro extracelular neuronal *single-unit* para animales en libre movimiento, pudiéndose posicionar entre los que presentan más ventajas en la actualidad, ya que se caracteriza por ser preciso, ligero, de poco volumen y de costo inferior a los *microdrives* comerciales, que se encuentran entre los 15,000 y 20,000 USD, sin ser motorizados.

El impacto social y tecnológico concerniente a las diversas aplicaciones del registro extracelular, así como los alcances en este proyecto, motivan al perfeccionamiento de esta clase de sistemas. Lo que resta llevar a cabo, es condicionar a la rata para poder utilizar los equipos de adquisición, para que de esta manera, se dé seguimiento con las actividades planteadas en el trabajo a futuro de este escrito.

El desarrollo de *microdrives* se trata de un gran reto para las neurociencias, y por supuesto, para la ingeniería. En este proceso, se sabe que existen diversas propuestas de mecanismos, manufactura, electrodos, microactuadores, control, procesamiento de señales y comunicación inalámbrica, por lo que este trabajo marca una pauta para dirigir hacia las nuevas modificaciones en este diseño, así como para otros modelos a futuro.

Para finalizar, es importante mencionar que México cuenta con la capacidad de poder desarrollar dispositivos de precisión aplicados a la biomédica, tal como lo es un *microdrive*, lo que es un punto significativo para impulsar su crecimiento.

TRABAJO A FUTURO

Como fue mencionado en la prueba de implantación, se diseñará un sujetador para ayudar en la colocación del *microdrive* de manera que no sea agresivo el montaje, y así se pueda reducir la gliosis alrededor de los electrodos. A partir de esto, se procederá con el desarrollo de otro diseño para electrodos de nicromo de 25 [μm] de diámetro y, de esta manera, se podrán realizar comparaciones trabajando con distintos rangos de impedancias y electrodos de distinto material.

Después de haberse obtenido los registros de actividad neuronal y haberse realizado las experimentaciones necesarias, se trabajará en el desarrollo de un sistema motorizado basado en [64], el cual puede ser mejorado mediante algún algoritmo de control más avanzado.

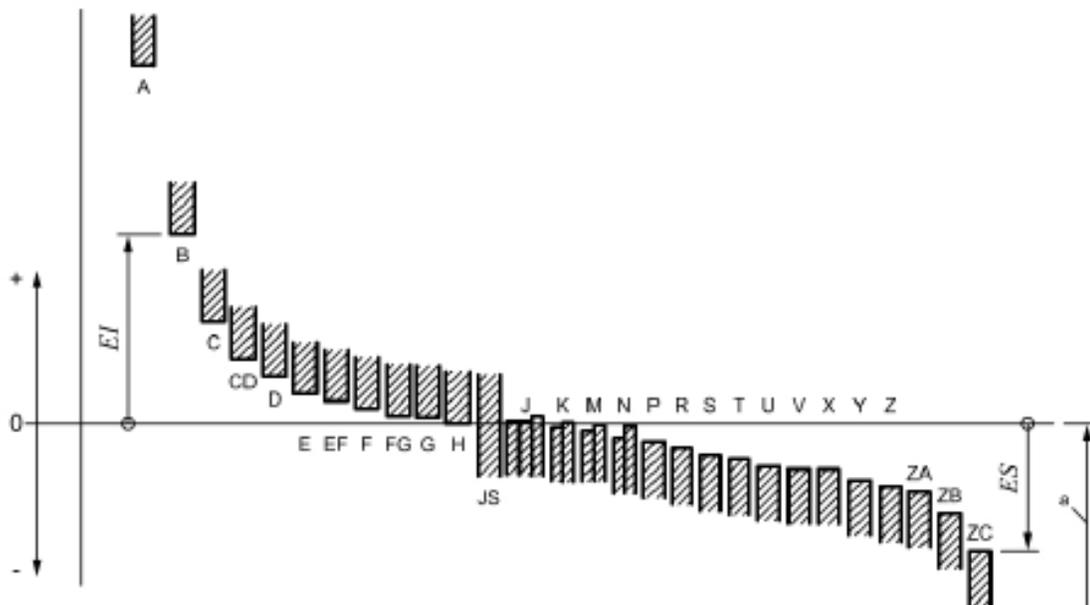
El siguiente paso, consistirá en controlar el sistema de manera inalámbrica, aunque se seguirían manteniendo los cables correspondientes al sistema de adquisición. En este sentido, es que se puede plantear el desarrollo de un sistema totalmente inalámbrico, y así, la rata podría actuar libremente, de manera que las investigaciones proporcionarían mejores resultados.

En pasos más adelante, se podría contemplar un sistema controlado por un observador, es decir, un sistema que automáticamente se desplazará al momento de que se perdiese una señal.

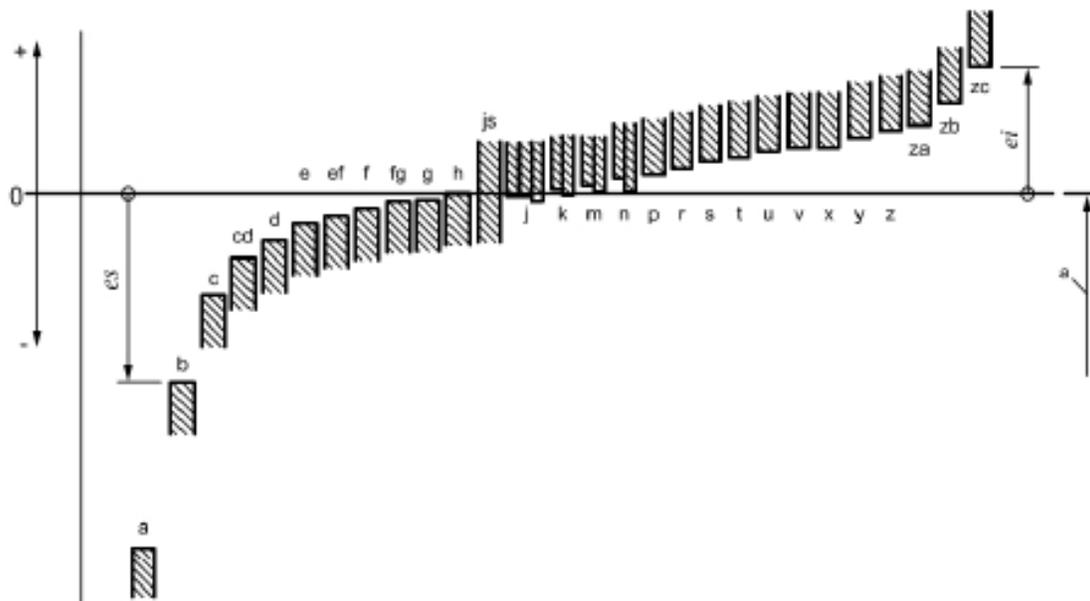
Las posibilidades de mejorar el sistema son múltiples, y como se ha visto, los *microdrives* han beneficiado a tal grado de que gracias a éstos, en 2014 John O'Keefe junto con May-Britt Moser y Edvard I. Moser obtuvieron premio el Premio Nobel en sus investigaciones. Por lo tanto, para conseguir alcances mayores, será necesaria la interacción con gente especializada en áreas como la física, la electrónica y la computación.

ANEXOS.

A.1. Representación esquemática de posición de las tolerancias (desviaciones fundamentales).



a) Holes (internal features of size)



b) Shafts (external features of size)

A.2. Ajustes preferentes.

Basic hole	Tolerance classes for shafts																
	Clearance fits				Transition fits				Interference fits								
H 6					g5	h5	js5	k5	m5		n5	p5					
H 7					f6	g6	h6	js6	k6	m6	n6	p6	r6	s6	t6	u6	x6
H 8				e7	f7		h7	js7	k7	m7				s7		u7	
H 9			d8	e8	f8		h8										
H 10	b9	c9	d9	e9			h9										
H 11	b11	c11	d10				h10										

— Preferable fits of the hole-basis system

Basic shaft	Tolerance classes for holes																
	Clearance fits				Transition fits				Interference fits								
h 5					G6	H6	JS6	K6	M6		N6	P6					
h 6					F7	G7	H7	JS7	K7	M7	N7	P7	R7	S7	T7	U7	X7
h 7				E8	F8		H8										
h 8			D9	E9	F9		H9										
h 9				E8	F8		H8										
			D9	E9	F9		H9										
	B11	C10	D10				H10										

— Preferable fits of the shaft-basis system

A.3. Valores numéricos de los grados de tolerancia normalizados IT para medidas nominales

Nominal size mm		Standard tolerance grades																			
		IT01	IT0	IT1	IT2	IT3	IT4	IT5	IT6	IT7	IT8	IT9	IT10	IT11	IT12	IT13	IT14	IT15	IT16	IT17	IT18
Above	Up to and including	Standard tolerance values																			
		µm											mm								
—	3	0,3	0,5	0,8	1,2	2	3	4	6	10	14	25	40	60	0,1	0,14	0,25	0,4	0,6	1	1,4
3	6	0,4	0,6	1	1,5	2,5	4	5	8	12	18	30	48	75	0,12	0,18	0,3	0,48	0,75	1,2	1,8
6	10	0,4	0,6	1	1,5	2,5	4	6	9	15	22	36	58	90	0,15	0,22	0,36	0,58	0,9	1,5	2,2
10	18	0,5	0,8	1,2	2	3	5	8	11	18	27	43	70	110	0,18	0,27	0,43	0,7	1,1	1,8	2,7
18	30	0,6	1	1,5	2,5	4	6	9	13	21	33	52	84	130	0,21	0,33	0,52	0,84	1,3	2,1	3,3
30	50	0,6	1	1,5	2,5	4	7	11	16	25	39	62	100	160	0,25	0,39	0,62	1	1,6	2,5	3,9
50	80	0,8	1,2	2	3	5	8	13	19	30	46	74	120	190	0,3	0,46	0,74	1,2	1,9	3	4,6
80	120	1	1,5	2,5	4	6	10	15	22	35	54	87	140	220	0,35	0,54	0,87	1,4	2,2	3,5	5,4
120	180	1,2	2	3,5	5	8	12	18	25	40	63	100	160	250	0,4	0,63	1	1,6	2,5	4	6,3
180	250	2	3	4,5	7	10	14	20	29	46	72	115	185	290	0,46	0,72	1,15	1,85	2,9	4,6	7,2
250	315	2,5	4	6	8	12	16	23	32	52	81	130	210	320	0,52	0,81	1,3	2,1	3,2	5,2	8,1
315	400	3	5	7	9	13	18	25	36	57	89	140	230	360	0,57	0,89	1,4	2,3	3,6	5,7	8,9
400	500	4	6	8	10	15	20	27	40	63	97	155	250	400	0,63	0,97	1,55	2,5	4	6,3	9,7
500	630			9	11	16	22	32	44	70	110	175	280	440	0,7	1,1	1,75	2,8	4,4	7	11
630	800			10	13	18	25	36	50	80	125	200	320	500	0,8	1,25	2	3,2	5	8	12,5
800	1 000			11	15	21	28	40	56	90	140	230	360	560	0,9	1,4	2,3	3,6	5,6	9	14
1 000	1 250			13	18	24	33	47	66	105	165	260	420	660	1,05	1,65	2,6	4,2	6,6	10,5	16,5
1 250	1 600			15	21	29	39	55	78	125	195	310	500	780	1,25	1,95	3,1	5	7,8	12,5	19,5
1 600	2 000			18	25	35	46	65	92	150	230	370	600	920	1,5	2,3	3,7	6	9,2	15	23
2 000	2 500			22	30	41	55	78	110	175	280	440	700	1 100	1,75	2,8	4,4	7	11	17,5	28
2 500	3 150			26	36	50	68	96	135	210	330	540	860	1 350	2,1	3,3	5,4	8,6	13,5	21	33

Referencias

- [1] A. K. Engel et. al., "Invasive recordings from the human brain: clinical insights and beyond," *Nature Reviews, Neuroscience*, vol. 6, pp. 35-47, 2005.
- [2] H. Supèr and P. Roelfsema, "Chronic multiunit recordings in behaving animals: advantages and limitations," *Progress in Brain Research, Elsevier*, vol. 147, pp. 263-282, 2005.
- [3] M. A. Howard, K. V. Nourski and J. F. Brugge, "Invasive Research Methods," in *The Human Auditory Cortex, Springer Handbook of auditory research 43*, Iowa, Springer Science+Business Media, 2012, pp. 39-67.
- [4] F. Sotres-Bayón et. al., "Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala inputs," *Neuron, Elsevier*, vol. 76, pp. 804-812, 2012.
- [5] C. Bravo-Rivera et. al., "Neural Structures Mediating Expression and Extinction of Platform-Mediated Avoidance," *The J. of Neuroscience*, vol. 34, no. 29, pp. 9736-9742, 2014.
- [6] "Neuropatología Molecular," [Online]. Available: <http://www.ifc.unam.mx/investigacion/neurociencias/neuropatologia-molecular>. [Accessed Jan 2016].
- [7] W. M. Grill, S. E. Norman and R. V. Bellamkonda, "Implanted Neural Interfaces: Biochallenges and Engineered Solutions," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, pp. 1-24, 2009.
- [8] M. Khare, A. Singh and P. Zamboni, "Prospects of Brain-Machine Interface in Motor Disabilities: The Future Support for Multiple Sclerosis Patient to Improve Quality of Life," *Ann. Of Medical and Health Science Research*, vol. 4, pp. 305-312, 2014.
- [9] A. B. Graf and R. A. Andersen, "Brain-machine interface for eye movements," *PNAS*, vol. 111, no. 49, pp. 17630-17635, 2014.
- [10] M. A. Nicolelis, "Actions from thoughts," *Nature*, vol. 409, pp. 403-407, 2001.
- [11] A. Woodruff, "Measuring Brain Activity in Humans," [Online]. Available: <http://www.qbi.uq.edu.au/human-recordings>. [Accessed Jan. 2016].
- [12] S. Finger, *Origins of neuroscience: A history of explorations into brain function*, N.Y.: Oxford University Press, 1994.
- [13] L. M. Oliveira and D. Dimitrov, "Surgical Techniques for Chronic Implantation of Microwire Arrays in Rodents and Primates," in *Methods for Neural Ensemble Recordings*, CRC Press, 2008, pp. 21-46.

- [14] R. Lemon, *Methods for neural recording in conscious animals*, Oxford: IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences, 1984.
- [15] J. O'Keefe, M.-B. Moser and E.-I. Moser, "The nobel prize in physiology or medicine 2014," *J Mahatma Gandhi Inst Med Sci*, vol. 20, pp. 106-107, 2014.
- [16] R. Brette and A. Destexhe, *Handbook of Neural Activity Measurement*, N.Y.: Cambridge University Press, 2012.
- [17] Guyton and Hall, "Potenciales de membrana y potenciales de acción," in *Tratado de Fisiología médica*, Elsevier, 2011, pp. 57-70.
- [18] M. S. Lewiki, "A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials," *Network: Comput. Neural Syst.*, vol. 9, pp. 53-78, 1998.
- [19] M. HajjHassan, V. Chodavarapu and S. Musallam, "NeuroMEMS: Neural Probe Microtechnologies," *Sensors J.*, pp. 6704-6726, 2008.
- [20] M. A. Nicolelis, "State-of-the-Art Microwire Array Design for Chronic Neural Recordings in Behaving Animals," in *Methods for Neural Ensemble Recordings*, CRC Press, 2008, pp. 1-20.
- [21] B. Ghane and M. Sawan, "Design and Implementation Challenges of Microelectrode Arrays: A Review," *SCIRES*, vol. 4, pp. 483-495, 2013.
- [22] "Microwire Array," [Online]. Available: <http://www.plexon.com/>. [Accessed Jan. 2016].
- [23] "Neural Probes," [Online]. Available: neuronexus.com. [Accessed Jan. 2016].
- [24] "Neuroscience Products," [Online]. Available: www.thomasrecording.com. [Accessed Jan. 2016].
- [25] M. Jeon et. al., "Partially flexible MEMS neural probe composed of polyimide and sucrose gel for reducing brain damage during and after implantation," *J. of Micromech and Microeng.*, vol. 24, pp. 1-10, 2014.
- [26] K. D. Wise et. al., "Wireless Implantable Microsystems High-Density Electronic Interfaces to the Nervous System," *Proceedings of the IEEE*, vol. 92, no. 1, pp. 76-97, 2004.
- [27] F. Strumwasser, "Long-Term Recording from Single Neurons in Brain of Unrestrained Mammals," *J. Stor*, vol. 127, no. 3296, pp. 469-470, 1958.
- [28] T. J. Morrow, "Improved Technique for Recording Single Unit Activity in Awake Animals," *Brain Research Bulletin*, vol. 5, pp. 91-93, 1979.
- [29] S. A. Deadwyler et. al., "A microdrive for use with glass or metal microelectrodes in recording from freely-moving rats," *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, Elsevier, vol. 47, pp. 752-754, 1979.

- [30] J. O'Keefe and M. L. Recce, "Phase Relationship Hippocampal Place Units and the EEG Theta Rhythm," *Hippocampus*, vol. 3, no. 3, pp. 317-330, 1993.
- [31] V. A. Korshunov, "Miniature microdrive for extracellular recording of neural activity in freely moving animals," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 57, pp. 77-80, 1995.
- [32] K. M. Gothard et. al., "Binding of Hippocampal CA1 Neural Activity to Multiple Reference Frames in a Landmark-Based Navigation Task," *The J. of Neuroscience*, vol. 16, no. 2, pp. 823-835, 1996.
- [33] D. K. Bilkey and G. M. Muir, "A low cost, high precision subminiature microdrive for extracellular unit recording in behaving animals," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 92, pp. 87-90, 1999.
- [34] M. S. Fee and A. Leonardo, "Miniature motorized microdrive and commutator system for chronic neural recording in small animals," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 112, pp. 83-94, 2001.
- [35] "Ball & ACME Lead Screw Technical Information," [Online]. Available: <http://www.sdp-si.com/Acme-Lead-Screws.htm>. [Accessed Jan. 2016].
- [36] M. S. Jog et. al., "Tetrode technology: advances in implantable hardware, neuroimaging and data analysis techniques," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 117, pp. 141-152, 2002.
- [37] C. S. Lansink et. al., "A split microdrive for simultaneous multi-electrode recordings from two brain areas in awake small animals," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 162, pp. 129-138, 2007.
- [38] Y. Yamamoto and M. A. Wilson, "Large-Scale Chronically Implantable Precision Motorized Microdrive Array for freely behaving animals," *J. Neurophysiol.*, vol. 100, pp. 2430-2440, 2008.
- [39] F. Kloosterman et. al., "Micro-drive Array for Chronic in vivo Recording: Drive Fabrication," *JOVE*, 2009.
- [40] A. Caballero-Ruiz et. al., "Sistema de microposicionamiento para el estudio de actividad neuronal en ratas," *9º Congreso Iberoamericano de Ingeniería Mecánica, Las Palmas de Gran Canaria*, pp. 165-171, 2009.
- [41] T. Sato, T. Sazuki and K. Mabuchi, "A new multi-electrode array design for chronic neural recording, with independent and automatic hydraulic positioning," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 160, pp. 45-51, 2007.
- [42] S. Yang et. al., "Feedback controlled piezo-motor microdrive for accurate electrode positioning in chronic single unit recording in behaving mice," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 195, pp. 117-127, 2011.

- [43] J. G. Cham et. al., "Semi-Chronic Motorized Microdrive and Control Algorithm for Autonomously Isolating and Maintaining Optimal Extracellular Action Potentials," *J. Neurophysiol.*, vol. 93, pp. 570-579, 2004.
- [44] I. Obeid, M. A. Nicolelis and P. D. Wolf, "A multichannel telemetry system for single unit recordings," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 133, pp. 33-38, 2004.
- [45] T. A. Szuts, "A wireless multi-channel neural amplifier for freely moving animals," *Nat Neurosci.*, vol. 14, no. 2, pp. 263-270, 2011.
- [46] D. Fan et. al., "A wireless Multi-Channel Recording System for Freely Behaving Mice and Rats," *Plos ONE*, vol. 6, pp. 1-9, 2011.
- [47] L. Rafflenbeul, R. Werthschützky and A. Gail, "Integrated wireless neural recording and electrode positioning system," *Procedia Engineering, Elsevier*, vol. 147, pp. 1097-1100, 2012.
- [48] T. Hasegawa et. al., "A wireless neural recording system with a precision motorized microdrive for freely behaving animals," *Scientific Reports*, 2015.
- [49] J. Muthuswamy et. al., "Electrostatic Microactuators for Precise Positioning of Neural Microelectrodes," *Transactions of Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 10, pp. 1748-1755, 2005.
- [50] *Geometrical product specifications (GPS) –ISO code system for tolerances on linear sizes, Part 1: Basis of tolerances, deviations and fits (ISO 286-1:2010)*, BS EN ISO 286-1:2010, London, U.K.: BSI Group.
- [51] E. S. Kappenman and S. J. Luck, "The Effects of Electrode Impedance on Data Quality and Statistical Significance in ERP Recording," *Psychophysiology*, vol. 47, no. 5, pp. 888-904, 2010.
- [52] *Agilent Impedance Measurement Handbook*, 4th ed. ed., U.S.A.: Technologies, Agilent, 2013.
- [53] V. A. Korshunov, "Miniature microdrive-headstage assembly for extracellular recording of neural activity with high-impedance electrodes in freely moving mice," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 158, pp. 179-185, 2006.
- [54] V. A. Korshunov, "A method of extracellular recording of neuronal activity in swimming mice," *J. Neuroscience Methods, Elsevier*, vol. 165, pp. 244-250, 2007.
- [55] E. H. Chang et. al., "Construction of Microdrive Arrays for Chronic Neural Recordings in Awake Behaving Mice," *JOVE*, pp. 1-8, 2013.
- [56] P. Anikeeva et. al., "Optetrode: a multichannel readout for optogenetic control in freely moving mice," *Nat. Neurosci.*, vol. 1, pp. 163-170, 2014.
- [57] J. E. Ferguson, C. Boldt and D. Redish, "Creating low-impedance tetrodes by electroplating with additives," *Sens. Actuators A Phys, Elsevier*, vol. 156, no. 2, pp. 388-393, 2009.

- [58] V. Kasar, "Electrode impedance analysis of chronic tungsten microwire neural implants: understanding abiotic vs. biotic contributions.," *Front. Neuroeng.*, vol. 7, pp. 1-12, 2014.
- [59] H. H. Lou and Y. Huang, "Electroplating," *Encyclopedia of Chemical Processing*, 2006.
- [60] "Microdrives and Electrode Positioners," [Online]. Available: neuralynx.com. [Accessed Jan. 2016].
- [61] *Neuralynx Plating Solutions and Protocols User Manual*, Neuralynx, 2013, pp. 4-10.
- [62] C. W. Scouten, "Navigator through the Brain - Stereotaxic Atlases for Neuroscience Research," Sept. 2009. [Online]. Available: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/stereotaxic/navigator-through-the-brain-stereotaxic-atlases-for-neuroscience-research/>. [Accessed Jan. 2016].
- [63] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3th ed. ed., Sn. Diego, California, USA: Academic Press, 1997.
- [64] L. I. García-Beltrán, Sistema de microposicionamiento de electrodos para registrar actividad neuronal en ratas, Tesis de Maestría, México: Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [65] SQL-RV-1.8 SQUIGLE® Motor, User Manual, Rev. A, N. Y.: NEWSSCALE Technologies, 2010.
- [66] *Interconnects, .050" Grid Headers and Sockets Single and Double Row, Series 850, 851, 852, 853*, Mill Max, 2015.
- [67] *Sistema ISO de tolerancias y ajustes. Parte 2: Tablas de los grados de tolerancia normalizados y de las desviaciones límite de los agujeros y de los ejes, UNE-EN 20286-2 (ISO 286-2:1988)*, Madrid, España, 1996.
- [68] "Single-Stranded Stainless Steel Wire," [Online]. Available: <https://www.a-msystems.com/>. [Accessed Jan. 2016].
- [69] M. L. Tsai and C. Yen, "A simple method for fabricating horizontal and vertical microwire arrays," *J. Neuroscience Methods*, Elsevier, vol. 131, pp. 107-110, 2003.
- [70] *NanoZTM User Manual*, White Matter LLC, 2012.