

64
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE INGENIERIA

**MONTAJE DE UN LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA
PARA EL ESTUDIO DE REDES NEURONALES EN
CEREBROS DE ANIMALES PEQUEÑOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERO MECANICO ELECTRICISTA

P R E S E N T A

JUAN MANUEL GOMEZ GONZALEZ

DIRECTOR: DR. ISMAEL ESPINOSA ESPINOSA

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

- Capítulo 1. Introducción	1
- Capítulo 2. Montaje y pruebas.	4
2.1 Acondicionamiento del lugar	4
2.2 Amplificación y filtrado	7
2.3 Electrodo	16
2.4 Almacenamiento de señales	23
2.5 Experimentación	26
2.6 Análisis	32
- Capítulo 3. Discusión	33
- Apéndices	36
Apéndice A. Aparato afilador de alambres de tungsteno	36
Apéndice B. Diseño de los filtros para los preamplificadores.	40
Apéndice C. Cirugía de caracol (<i>Helix aspersa</i>)	48
Apéndice D. Protocolos de experimentos	49
Apéndice E. Metodologías de edición.	73
- Referencias	75

MONTAJE DE UN LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE REDES NEURONALES EN CEREBROS DE ANIMALES PEQUEÑOS.

Capítulo 1.

1 Introducción.

El trabajo que se reporta en esta tesis ha consistido en montar y poner a funcionar un laboratorio para registrar, almacenar y analizar señales eléctricas extracelulares de grupos de neuronas de algunas regiones del cerebro de la rata anestesiada.

Es difícil darse cuenta de lo que ello significa si no se ha trabajado de cerca en ello. Este tipo de laboratorios se han utilizado desde el siglo pasado o anteriormente y se caracterizan, sobre todo, por su singularidad. No hay laboratorios iguales, aunque se pretendan realizar los mismos experimentos. La tecnología ha cambiado, pero este tipo de laboratorios, que podemos llamar de Neurofisiología, de todas maneras tendrán su propio funcionamiento.

Usualmente en él se reúnen tecnologías diversas y un grupo de especialistas de disciplinas diferentes. Ahí se reúnen habilidades en fisiología, anatomía, electrónica, máquinas herramientas, computación y muchas otras. Estos laboratorios han tenido la peculiaridad de contagiar a los participantes de la capacidad interdisciplinaria. Este es su encanto y, también, su conflicto. Además, nunca permanecen, sino que cambian continuamente. Se les hacen mejoras, se les quitan cosas, se les añaden otras, pero nunca son los mismos.

El montaje de que aquí nos ocupamos, ubicado en el Laboratorio de Cibernética de la Facultad de Ciencias de la UNAM, tiene sus antecedentes en el Laboratorio del Dr. George Gerstein¹⁰ en la Universidad de Pensilvania. En ese lugar el Dr. Ismael Espinosa realizó sus experimentos para obtener el doctorado en Bioingeniería¹. El laboratorio de Gerstein ha evolucionado rápidamente durante 25 años, ya que Gerstein no sólo introdujo las computadoras a la Neurofisiología sino además fue partícipe en la utilización de la técnica de correlación cruzada para estudiar la conectividad de neuronas registradas simultáneamente.

Durante los últimos treinta años el estudio sobre la organización de muchos sistemas nerviosos se ha efectuado en la neurona individual, sin embargo, la extraordinaria capacidad sensorial y motora del sistema nervioso manifiesta de inmediato que éste no funciona con neuronas individuales y aisladas funcionalmente, sino por el contrario formando un complejo circuito de conexiones entre miles de ellas haciendo que el sistema nervioso tenga la capacidad de utilizar procesamiento en

1 Introducción.

paralelo y no en forma secuencial, por ello se concluye que si los conjuntos neuronales son importantes para la organización del sistema nervioso, deberían examinarse en función de la microcircuitería fisiológica efectiva así como el flujo de información. Siendo viable si se registran simultáneamente tantas neuronas como sea posible. Por lo que se debe realizar registro extracelular múltiple, esto es, hay que introducir al cerebro de rata arreglos de electrodos que registrarán la actividad eléctrica de las neuronas que se encuentren más próximas a sus puntas. Los arreglos pueden variar en número de acuerdo a las técnicas logradas en el laboratorio para su fabricación o bien de la tecnología disponible en el mercado, como pueden ser los arreglos fabricados con tecnología VLSI².

El desarrollar una línea de investigación de este tipo, obliga a tener conocimientos de áreas como mecánica, electrónica, computación, anatomía, fisiología, anestesiología, análisis de señales y estadística conjuntamente con los conocimientos en el campo de la neurofisiología, resultando un desafío el integrar toda esta información en una unidad coherente para montar, realizar y analizar experimentos donde hay muchas cosas que pueden llevar a equivocarse, siendo difícil determinar en que momento se está equivocado. El sistema necesario emplea muchos módulos por los que pasa la información para poder ser checada y validada. Por lo anterior es que los laboratorios interesados en este tipo de estudios en el mundo, aún son muy pocos.

Del estudio de la conectividad dinámica de un grupo de neuronas, ya sea en condiciones espontáneas o en respuesta a un estímulo, se pueden esperar datos que indiquen o cuando menos sugieran como se reorganiza la conectividad en un grupo contiguo de neuronas. Esta información es muy importante, por una parte, para diseñar algoritmos de aprendizaje para las redes neuronales artificiales, por otra parte, también es muy importante por lo poco que se sabe acerca del funcionamiento en paralelo de las neuronas. Tal conocimiento iluminaría la comprensión de los mecanismos de tareas tan complejas como la categorización y la discriminación. Así pues, el alcance de esta experimentación tiene posibilidades de brindar nuevos conocimientos y métodos tanto a la biología como a la ingeniería.

Para poder realizar los estudios mencionados es necesario contar con un laboratorio de experimentación lo suficientemente equipado y acondicionado para poder hacer registro extracelular y multicelular. Por ello fue necesario realizar las siguientes actividades como fase inicial:

- a) Integrar las partes con las que se contaba. Decidir si fabricar o comprar las partes faltantes, tomando en cuenta la disponibilidad de recursos, tiempo y control de calidad.
- b) Instalar una fabrica de arreglos de microelectrodos de tungsteno, así como un taller capaz de maquinar microportadores mecánicos y motorizados de microelectrodos y también implantes crónicos.

1 Introducción.

c) Realizar experimentos agudos en rata para probar, ajustar y mejorar el laboratorio de registro extracelular, además de computarizar la adquisición, almacenamiento y análisis de datos.

El trabajo realizado y los resultados obtenidos se describen en esta tesis. Se montó y probó el laboratorio en condiciones reales, es decir, efectuando experimentos de neurofisiología en el cerebro de ratas tipo Wistar en donde se registraron potenciales extracelulares por medio de un microelectrodo de tungsteno y se grabaron y analizaron preliminarmente fuera de línea las señales obtenidas. El diagrama de bloques del montaje experimental se muestra en la figura 1.

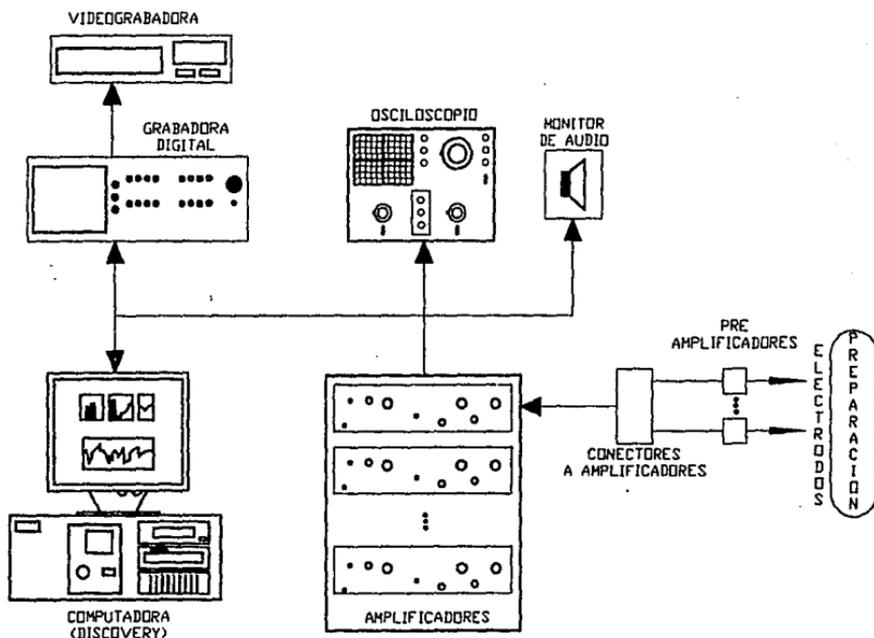


Figura 1. Diagrama de bloques del montaje experimental.

Capítulo 2.

Montaje y Pruebas.

2.1 Acondicionamiento del lugar.

Las características en cuanto a espacio y distribución del lugar debían ser las siguientes:

- Evitar al máximo la presencia de vibraciones de cualquier índole.
- Contar con una tierra física que ayudara a dar una referencia al equipo, además de poder eliminar el ruido eléctrico que pudiera inducirse.
- El equipo debía poderse colocar, mover, conectar y en general manipularse alrededor de la preparación sin que esto perturbara la realización de los experimentos.
- El espacio en el que se colocara la mesa de experimentación debería estar en un lugar con la menor cantidad de perturbaciones de cualquier índole, tales como el paso de personas, ruido, iluminación sin ningún control, etc.

Las características del lugar en el que se montó el laboratorio son las siguientes:

El Laboratorio de Cibernética se sitúa en un tercer nivel, con lo que se pueden tener problemas de vibración y no es posible evitarlas; en cuanto a la tierra física no se cuenta con una buena tierra, por lo que al referenciar las señales bioeléctricas obtenidas a ésta, hay una gran cantidad de ruido inducido, sin embargo y como se demostró durante los experimentos realizados es suficiente una tierra aislada para evitar problemas de ruido.

El lugar escogido para la ubicación de la mesa de experimentación se hizo de acuerdo a la disposición del mismo dentro del laboratorio, de este modo se colocó en un lugar en el que es fácilmente aislable de perturbaciones externas, además de estar lejos de ventanas, que pudiesen distraer a las personas que intervienen durante el desarrollo del experimento, hay que hacer la aclaración que el lugar en el que se inició la prueba de equipo y experimentación no es el lugar en el que se ha decidido dejar de forma permanente la etapa experimental, sino que se ha considerado utilizar un espacio destinado para otras actividades, planteando en un mediano plazo trasladar a este último el equipo.

Tomando en cuenta que en una instalación donde se hace experimentación neurofisiológica, el área en que se coloca la preparación biológica debe ser tal que el espacio en donde se hace la cirugía, permita manipular el instrumental quirúrgico,

2.1 Acondicionamiento del lugar.

equipo y conexiones de forma sencilla para interferir lo menos posible con movimientos involuntarios.

Debido a lo planteado anteriormente se actuó de la siguiente manera con respecto a la distribución de espacio:

- a) Se diseñó y mandó hacer una mesa para la realización de los experimentos, en los que es necesario hacer cirugías y tener control sobre el animal en estudio. Debía contarse con una mesa que proporcionara espacio de trabajo y facilidad de fijar equipo tal como estereotáxico, microscopio, lámparas, así como mantener el instrumental quirúrgico a los lados de éste.

En el diseño de la mesa se tomó en cuenta que sus dimensiones permitieran maniobrar de la siguiente manera:

- 1.- La persona encargada de realizar la cirugía debía poder manipular sin dificultad todo el instrumental usado.
 - 2.- Debía facilitar la labor de un ayudante en otro extremo sin que interfiriera con movimientos no deseados.
 - 3.- La altura debía permitir que los experimentos, que pueden ser muy prolongados, pudieran ser supervisados por las personas encargadas paradas o sentadas.
 - 4.- La estabilidad de la mesa es muy importante pues no debía tener movimientos bruscos bajo ninguna circunstancia.
 - 5.- Las orillas de la mesa se diseñaron con una distancia razonable entre ésta y las patas, pues se debía poder fijar a éstas el equipo necesario por medio de prensas.
- b) Se han distribuido los elementos indispensables para la realización de experimentos neurofisiológicos, en el espacio físico destinado para tal efecto, los elementos necesarios se acomodaron tomando en cuenta como punto central el lugar donde se ubicó la mesa, dentro de esta primordialmente fue la colocación del estereotáxico pues es el que sostiene a la preparación biológica, con respecto a esto se pensó en estudiar la mejor colocación que pudiera tener, la decisión final fue la de colocarlo en uno de los extremos de la mesa y al centro del mismo, con el fin de poder tener instrumental quirúrgico y la base del microscopio a los lados, mientras que al lado contrario se colocaron las lámparas (se tienen dos lámparas de marca Olympus una modelo TL2 y una modelo LGPS).

En segundo término, se colocaron en dos gabinetes móviles los aparatos necesarios para poder hacer el registro neurofisiológico, en el primer gabinete se colocaron los amplificadores y la fuente de alimentación, tratando de que los amplificadores estuvieran tan alejados de la fuente como fuera posible. Las fuentes de alimentación, que en un principio eran dos, una para un amplificador comercial y la otra para un amplificador diseñado en el Laboratorio, se redujeron a una, tomando la alimentación de la fuente comercial para ambos amplificadores, esto con la finalidad de evitar al máximo la cercanía de los cables de señal con los cables

2.1 Acondicionamiento del lugar.

de alimentación, reduciendo las posibilidades de inducción de ruido. En este mismo gabinete se colocó un osciloscopio y un monitor de audio³, en los que se introduce la señal amplificada con el fin de poder ver y escuchar la señal registrada, de esta forma los experimentadores no tienen que tener fija la vista en el osciloscopio, recurriendo a este último en el momento en el que se escucha actividad neuronal.

En el segundo gabinete se colocaron los aparatos que ayudan a almacenar y estudiar la señal registrada, estos aparatos son los siguientes: una videocasetera de formato de grabación y reproducción VHS de marca Panasonic modelo NV-J32HQ, una grabadora digital de marca Instrutech modelo VR-100A y un panel de conexiones de dieciséis canales para el software de separación y análisis Discovery, los primeros dos aparatos mencionados son usados para almacenar y reproducir las señales registradas durante los experimentos en videocintas de formato VHS y son descritos más adelante en el subtema de Almacenamiento. El es un panel de conexiones con el que es posible introducir las señales electrofisiológicas al software de análisis.

- c) Se dispuso de un mueble en el que se guardan y almacenan todos los materiales y sustancias usadas en la cirugía, así como los aparatos usados durante la realización de los experimentos.
- d) El laboratorio cuenta con un microscopio de disección de marca Olympus modelo SZ30, la base que lo sustenta resulta ser poco versátil, pues al intentar colocar el microscopio en una posición cómoda para poder observar el objeto deseado, se tienen que hacer muchas maniobras, algo que se debe tomar en cuenta en una base por el estilo es que no es válido permitir movimientos del microscopio, pues si este tiene algún movimiento se puede perder la visión del objeto en estudio, por lo que sería necesario ajustarlo de nuevo, sin embargo, debido a la falta de recursos técnicos en el taller mecánico de la Facultad de Ciencias resulta difícil plantear una solución óptima, por lo consiguiente se decidió que este permaneciera en su base original ocupando un espacio sobre la mesa de experimentación. Dentro de las posibilidades de modificación se plantearon, en primer lugar el mecanismo usado en las lámparas de escritorio, sin embargo presenta problemas de estabilidad debido a los resortes que le dan soporte, la segunda opción es la de una base muy parecida a la anterior solo que el microscopio sería soportado con una transmisión de cadena, dado que con esta se puede dejar fijo el microscopio, sin registrar movimientos, además de poder fijarlo a una base larga como un triple o bien del techo sobre la mesa de experimentación.

2.2 Amplificación y Filtrado.

En el diseño de amplificadores, destinados al registro electrofisiológico, no se cuenta con criterios uniformes de diseño, siendo el principal criterio de diseño las características de la señal y las condiciones experimentales. En cada caso es diferente el acoplamiento de impedancias, ganancias, respuestas en frecuencia, etc. Como ejemplo se pueden mencionar los amplificadores GRASS, que hay para diversos tipos de registros; sin embargo, hay quienes diseñan sus amplificadores "a la medida" fijando las características del amplificador, dependiendo del tipo de registro deseado. En particular el Laboratorio de Cibernética cuenta con dos tipos de amplificadores, uno de diseño propio y otro comercial de marca GRASS, diseñados para registro extracelular, estos dos amplificadores se evaluaron, comparando tanto características reportadas por el diseñador, como su operación en preparaciones reales. Las características del amplificador GRASS se muestran en la tabla 1 y las del amplificador diseñado se muestran en la tabla 2.

Amplificador GRASS.

Es un amplificador de alta ganancia, filtros ajustables, de bajo ruido a la salida con fácil interconexión a dispositivos periféricos como video-grabadoras, osciloscopio, computadora, promedidores de señal, etc. La entrada puede ser accesada por varios tipos de cable dependiendo de la impedancia del electrodo a usar.

Ganancia ajustable de 50 a 1'000,000 y 2% de error.

Respuesta en frecuencia: 1/2 amplitud (- 6 dB)

Filtrado ajustable a las frecuencias siguientes:

- Baja: 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 Hz.

- Alta: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 kHz

Impedancia de entrada:

- 20 M Ω diferencial; 35 pF en conector por terminal.

Rechazo en modo común ajustable a 10,000:1 a 60 Hz.

Salida:

- Terminación simple.

- Limitada aproximadamente a 10V pico a pico.

- Impedancia 300 Ω

- Nivel de corriente directa ajustable a cero.

- Terminales del tipo de conector coaxial o doble banana.

Calibración:

- 12 valores a partir de 10 V a 50 mV.

- Interna: actúa con pushbutton, con voltajes de DC.

- Externa: El panel frontal acepta ondas senoidal o cuadrada de 1.73 Vrms, al proporcionar calibración sobre los voltajes. La atenuación es aproximadamente de 2%.

Tabla 1. Características del amplificador GRASS

Amplificador diseñado

Diseño basado en amplificadores operacionales TL074 de las características siguientes:

- Entrada tipo FET, impedancia de entrada $10^{12} \Omega$.
- Voltaje de offset de 1mV.
- Razón de rechazo en modo común de 100 dB.
- Corriente de salida 2 mA.
- Corriente de offset de salida 10 pA.
- Bajo nivel de ruido de entrada de 16nV/ (frec.Hz).
- Ancho de banda de 4 MHz.

El amplificador consta de las siguientes etapas:

- Preamplificador de instrumentación de alta impedancia de entrada con ganancia de 76 dB, acoplado capacitivamente para evitar voltajes de desbalance a su entrada.

- Dos filtros Sallen-Key de componentes iguales con factor de calidad de 0.707, uno configurado como filtro paso bajas y el otro como filtro paso altas:

Filtro pasa bajas de 0.480 kHz, 1 kHz, 5 kHz, 10 kHz y 16 kHz.

Filtro pasa altas de 1 Hz, 10 Hz, 100 Hz, 300 Hz y 480 Hz.

- Un filtro supresor de banda de frecuencia central de 60 Hz
- Salida a través de dos amplificadores no inversores de ganancia variable (X10 y X100).

Características de operación:

- Ancho de banda (sin usar filtros) de 0.1 Hz a 20 KHz.
- Ancho de banda (con filtros) de 0.1 Hz a 16 KHz.
- Ganancia mínima a 1 KHz 80 dB.
- Ganancia máxima a 1 KHz 116 dB.
- Razón de rechazo en modo común de 89 dB.
- Pendiente de atenuación de los filtros 23 dB/década.
- Impedancia de entrada diferencial $6.18 \times 10^{16} \Omega$.
- Impedancia de entrada común $1.24 \times 10^{17} \Omega$.
- Impedancia de salida, a máxima ganancia 200Ω .

Tabla 2. Características del amplificador diseñado.

El tipo de registro que se realiza es el extracelular, de este modo se registran los potenciales eléctricos (espigas) generados por varias neuronas. Las espigas son potenciales con una amplitud aproximada de $500 \mu V$ y con frecuencias entre 1 y 2 kHz.

El amplificador mencionado, fue probado por su diseñador³ directamente en las condiciones experimentales siguientes:

En preparaciones biológicas en rata y sapo, tanto la preparación como el equipo de registro se encontraba dentro de una cámara especial del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En todos los experimentos realizados se registró con micropipetas de vidrio, con impedancias superiores a los 10 M Ω .

2.2 Amplificación y Filtrado.

Debido a las condiciones experimentales, no del todo adecuadas, sólo se realizó una comparación y evaluación visual entre las dos señales - la del amplificador GRASS y la del amplificador diseñado- y se observó que la del amplificador diseñado contenía menos ruido de fondo. Únicamente se tiene una grabación de la señal para el amplificador diseñado y se muestra en la figura 2, en la que se señalan con una flecha las espigas generadas por las neuronas y separadas, en este caso, de manera visual.

Estos experimentos fueron realizados en los meses de Enero a Marzo de 1990. Sin embargo, se dejó de experimentar en esa localización y se montó una nueva en el Laboratorio de Cibernética, continuando hasta el mes de enero de 1991. Por lo que se debía asegurar que el amplificador diseñado mantuviera una buena respuesta, similar a la obtenida anteriormente, por lo que había de ser probado con señales lo más parecidas a las que tendría que amplificar en condiciones de un experimento. De acuerdo con las características de las espigas a registrar, es difícil contar con un aparato que genere una señal con las mismas condiciones, por ello se desechó la idea de probarlo con señales periódicas, provenientes de generadores de señales, o de simuladores de espigas, y mejor se decidió probar su funcionamiento con preparaciones biológicas sencillas, en las que se pudieran encontrar neuronas que fueran capaces de producir actividad espontánea; se hicieron preparaciones en caracol común (*Helix aspersa*⁴), pues es relativamente fácil extraer el ganglio sub-esofageal, que contiene neuronas muy grandes, además de ser posible registrar actividad espontánea intracelularmente. Los potenciales que se pueden registrar cuentan con amplitudes (del orden de los cientos de milivolts) que pueden ser amplificados con facilidad permitiendo probar de forma segura los amplificadores y sus filtros además de permitir entrenar al experimentador en la realización de microcirugía. Las ventajas adicionales de ésta preparación es que es fácil mantener en buen estado durante un periodo largo sin muchos problemas, además de que existen mapas bien detallados sobre la localización de todas las neuronas de tamaño regular que se pueden localizar en cada ganglio que lo compone.

En el momento en que se intentó realizar registro en el ganglio no fue posible obtenerlo, debido a que el amplificador diseñado presentaba problemas de producción de ruido, siendo prácticamente imposible referenciar a tierra la señal obtenida y por tanto se perdía entre el ruido producido por el amplificador.

Lo que se quería era comparar los registros del amplificador diseñado y de un amplificador comercial al mismo tiempo. Un problema adicional fue que al no tener noción del nivel de tierra física a la cual se referenciaba el equipo, no se contaba con la seguridad de que lo obtenido no estuviera causado por tierras flotadas; por lo que se cambió de preparación biológica, esta vez el nervio ciático de rana, con la que saltó a la vista que, mientras en el amplificador comercial se obtuvo un buen potencial de acción al estimular el nervio, en el amplificador diseñado no se pudo obtener la misma señal, sino una serie de oscilaciones producidas por el mismo.



Figura 2. Registro electrofisiológico del cerebro del sapo obtenido con el amplificador de diseño propio (la zona cerebral de registro se desconoce).

El siguiente paso fue intentar corregir el desperfecto que pudiera haber sufrido, sin embargo, al revisar el amplificador en base al diagrama eléctrico y tratar de localizar la falla, se encontraron los siguientes problemas de diseño:

- 1.- El diagrama eléctrico no corresponde exactamente al que finalmente se implantó en el circuito impreso.
- 2.- No se cuenta con ninguna documentación de cambios hechos al diagrama.
- 3.- Las componentes del circuito impreso no cuentan con la numeración asignada en el diagrama eléctrico.
- 4.- La inestabilidad de la ganancia, debido a que no se utilizaron componentes de precisión, no permite conocer con exactitud el intervalo de amplitudes de la señal de entrada.
- 5.- La fabricación casera del circuito impreso deja mucho que desear por ejemplo hay roturas en las pistas y en algunos casos son muy anchas.

El amplificador, aun en operación, no se ha rediseñado, ni se ha usado en los experimentos para registrar, pues se ha decidido continuar trabajando con los amplificadores comerciales GRASS, debido a que además de los problemas encontrados y descritos existen otros puntos que hay que tomar en cuenta y que se abordarán en la discusión.

Filtrado.

En una preparación en la que se pretende registrar señales de unos cuantos microvolts, la presencia de ruido eléctrico provoca la pérdida de la señal. En el desarrollo del experimento 1, de una serie de 11, se pudo observar que el ruido era característico de la emisión de estaciones radiofónicas de AM y del de 60 Hz. En la figura 3, grabada durante el experimento 1, se observan claramente estos dos componentes. Este ruido se "tragaba" el registro de señales cerebrales.



Figura 3. Muestra de ruido inducido (radio frecuencias).

Para corregir la situación, en primer término se aseguró que la conexión eléctrica en su totalidad se encontrara referida a tierra física. El estereotáxico y todos los aparatos se aterrizaron; se verificó que no existieran lazos que pudieran actuar como antenas, sin embargo, el ruido no pudo ser eliminado de esta manera. Luego se probó hacer el registro sin la conexión del estereotáxico a tierra con el fin de estudiar la procedencia de la inducción de ruido y tratar de eliminarla; se pudo observar que la tierra física con la que se cuenta induce una gran cantidad de ruido, por lo que se decidió no referenciar las señales a tierra física y tomar como tierra aislada el mismo estereotáxico, con estas medidas el ruido disminuyó, pero no lo suficiente para poder clarificar el registro, pues continuaron presentes las altas frecuencias. Así pues, se planteó la necesidad de contar con una jaula de Faraday y de preamplificadores.

Los amplificadores convencionales se ubican lejos de la preparación biológica y reciben un conector desde la mesa de experimentación. En cambio, los preamplificadores tienen que encontrarse cerca de la preparación, por lo que deben ser pequeños, pues al igual que los amplificadores, también se necesita un preamplificador por microelectrodo.

Se diseñó un preamplificador para tratar de eliminar el ruido descrito anteriormente y las características eléctricas escogidas fueron las siguientes:

2.2 Amplificación y Filtrado.

Preamplificador 1:

Ganancia de 100.

Filtrado con banda de paso de 100 Hz a 10 kHz.

Para el diseño de los filtros se usó el paquete de software DIFAC diseñado en la Facultad de Ingeniería de la UNAM⁵. Dependiendo del tipo de filtro que se desea diseñar, se debe proporcionar la plantilla de diseño (frecuencias de corte, supresión, etc.) y da como resultado el valor de los componentes (resistencias y capacitores) a usar y el diagrama esquemático, los criterios y pasos de diseño son detallados en el apéndice B.

Para hacer diversas pruebas de eliminación de ruido, se diseñó el preamplificador 2 con las características siguientes:

Preamplificador 2:

Ganancia de 100.

Filtrado con banda de paso de 600 Hz a 3 kHz.

Los procedimientos de diseño fueron similares a los del preamplificador 1. Al probar el preamplificador 2 en el experimento 10, se observó que su comportamiento fue satisfactorio. Sin embargo, la banda de paso es estrecha por lo que se pudo observar que, aunque permite eliminar de manera más eficiente el ruido, también afecta de manera ligeramente significativa las señales de interés. En la figura 4 se muestran señales registradas en el cerebro de la rata con los preamplificadores 1 y 2. Cada preamplificador se coloca en cajas pequeñas que no interfieren con el experimento aún estando muy cerca de la preparación.

Al analizar la operación de ambos preamplificadores en condiciones de experimentación, se pudo observar que el preamplificador 1 muestra mejor respuesta en la eliminación de ruido y en la conservación de las características de las espigas registradas; mientras que el preamplificador 2, aunque elimina de forma más eficiente el ruido, también atenúa la señal de salida, por lo que es mejor usar un ancho de banda mayor, que sea capaz de eliminar eficientemente ruido de baja y alta frecuencia. Otra característica lograda con los preamplificadores es una muy alta impedancia de entrada, por lo que es posible eliminar sin cambios significativos la punta de alta impedancia del amplificador GRASS, representando para el laboratorio un ahorro importante. La figura 5 muestra diferentes grabaciones de tramos característicos de registros de señales del cerebro de la rata y para los cuales se utilizaron los diferentes dispositivos mencionados. Los preamplificadores son muy fáciles de reproducir, a partir de los diseñados, y su tamaño y costo (menos de veinte mil pesos) permiten que se pueda construir la cantidad necesaria según se vayan añadiendo microelectrodos a la preparación.

2.2 Amplificación y Filtrado.

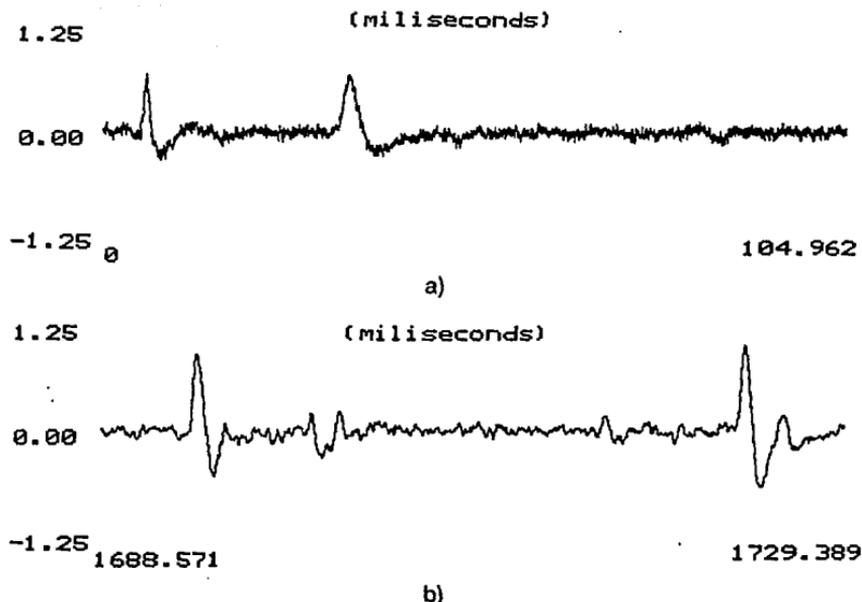


Figura 4. Diferentes registros de señales neuroeléctricas, grabadas con ayuda de ambos preamplificadores (zona cerebral de registro hipocampo de la rata), a) con preamplificador 1; b) preamplificador 2.

Adicionalmente para tratar de eliminar el ruido que se inducía se mando construir una jaula de Faraday ensamblable, compuesta por cinco paneles forrados con tela de alambre de cobre de 18 hilos por pulgada. De esta forma es posible trabajar libremente sobre la preparación biológica y una vez que se introduce el electrodo y se tienen las condiciones para empezar el registro, entonces se ensambla la jaula. La construcción de la jaula tardó demasiado tiempo por lo que se realizaron todos los experimentos sin la presencia de la jaula y sólo con los preamplificadores descritos.

2.2 Amplificación y Filtrado.

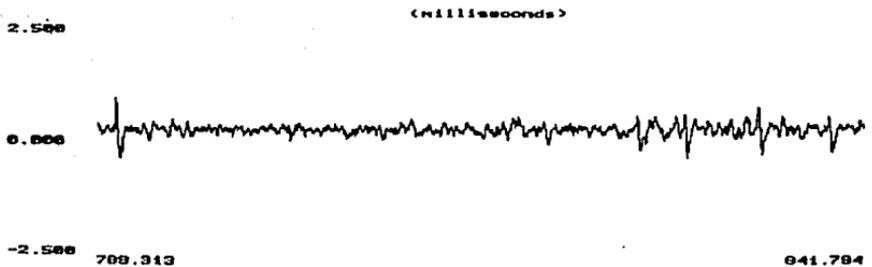


Figura 5 a)

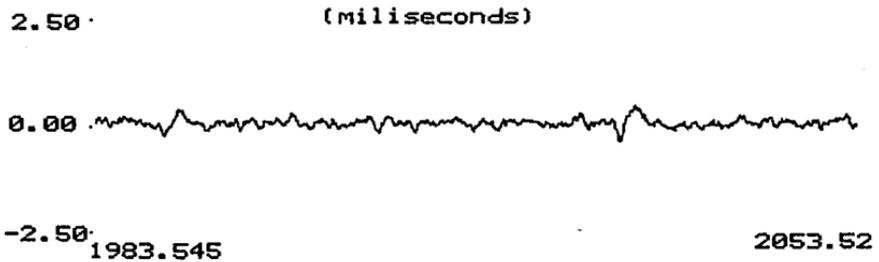


Figura 5 b)

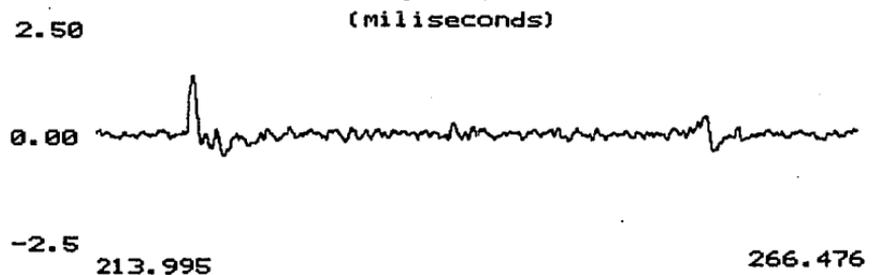


Figura 5 c)

Figura 5. Registros tomados del cerebro de la rata con ambos preamplificadores (zona cerebral de registro hipocampo de la rata). a) Preamplificador 1 con punta de alta impedancia, b) Preamplificador 1 con punta de baja impedancia, c) Preamplificador 2 con punta de baja impedancia y d) Preamplificador 2 con punta de alta impedancia.

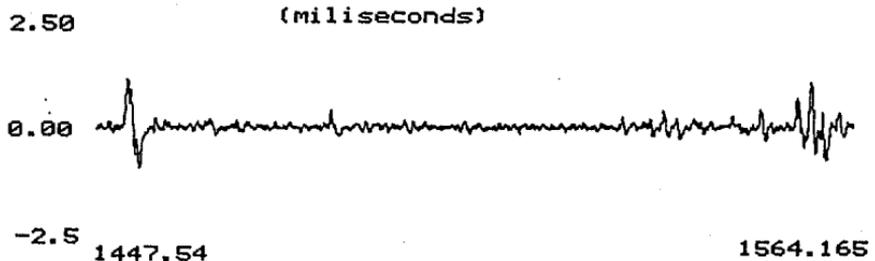


Figura 5 d)

Otros ruidos presentes.

La presencia de cables conectados directamente a la línea y la presencia cercana de lámparas fluorescentes induce también ruido. Para eliminar el ruido provocado por éstos, se debe separarlos del lugar por donde pasan los cables de señal (aproximadamente 1.5 metros entre cables de alimentación y de señal) y apagar las lámparas que se encuentren más próximas. En la instalación de que aquí nos ocupamos se pudo eliminar este ruido sin que fuera necesaria la jaula de Faraday. Sin embargo, no es posible mantener conectadas durante el registro las lámparas usadas durante la cirugía, ni las lámparas fluorescentes situadas encima de la mesa, por lo que la iluminación usada durante el registro es la proporcionada por linternas manuales de baterías. Además, para evitar al máximo la inducción de ruido o la posibilidad de que sucediera, todas las alimentaciones de amplificadores y preamplificadores fueron tomadas de una sola fuente que es capaz de proporcionar 12V y -12V.

Todos los registros hechos hasta ahora se han realizado bajo las condiciones enumeradas anteriormente. Hay aparatos cercanos a la preparación (dos metros) tales como un monitor de una computadora, pero las condiciones de registro no son afectadas si éste está encendido.

2.3 Electroodos.

Los microelectrodos usados en registro neurofisiológico deben tener puntas muy finas, estos pueden ser colocados dentro de una célula (registro intracelular), o fuera de ellas (registro extracelular). En el registro extracelular el microelectrodo se posiciona próximo a grupos de células y se pueden obtener sus potenciales traslapados dependiendo del tamaño de la punta del microelectrodo. Mientras más grande la punta, mayor es el número de potenciales diferentes que se registran, pero también es mayor el ruido nervioso. Existen dos tipos de microelectrodos gruesos. Los de metal que solo pueden ser usados en registro extracelular debido a que la polarización de potenciales al instalar la interface metal-fluido biológico se dificulta cuando se hace registro intracelular. El otro tipo son los microelectrodos de vidrio los que presentan varias dificultades con respecto a los metálicos, las más importantes son que no es posible hacer una conexión directa con metal, usualmente plata, el contacto se hace por medio de electrolitos que deben llenar el electrodo además de ser muy frágiles, con estos se pueden tener impedancias muy altas usándose principalmente en registro intracelular.

Los microelectrodos de metal combinan bajos niveles de ruido con resistencia mecánica no encontrada en los de vidrio llenos de electrolito. Los electrodos de metal pueden ser clasificados en tres grupos: (1) electrodos de metal cubiertos con vidrio. (2) electrodos hechos de alambres de metal afilado y después aislado con varios materiales. (3) electrodos de vidrio rellenos con metal colocado después de que la pipeta este hecha.

El registro extracelular mejor logrado es con electrodos de metal por lo que los electrodos usados y fabricados son los electrodos que describe Hubel⁹ (1957), usando como metal tungsteno, el cual se afila por medio de una reacción electroquímica y se aíslan con laca. El tungsteno es un metal duro, con el que se pueden producir electrodos fuertes permitiendo registros estables por largo tiempo, aunque permite el paso de ruido, sobre todo de bajas frecuencias, que puede ser removido fácilmente al pasar la señal registrada a través de filtros pasa altos sin problemas de pérdida de señal. Las características eléctricas de los microelectrodos de metal aún son poco conocidas por los fisiólogos, pues para cada tipo de registro se tienen condiciones diferentes, por lo que aunque es posible obtener microelectrodos de tungsteno comercial, es preferible fabricarlos con las características requeridas.

La metodología de fabricación y establecimiento de condiciones adecuadas que se siguió consta de tres etapas:

- Afilado.
- Aislado y
- Prueba en condiciones de registro.

2.3 Electroodos.

Los microelectrodos se pueden hacer a partir de alambre de tungsteno de 120 micras de diámetro cortado en piezas rectas de la longitud deseada. El afilado se logra sumergiéndolo en un baño electrolítico en una solución concentrada de Nitrito de Potasio (KNO_2 de laboratorios J. T. Baker), el alambre debe cerrar un circuito, entre el alambre y un electrodo de grafito contenido por el recipiente donde se coloca la solución, por el que pasará corriente alterna de 60 Hz, se pueden variar las condiciones de voltaje y concentración para obtener diferentes características de afilado, el circuito formado se puede observar en la figura 6.

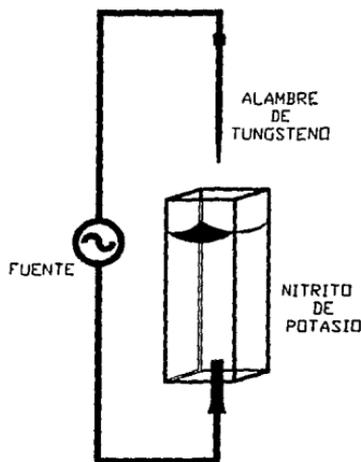


Figura 6. Circuito usado en la reacción, para el afilado de los alambres de tungsteno.

El afilado se hace en dos pasos, el primero consiste en sumergir y sacar el alambre repetidas veces en la solución electrolítica, de manera que la punta se desgaste más que las partes del alambre que están más alejadas de esta, con esto se pretende que la punta tome forma de lápiz. El paso siguiente consiste en sumergir sólo la parte más afilada de la punta y provocar que esta sea degradada hasta que desaparezca, con ello se logra dar a la punta un ángulo de afilado, con respecto a la línea media del alambre, lográndose de esta forma electrodos tan gruesos o delgados como se quiera.

Una vez que se ha afilado el alambre se aísla con barniz aislante. Se sumerge con la punta hacia arriba en el recipiente que contiene el barniz hasta cubrirlo por completo. Se debe tener en cuenta que el barniz no presente burbujas de aire que pudieran

adherirse a la superficie del alambre para evitar impedancias bajas. Luego se saca lentamente del recipiente para que la capa de barniz sea uniforme y delgada. Dependiendo de la impedancia que se quiera lograr es el número de capas de barniz que se deben poner en el microelectrodo.

La característica eléctrica de gran importancia en un microelectrodo es la impedancia que presente, esta puede ser evaluada si se cuenta con un puente de Wheatstone por el que circule corriente alterna, con frecuencia similar a la de los potenciales a medir, sin embargo estas condiciones de prueba no aseguran que, al ser usado el microelectrodo, su impedancia se mantenga, pues al estar dentro del cerebro de la rata se presentan efectos capacitivos muy complejos que no es posible evaluar, modificándose el valor de la impedancia. Debido a lo anterior es necesario contar con criterios que ayuden a evaluar las condiciones eléctricas y físicas de manera cualitativa (se puede hacer de manera exacta, pero es costoso y no significativo en este tipo de registro) y sea posible ajustar los procedimientos de fabricación de manera tal que se le den a los electrodos en un primer proceso la forma y diámetro adecuados, entre 15 y 25 micrómetros, en la punta y evaluar el estado del aislante. El procedimiento para evaluar el estado del barnizado es sumergiendo el microelectrodo en solución salina y permitiendo el paso de corriente a través del electrodo durante un instante, al observar por el microscopio el microelectrodo en el instante en el que circula la corriente se debe poder apreciar que sólo en la punta aparezca una burbuja, lo que indica que el electrodo cuenta con una impedancia adecuada para el registro extracelular, alrededor de $1\text{ M}\Omega$, de no ser así se podrá observar que en las partes descubiertas a lo largo del cuerpo del microelectrodo aparecerán burbujas. Es posible lograr impedancias altas, arriba de 3 megaohms, si se le dan al electrodo más capas de aislante. La prueba de los electrodos, tanto en las condiciones descritas, como en las experimentales en el cerebro de la rata demostraron que es suficiente con que el microelectrodo cuente con tres capas de barniz para poder efectuar registro extracelular de espigas provenientes de varias neuronas. Si la impedancia es mayor el electrodo solo podrá registrar los potenciales de un número menor de neuronas.

El proceso de fabricación con el que se contaba anteriormente para afilar y barnizar los microelectrodos³, se basaba en un sistema hidráulico formado por un par de jeringas unidas por una manguera llena de agua. Una de las jeringas queda libre para que con ella se controle el desplazamiento del émbolo de la otra jeringa, que se fija mediante una pinza para bureta a un soporte universal de manera que el émbolo pueda desplazarse hacia abajo. En este se encuentra fija una aguja metálica del número 22 que sirve de soporte y de conexión eléctrica para el electrodo; bajo la jeringa se coloca otra pinza, que soporta una pequeña cubeta con un electrodo de grafito en el fondo, que sirve para poder hacer la conexión eléctrica entre el Nitrato de Potasio y la fuente.

Para el barnizado de los microelectrodos se contaba con un alambre grueso y recto, a éste en una de sus puntas se hizo un doblez en forma de "U" al que se fijó una aguja

metálica hipodérmica, en la que se colocaba el electrodo y por la forma del alambre, la posición del electrodo era con la punta hacia arriba; con el electrodo fijo se sumergía el arreglo a un tubo de ensayo lleno de barniz. Este proceso se hacía a mano por lo que al sacar el electrodo debía ser con todo cuidado y muy lentamente, haciéndolo un proceso difícil de controlar, pues de no ser así la capa de barniz adherido al electrodo es demasiado gruesa, afectando las características físicas del electrodo. Lo más conveniente es lograr que las capas de barniz sean lo más uniforme y delgado, por lo que el realizar el barnizado a mano da como resultado capas no uniformes. El procedimiento de fabricación de electrodos descrito se ha usado durante varias décadas en estudios de gran importancia⁹, por lo que se pretende montar una estación en la que se puedan fabricar dichos electrodos de manera sencilla.

La fabricación de electrodos se hizo usando las herramientas y métodos descritos anteriormente; con esto se intentaba probar y establecer las condiciones de voltaje y degradación, para ambas etapas del afilado, fabricando seis electrodos, con ellos se ajustó el voltaje de afilado y cortado, así como el número adecuado de sumersiones para lograr las mejores condiciones. De esta forma se obtuvieron los resultados de la tabla 3.

Como se puede observar las mejores condiciones son al afilar y cortar con 5.7 Volts y dar 200 sumersiones para obtener una punta larga y cortar a la distancia requerida. El barnizado se dio de la siguiente manera: los electrodos del tres al seis se barnizaron con una capa y se dejaron secar durante la noche dando una segunda capa al día siguiente. La prueba de impedancia se realizó directamente en cerebro de la rata, durante octubre de 1991, con lo que se pudo observar que la impedancia presentada era demasiado baja, pues no fue posible observar registro neuronal. Al ser observados al microscopio se pudo observar que el barniz se había desprendido, por lo que la fijación del barniz representó la pérdida de impedancia.

Por ello se planteó la posibilidad de automatizar el proceso de barnizado, la solución se dio mediante un circuito manejador y controlador de un motor de pasos, en la figura 7 se muestra su diagrama de bloques y es explicado en el apéndice A, el que permite tener avances pequeños sin que la persona tenga que esforzarse, pues esta tarea se limita a manipular dos botones de control. El sistema diseñado superó las expectativas deseadas, obteniéndose un excelente resultado también en el proceso de afilado.

El aparato basa su funcionamiento en la generación de la secuencia de datos, para el movimiento del motor de pasos, mediante un circuito compuesto de un contador y dos multiplexores, con ellos se genera las secuencias de movimiento en ambos sentidos, que son controladas mediante dos botones y un circuito combinacional. El circuito fue diseñado usando los materiales con los que cuenta el laboratorio, usándose el riel para deslizamiento de la cabeza de impresión, banda y motor de pasos

de una impresora ATI Z-100. Con esto se logra dar el soporte necesario que permite mover un electrodo verticalmente para poder ser barnizado o afilado. La velocidad de conteo es controlada mediante un temporizador de frecuencia variable, con lo que se pueden obtener velocidades adecuadas, tanto para el barnizado como para el afilado, dependiendo del proceso de la fabricación únicamente hay que adaptar al soporte móvil del aparato la base adecuada, ya sea al afilar o al barnizar

Electrodo	Voltaje	Sumersiones	Observaciones
1	3	-	Afilado muy defectuoso
2	2	-	Afilado defectuoso. Presentando rebaba en la Punta.
	5	-	Afilado regular, con muescas cerca de la punta.
	5.5	-	Punta muy afilada, se corta con el mismo voltaje, en la punta aparecen muescas.
3	5.7	100	Punta con muescas, como final de aproximadamente 60 μm , presenta dos anillos en la punta
4	5.7	150	Punta bien, como final de 40 μm .
5	5.7	200	Punta bien, como final 30 μm
6	5.7	175	Punta bien.

Tabla 3. Puebas de afilado de alambres de tungsteno.

Las pruebas funcionamiento del aparato consistieron en la fabricación de tres microelectrodos de tungsteno. El aparato se utilizó para afilado y barnizado siguiendo las mejores condiciones indicadas en la tabla 3, es decir, un voltaje de 5.7 volts y 100 sumersiones. Se lograron puntas satisfactorias con diámetros aproximados a los 40 μm y el barnizado se veía adecuado bajo el microscopio. Luego, en un experimento, se utilizaron estos electrodos para intentar registrar del hipocampo de la rata. No se logró ningún registro. Se pensó que la impedancia era muy baja y para probarlo se utilizó un microelectrodo comercial (de marca FHC, Brunswick, ME) con una impedancia de 2 M Ω . Con este electrodo sí se pudo registrar. Después del experimento se revisaron bajo microscopio los electrodos fabricados en el laboratorio y se encontró que el aislante se había desprendido en la región de la punta, de ahí la baja impedancia.

En este punto se habían logrado buenas condiciones de afilado y barnizado, pero mala adhesión del barniz al tungsteno. Para mejorar se empezó a limpiar el alambre afilado con agua destilada, alcohol y ácido clorhídrico, pero no sirvió. Después se hizo limpieza ultrasónica del alambre afilado lográndose registros buenos, pero de poca duración (1 hora más o menos) y, además, se tuvieron que dar de tres a cinco capas de barniz a los alambres afilados.

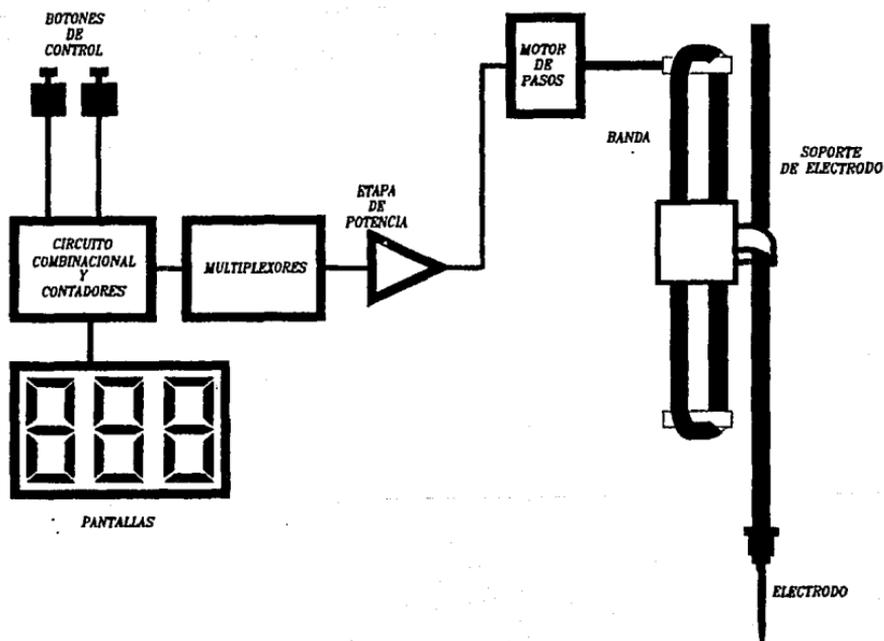


Figura 7. Diagrama de bloques del aparato afilador.

2.3 Electrodo.

Para lograr una mejor comprensión de lo que estaba sucediendo se construyó una cámara transparente de acrílico (figura 8) que se llena de solución salina y a través de la cual se puede pasar una corriente cuando el electrodo está sumergido. Se probaron los electrodos antes y después de registrar. Antes del registro, la mayoría de los electrodos presenta ausencia de burbujas o sólo en la punta cuando se le aplica momentáneamente el voltaje, pero después del registro puede presentar muchas burbujas a todo lo largo debido a que el barniz se despegó o desgarró y, por supuesto, no registra. En los casos en que sí hubo registro sólo se observa una burbuja en la punta, siendo el tamaño de ésta proporcional al metal expuesto.

Hay que hacer notar que ningún electrodo dura indefinidamente, sea hecho en casa o en fábrica, lo que se quiere lograr es que tengan una duración de registro de cuando menos 8 horas. Estos son detalles que mejoraremos en la marcha y que requerirán de que usemos tungsteno, barniz nuevo y, posiblemente, hasta horneado, pero en nuestra experiencia en otras instalaciones esto no era necesario. Por supuesto siempre queda la alternativa de comprarlos.

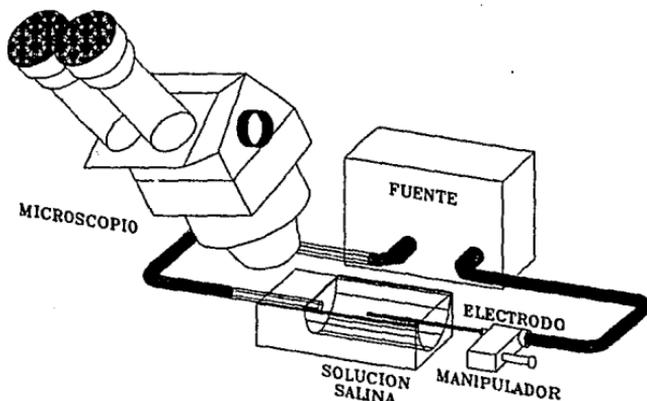


Figura 8. Montaje para pruebas del estado del barniz en los microelectrodos.

2.4 Almacenamiento de señales.

El equipo de almacenamiento de las señales registradas son una grabadora digital y una videocasetera. El primero que es un aparato diseñado para almacenar señales electrofisiológicas en tiempo real, para su futuro análisis en computadora. Permite grabar las señales registradas, en una videograbadora de formato VHS, en representación digital de alta calidad, de esta forma permite tener bajos niveles de ruido y lograr grabaciones de mayor calidad que las hechas en equipos analógicos de FM, además de tener plena disposición de la señal analógica que se graba. Simultáneamente realiza la conversión de la señal analógica original a su representación digital, modula la señal digitalizada sobre una portadora de video para poder ser enviada a la videograbadora y realiza la conversión de la representación digital a la señal analógica original. Cuenta con la capacidad de operar en tres modos de grabación, de acuerdo con la cantidad de canales que se quieran usar, por lo que es posible programarla para trabajar con uno, dos y cuatro canales, dando la posibilidad de ampliar su capacidad hasta ocho canales de grabación simultánea.

Es posible poner marcas a la cinta en cualquier momento de la grabación para identificar eventos de interés, mismas que al reproducir la cinta, pueden servir como disparo para otros dispositivos pues se presentan como impulsos eléctricos en una de las terminales.

Además es posible hacer la grabación de voz durante la grabación independiente de señales electrofisiológicas, mediante el canal de audio.

Se cuenta con una interface que permite la transferencia directa de los datos grabados digitalmente a una computadora con comunicación en paralelo de catorce bits, o bien permite usar una computadora personal como terminal de control por medio de comunicación serie. Las características con las que cuenta la grabadora digital se muestran en la tabla 4.

relación de muestreo	94.4 kilomuestras/segundo
resolución	14 bits
relación señal a ruido	84 dB
error de conversión	1/2 LSB
filtros	respuesta Bessel de 4 polos
rango analógico de entrada	10 volts a plena escala
respuesta en frecuencia analógica:	
@TABLA TABULA2 = modo de 1 canal	37 kHz
modo de 2 canales	18.5 kHz
modo de 4 canales	9 kHz
modo de 8 canales	4.5 kHz

Tabla 4. Características de la grabadora digital Instrutech modelo VR-100A

2.4 Almacenamiento de señales.

Por otra parte se cuenta con una Videgrabadora de formato VHS, de marca PANASONIC modelo NV-J32 HQ, que como principales características son la de poder manejarla a distancia y permite ponerse en línea para poder hacer grabaciones directas desde la grabadora digital.

El procedimiento de calibración y puesta en marcha, se realizó con ambos aparatos a la vez (grabadora digital y videgrabadora), consistiendo en ajustar un potenciómetro de calibración, contenido en la grabadora digital, con una señal de ruido grabada hasta que desaparezca en el indicador luminoso la presencia de error de grabación.

Se realizaron pruebas sobre ambas para asegurar que la reproducción de las señales fuera la misma que la original; se introdujeron señales periódicas tales como senoidales, y se generaron algunas señales a partir de un banco de datos en el cual se tenían digitalizadas la formas de las espigas, en ambos casos las señales reproducidas fueron las mismas que las originales, con lo que se pudo confiar en su operación. Con los registros obtenidos en los experimentos realizados en Marzo de 1992 se encontró que en el momento en el que se reproducían los registros, aparecían contaminados con ruido de alta amplitud en forma de impulsos aleatorios, pues se podían observar o no en el momento de reproducir en distintas ocasiones el mismo tramo de cinta. Dichos pulsos son mostrados en la figura 9.

El problema radica en que si no se elimina este tipo de problemas el ruido puede ser tanto que en el momento en que se introduce la señal a la computadora para ser separada, el ruido contenido en la grabación ocuparía espacio en disco duro restando una gran cantidad de bytes por lo que la capacidad de almacenamiento de la computadora sería subutilizada, el estudio de la causa de la aparición de dichos impulsos llevó a plantear varias posibilidades, en la manera en que se graba y reproduce la señal, debiendo ser del todo libre de agentes externos, por lo que se revisó la posibilidad de inducción de ruido por medio de agentes externos, el estado de limpieza de las cabezas de la videgrabadora y en la limpieza y estado físico de los conectores y cables de señal, finalmente se pensó en que el estado de las cintas era el que provocaba dicho problema, por lo que se intentó recorrer la cinta varias veces con lo que se logró eliminar por completo el problema, con esto se pensó en que con solo recorrer las cintas antes de ser usadas tanto para la grabación como para la reproducción de las señales eliminaría este tipo de problemas, sin embargo las señales se han seguido observando, por lo que dos meses después de haber finalizado el trabajo experimental descrito más adelante, se pudo observar que en todas las cintas en las que se grabó cualquier registro, presentan el mismo problema de aparición de pulsos aleatorios, ahora con mayor frecuencia y que no ha sido posible eliminar de ninguna forma por lo que antes de pasar a otra etapa de experimentación habrá que solucionarlo.

2.4 Almacenamiento de señales.



Figura 9. Ruido aleatorio de la señal producido por el estado de la cinta.

Hasta ahora las grabaciones obtenidas de señales neuroeléctricas, no pueden servir para obtener de ellas resultados científicos relevantes. Sin embargo, han permitido demostrar de manera indiscutible que se pueden obtener registros utilizables en el aprendizaje del manejo de los programas de adquisición y separación de espigas, así como para manipular las señales desde la grabación hasta la computadora.

2.5 Experimentación.

En la primera fase experimental realizada en el montaje del laboratorio de Cibernética de la Facultad de Ciencias, se realizaron 11 experimentos en ratas tipo Wistar obtenidas del bioterio de la misma facultad.

En estos experimentos la finalidad principal fue integrar los procedimientos y componentes con el objetivo de lograr registros electrofisiológicos extracelulares con suficientes espigas y una cantidad reducida de ruido.

Se probaron los procedimientos para el manejo de la preparación experimental, en este caso, la rata. En particular, se trabajó con cuidado la anestesia y se llegó a establecer una rutina que en la mayoría de los experimentos producía un estado anestésico razonablemente bueno, aunque deberá mejorarse y perfeccionarse.

Además, se probaron diferentes microelectrodos fabricados en el laboratorio y se consideró satisfactorio lo que se logró aunque también requiere de ajustes en los detalles.

El equipo electrónico-computacional se probó y ajustó y se obtuvieron registros razonablemente buenos, aunque fuera de un protocolo de experimentación formal. Esto se implementará en el futuro, cuando se hayan pulido los detalles.

Finalmente, se empezaron a realizar análisis preliminares de los datos por medio del paquete de software DISCOVERY de BrainWave⁶. Hay que hacer notar que, aunque hasta ahora se ha presentado de manera separada lo desarrollado, no es posible hablar de un desarrollo secuencial, sino en paralelo, pues cada cosa podía ser modificada, en cualquier momento, si en la experimentación los resultados no satisfacían las expectativas.

El procedimiento experimental seguido se describe a continuación:

Las ratas usadas para la experimentación se obtenían del bioterio de la Facultad de Ciencias, las ratas debían ser machos con pesos aproximados a los 300 gramos. El procedimiento de preparación experimental se iniciaba por la mañana preparando a la rata y los anestésicos (Anestésal, pentobarbital de uso veterinario fabricado por Smith Kline), de tal forma que suministrar la primera dosis de anestésico fuera lo primero que se hacía, una vez aplicada la primera dosis (0.1 ml) se colocaba a la rata en la obscuridad en el que la temperatura del animal no bajara, pues el barbitúrico deprime la producción de calor, y se esperaba media hora a que hiciera efecto, aunque es posible trabajar al animal transcurridos quince minutos, tiempo suficiente para poder manejarlo, procediendo a rasurar la cabeza del animal. Una vez transcurrida media hora se aplicaba una dosis igual a la primera (0.1 ml) y una dosis de anticongestionante (atropina 0.2 ml) se esperaba un tiempo variable, dependiendo del efecto de cada rata,

2.5 Experimentación.

Intentando montarla al aparato estereotáxico (estereotáxico David Kopf modelo 1404) en el momento en que se notara que se encontraba totalmente anestesiada.

El montaje al estereotáxico consiste en introducir por cada canal auditivo de la rata un estilite con puntas romas. El colocar correctamente los estilites es un proceso complicado, debido a que aunque el animal se encuentra completamente anestesiado, se presentan, normalmente, movimientos reflexivos. Ambos estilites se deben colocar de forma tal que los dientes centrales de la rata queden en el centro del estereotáxico, estos son introducidos a una pieza que sujeta la parte superior del hocico de la rata y los dientes frontales superiores, con lo que se logra evitar cualquier movimiento de la rata.

Una vez que se tiene a la rata fija al estereotáxico, se coloca y ajusta la posición del microscopio de disección con el que se supervisará la cirugía. Se procede a suministrar un anestésico local (Rucaina, xilocaina fabricado por Rudelsa) en el cuero cabelludo, mismo que es cortado de forma longitudinal con bisturí y el músculo que envuelve al cráneo se separa hacia los lados con mucho cuidado - para no provocar hemorragias- y se deja al descubierto el cráneo. Estando a la vista el hueso craneal se seca y se reconocen las suturas y las marcas conocidas como bregma y lambda, a partir de la bregma se toman las mediciones (2.1 mm lateral y 3 mm posterior de la bregma al lado izquierdo de la rata para el caso del hipocampo izquierdo de acuerdo al atlas⁷) en las que se hace un pequeño agujero (tipo Burr) con un taladro de dentista. Luego se perforan con gran cuidado las meninges y se hace penetrar un microelectrodo. El proceso descrito hasta aquí se puede llevar de dos a tres horas.

Una vez que se ha hecho la perforación se procede a retirar el instrumental quirúrgico de la mesa para colocar el avanzador del microelectrodo (marca Narishige) y un medidor de avance (catetómetro de marca Gaernet con ocular 10X, modelo 48 M/M EFL), estos dos aparatos ayudan a mover el microelectrodo hacia la zona cerebral de interés, que para todos los experimentos se trata de la zona conocida como el Hipocampo, y a medir la distancia que se ha penetrado respectivamente. El procedimiento de montaje del electrodo consiste en montar al manipulador una aguja hipodérmica número 22, con la punta recortada, a la que se inserta el microelectrodo con mucho cuidado para evitar que la punta se dañe. Una vez montado el microelectrodo al manipulador se avanza hasta tocar la superficie cerebral, en este momento se empieza a medir la distancia que penetra. Aunque el manipulador no permite que el microelectrodo se avance por micras y el catetómetro solo puede medir cientos de micras, es posible penetrar de manera muy aproximada a una región específica, avanzando en pasos de 500 μm en intervalos de tiempo variables que pueden variar entre unos minutos a horas, dependiendo del estado del registro en la zona. Si se tiene registro en la zona en la que está el electrodo entonces se graba la señal para su posterior manipulación en los programas de separación y análisis.

2.5 Experimentación.

Dependiendo del estado físico en el que se encuentra la rata, los experimentos pueden prolongarse a lo largo de 10 horas continuas, desde que se comenzó a preparar a la rata, dependiendo esto de las condiciones de salud en las que se recibió al animal, del estrés cuando se le aplicaron las primeras dosis, del cuidado de aplicar cuando se requiera la atropina y anestesia, de evitar al máximo que sobrevengan paros respiratorios y de cuidar que se mantenga la temperatura del animal.

Aunque se realizaron tres experimentos previos a los experimentos a los que se hace referencia arriba en estos solo se observó la disposición de instrumental quirúrgico, manipulación de las ratas, y faltantes de equipo eléctrico.

En los experimentos 1 y 2 no se hizo registro por el ajuste de las dosis del anestésico. En el experimento 3 se logro hacer registro con un electrodo comercial, mientras que con dos electrodos fabricados en el laboratorio se pudo observar que el barniz se desprendió.

También se pudo observar y determinar las condiciones en las que se podía hacer de manera adecuada el registro:

- No podía haber lámparas encendidas (incandescentes y fluorescentes de corriente alterna) en las cercanías de la preparación, por lo que el alumbrado de la preparación debería ser por medio de lámparas de mano.
- La tierra física con la que cuenta el laboratorio induce una gran cantidad de ruido, por lo que fue necesario desconectar el estereotáxico de ésta y usar el mismo como tierra aislada.
- El registro no se puede obtener sin la presencia del preamplificador conectado entre el electrodo y el amplificador.
- Se corroboró que el amplificador de diseño propio presenta problemas de diseño, al no saber el nivel exacto de ganancia.

Durante el análisis de los registros se pudo observar que el paquete Discovery se saturaba, por lo que en el experimento 4 se ajustó la ganancia de los amplificadores para evitar la saturación. De nuevo se intento hacer registro con un electrodo de fabricación casera, siendo el resultado el mismo que el anterior, desprendimiento del barniz. El registro se hizo con el electrodo comercial, ajustando la ganancia a los requerimientos del Discovery.

En el experimento 5 se intentó probar otro electrodo fabricado, teniendo como resultado desprendimiento del barniz de la punta, por lo que no se pudo hacer registro.

En el experimento 6 se logró obtener registro con el electrodo comercial, en la corteza cerebral arriba del hipocampo (figura 10), sin embargo se pudo observar registro por poco tiempo pues el barniz del electrodo se desprendió. En especial en este experimento se uso un calmante (Rompun fabricado por Bayer de México) con

2.5 Experimentación.

el fin de poder anestésicar a la rata evitando paros cardíacos. Sin embargo, se pudo observar que presentaba más movimientos que cuando no fue usado por lo que en los experimentos siguientes ya no se usó.

Durante los experimentos 7, 8 y 9 se probaron los electrodos fabricados con diferente número de capas de barniz, pues hasta la vez anterior los electrodos probados habían sido de tres capas, en el caso del experimento 7 no se pudo registrar, por problemas en la preparación biológica. Mientras que en el experimento 8 se probó un electrodo con cinco capas y limpiado con un aparato de ultrasonido, antes de ser barnizado, esta vez con este electrodo se pudo registrar por primera vez con electrodos de fabricación casera.

Los registros del experimento 9 se lograron registros con el electrodo anterior, con lo que se concluye que el problema de limpieza esta resuelto y solo hay que probar si la impedancia lograda es la adecuada (por experiencia se sabe que la impedancia del electrodo es suficiente por el tipo de registro obtenido).

Durante los experimentos 10 y 11 se probó la eficiencia de los preamplificadores como acoplamiento de impedancias, pues se intentó, con éxito, eliminar la punta de alta impedancia del amplificador, pues la alta impedancia de entrada de los preamplificadores acoplan de manera eficiente las impedancias del electrodo y la del amplificador, las pruebas de registro se realizaron con electrodos de fabricación casera.

2.5 Experimentación.

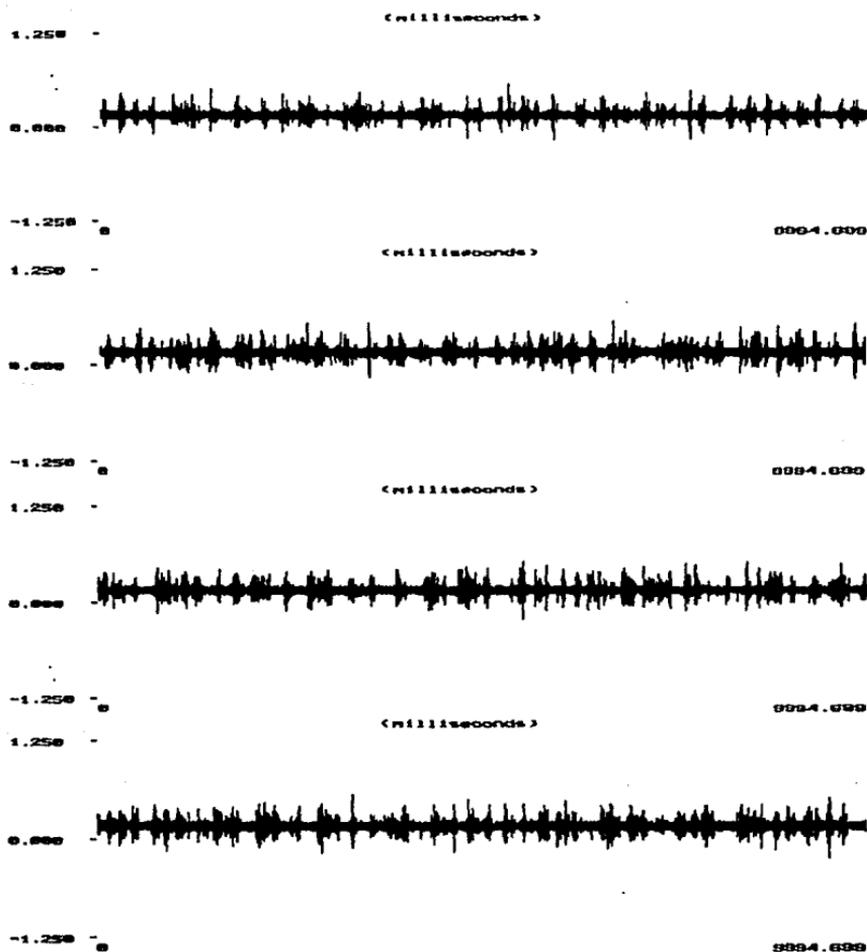


Figura 10.a)

Figura 10. Muestra del registro obtenido en el experimento 6 en la corteza cerebral de la rata. a) Muestra de 60 segundos del registro, b) Forma de las espigas registradas en el experimento 6.

2.5 Experimentación.



Figura 10 a)

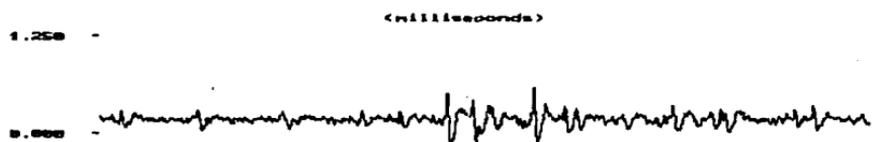


Figura 10 b)

2.6 Análisis.

Con el análisis de las señales registradas se quiere estudiar la conectividad entre las neuronas registradas y separadas y su posible cambio funcional en condiciones de actividad espontánea. Para esto, es necesario, en primer término, separar las espigas producidas por las neuronas registradas por cada electrodo, pues como se ha explicado cada electrodo es capaz de registrar lo proveniente de varias neuronas. Una vez separados los registros se deben hacer estudios de correlación cruzada, con los que es posible encontrar la correlación temporal de la actividad de una neurona con otra. Estos estudios involucran una gran cantidad de datos, por lo que es necesario el empleo de equipo y programas de cómputo que permitan el análisis de manera rápida. El Laboratorio de Cibernética ha trabajado en dos direcciones para lograr tener un sistema completo de análisis, el primero de ellos es la implementación de algoritmos computacionales mediante programación en lenguajes de alto nivel y en procesadores digitales de señales, y por otro lado en la adquisición de un programa de software llamado Discovery. Con estos tres es posible lograr la separación del registro, sin embargo el único que es capaz, por el momento, de ejecutar algoritmos de análisis de registros de hasta dieciséis canales es el Discovery⁶, a este llegan los potenciales de la grabadora digital y deben ser analizados fuera de línea. Dentro de los cuidados que hay que tener, son las amplitudes de las señales grabadas, debido a que cuando la grabación de las espigas sobrepasa cierto nivel, los convertidores de la tarjeta de adquisición se saturan y no es posible conservar, en el análisis, la forma de los potenciales, por lo que al experimentar se han ajustado las ganancias de los amplificadores de tal forma de que los potenciales no excedan los umbrales máximos permitidos.

La producción de separadores y analizadores de espigas no se ha detenido, sin embargo, los recursos técnicos con los que se cuenta no han permitido del todo su completo desarrollo.

3 Discusión.

Todos los experimentos realizados durante el montaje inicial del laboratorio de Cibernética se han efectuado en condiciones precarias. Por ejemplo, no se cuenta con instrumental de precisión para localizar exactamente al hipocampo de acuerdo a las coordenadas del atlas del cerebro de la rata. Tampoco se puede avanzar lentamente -de micra- al microelectrodo, lo que genera movimientos indeseados y que definitivamente alteran la calidad del registro, etcétera.

No obstante, el montaje, procedimientos quirúrgicos, interconexión de todos los aparatos y la experimentación en condiciones reales, nos dan la ventaja de obtener señales reales con las que se pueden ajustar las ganancias de los amplificadores, los anchos de banda y acoplamientos de impedancias de los preamplificadores, grabar y reproducir en el equipo de almacenamiento para asegurar su buen funcionamiento y entrenar a los experimentadores en el manejo del paquete Discovery.

Se puede decir que se cumplieron los objetivos de este proyecto al obtenerse los diferentes registros del hipocampo y también de la corteza encima de él (esto no era esperado, pero se registró cuando se dió la oportunidad por las condiciones de anestesia muy ligera en ese momento). Estos registros suman un tiempo considerable y sólo hemos trabajado con una parte reducida de ellos. Los pequeños tramos que se presentaron en la tesis representan un porcentaje mínimo del total disponible. La etapa de análisis todavía está en desarrollo⁶ y, como ya se ha comentado, se han presentado nuevos problemas que resolver antes de poder continuar.

Puede notarse que en los diferentes componentes de este proyecto existen muchos detalles por terminar. Se dejaron así para poder llegar a una integración de todos ellos y, de esta manera, poder lograr resultados. Los resultados no son algo nuevo, ni servirían para una publicación científica internacional, pero nos han dado la base para avanzar hacia la obtención de resultados originales. Si nos hubieramos dedicado a perfeccionar algunos de los aparatos o procedimientos aquí mencionados, probablemente nunca hubieramos hecho experimentos. Creemos que por sí sólo cada uno de los aparatos diseñados y construidos por nosotros pudiera haber sido tema de una tesis; hemos ido más allá y estamos presentando resultados modestos de todo un sistema experimental.

Como se mencionó en la Introducción, el desarrollo de esta tesis requirió de aprender y manejar muy diversas técnicas, tanto cirugía y anestesia, como diseño e implementación electrónica, realización de experimentos y manejo hábil de paquetería de software, entre otras. Los apéndices de la tesis dan una idea de la variedad de las tareas realizadas.

Por otra parte, el lector con orientación fisiológica podría preguntarse por qué no están claros los objetivos en cuanto a registro en alguna región particular del cerebro. Una respuesta sencilla es que se sabe tan poco de cómo funcionan las neuronas en paralelo que cualquier región podría ser buena. Escogimos el hipocampo por la riqueza de actividad que posee⁸, aun espontánea. Además de que es una región muy grande y a la que se puede llegar sin instrumental de precisión. No aseguraríamos en un cien por ciento que los registros que logramos son de esa zona, pero en los experimentos que seguirán tendremos las herramientas para hacer la localización anatómica exacta y la identificación fisiológica de las neuronas ahí presentes. El laboratorio cambia, aunque lentamente, hacia la mejoría.

También hay que mencionar que aunque todos los experimentos se realizaron con un solo electrodo, se pueden establecer dos etapas de continuación de la experimentación. La primera es encaminarla a introducir un arreglo de electrodos, pues las condiciones de registro están todas bajo control, así como las técnicas de fabricación y el entrenamiento adquirido. Los arreglos pueden ser de hasta cuatro electrodos, debido a la capacidad de la grabadora digital, que en un mediano plazo puede ser ampliada hasta ocho canales de grabación. Una vez dominada esta etapa y cuando sea posible conseguir comercialmente arreglos de electrodos, fabricados mediante tecnología VLSI², se podrán obtener resultados importantes en el estudio de la dinámica de las redes neuronales. Es importante mencionar que a largo plazo la solución no es fabricar o comprar 100 o 200 amplificadores, sino que las técnicas de miniaturización y otros procedimientos como el multiplexado podrán resolver el problema de registrar cientos de neuronas simultáneamente.

Los aparatos diseñados para esta etapa solo han sido un par y se ha evaluado un amplificador, en este aspecto se deben discutir las metas con las cuales se intenta montar un laboratorio de estas características, pues el objetivo fundamental del desarrollo de esta investigación no es diseñar equipo, sino implantar una serie de electrodos y estudiar la conectividad de los grupos neuronales registrados. La falta de recursos en el laboratorio nos a llevado a buscar el auto-equipamiento, y ha desviado hasta cierto punto nuestra atención en la investigación. Sin embargo, esta alternativa es muy valiosa en su aspecto didáctico y académico, pues los estudiantes que participan aprenden "metiendo las manos". Pero por otro lado, para la investigación no es lo más conveniente, ya que ésta requiere de equipo de precisión que es muy difícil fabricar en las instalaciones universitarias que no están hechas para producción en serie y alto control de calidad, además que ese no es el fin de ellas. En este trabajo se refleja esta disyuntiva y lo que se hace es tratar de sacar lo mejor de las dos alternativas, es así que se pudieron diseñar los preamplificadores que dieron un resultado mejor al esperado, la máquina para fabricar electrodos en la que se obtienen afilados de muy buena calidad y, sobre todo, registros extracelulares de buena calidad.

3 Discusión.

La experiencia adquirida hasta el momento ha sido muy valiosa en términos académicos, pues los estudiantes involucrados en el proyecto han adquirido una educación en electrónica que es bastante sólida y, además, lo han hecho en un contexto de investigación, lo que ha enriquecido su experiencia personal y fortalecido los recursos de la universidad.

La presente tesis va a terminar con esta discusión, pero el proyecto va a continuar. Se ha llegado a una etapa en la que se pueden realizar experimentos, aunque todavía son difíciles. Para llegar aquí se ha contado con el apoyo débil, pero continuo del departamento de Física de la Fac. de Ciencias, el apoyo incompleto de DGAPA y no se ha obtenido apoyo de CONACYT. Ha habido apoyo de parte de los amigos del laboratorio que han prestado parte de su equipo, en particular el laboratorio de Biofísica de la Fac. de Ciencias. Es seguro que a partir de este punto y con la obtención de resultados originales se obtendrá un apoyo sólido de diversas fuentes.

Apéndices

Apéndice A

Aparato afilador de alambres de tungsteno.

El aparato fue diseñado tomando en cuenta que la fabricación de electrodos pudiera ser más sencilla usando los recursos disponibles en el laboratorio, el diseño se puede analizar en dos partes:

1.- Bases y mecanismos.

La base debe mantener y permitir que el movimiento del electrodo sea vertical por ello se tomó como base dos soportes universales. Como mecanismo que permite el movimiento se usó la base de la cabeza de impresión y las barras paralelas donde ésta se desliza de una impresora de matriz de puntos obsoleta.

2.- Circuitos electrónicos.

Los circuitos que se diseñaron, consisten de un generador de la secuencia de control para un motor de pasos. La secuencia es generada en orden ascendente o descendente según sea necesario; la dirección de giro es controlada mediante un par de botones que al estar presionado alguno de ellos permite el paso de la señal del reloj central hacia las patas correspondientes de conteo (UP ó DOWN), si la base del mecanismo se localiza en alguno de sus extremos se activa un interruptor que inhabilita el botón controlador de la dirección en la que se ha llegado al extremo, permitiendo moverse sólo en sentido contrario.

La secuencia generada se basa en código GRAY de dos bits y sus respectivos complementarios, la secuencia de control es mostrada enseguida:

A	\bar{A}	B	\bar{B}
0	1	0	1
0	1	1	0
1	0	1	0
1	0	0	1

El contador usado es un 74193, que es un contador de 4 bits programable de conteo progresivo y regresivo, la dirección de la cuenta es controlada mediante dos patas llamadas UP y DOWN a las que es conectado un circuito combinatorial que permite el paso de la secuencia de reloj dependiendo de los interruptores accionados; la secuencia de conteo GRAY es generada con dos multiplexores usando como selector

el conteo de los dos bits menos significativos, de modo tal que a la salida del multiplexor se obtienen las señales adecuadas, los complementos de ambos bits se obtienen con ayuda de inversores, la conexión al motor de pasos se hace a través de transistores de potencia del tipo PNP, los que aportan la corriente necesaria para permitir el movimiento del motor, el diagrama eléctrico de la máquina para hacer electrodos se muestra en la figura A.1.

Además se han instalado tres contadores, que permite contar las veces que se ha cubierto todo un ciclo, es decir, la cabeza de impresión usada ha estado en una posición baja y una alta, con lo que se cuentan las sumersiones que se dan al electrodo cuando se afila, el diagrama eléctrico se muestra en la figura A.2.

El aparato lo constituyen dos tarjetas, en la primera de ellas se han colocado la fuente, contadores, multiplexores y conectores y en la otra se han puesto las pantallas de cuenta de sumersiones.

El contador no trabajó adecuadamente, pues la manera de registrar los pulsos de entrada al contador es tomándolo de ambos interruptores de control de dirección por lo que al estar ambos presionados ocurre la generación de pulsos sin control, pero tampoco ha sido necesario, por lo que no se le ha corregido, pudiendo hacerlo con un optoacoplador.

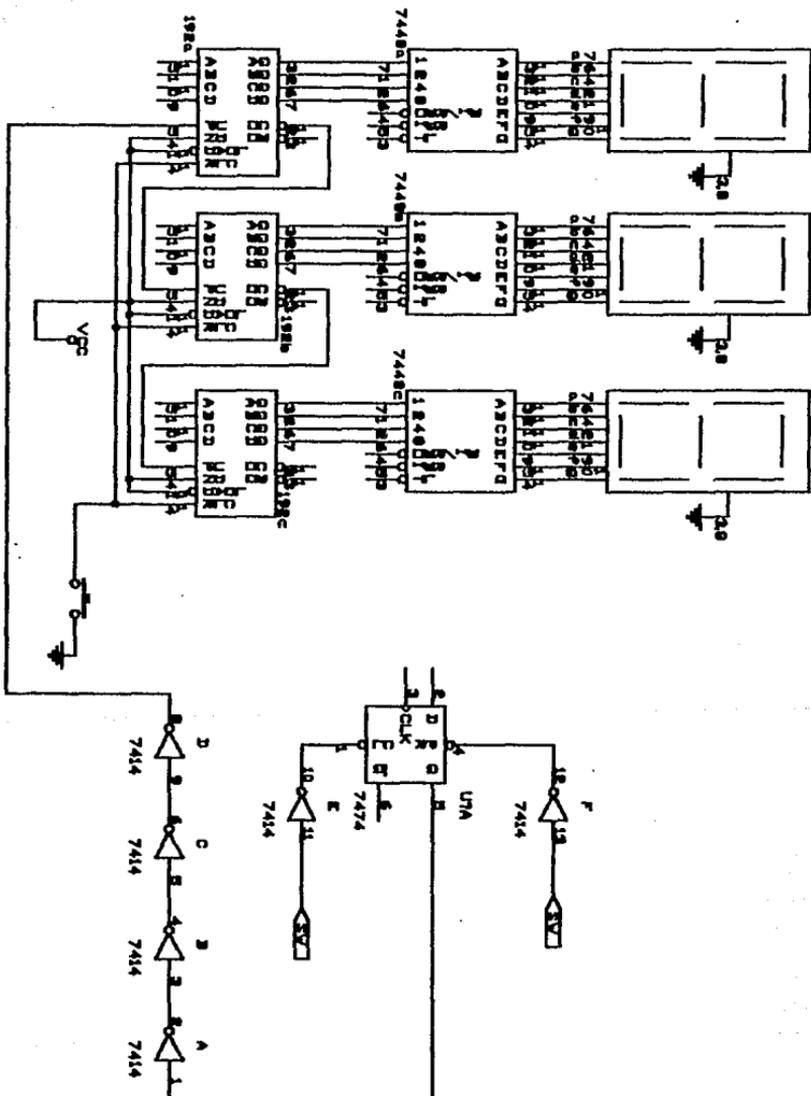


Figura A.2. Diagrama eléctrico del contador de sumergidas.

Apéndice B

Diseño de los filtros para los preamplificadores.

En todos los casos, se decidió implementar cada uno de los filtros activos con una configuración de realimentación múltiple, debido a que permite tener ganancias altas o unitarias. Primeramente se eligió el tipo de amplificador operacional, tomando en cuenta que la impedancia del microelectrodo es del orden de uno o dos megahms , por lo que se requiere una alta impedancia de entrada para que el acoplamiento sea adecuado, por ello se eligió un amplificador con entrada de FET (TL084) que tiene una impedancia de entrada del orden de los $10^{12} \Omega$. El planteamiento de las condiciones de operación de los filtros se hizo de acuerdo con las frecuencias de corte usadas en los pasos de filtrado del amplificador GRASS. La plantilla utilizada en el paquete DIFAC⁵ para diseñar el preamplificador 1 se muestra en la figura B.1. Los valores de los componentes y todas las características del filtro fueron fijadas para que este resultara un filtro de segundo orden. Al probar el filtro con una señal periódica (senoidal) se observó que la frecuencia de corte superior era cercana a los 100 kHz. En tales condiciones, se optó por sustituir el filtro paso banda por dos filtros, uno paso altas con frecuencia de corte en 100 Hz y uno paso bajas con frecuencia de corte en 10 kHz, ambos de segundo orden. En la figura B.2 se muestran las plantillas de diseño de los filtros y en la figura B.3 los componentes requeridos. Las pruebas de este circuito resultaron satisfactorias obteniéndose una mejor respuesta en frecuencia (300 Hz y 9.5 kHz).

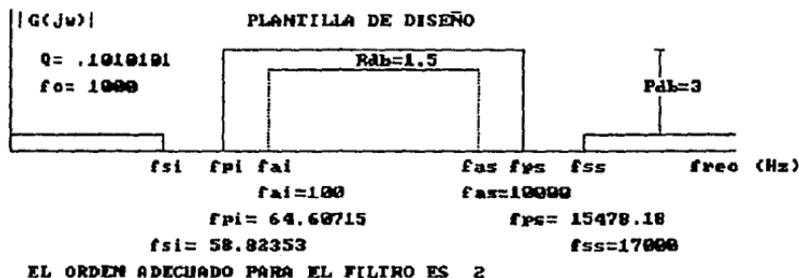


Figura B.1. Plantilla de diseño del filtro paso banda, introducida al programa de diseño de filtros activos.

El preamplificador 1 fue armado una vez que los resultados de las pruebas mostraron que se cumplían los requerimientos en frecuencia. La etapa de

acoplamiento, con la que el amplificador es conectado al microelectrodo, se hace por medio de un seguidor, con configuración inversora, de voltaje con ganancia de 10. A la salida de la etapa de filtrado es colocado otro seguidor con una ganancia también de 10, obteniéndose una ganancia total de 100. La ganancia se fijó arbitrariamente tomando en cuenta que el preamplificador 1 sólo debe adecuar la señal para eliminar problemas de ruido y dar una amplitud tal que el amplificador no tenga problemas de saturación o de ruido. En la figura B.4 se muestra el circuito esquemático del preamplificador 1, mismo que fue probado en los experimentos del 3 al 11 de manera exitosa, por lo que no hubo que hacer ningún cambio a los valores del diseño original.

El preamplificador 2 se diseñó con las siguientes características de operación: frecuencias de corte en 600 Hz y 3 kHz, y ganancia de 100. Los procedimientos de diseño fueron similares a los del preamplificador 1. Se proporcionaron al programa DIFAC las plantillas de diseño mostradas en la figura B.5, obteniéndose los valores de componentes mostrados en la figura B.6. Al igual que para el preamplificador 1, las ganancias de entrada y de salida se fijaron en 10 (la figura B.7 muestra el diagrama esquemático).

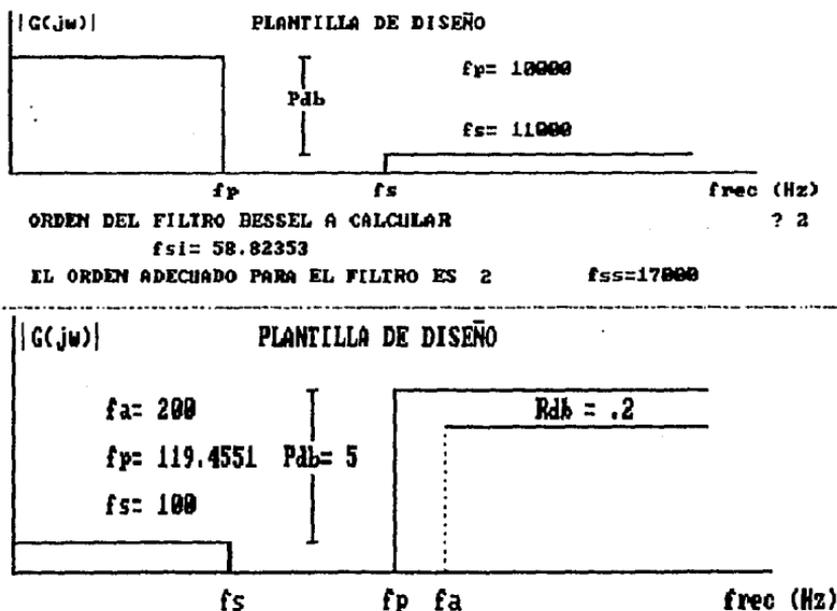


Figura B.2. Plantillas de diseño del preamplificador 1.

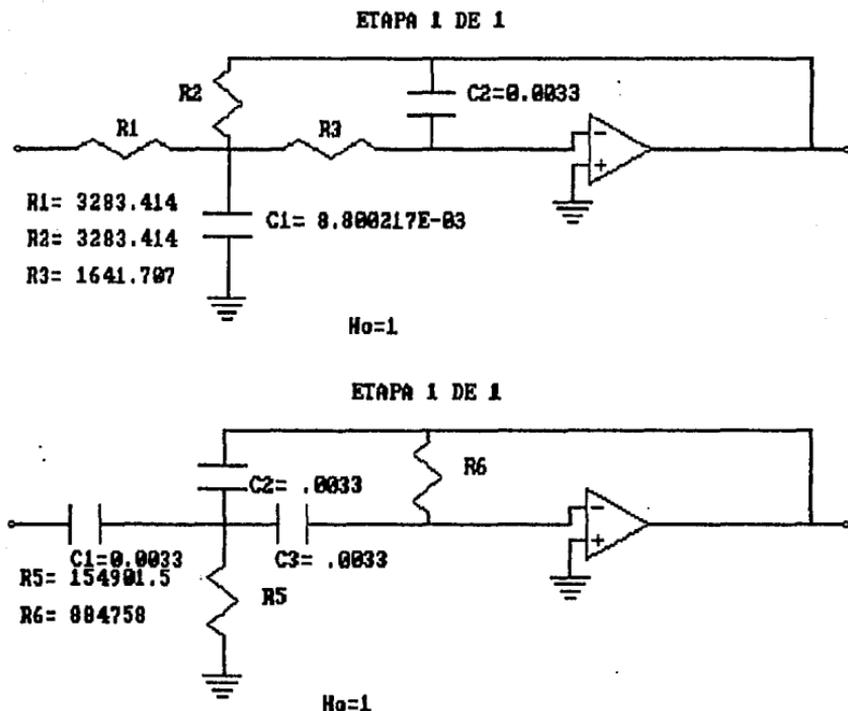
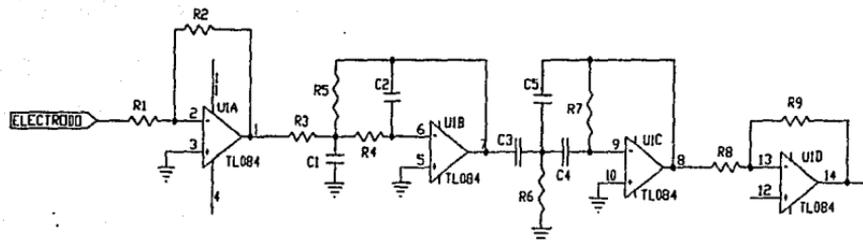


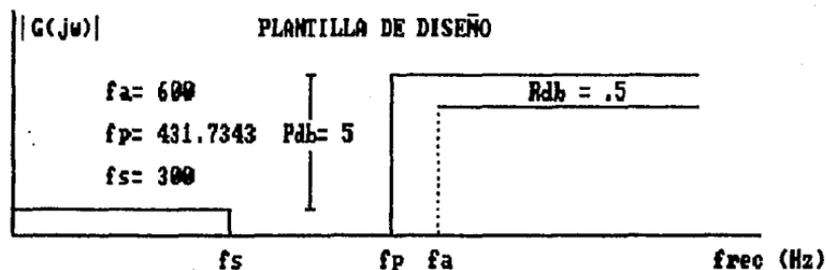
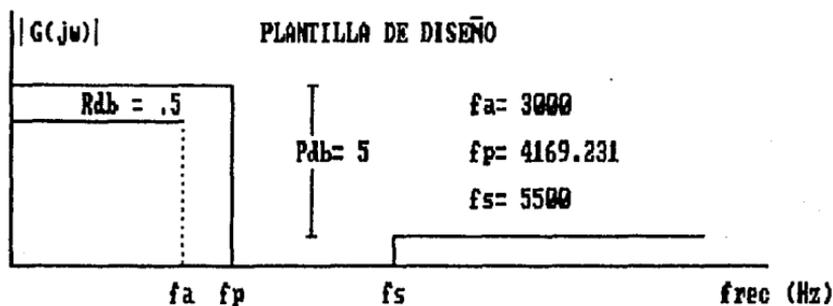
Figura B.3. Componentes usados en los filtros del preamplificador 1.

Ambos preamplificadores fueron armados en tabletas perforadas previamente, con lo que la conexión fue con soldadura punto a punto. La distribución de componentes en los preamplificadores se muestran en la figura B.8. Una vez armados los circuitos de cada preamplificador cada uno se encapsuló en cajas de plástico de diferente color, usadas para guardar cintas para máquina de escribir, por lo que la caja del preamplificador 1 es de color naranja y blanco, mientras que para el preamplificador 2 es amarilla y gris.



R1=47K	C1=8.2n
R2=470K	C2=3.3n
R3=3.3K	C3=3.3n
R4=1.5K	C4=3.3n
R5=3.3K	C5=3.3n
R6=150K	
R7=820K	
R8=1K	
R9=10K	

Figura B4. Circuito esquemático del preamplificador 1.



EL ORDEN ADECUADO PARA EL FILTRO ES 2

Figura B.5. Plantillas de diseño del preamplificador 2.

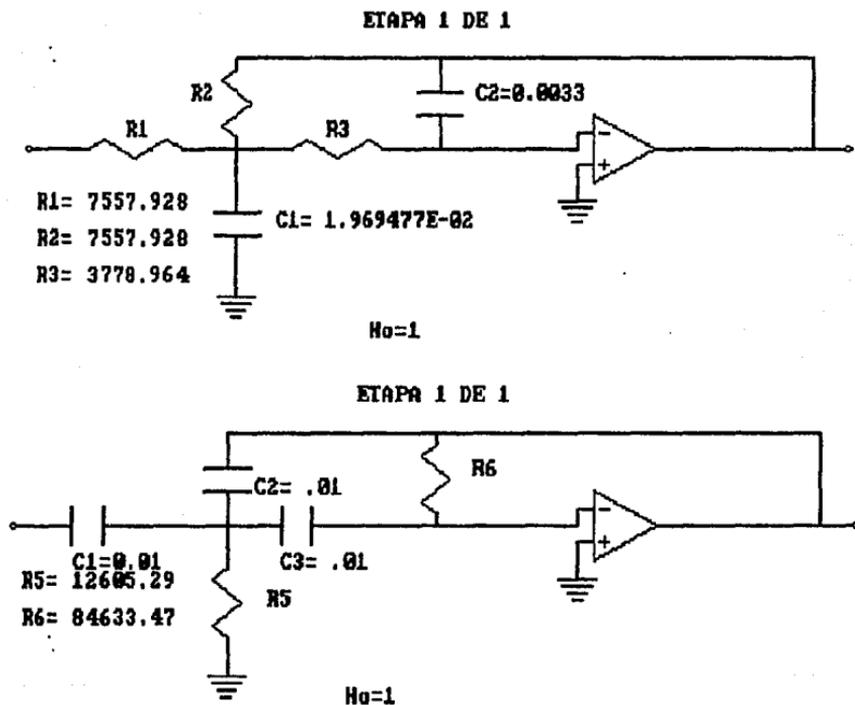
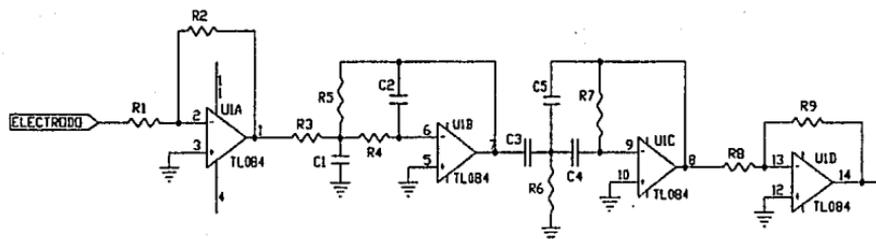
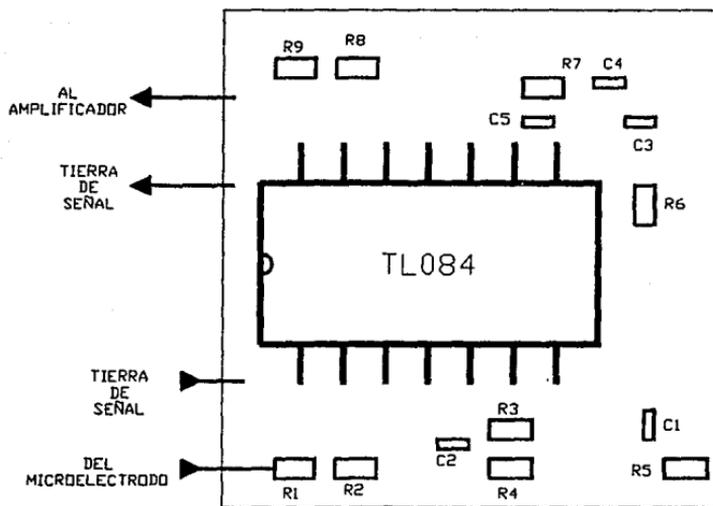


Figura B.6. Componentes usados en los filtros del preamplificador 2.

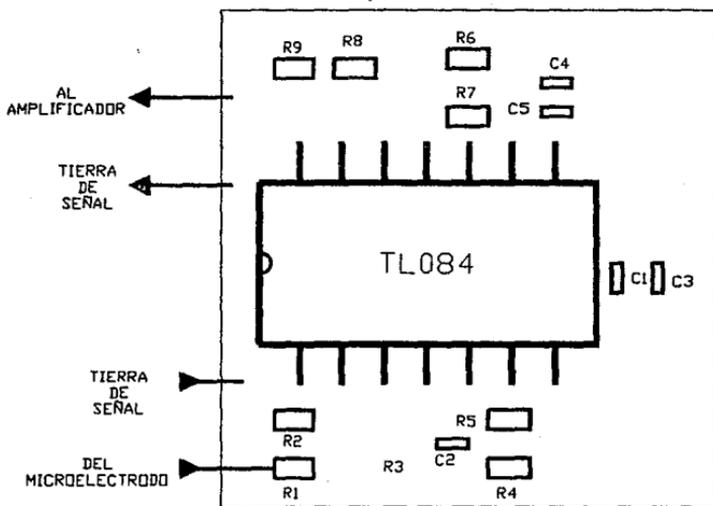


R1=10K	C1=0.022M
R2=100K	C2=3.3n
R3=9.2K	C3=0.01M
R4=3.9K	C4=0.01M
R5=9.2K	C5=0.01M
R6=12K	
R7=9.2K	
R8=10K	
R9=100K	

Figura B.7. Diagrama esquemático del preamplificador 2.



a)



b)

Figura B.8. Distribución de componentes a) preamplificador 1. b) preamplificador 2.

Apéndice C

Cirugía de caracol (*Helix aspersa*)

Dentro del montaje del equipo utilizado para realizar experimentos, fue necesario comenzar a hacer preparaciones relativamente sencillas, que ayudaran en un principio a poder determinar parámetros importantes en la obtención de potenciales de acción a un buen nivel (eléctrico). Por esto se comenzó a tratar de registrar en caracol de jardín (*Helix aspersa*), con el fin de conseguir grabar actividad espontánea de las neuronas del ganglio, ya que son muy grandes, resultando relativamente fácil el localizarlas con ayuda de un microscopio de disección, así como de introducir microelectrodos de vidrio, permitiendo que el registro sea intracelular.

La preparación del caracol consiste en los siguientes pasos:

- 1.- Se fija el caracol, con ayuda de agujas hipodérmicas, en una superficie plana de manera tal que se pueda ver desde una posición cómoda la parte alta del cuerpo.
- 2.- Se corta la piel y se procede a localizar en primera instancia el esófago.
- 3.- Localizado el esófago se encuentra en anillo del ganglio que rodea al mismo y se engancha para no perderlo.
- 4.- Se corta el esófago y se mantiene en alto el ganglio para poder cortar todas las conexiones que llegan a él.
- 5.- Una vez que el esófago está totalmente separado del cuerpo del caracol se introduce en una solución salina con concentraciones similares a las del propio caracol (Ringer).
- 6.- Auxiliándose por un microscopio de disección se fija el ganglio, y se procede a romper las membranas que protegen a los grupos de neuronas.
- 7.- Se inserta en una neurona un microelectrodo, que esté conectado a un amplificador con el fin de poder hacer registro. Adicionalmente se puede conectar un modulador digital de pulsos y una video-grabadora, con el fin de poder grabar los potenciales de acción.

Apéndice D

Protocolos de experimentos

28 de Febrero de 1992

Experimento 1/92

Peso de rata: 425 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
8:18	Se prepara rata Dosis: 0.2 ml anestésal	
8:36	Se administra anestésal 0.2 ml	
8:55	Rata dormida	
9:00	Se administra 0.2 de atropina	
9:09	Se rapa a la rata	
9:16	La rata presenta movimientos al tratar de montarla al estereotáxico	
9:17	Se suministra 0.1 de anestésal tiene problemas respiratorios por lo que se suministra 0.1 ml de atropina	Faltan cotonetes
9:35	Rata con muchos movimientos	
9:36	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
9:55	Se logra montar rata al estereotáxico y se suministra 0.1 ml de anestésal.	
10:21	Se intenta cortar cuero cabelludo	Conseguir agujas y pincel delgado
10:25	Se administra 0.1 ml de anestésal rata con movimientos	
10:34	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
10:47	Rata muere de paro respiratorio	

28 de Febrero de 1992

Experimento 2/92

Peso de rata: 305 g.

- 11:16 Se suministra 0.2 ml de anestésal
- 11:51 La dosis parece ser muy alta.
la rata muere de paro respiratorio

Es conveniente
usar fresas circulares

28 de Febrero de 1992

Experimento 3/92

Peso de rata: 362 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
12:24	Se suministra 0.1 ml de anestésal.	Fijarse que la rata no tenga bordes en la cabeza.
12:51	Se suministra 0.05 ml de anestésal.	
12:58	Se suministra 0.2 ml de atropina.	Aún se mueve mucho Rata ya dormida y se comienza a rapar.
13:15	Se suministra 0.05 ml de anestésal.	
14:14	Rata totalmente despierta. Se suministra 0.1 ml de anestésal.	
14:33	Se suministra 0.05 ml de anestésal. Rata todavía con movimientos.	
14:50	Se suministra 0.1 ml de anestésal. Se suministra 0.1 ml de anestésal.	
15:09	Se suministra 0.05 ml de anestésal.	

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
15:15	Se monta a la rata al estereotáxico. Se suministra 0.2 ml de atropina para evitar problemas con la respiración.	Comprar anestesia local.
15:46	Se trepana cráneo, la rata presenta movimientos; se suministra 0.1 ml de anestésal.	Se hizo un agujero cerca de la cima media rompiendo una vena. No se va a ver la entrada.
16:25	No presenta movimientos, estable.	
16:55	Presenta movimientos; se administra 0.1 ml de anestésal.	
17:05	Electrodo se avanza hasta tocar. No se puede evaluar la distancia de penetración.	
18:02	Se administra 0.1 ml de anestésal.	
18:44	Se administra 0.1 ml de atropina.	
19:53	Se administra 0.1 ml de anestésal.	
20:00	Se administra 0.2 ml de atropina.	
20:04	Se avanza electrodo y aumenta la cantidad de potenciales. se graba 10 minutos la señal.	
20:30	Se concluye experimento. Se inyecta sobredosis, para sacrificar al animal.	

Notas: Al conectar el filtro y tocar el cráneo, se escucha la respiración y la onda de radio-frecuencias al estar fuera. El filtro y preamplificador mejora el registro.

La tierra, que consideramos física mete ruido, por lo que el registro es mejor; se toma una muestra en el videocasette.

Al parecer el filtro-preamplificador funciona bien, sin embargo es, al parecer conveniente disminuir el ancho de banda (600 Hz a 3 kHz).

Se pudo registrar aproximadamente a las 19:00 horas, con el electrodo comercial No. 12, con 2 M Ω de impedancia.

Se observa al microscopio que el barniz de los electrodos se desprende con mucha facilidad por lo que hay que limpiar la superficie de residuos, antes de barnizar.

Las condiciones con las que se registro fueron:

Señal en el osciloscopio:

8 cuadros con una escala de 0.2 v/div (en promedio).

5 ms/div en barrido.

Señal en el amplificador grass:

ganancia: x10 (100)

filtrado: Banda de paso 1 Hz a 3 KHz y filtro supresor de banda de 60 Hz conectado.

Condiciones de preamplificación: Preamplificador con ganancia de 10 a la entrada del electrodo. Filtrado con banda de paso de 100 Hz a 10 kHz. ganancia de 10 a la salida del filtrado.

Ruido:

2.5 cuadros con una escala de 0.2 v/división.

Condiciones especiales:

La tierra física que se tomó de la instalación eléctrica no funciona para poder eliminar ruido sino por el contrario mete ruido al registro.

La tierra de la señal se obtiene conectando el caimán al estilete.

La salida del preamplificador a la punta de alta impedancia se conecta a G1 y G2.

Respecto a la iluminación resulta imposible tener una lámpara de alimentación de 127 v cerca de la preparación, pues induce demasiado ruido, por lo que hay que tener iluminación de d.c.

El ruido producido por las lámparas fluorescentes no provoca gran inducción si se tienen encendidas las de los extremos del laboratorio.

El montaje de la rata en los estiletos, fue malo, pues solo un estilete se encontraba dentro del canal auditivo, mientras que el otro se encontraba fuera del respectivo canal.

Para preparar no cortar músculo para evitar sangrado. Además, la rata se encontraba mal colocada en el soporte dental.

6 de Marzo de 1992

Experimento 4/92

Peso de rata: 400 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
11:51	Rata un poco estresada se suministra 0.1 ml de anestésal.	
12:21	Se suministra 0.1 ml de anestésal.	
12:23	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
12:40	Rata despierta, se comienza a rapar	
13:05	Rata despierta.	
13:16	Rata despierta se administra 0.1 ml de anestésal.	
13:58	Rata con movimientos.	
14:09	Rata con movimientos se inyecta 0.1 ml de anestésal.	
14:31	Rata con problemas respiratorios se suministra 0.1 ml atropina.	
14:53	Se suministra 0.1 ml de anestésal.	
15:06	Rata con problemas respiratorios se suministra 0.1 ml de atropina.	
15:10	Rata con muchos reflejos, se inyecta 0.05 ml de anestésal.	
15:13	Se aplica 0.2 ml de atropina.	
15:27	Se inicia la cirugía.	
15:33	Se suministra 0.05 ml de anestésal.	
15:42	Se suministra 0.05 ml de anestésal.	
15:52	Se suministra 0.1 ml de atropina.	

Apéndice D

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
16:37	Se suministra 0.1 ml de anestesia.	
16:57	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
17:11	Se introduce electrodo 500 μm .	
17:21	Electrodo avanza 500 μm .	No hay registro tal vez por mala impedancia.
17:26	Se suministra 0.1 ml de anestesia.	Por error se suministro anestesia, hay que marcar las jeringas de modo más notorio
17:28	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
17:35	Se suministra 0.2 ml de atropina.	
18:00	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
18:24	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
18:45	Se introduce electrodo comercial número 12, con 12 M Ω de impedancia, una distancia de 500 μm .	
18:52	Se avanza electrodo 500 μm .	
19:03	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
19:05	Se avanza electrodo 500 μm .	
19:15	Registro bueno, se ajusta el umbral de separación de Brain Wave en 1200 y 1000 unidades, siendo mejor el último.	Amplificador. filtros: 60 Hz fuera banda de paso: 100 Hz a 3 KHz ganancia: 500.
19:25	Se graba registro. Contador de casetera en 0000, se grabarán 5 min. término de grabación en 0145.	Preamplificador conectado con ganancia 100 y filtrado de 200 Hz a 10 kHz
19:30	Se avanza electrodo 500 μm .	
19:34	Se avanza electrodo 500 μm . El registro es mínimo.	

Hora	Tarea	Observación
19:42	Se avanza electrodo 300 μm . Se detiene avance al encontrar zona de mayor actividad espontánea.	
19:47	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
19:49	Se graba señal, contador en 0145 marcas en 0155, 0165 a 0175 y 0215 Registro bastante bueno.	Amplificador. filtros: 60 Hz fuera banda de paso: 300 Hz a 3kHz ganancia:500 preamplificador conectado con ganancia 100 y filtrado de 200 Hz a 10 kHz.
19:54	Se deja de grabar, contador en 0309.	
19:56	Se avanza electrodo 100 μm .	
19:58	Se suministra 0.1 ml de atropina.	
20:01	Se graba, contador y marca en 0310	
20:06	Se deja de grabar en 0424	
20:08	Se avanza electrodo 500 μm . No se obtiene registro.	
20:14	Se avanza electrodo 200 μm . Zona con actividad. se fija umbral de BW en 1000.	
20:17	Se avanza 100 μm , registro mayor.	
20:24	Se graba con contador en 0425, marca en 0435.	
20:34	Se para grabación 0680.	
20:35	Se avanza electrodo 500 μm , no se obtiene registro	
20:37	Actividad aumenta, ganancia muy alta	
20:40	Se ajusta ganancia a 100, filtro 60 Hz fuera, banda de paso 100 hz a 3 kHz, preamplificador conectado con ganancia 100 y filtrado de 200 Hz a 10 kHz	
20:44	Se graba a partir de 0681, marca en 0700, umbral en 525	

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
20:56	Se presenta un brinco en la rata. Fin de grabación y marca en 1025.	
20:58	Concluye experimento, se sacrifica a la rata.	

Notas:

Se consiguió un Catetómetro, de marca Gaertner, en el que es posible tener mediciones en el orden de cientos de micras, con lo que se podría estimar la zona en la cuál se encontraba el electrodo.

El objetivo que se persiguió en un principio era el de hacer registro en una zona llamada Hipocampo. Se penetró 3.8 mm, los primeros dos milímetros pertenecen a la corteza cerebral en la que se pudo registrar por primera vez a los 1.5 milímetros de profundidad, el hipocampo se alcanzó a la profundidad de 2.5 mm y hasta los 3.8 mm podemos estimar que nos encontrábamos dentro de la misma región, en la que se obtuvo registro, mismo que se grabó al estar a los 2.8mm, 2.9mm, 3.7mm y 3.8mm.

Aunque se pudo medir con cierta precisión el avance del electrodo, debe ser del orden de las micras para evitar lesionar las zonas por las que pasa.

Es importante mencionar que aunque no se puede saber la inclinación con la que el electrodo entra, la zona registrada es muy grande, por lo que aunque el electrodo no entrara completamente vertical la zona de registro final es sin lugar a dudas el hipocampo.

20 de Marzo de 1992

Experimento 5/92

Peso de rata: 325 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
8:18	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
8:36	Se suministra 0.2 ml de atropina	
8:57	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
9:10	Se rapa a la rata	
9:16	Rata totalmente dormida	
10:08	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
10:21	Se suministra 0.2 ml de atropina	
10:37	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
11:20	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
11:29	Se suministra 0.1 ml de atropina	
11:35	Problemas de respiración, se suministra 0.2 ml de atropina	
11:51	Se suministra 0.2 ml de atropina	
12:00	Se trepana en 1.9 mm, 3.1 mm, para evitar el seno se mueve el agujero 1 mm atrás, se perfora en 1.9 mm, 4.00 mm	
12:06	Se suministra 0.2 ml de atropina	conseguir cera de hueso
12:43	Se suministra 0.2 ml de atropina	
13:00	Se avanza 200 μm	electrodo en: 200 μm nivel de meninges
13:01	Se suministra 0.2 ml de atropina	
13:13	Se suministra 0.2 ml de atropina	

Apéndice D

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
13:25	Se avanza 500 μm	700 μm
13:42	Se avanza 500 μm	1200 μm
13:50	Se avanza 500 μm	1700 μm
14:02	Se avanza 500 μm	2200 μm
14:06	Se suministra 0.2 ml de atropina	
14:16	Se avanza 200 μm	2400 μm
15:28	Se avanza 500 μm	2900 μm
15:40	Se avanza 500 μm	3400 μm
15:45	Se avanza 100 μm	3500 μm
16:10	Se extrajo electrodo	Se observó desprendimiento del barniz en la punta
16:15	Se suministra 0.2 ml de atropina	
16:35	Rata fallece	

Apéndice D

27 de Marzo de 1992

Experimento 6/92

Peso de rata: 325 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
9:07	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
9:37	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
9:41	Se suministra 0.2 ml de atropina	
9:47	Se intenta montar rata en el estereotáxico	
10:00	Rata montada en el estereotáxico	
10:08	Se suministra 0.2 ml de atropina	
10:37	Se suministra 0.1 ml de anestésal rata con movimientos	
10:47	Respiración muy acelerada, se suministra 0.2 ml de atropina	
10:58	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
10:59	Se suministra 0.2 ml de atropina	
11:15	Se comienza cirugía	
11:34	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
11:58	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
12:03	Se suministra 0.2 ml de atropina	
12:06	Se trepana y comienza a avanzar el electrodo	
12:47	Se avanza 500 μm	electrodo en: 500 μm
12:58	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
13:07	Se avanza 500 μm	1000 μm
13:16	Se suministra 0.2 ml de atropina	Tiene problemas respiratorios al

Apéndice D

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
		parecer hay que esperar para el suministro de la anestesia a que esté más inquieta y no debe ser periódica
14:01	Se avanza 500 μm	1500 μm
14:16	Se avanza 500 μm	2000 μm
14:23	Se avanza 500 μm	2500 μm
15:02	Se avanza 500 μm	3000 μm
15:09	Se suministra 0.2 ml de atropina	
15:24	Se avanza 500 μm	3500 μm
15:40	Se extrajo electrodo	Se despellejo el barniz
16:00	Se introduce electrodo comercial número 12 12M Ω 500 μm	electrodo en: 500 μm
16:11	Se avanza 300 μm La penetración es anterior que la penetración precedente Se graba en videocinta y en disco duro (Brain Wave), contador en videocasetera en 0000 umbrales de Brain Wave en 800, 600 y 100 amplificador en 10 X 10 filtros en 100 Hz y 3 KHz, filtro de 60 Hz fuera. Se marca cinta en 0028 hora 16:43 en la grabadora digital al mismo tiempo comienza grabación en Brain Wave	800 μm Registro muy bueno en corteza cerebral
17:09	Termina la actividad espontánea, se para la grabación en 0795	
17:14	Se avanza 500 μm	1300 μm

Apéndice D

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
17:20	Se avanza 1200 μm	2500 μm
	17:32	Se avanza 500 μm 3000 μ
17:38	Se avanza 800 μm	3800 μm
17:44	Se avanza 200 μm	4000 μm
17:52	Se avanza 500 μm	4500 μm
17:54	Se avanza 200 μm	4700 μm
18:05	Se avanza 500 μm	5200 μm
18:18	Se suministra 0.1 ml de anestesia	
18:24	Se suministra 0.1 ml de anestesia	

Notas: El electrodo comercial, al parecer se le cayó el barniz en la punta, al microscopio se nota un cambio de coloración entre la punta y el cuerpo del electrodo.

Probando el electrodo comercial en la caja de acrílico se ve que en toda la punta aparecen una gran cantidad de burbujas.

10 de Abril de 1992

Experimento 7/92

Peso de rata macho: 299 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
9:10	Se suministra 0.1 ml de anestésal	Faltan jeringas
9:19	Se suministra 0.045 ml de Rompun	Rata muy inquieta y es difícil sujetar
9:50	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
10:08	Se suministra 0.2 ml de atropina	La rata se ve mal
10:33	Se suministra 0.05 ml de anestésal	reacciona al montarse en el estereotáxico
11:05	Se inicia cirugía	
11:34	Se suministra 0.05 ml de anestésal Se suministra 0.2 ml de atropina	
12:05	Se suministra 0.05 ml de anestésal Se suministra 0.2 ml de atropina	
12:38	Se introduce electrodo No. 3 Se avanza 300 μm	electrodo en: 300 μm
12:42	Se avanza 400 μm	700 μm
12:47	Se avanza 300 μm	1000 μm
13:07	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
13:08	Se avanza 500 μm	1500 μm
13:23	Se avanza 500 μm	2000 μm
13:23	Se suministra 0.2 ml de atropina	periódica
13:29	Se avanza 400 μm	2400 μm
13:36	Se avanza 300 μm	2700 μm

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
13:39	Se avanza 600 μm	3300 μm
15:02	Se avanza 500 μm	3000 μm
15:09	Se suministra 0.2 ml de atropina	
15:24	Se avanza 500 μm	3500 μm
15:40	Se extrajo electrodo	Se despellejó el barniz
16:00	Se introduce electrodo comercial número 12 12M Ω 500 μm	electrodo en: 500 μm
16:11	Se avanza 300 μm La penetración es un poco más atrás que la penetración anterior Se graba en videocinta y en disco duro (Brain Wave), contador en videocasetera en 0000 umbrales de Brain Wave en 800, 600 y 100 amplificador en 10 X 10 filtros en 100 Hz y 3 KHz, filtro de 60 Hz fuera. Se marca cinta en 0028 hora 16:43 en la grabadora digital al mismo tiempo comienza grabación en Brain Wave	800 μm Registro muy bueno en corteza cerebral
17:09	Termina la actividad espontánea, se para la grabación en 0795	
17:14	Se avanza 500 μm	1300 μm
17:20	Se avanza 1200 μm	2500 μm
17:32	Se avanza 500 μm	3000 μm
17:38	Se avanza 800 μm	3800 μm
17:44	Se avanza 200 μm	4000 μm
17:52	Se avanza 500 μm	4500 μm
17:54	Se avanza 200 μm	4700 μm
18:05	Se avanza 500 μm	5200 μm

Apéndice D

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
18:18	Se suministra 0.1 ml de anestésico	
18:24	Se suministra 0.1 ml de anestésico	
18:25	Fallece la rata	

24 de Abril de 1992

Experimento 8/92

Rata macho, peso 420 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
9:39	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
10:10	Se suministra 0.1 ml de anestésal Se suministra 0.2 ml de atropina	Rata con poco movimiento, más rígida que las anteriores
10:20	Se suministra 0.2 ml de atropina	
10:43	Se suministra 0.2 ml de atropina	
10:57	Se suministra 0.1 ml de anestésal	Rata caminando
11:07	Se suministra 0.2 ml de atropina	
12:20	Se suministra 0.2 ml de atropina	
12:23	Se suministra 0.1 ml de anestésal	Meninges rotas con herramienta especial y se provocó sangrado por lo que se acelera avance antes de que coagule.
13:04	Se suministra 0.1 ml de anestésal Se suministra 0.2 ml de atropina	
13:10	Se abre cuero cabelludo	
13:40	Se perfora cráneo	
14:26	Se introduce electrodo No. 7 con 5 capas de barniz, se tiene registro, por lo que la impedancia es buena Se avanza 3700 μm	electrodo en: 3700 μm
14:29	Se avanza 100 μm	3800 μm
14:32	Se avanza 300 μm	4100 μm
14:42	Se tiene buen registro Amplificador: ganancia 50 X 10 filtros en 100 Hz y 3 kHz filtro de 60 Hz fuera. Se graba a partir de 1300 y se marca	
14:46	Se para grabación en 1400	

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
14:47	Se avanza 200 μm	4300 μm
14:57	Se graba a partir de 1400 y se marca en 1410, al rededor de 1750 hay un cambio de actividad. Se para la grabación en 1806	
15:19	Se avanza 500 μm Se suministra 0.2 ml de atropina	4800 μm
15:24	Se avanza 500 μm	5300 μm
15:35	Fallece	

30 de Abril de 1992

Experimento 9/92

Rata macho, peso 280 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
8:44	Se suministra 0.1 ml de anestésal	
8:52	Se suministra 0.2 ml de atropina	
8:18	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
9:48	Se suministra 0.05 ml de anestésal Se suministra 0.2 ml de atropina	
10:01	Se suministra 0.2 ml de atropina	
10:29	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
10:31	Se suministra 0.2 ml de atropina	
10:52	Se suministra 0.2 ml de atropina	
11:38	Se suministra 0.2 ml de atropina	
11:48	Se introduce electrodo 500 μm	electrodo en: 500 μm
11:56	Se avanza 500 μm	1000 μm
12:25	Se graba señal en video (posible que sea en corteza). Amplificador: ganancia en 500, filtros en 100 Hz y 3 kHz, filtro de 60 Hz fuera. casete en 2000	
12:43	Se para grabación en 2335	
12:43	Se avanza 500 μm Se avanza 500 μm	1500 μm 2000 μm
12:59	Se avanza 700 μm Se avanza 100 μm Se graba a partir de 2340	2700 μm 2800 μm
13:17	Se avanza 200 μm	3000 μm
13:26	Se avanza 500 μm (cinta en 2560)	3500 μm

Apéndice D

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
13:30	Se suministra 0.2 ml de atropina	
13:40	Se aplica 0.1 ml de anestésico Rata con movimientos (cinta en 2730)	
13:43	Fallece (cinta en 2800)	

15 de Mayo de 1992

Experimento 10/92

Rata macho, peso 320 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
8:39	Se suministra 0.1 ml de anestésal	Rata muy dormida
8:48	Se suministra 0.1 ml de atropina	
9:25	Se suministra 0.06 ml de anestésal	Rata despierta
10:00	Se suministra 0.04 ml de anestésal	
10:40	Se suministra 0.12 ml de atropina	
10:45	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
11:00	Se suministra 0.1 ml de atropina	
11:15	Se suministra 0.05 ml de anestésal	
11:30	Se monta en el estereotáxico	
11:37	Se suministra 0.05 ml de anestésal	0.35 anestésal
12:07	Se suministra 0.1 ml de anestésal	0.45 anestésal
12:08	Se suministra 0.2 ml de atropina	0.52 atropina
12:30	Se hace incisión	
12:45	Se hace agujero	
13:12	Se introduce electrodo 500 μm	electrodo en: 500 μm
13:23	Se avanza 400 μm	900 μm
13:28	Se graba en video, casete en 2000 Amplificador: ganancia en 500, filtros en 100 Hz 3 kHz, filtro de 60 Hz fuera. Con preamplificador 2 y punta de baja impedancia	
13:30	Se para grabación en 2100	
13:40	Se graba desde 2100 se para grabación en 2150	

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
13:45	Se avanza 500 μm	1400 μm
13:55	Se avanza 500 μm	1900 μm
14:06	Se avanza 500 μm	2400 μm
14:20	Se avanza 550 μm Se graba a partir de 2340	2950 μm
14:33	Se graba en video, casete en 2150 Amplificador: ganancia en 500, filtros en 100 Hz 3 kHz, filtro de 60 Hz fuera. Con preamplificador 1 y punta de alta impedancia Se avanza 250 μm Se para grabación en 2300	3200 μm
15:50	Se saca electrodo. Grabación en 2305 Se para en 2350	
15:15	Se coloca electrodo No.5 con 4 capas	
15:20	Se avanza 600 μm	600 μm
15:21	Se avanza 1000 μm	1600 μm
15:29	Se avanza 300 μm	1900 μm
15:12	Se aplica 0.1 ml de anestésico	0.55 ml en total
15:40	Se avanza 1900 μm	3800 μm
15:40	Se suministra 0.2 ml de atropina	
15:50	Se avanza 1000 μm	4800 μm
16:03	Fallece	

5 de Junio de 1992

Experimento 11/92

2 Ratas macho, peso 292.5 g.

<u>Hora</u>	<u>Tarea</u>	<u>Observación</u>
	Se suministrarán los mismos fármacos en cantidades iguales, con el fin de observar los efectos en una y otra rata, mientras una de ellas se somete a cirugía, la otra sólo estará en observación	
8:56	Se suministra 0.1 ml de anestésico	Ambas ratas aún con movimiento
9:41	Se suministra 0.1 ml de anestésico Se suministra 0.2 ml de atropina	Una de las ratas muere, la otra con muchos movimientos
10:23	Se suministra 0.1 ml de anestésico	
10:42	Se suministra 0.2 ml de atropina	
11:38	Se suministra 0.05 ml de anestésico Se suministra 0.2 ml de atropina	
11:57	Se suministra 0.05 ml de anestésico	
12:43	Se suministra 0.1 ml de anestésico	
13:39	Se suministra 0.15 ml de atropina	0.75 ml en total
13:52	Se suministra 0.05 ml de anestésico	0.45 ml en total
14:25	Se suministra 0.05 ml de anestésico	0.50 ml en total
14:50	Se suministra 0.2 ml de atropina Se monta en el estereotáxico Se inicia cirugía	0.95 atropina Se nota cierta excitabilidad al tocar la zona lumbar de la médula espinal
15:30	Se suministra 0.1 ml de anestésico	

Hora	Tarea	Observación
	<p>Amplificador GRASS con ganancia 500 filtros de 100 Hz a 3 kHz, calibrador en 7.</p>	
	<p>Pruebas de ruido con:</p>	
	<p>Electrodo al aire, tira de conectada y apagada se graba en 900</p>	
	<p>Con lámpara apagada sólo conectada a la tira, el ruido es grande, se graba en 938 a 30 cm de la rata, se para en 960.</p>	
	<p>Se prende tira y la lámpara apagada. a 15 cm de la preparación, se graba hasta 990.</p>	
	<p>Se enciende lámpara a 15 cm, se graba de 1020 a 1050</p>	
	<p>Todas las lámparas del laboratorio prendidas, se graba de 1050 a 1100</p>	
	<p>Con las lámparas que están arriba de la preparación, se graba de 1100 a 1150.</p>	
	<p>Se quita punta de alta impedancia y se coloca la de baja impedancia.</p>	
15:49	<p>Se toca con el electrodo y se avanza 600 μm Se graba de 1150 a 1200 Se graba movimiento de 1201 a 1250</p>	600 μm
16:00	<p>Se suministra 0.2 ml de atropina</p>	
16:02	<p>Se avanza 1500 μm Se graba señal de 1250 a 1254</p>	2100 μm
16:10	<p>Fallece</p>	

Apéndice E

Metodologías de edición.

Para la elaboración de éste documentos se ha seguido un procedimiento que por su extensión puede ser complicado, por ello en las siguientes secuencias de pasos se tratará de explicar la manera en que se elaboró el documento y las figuras aquí presentadas, respectivamente.

Documento:

- Se captura el texto en cualquier procesador de texto, para el caso de éste trabajo se usó Word versión 5. El procesador de texto debe ser compatible con Ventura Publisher o en su defecto ser capaz de salvar el documento en ASCII de 8 bits (ASCII extendido) para que respete los caracteres especiales, como son las letras acentuadas.

- Todas las correcciones de texto se deben hacer, por facilidad desde el procesador de texto.

- Una vez que se está seguro de que el documento es la versión final, entonces desde el paquete Ventura Publisher se carga el archivo, para darle el formato final. Hay que mencionar que dentro de Ventura se pueden hacer correcciones, pero no es un procesador de texto, por lo que complicarían las correcciones. La versión de Ventura Publisher usada en la formación de este Texto es la versión 3.0 con extensión profesional, que permite además insertar figuras y dar formato a los párrafos del texto es posible introducir fórmulas matemáticas.

Figuras:

En el caso de las figuras se generaron dos tipos, las de señales neuroeléctricas grabadas en videocinta y las representaciones a bloques o esquemáticas.

Las señales neuroeléctricas se deben primero pasar a disco duro, por medio de la tarjeta de interface de la grabadora digital y usando el paquete llamado VR111 que lee la tarjeta y almacena en disco duro la señal. Con la señal digitalizada, se convierte el archivo generado a un archivo que pueda ser desplegado en pantalla con ayuda del programa del VR111, llamado DISPLAY y que permite ver el contenido completo de la señal, en una ventana superior y en una inferior un tramo de la señal seleccionada. Previamente de correr DISPLAY se instala un programa para la captura de pantallas gráficas, para el caso de las señales aquí presentadas se usó el programa GRAFPLUS

(versión 4.0) que salva las pantallas gráficas en formato PCX, con lo que se puede editar la figura desde PAINTBRUSH (versión 3.0 de Windows) y quitar de ella los colores y dejarla en blanco y negro.

Las figuras a bloques y los esquemáticos fueron hechas desde AUTOCAD versión 10 y desde ORCAD versión 3.21, en estos dos paquetes para poder hacerlos compatibles con Ventura Publisher, es necesario hacer lo siguiente:

- Los archivos de ORCAD se mandan imprimir a un archivo con el programa PLOTALL que debe estar configurado como DXF (interface de ORCAD para AUTOCAD) se carga desde AUTOCAD importándolo como archivo con formato DXF, en AUTOCAD se le quitan los caracteres que no deban salir y se manda a un archivo para plotter. El mismo proceso se sigue para los archivos editados en AUTOCAD. Los archivos con formato HPGL (los archivos para plotter de autocad) se convierten a formato GEM con el programa de VENTURA llamado HPGL2GEM, hecho esto es posible importar éstas gráficas a VENTURA.

Inventario de señales grabadas en videocintas.

Se cuenta con cuatro videocintas de formato VHS, los contenidos son los siguientes:

Cinta	Contenido
1 Hitachi T-120HR	Experimento del 28 de Febrero de 1992 000-060 ruido 060-280 primer intento de introducir primer electrodo 280-780 segundo intento de introducir electrodo 780-950 segundo electrodo 950-1735 electrodo comercial (avance el 1310) 1735-1774 Misma posición, amplificador de Francisco 1775-1902 tercer electrodo 1902-2214 tercer electrodo avance
2 Hitachi T-120HR	Experimento 6 de Marzo de 1992 000-1025 Experimento 24 de Abril de 1992 1300-1806 Experimento 15 de Mayo de 1992 2000-2350
3 Hitachi T-120HR	Experimento 27 de Marzo de 1992 000-795
4 Hitachi T-120HR	Señal ejemplo Brain Wave 000-1220 Señal ejemplo Brain Wave 1220-2890 Experimento en video 28 de Febrero de 1992 3000 Experimento 5 de Junio de 1992 900-1220

Referencias

- 1.- Espinosa E., I., "CROSSCORRELATION ANALYSIS OF SPIKE TRAINS RECORDED SIMULTANEOUSLY IN CAT'S PRIMARY AUDITORY CORTEX (AI) DURING PRESENTATION OF THREE-TONE SEQUENCES", Doctoral Dissertation, University of Pennsylvania, 1985.
- 2.- Campbell, P., et. al., "A Silicon-based, Three-Dimensional Neural Interface: Manufacturing Process for an Intracortical Electrode Array", IEEE Trans. Biomed. Eng., vol. 38, pp 758-768, 1991.
- 3.- Heredia L., F., "DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN LABORATORIO PILOTO PARA REGISTRO EXTRACELULAR EN LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA Y EL CONEJO", Tesis de Maestría en Ingeniería Biomédica, UAM, 1990.
- 4.- Kerkut, G. A., et al., "Mapping of Nerve Cells in the Suboesophageal Ganglia Of *Helix aspersa*", Blochem. Physiol., Vol. 50A, pp. 1 - 25, Pergamon Press, Great Britain, 1975.
- 5.- Salvá C., A., "DIFAC (Programas Interactivos Para Diseño de Filtros Activos)", IX Conferencia Nacional de Investigación y Desarrollo en Ingeniería Eléctrica y Electrónica (MEXICON 83), Cuernavaca Morelos, 1983.
- 6.- Serna, R., Austrich, J., Espinosa, I., "Reconocimiento, Mediante Programa, de Espigas en Registro Neurofisiológico Compuesto", Rev. Ing. Biom. vol. 13(2), pp 353-356, 1992.
- 7.- Paxinos, G. "THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES", Academic Press Inc., San Diego, California, 1986.
- 8.- Buzsáki, G., et al., "Multisite Recording of Brain Field Potentials and Unit Activity In Freely Moving Rats", J. Neurosci. Meth. 28, pp 209-217, 1989.
- 9.- Hubbard, J. I., et al., "ELECTROPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF SYNAPTIC TRANSMISSION", Edward Arnold Publishers, London, pp 298-299, 1969.
- 10.- Gerstein, G. L., Bloom, M. J., Espinosa E., I., Evanczuk, S., and Turner, M. R., "Design of a Laboratory for Multineuron Studies", IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Vol. SMC-13, No. 5, pp. 668-676, September/October 1983.