

Diseño y construcción de un sistema telemétrico de registro extracelular multiunitario

Francisco J. Heredia López¹, Br. Zoemy Esquivel Loria²

¹Universidad Autónoma de Yucatán, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Laboratorio de Ingeniería Biomédica. hlopez@tunku.uady.mx

²Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Matemáticas. zgel_09@yahoo.com.mx

Resumen. Este trabajo describe los avances que se han logrado en el proyecto de desarrollo de un sistema para la transmisión inalámbrica de potenciales de acción neuronales extracelulares a una PC, y que permita mover mediante señales inalámbricas un conjunto de hasta cuatro electrodos implantados en el cerebro de la rata, sin tener que inmovilizar o anestesiarse al animal.

Abstract. This paper describes the advances that have been achieved in the project of development of a system for the wireless transmission of extracellular action potentials to a PC, and that allows to move a group of up to four electrodes with wireless commands without having to immobilize or to anesthetize the animal.

1 Introducción

Uno de los problemas que con más frecuencia obstaculizan la medición de la actividad eléctrica de las neuronas es la vibración a la que están sometidos los microelectrodos durante el movimiento de los animales, lo cual hace que la punta del electrodo cambie de posición y se pierda la señal. Esto se ha tratado de solucionar mediante dispositivos de avance micrométrico que permiten reubicar los electrodos para localizar otra neurona o estructura funcional, pero que poseen la desventaja de ser controlados manualmente, lo cual requiere manipular e inmovilizar al animal, alterando su comportamiento espontáneo, con lo que se reduce la validez y confiabilidad de los datos.

En el Laboratorio de Ingeniería Biomédica del Centro de Investigaciones Regionales de la UADY, se está desarrollando un sistema para la transmisión inalámbrica de potenciales de acción neuronales extracelulares, teniendo como objetivo el desarrollo de un sistema telemétrico implantable en el cráneo de ratas, que permita mover un conjunto de hasta cuatro electrodos sin tener que inmovilizar o anestesiarse al animal y que transmita en forma inalámbrica las señales de la actividad eléctrica a una computadora cercana.

Actualmente se han desarrollado los circuitos para establecer comunicación por Radio-Frecuencia (RF) utilizando la tecnología RF-Monolithics. La señal a transmitir es previamente digitalizada por un microcontrolador PIC12CE674, para posteriormente enviarla de manera serial utilizando el transceptor DR3000-1 de RF-Monolithics logrando tasas de transferencias de 125 Kb/s. La señal es recuperada

utilizando el microcontrolador PIC16F877, el cual establece comunicación con la PC a través del puerto paralelo; dicha señal es visualizada en la PC utilizando una interfase creada en el lenguaje LabView 6.1.

2 Antecedentes

En trabajos previos se han reportado diversos sistemas para registrar la actividad eléctrica extracelular mediante arreglos de microelectrodos implantados en el cráneo, los cuales son ubicados en el núcleo cerebral de interés por dispositivos de avance micrométrico controlados manualmente [1] [2].

En todos estos trabajos se resalta la importancia de poder medir varias unidades simultáneamente con el fin de correlacionar de manera más completa la actividad eléctrica detectada con las respuestas a los estímulos empleados durante el proceso experimental. Sin embargo, los dispositivos reportados poseen varios inconvenientes que limitan la posibilidad de realizar un mapeo de las distintas capas de neuronas presentes en la región cerebral en estudio, sin manipular y alterar el comportamiento de los animales, lo cual restaría validez a los resultados.

En algunos estudios [1] [3], los sistemas desarrollados se han basado en el uso de dispositivos capaces de detectar varias unidades de manera simultánea y de reubicar manualmente el arreglo de microelectrodos en caso de pérdida de la señal o de querer realizar registros a distintos niveles (capas de tejido), pero con el inconveniente de que la información es transmitida de manera alámbrica [4], lo cual impone ciertas restricciones al movimiento del animal en experimentación.

Es por ello que algunos autores han enfocado sus esfuerzos al diseño de sistemas para la captura y transmisión inalámbrica de las señales eléctricas [5] [6]. Cabe destacar que en los trabajos citados, el cambio de posición de los arreglos de microelectrodos sólo podía efectuarse manualmente, introduciendo involuntariamente en el animal alteraciones conductuales, ya sea por la propia manipulación o por la administración de sedantes o anestésicos que alteran la actividad eléctrica de grupos neuronales, tal como ha sido reportado en otros estudios [7] [8].

Como puede observarse, los enfoques de los trabajos reportados en la literatura no convergen en una metodología capaz de registrar la actividad eléctrica neuronal mediante microelectrodos de registro con avance micrométrico controlado a distancia y que permita capturar por vía telemétrica la señal electrofisiológica, sin tener que restringir la actividad del animal o introducir alteraciones en los patrones de actividad eléctrica por la administración de sedantes o anestésicos.

El proyecto en proceso tiene como objetivo desarrollar un implante en el cráneo del animal que contenga:

- (a) Un arreglo de hasta cuatro electrodos que permita detectar simultáneamente los potenciales de acción de varias neuronas.
- (b) Un sistema electromecánico en miniatura controlado de manera inalámbrica que permita reubicar el avance de los electrodos en pasos precisos y conocidos para localizar a otras neuronas.

Además incluirá un dispositivo electrónico en miniatura para la amplificación y transmisión inalámbrica de las señales electrofisiológicas a un receptor cercano, con el fin de tener al animal sin restricciones físicas que impidan su libre movimiento. Un segundo módulo receptor-transmisor que reciba las señales provenientes del módulo en el cráneo de la rata y que transmita la información necesaria para reposicionar la tétada de microelectrodos (montados en un portaelectrodos).

En ambos casos la información será enviada o provendrá de una PC en el caso de que el usuario desee mover la tétada de electrodos.

3 Métodos

Actualmente se han diseñado e implementado los circuitos electrónicos y los programas de computadora que constituyen un sistema automático para la transmisión inalámbrica de potenciales de acción extracelulares y para el control inalámbrico de reposicionamiento de los micro electrodos.

Así el trabajo desarrollado puede centrarse en dos grandes secciones: Desarrollo del "hardware" y desarrollo del "software".

3.1 Desarrollo del hardware

3.1.1 Módulo Transmisor

Actualmente éste módulo está construido alrededor de un microcontrolador RISC ("Reduced Instruction Set Computer") PIC12CE674, para digitalizar los potenciales de acción provenientes de los amplificadores. Para lograr un enlace telemétrico digital por señales de radiofrecuencia se emplea un transmisor de tecnología RF-Monolithics, específicamente el transceptor DR3000-1 en modo transmisor (ver figura 1).

Así, el convertidor análogo digital (A/D) de cuatro canales del microcontrolador hace un muestreo de alguno de los cuatro canales de los amplificadores y cada "byte" obtenido es transmitido de manera serial, logrando una tasa de transferencia de 125 Kb/s utilizando el protocolo RS-232, esto es, se logra digitalizar y transmitir 21 muestras por canal, teniendo por cada evento una duración de 2ms.

3.1.2 Circuito preamplificador

La señal eléctrica proveniente de la actividad neuronal, es enviada a este circuito preamplificador. El diseño de este circuito está basado en un seguidor de voltaje J-FET (con un transistor 2N5457) para lograr una impedancia de entrada de varios Mohms. La salida de este seguidor se acopla a una etapa de alta ganancia de voltaje construida por medio de un transistor "darlington" MPSA13. Esta etapa tiene una ganancia aproximada de 10, teniendo un consumo de energía de 833 μ A.

Para las pruebas mostradas en este trabajo, la señal que recibe el preamplificador proviene de un circuito generador de señales que simula ráfagas de potenciales de acción.

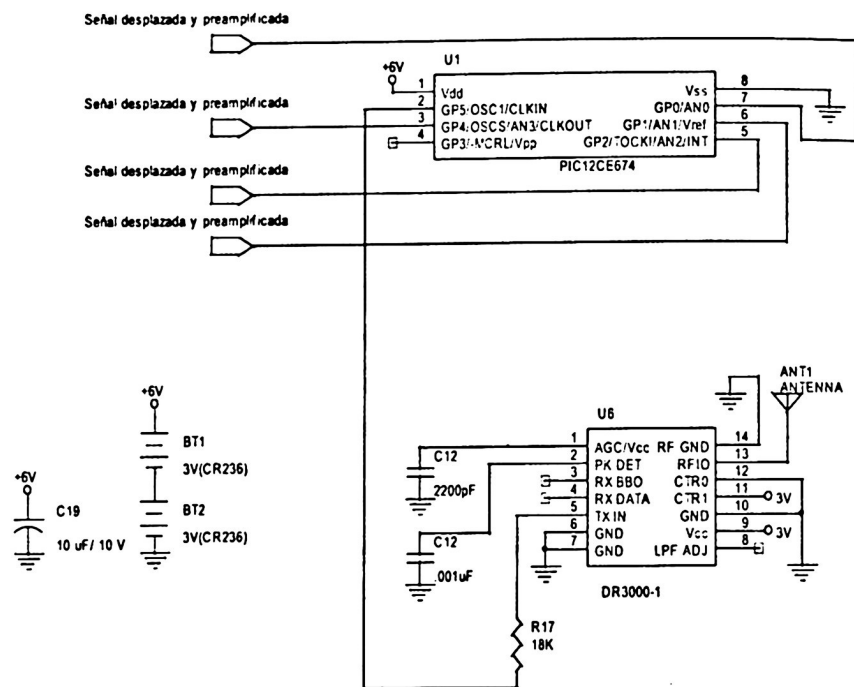


Figura 1. Diagrama del módulo transmisor.

3.1.3 Circuito amplificador y desplazador de nivel

La señal amplificada de los potenciales de acción es pasada a través de un desplazador de nivel con ganancia de 100 a fin de montarla sobre un voltaje constante de la mitad del valor de la fuente de alimentación, para de ahí enviarla al microcontrolador y digitalizarla, esto es debido a que el convertidor A/D del PIC12CE674 no maneja voltajes negativos.

3.1.4 Circuito generador de señal

Para probar las secciones previamente descritas (preamplificador, desplazador de nivel) se llevó a cabo el diseño y construcción de un circuito generador de pulsos basado en el microcontrolador Microchip PIC16C84, que es capaz de generar cuatro patrones de pulsos diferentes, cada patrón con una duración de 20ms, aproximadamente, los cuales son enviados a cuatro derivadores y de ahí a un divisor resistivo, obteniendo así pulsos con flancos de salida exponenciales negativos de 2ms de duración con una amplitud de 5mV aproximadamente, que simulan un potencial de acción.

La figura 2 muestra el diagrama de los circuitos desplazador, preamplificador de señal y generador de señal para un canal.

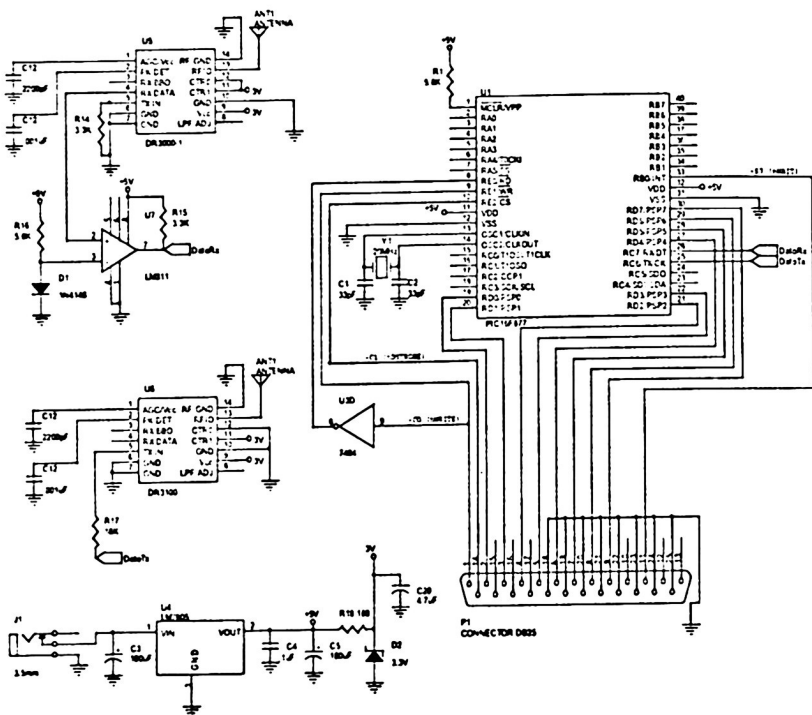


Figura 3. Diagrama del módulo receptor.

3.2 Desarrollo del software

3.2.1 Módulo Transmisor

El programa desarrollado para el microcontrolador que se utiliza en el módulo transmisor ejecuta las siguientes tareas:

1. Programa el convertidor A/D para utilizar los bits GP0, GP1, GP2 y GP4 (canales 0 al 3 del A/D) como entradas de la señal a digitalizar provenientes de la tetrada de electrodos.
2. Programa el bit GP5 como la terminal de salida de los datos digitalizados hacia el transmisor de radio frecuencia.
3. Programa el Puerto GP3 como terminal de entrada digital para recibir comandos de cambio de canal a digitalizar y transmitir.
4. Programa el convertidor A/D para que digitalice en los canales 0 a 3, con una frecuencia de conversión de 500KHz, con lo que se obtiene un tiempo de conversión (TAD) de $1/500 = 2$ microsegundos.

5. Programa el registro OPTION REGISTER para que el "timer" (TMR0) decremente su conteo con una frecuencia de 500 KHz (una cuenta cada 2 microsegundos).
6. Programa el TMR0 con 250 para que al llegar a 0 hayan transcurrido 12 μ s y se limpie la bandera de rebose del mismo (TOIF). Estos 12 μ s se requieren para que el A/D pueda muestrear correctamente el canal a digitalizar.
7. Seguidamente el bit GO del registro ADCON0 del A/D es puesto en alto para iniciar la digitalización del canal seleccionado, y el programa vigila en un lazo de espera cuando este bit va a bajo (digitalización completa, dato disponible en ADRES).
8. Al detectar el fin de conversión el programa ejecuta una rutina destinada a cambiar el valor binario en los bits ADCON0,3 y ADCON0,4 para seleccionar el siguiente canal (electrodo) y pasa el resultado de la digitalización a la variable l_dummy por medio del registro de trabajo W, e inicia otra digitalización (pone GO en H).
9. Seguidamente el programa transmite el dato en la variable l_dummy por GP5 usando el protocolo RS232 a 125Kb/s a 8n1s. La rutina está escrita en forma lineal. Al terminar de transmitir el dato, el programa chequea por si hay solicitud de cambiar de canal, y salta a la rutina de actualización de canal a digitalizar (paso 8) y el proceso se repite.

3.2.2 Módulo Receptor

El programa desarrollado para el microcontrolador que se utiliza en el módulo receptor ejecuta las siguientes tareas:

1. Programa los puertos A y C como entradas y los puertos B y D como salidas.
2. Programa el puerto paralelo esclavo del microcontrolador.
3. Programa el puerto serial del PIC16F877 para una recepción asíncrona a una tasa de transferencia de 125 Kb/s, sin paridad, un bit de stop, 8 bits de datos.
4. Inicia la recepción de datos seriales provenientes del receptor de radiofrecuencia.
5. Checa si hubo algún error durante la recepción (mediante recepción completa). Si es así, lo intenta de nuevo.
6. El microcontrolador chequea la bandera del buffer de recepción de su puerto paralelo para detectar la presencia de un byte de comando proveniente de la PC.
7. Si hay dato recibido el microcontrolador salta a una rutina para recibir otros dos bytes. En caso de que el primer byte recibido sea una M, los siguientes dos bytes contienen el total de micras que los microelectrodos avanzarán. Si por el contrario el primer byte recibido es una C, el siguiente byte contiene el número de canal a digitalizar.
8. Si la bandera de recepción del puerto paralelo esclavo está inactiva, el dato válido proveniente del puerto serial es transmitido por el microcontrolador a la PC por medio de su puerto paralelo esclavo usando el protocolo EPP.

3.2.3 Módulo generador de señal

Como se mencionó en la sección del transmisor se construyó un circuito generador de señales de potenciales de acción, usando un microcontrolador PIC16C84, el cual es controlado por un programa que realiza las siguientes funciones:

1. Inicializar el puerto B como salida, y el oscilador como RC a 4MHz.
2. Se programa el OPTION REGISTER para que trabaje con una frecuencia de 1:256
3. Se programa el TMR0 para que cuente 2 ms.
4. Si ya pasaron los 2 ms:
 - 4.1 Generar 4 patrones de pulsos diferentes, alternando 0's y 1's
5. Programar el TMR0 para contar de nuevo 2ms y se regresa al paso 3.

3.2.4 Programa para la recuperación de los datos

El programa para recuperar las señales en una PC fue desarrollado en lenguaje gráfico LabView 6.1 de National Instruments, el cual realiza las siguientes tareas (ver figuras 4,5 y 6):

1. Poner en bajo C0, C1 y C3 del puerto de control del puerto paralelo, antes de acceder al registro EPP e iniciar la recepción de datos.
2. Inicializar con ceros un arreglo de datos con capacidad de 1024 datos.
3. Se lee constantemente S7 del Puerto de Estatus hasta que el dato leído sea 128 (bit 7 en alto) lo cual significa que existe un nuevo dato en el Puerto Paralelo Esclavo del microcontrolador.
4. Leer el dato en el registro de datos (dirección base + 4).

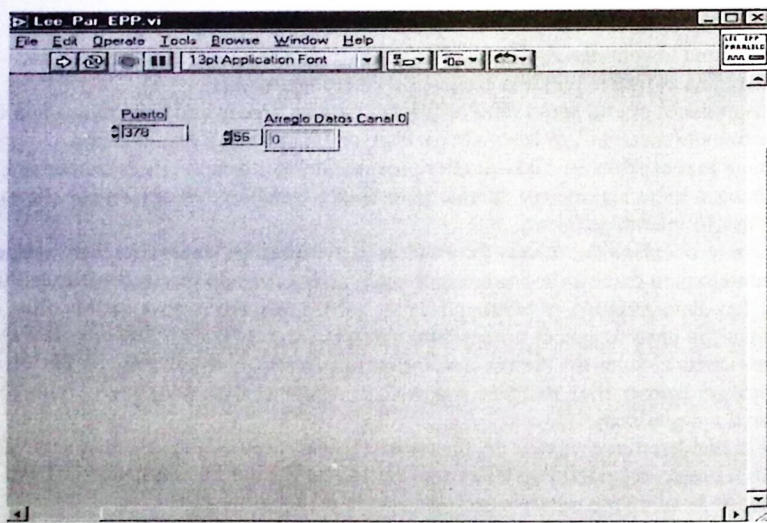


Figura 4. Inicialización del programa de recepción de datos.

5. Pasa el arreglo de datos a una función de graficación para su desplegado.

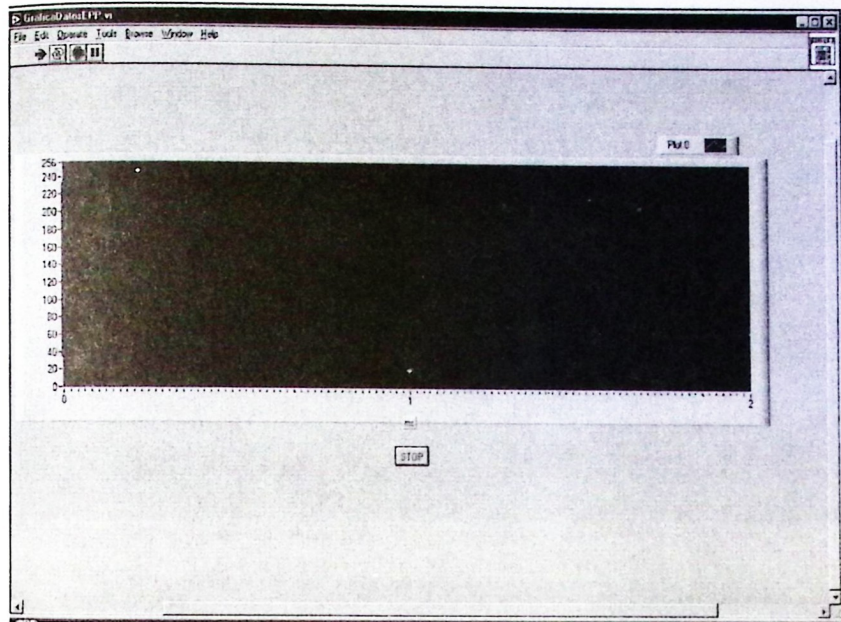


Figura 5. Pantalla para la representación gráfica de la recepción de datos.

4 Resultados

En las primeras pruebas se digitalizaron cuatro canales de manera secuencial utilizando una señal senoidal con una frecuencia de 500 Hz y obteniendo 8 muestras por evento. Esta cantidad de información es insuficiente para obtener una imagen digitalizada de un potencial de acción con una adecuada resolución. Por trabajos previos, en las condiciones experimentales se necesita un mínimo de 10 muestras por evento.

Para las pruebas actuales se utilizó únicamente el canal 0 del sistema desarrollado obteniendo 21 muestras por evento, situación que permite una digitalización de un potencial de acción con buena resolución. (Ver figura 6).

Posteriormente se sustituyó la señal senoidal, por la señal proveniente del generador de patrones. En la figura 7 se observa en el osciloscopio la señal proveniente del generador de patrones; y en la figura 8 se muestra a modo comparativo la señal recuperada dentro de la PC.

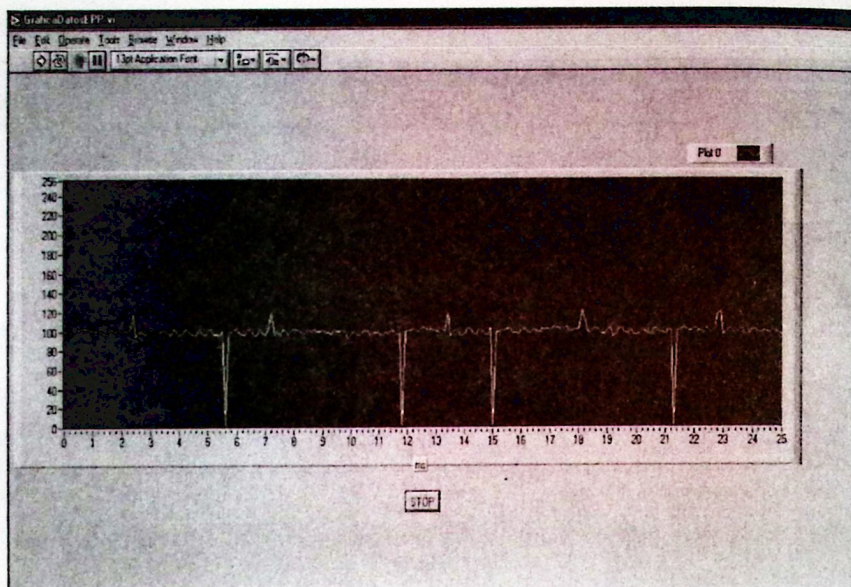


Figura 6. Señal senoidal recuperada en la PC.

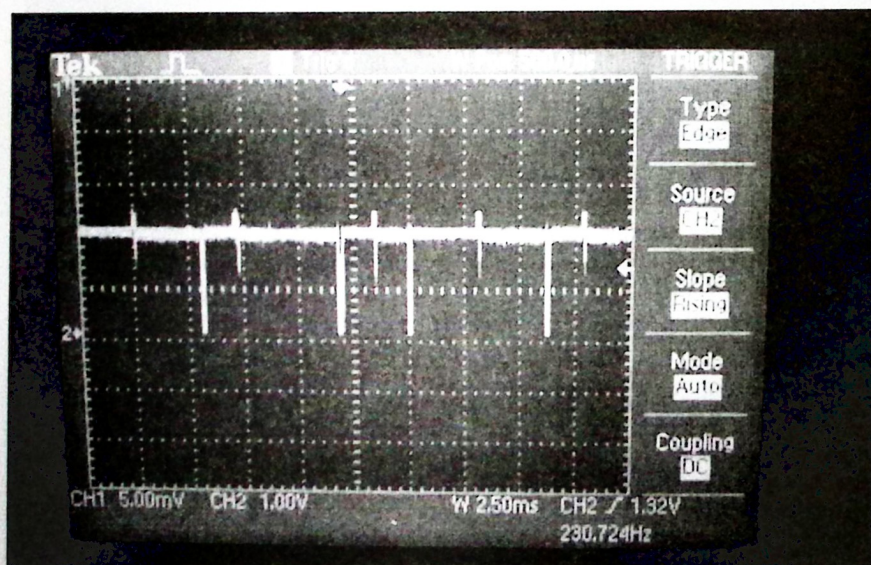


Figura 7. Señal proveniente del generador de pulsos.

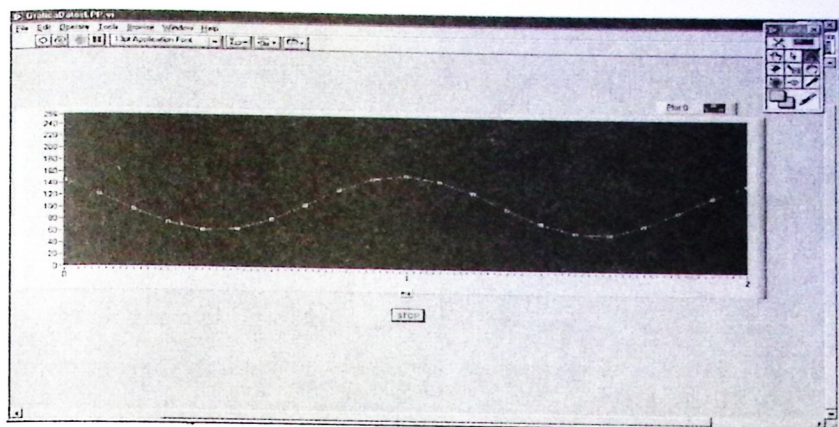


Figura 8. Señal recuperada en la PC

En la siguiente figura (figura 9) se muestra una imagen de la tarjeta del receptor e interfase con la PC, pueden observarse los módulos de transmisión y recepción por RF.

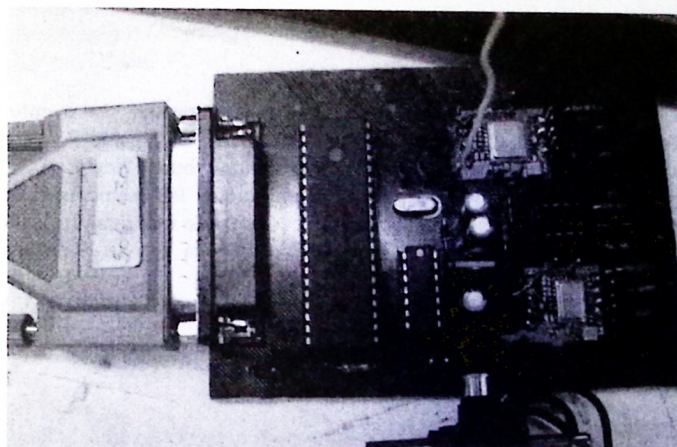


Figura 9. Módulo actual de la etapa receptora.

En la figura 10 se muestra una imagen de la tarjeta del sistema transmisor integrado, el cual incluye las etapas: preamplificadora, amplificadora y desplazadora de nivel, digitalizadora y transmisión por Radio Frecuencia a través del transceptor DR3000-1.

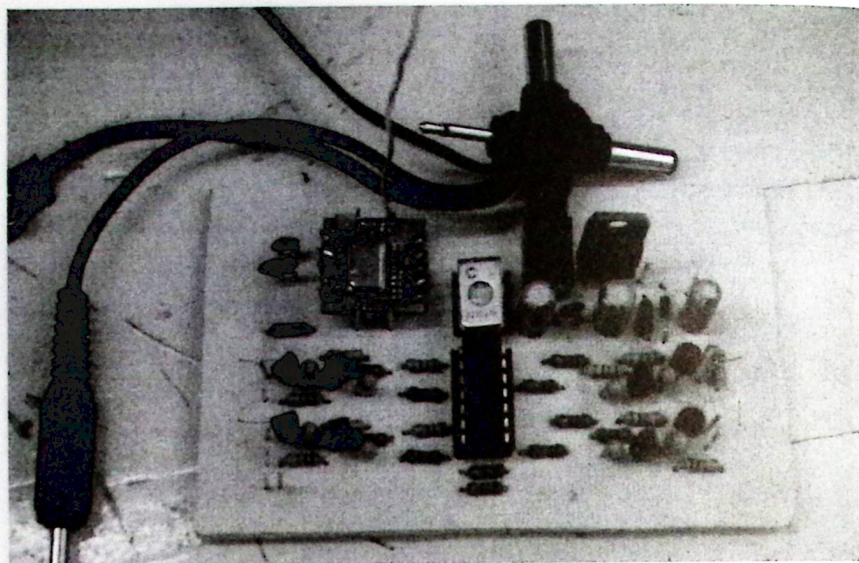


Figura 10. Módulo actual del sistema transmisor.

5 Discusiones

Como puede observarse en la figura 6 se obtienen 21 muestras por evento de 2 ms, este número de muestras al hacer la comparación entre las figuras 7 y 8 permite la reconstrucción del potencial de acción simulado con muy buena fidelidad.

La siguiente etapa del proyecto consiste en iniciar las primeras pruebas para obtener las señales eléctricas provenientes directamente de una rata, utilizando ambos sistemas: transmisor y receptor y visualizar en la PC la actividad eléctrica de las neuronas.

Este proyecto está patrocinado por el convenio Sectorial SEP/CONACYT 2003-2006 No.2003-01-31-001-056.

Bibliografía

1. Ainsworth A, O'Keefe JA. Lightweight microdrive for the simultaneous recording of several units in the awake, freely moving rat. *J Physiol (Lond)*, 269(1):8P-10P, 1977.
2. V.A. Korsunov. Miniature microdrive for extracellular recording of neuronal activity in freely moving animals.. *Journal of Neuroscience Methods*, 77-80, 1994.

3. Imre Szabó a, András Czurkó, Jozsef Csicsvari, Hajime Hirase, Xavier Leinekugel, Gyorgy Buzsaki. The application of printed circuit board technology for fabrication of multi-channel micro-drives. *Journal of Neuroscience Methods* 105,105–110, 2001.
4. Mountcastle VB, Reitboeck HJ, Poggio GF, Steinmetz MA. Adaptation of the Reitboeck method of multiple microelectrode recording to the neocortex of the waking monkey. *J Neurosci Meth* ,36:77-84, 1991.
5. Eichenbaum H, Pettijohn D, Deluca AM, Chorover SL. Compact miniature microelectrode-telemetry system. *Physiol Behav*,18(6):1175-8, 1997.
6. H. Fisher, H. Kautz, W. Kutsch. A radiotelemetric 2-channel unit for trnasmission of muscle potentials during free flight of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Neuroscience Methods*, 39-45, 1995.
7. Mark D. Kelland, Louis A. Chiodo, Arthur S. Freeman. Dissociative Anesthesia and striatal neuronal electrophysiology. *Synapse* , 75-78, 1991.
8. Mark O. West. Anesthetics eliminate somatosensory-evoked discharges of neurons in the somatotopically organized sensorimotor striatum of the rat. *The Journal of Neuroscience.*; 9055-9068, 1998.
9. LabVIEW 6.1. User Manual. National Instruments Corporation. 1997
10. Microchip Microcontroller PIC16F877, 1-218, 2001.
11. Microchip Microcontroller PIC16CE674, 1-218, 2001.