

# Programación de Neuroprocesadores Biológicos mediante Estimulación Hebbiana

Lorente Sánchez, V., Ferrández Vicente, J.M.  
 Departamento de Electrónica, Tecnología de Computadores y Proyectos.  
 Universidad Politécnica de Cartagena, España  
 E-mail: victor.lorente@upct.es

**Resumen.** *La estimulación eléctrica ha sido ampliamente utilizada para inducir cambios en cultivos neuronales desarrollados sobre matrices de microelectrodos (MEAs). En este artículo se emplea una estimulación eléctrica de baja frecuencia basada en corriente sobre cultivos disociados de células de hipocampo para analizar cómo estos cultivos neuronales pueden ser entrenados con el fin de dirigir un robot con los principios de Braitenberg. Se expone que una estimulación persistente y sincrónica de electrodos adyacentes puede ser usada para la creación de conexiones físicas o lógicas en diagramas de conectividad siguiendo la ley de Hebb.*

## 1. Introducción

Los arrays de microelectrodos (MEAs) han sido diseñados para cultivar directamente células neuronales sobre sustratos de silicio o cristal, proporcionando la capacidad de estimular y registrar de forma simultánea cultivos de neuronas. El uso de neuronas corticales disociadas sobre MEAs representa un modelo experimental útil para caracterizar tanto el comportamiento espontáneo de poblaciones neuronales como su actividad en respuesta a cambios eléctricos y farmacológicos.

El aprendizaje es un proceso natural que comprende la creación y modulación de un conjunto de asociaciones entre estímulos y respuestas. La comunidad científica ha empleado un abanico extenso y diverso de protocolos de estimulación con el fin de inducir cambios en la actividad electrofisiológica de cultivos neuronales en su búsqueda de conseguir el aprendizaje [1-3] y el empleo de la estimulación eléctrica a baja frecuencia ha dado buenos resultados a los investigadores al mejorar la actividad de disparo en cultivos corticales [3].

El aprendizaje Hebbiano describe un mecanismo básico para la plasticidad sináptica donde un incremento en la eficiencia sináptica en las células presinápticas viene dado por una estimulación repetida y persistente en la célula postsináptica. Esta teoría se evoca comúnmente para explicar algunos tipos de aprendizaje asociativo en los que la activación simultánea de células lleva a un incremento pronunciado en la fuerza sináptica. Básicamente, la eficiencia de una conexión sináptica se incrementa cuando la actividad presináptica se encuentra sincronizada con la actividad postsináptica.

En este trabajo empleamos este tipo de estimulación para crear conexiones lógicas o físicas adyacentes en

los diagramas de conectividad de los MEAs siguiendo la Ley de Hebb. En artículos previos [4] se empleó una estimulación de baja frecuencia basada en corriente específica en cultivos disociados de células de hipocampo para estudiar si este tipo de cultivos neuronales podía ser entrenado con esta estimulación. Se mostró que con dicha estimulación se podrían crear conexiones adyacentes físicas o lógicas en los diagramas de conectividad que seguían la Ley de Hebb. En experimentos posteriores se ha continuado con esta estimulación a baja frecuencia empleando diferentes parámetros con la intención de comprobar hasta qué punto era posible seguir creando este tipo de conexiones y si con diferentes parámetros de estimulación se podían conseguir mejores resultados. En las secciones posteriores se comentarán las conclusiones obtenidas en estos experimentos.

## 2. Métodos

### 2.1. Preparación de cultivos celulares

Los cultivos empleados contenían neuronas CA1-CA3 de hipocampo y fueron extraídos de embriones hermanos E17.5. Durante la extracción de hipocampo se incluye inevitablemente una pequeña cantidad de tejido cortical. El tejido fue mantenido en 2ml de HBSS. Se añadió 10mt/ml de tripsina al medio y se mantuvo en agua a 37°C durante 13 min para la consiguiente disociación. El tejido fue entonces llevado a 15 ml falcon que contenían 4 ml de NB/FBS y triturando usando una combinación de pipetas de Pasteur fine-pore fire-polished (Volac). Las células fueron transferidas posteriormente a 12 recipientes (Corning Incorporated) que contienen cubiertas de cristal (Thermo Scientific).

Las cubiertas de cristal fueron tratadas previamente con PDL (50mg/ml) y se utilizó una molécula sintética como revestimiento para mejorar la adhesión de las células. El PDL fue entonces aspirado y las cubiertas limpiadas por duplicado con PBS. A todo

esto le siguió un revestimiento final de laminina (50 $\mu$ g/ml), una proteína que se encuentra en la matriz extracelular, que ayudará a anclar a las células disociadas de hipocampo. Las células fueron mantenidas en una mezcla de 500ml NB/B27 (favorece el crecimiento neuronal) y 500ml NB/FBS (promueve el crecimiento glial), cada uno suplementado con Glutamax y Pen/Strep (disolución 1/100). La densidad celular de cada cubierta fue de unas 200000 células. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y 6% de CO<sub>2</sub>.

## 2.2. Setup experimental

Las matrices de microelectrodos (Multichannel systems, MCS) consistían en 60 electrodos de TiN/SiN planos y redondeados (200  $\mu$ m de espacio entre electrodos, 30  $\mu$ m diámetro electrodo) dispuestos en un array de 8x8. Se seleccionaron dos pares de electrodos para la creación de conexiones en cada par. La actividad de los cultivos fue registrada con un sistema MEA60 (MCS). Las señales se amplifican a 1200X, se muestrean a 10kHz y se adquieren a través de una tarjeta de adquisición y el software MCRack (MCS). Cada par de electrodos se estimula mediante un estimulador de dos canales STG1002 (MCS).

## 2.3. Protocolo experimental

Tres experimentos fueron llevados a cabo empleando un total de 15 cultivos durante 2-3 semanas por experimento. En cada experimento se estimulaban cinco cultivos con una estimulación a baja frecuencia que difería únicamente en algunos parámetros. Los cultivos comenzaban cuando los cultivos tenían 14 DIV (días in vitro). A continuación se resumen los experimentos y la estimulación empleada.

- *Experimento E1*: Cultivos ID48-52, 16 días de experimento, estimulación1 (tren de 5 pulsos bifásicos *cathodic-first*, 50  $\mu$ A pico, 100  $\mu$ s fase, 50ms ISI, enviados cada 3s durante 10 min).
- *Experimento E2*: Cultivos ID68-72, 10 días de experimento, estimulación1 (tren de 5 pulsos bifásicos *cathodic-first*, 60  $\mu$ A pico, 100  $\mu$ s fase, 50ms ISI, enviados cada 3s durante 8 min).
- *Experimento E3*: Cultivos ID48-52, 11 días de experimento, estimulación1 (tren de 5 pulsos bifásicos *cathodic-first*, 40  $\mu$ A pico, 100  $\mu$ s fase, 50ms ISI, enviados cada 3s durante 8 min).

En cada experimento se empleaban diagramas de conectividad basados en correlación cruzada para seleccionar dos pares de electrodos sin conexiones lógicas entre ellos. Cada sesión de estimulación se componía de los siguientes pasos:

- 1) Registro de actividad espontánea durante 2 minutos después de un tiempo adaptación del cultivo.
- 2) Estimulación de los cultivos a través de los dos pares de electrodos seleccionados utilizando el protocolo de estimulación correspondiente.

- 3) Registro de la actividad espontánea durante 2 minutos.

## 2.3. Análisis realizados

La actividad espontánea de los cultivos fue analizada antes y después de los experimentos, así como las respuestas inducidas por los estímulos aplicados. Análisis de ráfagas, análisis de histogramas de tiempo post-estímulo y la conectividad funcional fueron los principales análisis realizados sobre los datos registrados.

## 3. Resultados

La estimulación en corriente de baja frecuencia utilizada en este estudio tuvo un impacto sobre las respuestas electrofisiológicas de los cultivos, tal y como estudios previos habían dado a conocer. Los *raster plots* mostraron que todas las estimulaciones producían cambios en la frecuencia de disparo de los cultivos, donde se puede observar un cierto grado de reorganización, pasando de una actividad de disparo uniforme a una actividad donde los disparos son en instantes más discretos. Después de la tercera semana in vitro, la actividad de ráfagas es más frecuente y robusta y este efecto se hace más evidente que durante las primeras semanas (Figura 1).

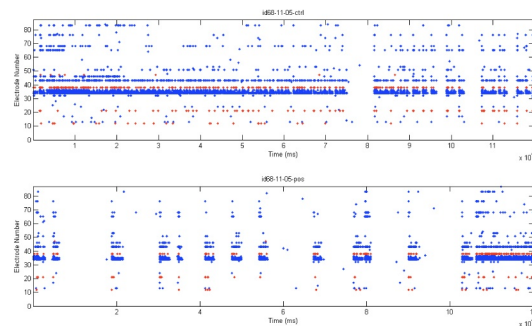


Fig. 1: Raster plot perteneciente al cultivo ID68 de E2 a los 32 DIV.

Los diagramas de conectividad basados en correlación cruzada también muestran un cierto grado de reorganización tras la estimulación, concentrándose en unos pocos electrodos. Además, las conexiones físicas o lógicas aparecen en los diagramas de conectividad sobre los electrodos estimulados (Figura 2).

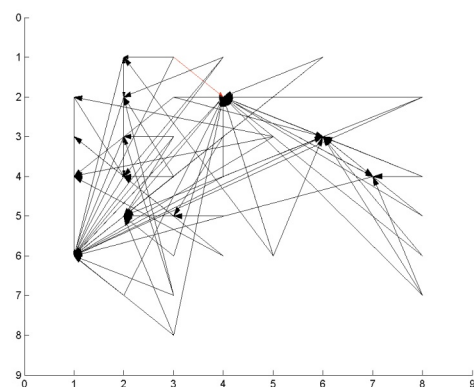
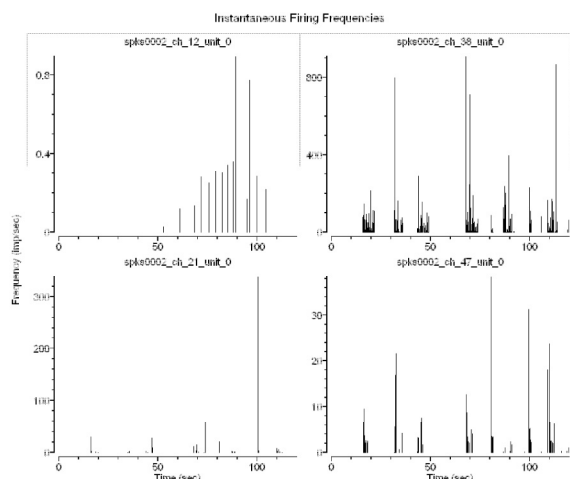


Fig. 2: Diagrama de conectividad post-estimulación del cultivo ID48 (E1) a los 25 DIV.



Los electrodos con conexiones entre ellas pueden ser detectados a través de grafos de frecuencias instantáneas. La Figura 3 muestra dos pares de electrodos estimulados (12, 21 y 38, 47) antes y después de la sesión de estimulación. Se observa como los periodos de disparo de los electrodos del segundo par se siguen exactamente uno al otro, mientras que los del primer par no. Además, los electrodos del segundo par cambian ambos los periodos de disparo tras la estimulación. Este hecho indica que existe una fuerte conexión entre ellos.



**Fig. 3:** Frecuencias de disparo instantáneas el cultivo ID68 (E2) a los 22 DIV.

Todos los cultivos del experimento E1 establecieron algún tipo de conexión, en los pares de electrodos estimulados, mientras que el 60% de los cultivos del experimento E3 y solo el 20% de los cultivos del experimento E2 mostraron algún tipo de conexión. En algunos casos las conexiones fueron intermitentes, durando de uno a varios días, en otros, se creó una conexión permanente y, finalmente, algunos cultivos no crearon ningún tipo de conexión. En este sentido, la estimulación Hebbiana creó conexiones lógicas ad-hoc permanentes o transitorias modificando la eficiencia de los caminos entre los electrodos. Especulamos que los cultivos fallidos pueden ser causa de un crecimiento no homogéneo entre los electrodos y a propiedades neurobiológicas de las conexiones que confirmaremos empleando técnicas histológicas en trabajos futuros. En este caso, la estimulación a baja frecuencia con una amplitud de corriente de  $50 \mu\text{A}$  fue la que proporcionó los mejores resultados para la creación de conexiones siguiendo la ley de Hebb.

## 4. Conclusiones

El aprendizaje en redes biológicas cultivadas es una tarea muy compleja. Muchos investigadores han propuesto métodos muy diferentes para inducir una plasticidad deseada y controlada sobre esta estructura biológica, entre las que destaca el empleo de estimulación a baja frecuencia.

En este artículo se ha mostrado que usando este tipo de estimulación es posible crear conexiones adyacentes físicas o lógicas en diagramas de conectividad siguiendo la Ley de Hebb y que esta estimulación induce cambios en la respuesta electrofisiológica de las células del cultivo.

En trabajos futuros se emplearán diferentes estimulaciones, como la estimulación tetánica, y se buscarán cuales son los parámetros óptimos de cada estimulación que inducen cambios permanentes en el cultivo. Estas conexiones inducidas serán empleadas para conducir un robot usando los principios de Braitenberg.

## Agradecimientos

Este trabajo está financiado por la beca 12361/FPI/09 de la Fundación Séneca de la Región de Murcia y por el proyecto 2010V/PUNED/0011 de la UNED.

## Referencias

- [1] Jimbo, Y., Robinson, H.P. & Kawana, A. (1998) Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures: application of planar electrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng*, 45 (11): 1297-1304.
- [2] Shahaf, G. & Marom, S. (2001) Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci*, 21 (22): 8782- 8788.
- [3] Bologna, L.L., Nieuwenhuis, T., Tedesco, M., Chiappalone, M., Benfenati, F. & Martinoia, S. (2010) Low-frequency stimulation enhances burst activity in cortical cultures during development. *Neuroscience*, 165: 692-704.
- [4] Lorente, V., Ferrández, J.M., de la Paz F. & Fernández, E. (2012) Training hippocampal cultures using low-frequency stimulation: Towards Hebbian Learning. *MEA Meeting*, 90-91.