

53



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE INGENIERIA

**DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN AMPLIFICADOR
PARA REGISTRO INTRACELULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERO MECANICO ELECTRICISTA

P R E S E N T A

BRUNO ELOY MÉNDEZ AMBROSIO



DIRECTOR: DR. FRANCISCO FERNANDEZ DE MIGUEL
CODIRECTOR: M.I JOSÉ ISMAEL MARTÍNEZ LÓPEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS:

A Ma. Jesus Espino Vázquez (mi esposa)

Por su gran apoyo incondicional y por compartir esta etapa tan importante en mi vida. Mi gran compañera gracias.....

A Vanessa y Dennis (mis pequeñas hijas)

Por descubrir en mí, esa forma tan especial de amarlas.

A mis padres:

Por sus sacrificios para que fuera alguien en la vida, por la voz de aliento que nunca me faltó en los momentos más difíciles y sobre todo por regalarme algo tan valioso: la vida.

A mis hermanos:

Por su apoyo tanto moral como económico para que continuara estudiando. A Edgar por su valor para afrontar la vida y su compañía, a Maritza por su ejemplo y dedicación, y a Rosalba por la comprensión y cariño hacia mi persona.

AGRADECIMIENTOS:

A Fco. Fernández de Miguel:

Quién me brindo su amistad y apoyo incondicional para el término y realización de este documento.

A Adrián Hernández:

Por su compañerismo, amistad, apoyo y comentarios que hizo a este documento.

A los maestros en Ingeniería:

Jorge Rodríguez Cuevas, José Ismael Martínez López, y Larry H. Escobar Salguero quienes participaron en la revisión y aprobación de este documento. Gracias por sus aportaciones y comentarios.

Índice temático:

JUSTIFICACIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
METODOLOGÍA.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. CONCEPTOS BASICOS (ANTECEDENTES).....	5
1.1 La célula y sus componentes (teoría celular).....	5
1.2 Intercambio de materiales entre la célula y el medio ambiente.....	5
1.3 Las propiedades eléctricas de las células nerviosas.....	7
1.3.1 El voltaje y la corriente transmembranales.....	7
1.3.2 El potencial de reposo y el potencial de equilibrio.....	8
1.3.3 La ecuación de Nernst.....	8
1.3.4 Desvío del potencial de membrana de la ecuación de Nernst.....	9
1.3.5 Bombeo del Na ⁺ y K ⁺ en el mantenimiento del potencial de reposo.....	10
1.4 El modelo eléctrico de la membrana.....	11
1.4.1 La fuerza impulsora de un ion.....	11
1.4.2 La ley de Ohm.....	11
1.4.3 Circuito equivalente de la membrana.....	12
1.4.4 La resistencia membranar R _m	13
1.4.5 La capacitancia membranar C _m	13
1.4.6 El circuito R _m C _m	14
1.5 El potencial de acción.....	15
1.5.1 La amplitud del potencial de acción.....	16
1.5.2 La reconstrucción del potencial de acción.....	16
1.6 Sinapsis eléctricas y químicas.....	17
1.6.1 Sinapsis eléctricas.....	17
1.6.2 Sinapsis químicas.....	18
1.6.3 Potencial sináptico.....	18
1.6.4 Mecanismos de integración en neuronas.....	18
1.6.5 Cinética del potencial sináptico directo.....	18
1.7 Microelectrodo y su modelo eléctrico.....	29
2. DISEÑO y CONSTRUCCION DEL AMPLIFICADOR PARA REGISTRO	
INTRACELULAR.....	24
2.1 El seguidor de voltaje.....	24
2.2 Convertidor de voltaje – corriente.....	26
2.3 Monitor de corriente.....	32
2.4 Compensación de efectos capacitivos.....	33
2.5 Compensación de resistencia.....	37
2.6 Ganancia x 10 del preamplificador.....	39
2.7 Control del cero.....	40
2.8 Etapas subsecuentes de amplificación.....	41
2.8.1 La etapa de acoplamiento.....	42

2.8.2 corrimiento.....	43
2.8.3 Amplificación.....	43
2.9 Construcción del amplificador para registro intracelular.....	43
2.9.1 El cabezal.....	43
2.9.2 Etapa de controles.....	44
3. PRUEBAS Y RESULTADOS.....	45
3.1 Pruebas de control del cero.....	46
3.2 Pruebas para medir la inyección de corriente.....	46
3.3 Pruebas de compensación de capacitancia.....	47
3.4 Pruebas de compensación de resistencia.....	48
3.5 Pruebas del modelo general de la célula y microelectrodo.....	49
3.6 Pruebas reales del amplificador en células vivas.....	50
4. CONCLUSIONES.....	52
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

OBJETIVO GENERAL:

Diseñar y construir un amplificador para registro intracelular con la finalidad de medir pequeños cambios en la actividad eléctrica neuronal.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- *Ganancia variable de 10 hasta 1000*
- *Que cuente con 12 db de relación señal-ruído*
- *Inyección de corriente de 0 a 1 y de 0 a 10 nanoamperios*
- *Compensación de efectos capacitivos y resistivos del microelectrodo*
- *Control del potencial de reposo para amplificar la señal*

METODOLOGIA UTILIZADA

- 1. Conocer los antecedentes necesarios y conceptos básicos de las células y su comportamiento para entender las características de las señales a medir, esto permitió delimitar y entender el problema (capítulo 1)**
- 2. Analizar los modelos eléctricos de la membrana celular y el microelectrodo**
- 3. Conocer y aprender la operación de los controles de un amplificador de registro intracelular**

DISEÑO DEL AMPLIFICADOR

- ✓ *División del diseño del proyecto en tres módulos.*
 - a) Diseño del cabezal**
 - b) Diseño del tablero de control general**
 - c) Diseño de las etapas de amplificación y manejo del potencial de reposo de membrana (capítulo 2)**
- 4. Pruebas y mediciones reales en células vivas (capítulo 3)**
- 4. Conclusiones (capítulo 4)**

INTRODUCCIÓN

El interés de los científicos por lograr descubrimientos interesantes y que puedan llegar a ser definitivos en un futuro, ha ocasionado que cada día se esfuercen por estudiar cosas y fenómenos más relevantes logrando que la ciencia vaya ganando terreno contra la ignorancia y lagunas culturales que existen sobre el extenso universo que nos rodea. Una de las ramas de la ciencia que en particular nos interesa es la electrofisiología, la cual estudia el comportamiento de células excitables.

Dentro de esta ciencia se han realizado una serie de experimentos que permiten dilucidar el comportamiento de las neuronas cuando se les introduce estímulos externos. Estos experimentos se llevan a cabo utilizando diversas preparaciones expensas tales como: nervios de rana, membranas de algas marinas, axones de calamar gigante, células de las sanguijuelas, etc.

Ya desde la antigüedad se daban los primeros estudios del cuerpo humano para saber cómo funcionaba por dentro, y estos estudios hacían referencia a un fluido eléctrico que conducía a espíritus animales a lo largo de los nervios, desde el cerebro hasta los músculos y que el poder de la mente controlaba su flujo. Estos espíritus animales son lo que ahora se conoce como corrientes iónicas. Después se realizaron experimentos con animales, pues la posible conexión entre la electricidad y los nervios en el cuerpo humano motivaron a creer que había similitud con los animales, además de que se hizo un tema preferido de la ciencia hacia el último cuarto del siglo XVIII. Los trabajos de Luigi Galvani, médico y profesor italiano en Bologna hicieron contribuciones importantes para entender las funciones del sistema nervioso en los animales. Con sus estudios de las corrientes eléctricas en células excitables en patas de rana se abrió por primera vez el campo de la electrofisiología. Muchos de los experimentos de Galvani fueron publicados en su famoso libro de 1791, llamado *De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Comentarius*, escrito en cuatro partes. En la primera parte describe la producción de contracciones musculares en ranas y otros animales cuando son estimuladas por la electricidad almacenada en la botella de Leyden. La segunda parte describe los efectos de la electricidad atmosférica sobre las mismas preparaciones y en las partes finales discute las demostraciones de la electricidad animal, arguyendo que seguramente debían ser los "espíritus animales" descritos por los antiguos filósofos.

Después hubo más experimentos e investigadores que siguieron la pauta de Galvani pero mejorando su técnica dedicándose al estudio ahora en membranas para estudiar sus corrientes eléctricas, con esto surgieron términos como: corrientes iónicas, potencial de acción y corriente de compensación, entre otros.

En nuestros días se ha mejorado y avanzado en el conocimiento sobre el comportamiento eléctrico de las células siendo más fácil entenderlo. De una

manera breve y condensada este proceso se puede definir como "la capacidad celular de distribuir iones selectivamente a través de la membrana citoplásmica", originando en ella diferencias en la distribución de cargas eléctricas. Esto permite a las células generar actividad eléctrica espontánea o en respuesta a una estimulación. Las corrientes iónicas fluyen de un lado a otro de la membrana celular, a través de poros proteicos que cruzan la membrana, llamados canales iónicos. Los canales iónicos son sensibles al voltaje, a ligandos o a la tensión mecánica y son selectivamente permeables a diferentes tipos de iones. La apertura de los canales iónicos permite el flujo de iones siguiendo su gradiente electroquímico. La corriente eléctrica producida por el flujo de iones a través de la membrana ocasiona cambios de voltaje que se propagan a lo largo de ésta. Si los cambios de voltaje son pequeños, su propagación es pasiva y sufren una atenuación a lo largo de la distancia. Si el cambio de voltaje sobrepasa un umbral, se producen impulsos conocidos como potenciales de acción. Estos son autorregenerativos y se propagan sin atenuación a lo largo de las células. Los impulsos nerviosos surgen de cambios transitorios en la permeabilidad membranal a iones, principalmente al Na^+ y al K^+ , aunque en ocasiones el Ca^{++} tiene combinaciones importantes. (Fernández de Miguel, 1998)

Ahora bien, al realizar estos experimentos es necesario inyectar corriente al interior de la célula y sensor los cambios de voltaje que ocurren al estimularla. Para esto, se necesita un amplificador de registro intracelular, el cual requiere alta relación señal-ruido, capacidad de inyectar corriente hiperpolarizante y despolarizante, capacidad de compensación de resistencia del electrodo (± 10 nA), salida amplificada para observar el potencial de reposo independiente de la salida principal, salida para monitorear la corriente, capacidad de amplificación variable y manejo del corrimiento (offset) de salida. Debido a esto, surgió la necesidad de diseñar y construir un amplificador que pueda satisfacer las necesidades requeridas para estos registros intracelulares ya que los amplificadores existentes tienen restricciones para el uso que a nosotros nos interesa.

Nuestro amplificador contará con tres bloques:

1° El cabezal donde se monta el microelectrodo (transductor) que recibe la señal y es el mecanismo que sirve para estimular la célula.

2° Módulo de controles.

3° Etapas de amplificación subsecuentes.

Con esto se espera que el amplificador de registro intracelular pueda ser más flexible en sus aplicaciones y pueda medir los potenciales sinápticos miniatura, es decir, potenciales postsinápticos producidos por la liberación espontánea de cuantos de acetilcolina, además de poderse acoplar a un convertidor analógico digital y almacenar la información en la computadora.

CAPITULO 1

CONCEPTOS BASICOS (ANTECEDENTES)

Para poder entender cómo es que surgió la idea de construir un amplificador para registros intracelulares, que es un aparato de instrumentación utilizado en el área de la electrofisiología, tenemos que tomar en cuenta varios conceptos de biología que son imprescindibles para encontrar la lógica y la mecánica del comportamiento de las células y su representación en modelos eléctricos.

La electrofisiología es el área de la fisiología que estudia la actividad bioeléctrica de los tejidos. Sus herramientas de estudio consisten en la electroestimulación, el registro de la actividad eléctrica mediante electrodos acoplados a sistemas de amplificación, osciloscopios y sistemas de memorización de datos; la ionoforesis, que permite analizar los efectos de una sustancia cerca de la neurona estudiada, etc.⁵

Una vez que ya sabemos qué significa electrofisiología comenzaremos por enumerar y describir los conceptos que se utilizarán en esta tesis.

1.1 La célula y sus componentes (Teoría celular)

La teoría celular incluye el concepto de que la célula es la unidad fundamental, tanto de función como de estructura es el fragmento representativo más diminuto que ostenta todas las características de las cosas vivas.

La célula se puede definir como la unidad organizada de cualquier forma viviente, capaz de una existencia prolongada, independiente y capaz de reemplazar sus propios materiales en un ambiente adecuado. Por lo general, es de tamaño microscópico.

Por lo general cada célula contiene un núcleo y está rodeada de una membrana plasmática. Además contiene un buen número de órganos subcelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico granuloso, retículo endoplásmico liso y complejo de Golgi).

1.2 Intercambio de materiales entre la célula y el medio ambiente

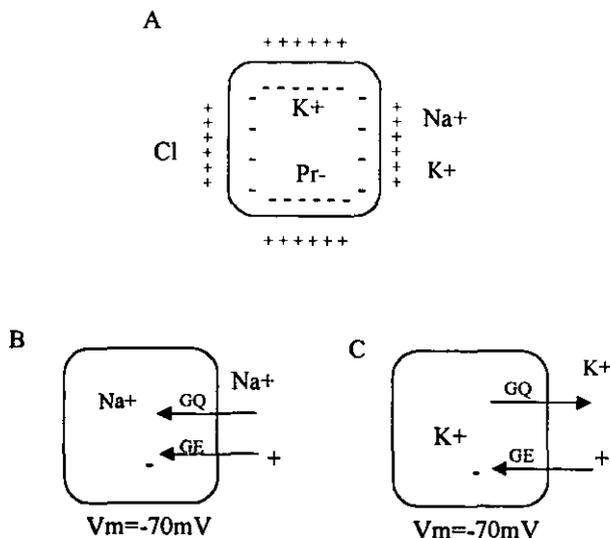
La superficie externa de cada célula está circunscrita por una cubierta delgada, parte integral y funcional de la misma, denominada **membrana plasmática**. Esta membrana importante en la regulación del contenido de la célula, ya que todos los elementos nutritivos que entran en la misma, así como los productos de desecho o secreciones que salen de ella deben atravesarla. Así mismo, la membrana plasmática tiene poros microscópicos selectivos a ciertas sustancias. El tamaño de estos poros determina el tamaño máximo de la molécula que puede atravesar la membrana por lo que impide la entrada de unas sustancias

y facilita la de otras. Otros factores distintos del tamaño molecular, como la carga eléctrica, número de moléculas de agua, y la solubilidad de la partícula en lípidos pueden ser importantes también para determinar si la sustancia atravesará o no la membrana.³

Todas las membranas celulares, tanto la plasmática como la de los órganos internos, están formadas de un ensamble de lípidos y proteínas unidos principalmente por enlaces no covalentes. Hay tres clases de lípidos que componen a las membranas: 1) los **fosfolípidos** que contienen un esqueleto de glicerol 2) los **glucolípidos** que tienen un esqueleto de esfingosina y 3) los **esteroides** como el colesterol. Los tres tipos de lípidos de la membrana son moléculas anfipáticas es decir, tienen un extremo o cabeza polar *hidrofilica* (soluble en agua), y una cola apolar *hidrofóbica* (insoluble en agua). (Massieu, 1998)

Además la membrana plasmática, es una estructura funcional activa, con mecanismos enzimáticos que desplazan moléculas específicas penetrando o saliendo de la célula contra un gradiente de concentración. Ahora bien, ¿a qué se debe el que puedan desplazarse moléculas dentro y fuera de la membrana?. El flujo de corriente transmembranal se lleva a cabo a través de canales iónicos, los cuales son proteínas que traspasan la membrana dirigiéndose de un lugar a otro. Estos canales iónicos tienen en su centro un poro cuya función es ser selectivo ante ciertos iones. Además el flujo de iones a través de los canales no es continuo, sino que éstos se abren y se cierran generando pulsos de corriente escalonada. La apertura o cierre de estos canales es probabilística; y esta probabilidad puede cambiar en respuestas al voltaje o a ligandos, dependiendo del tipo de canal. Así mismo, podemos decir que la capacidad de un ion para difundirse entre dos compartimentos depende de dos gradientes: el osmótico o químico (determinado por la diferencia de concentración) y el eléctrico (determinado por la diferencia de carga). En la figura 1.1 A, se muestra la concentración de sodio y cloro en el espacio extracelular la cual es mucho mayor que la intracelular, en cambio en el interior, el potasio y los aniones proteicos se encuentran más conectados que el Na^+ y el Cl^- .

Como entre la célula y su medio externo existe una membrana de permeabilidad selectiva a través de la cual se pueden difundir los iones además de haber una diferencia de potencial con un voltaje en el interior, el Na^+ tenderá a difundir hacia el interior de la célula, esto lo logra por medio de su gradiente de concentración y su gradiente eléctrico (figura 1.1B). Para el K^+ el gradiente de voltaje favorece su permanencia en el interior, pero su gradiente de concentración favorece su desplazamiento hacia fuera. Esto es, el flujo de potasio está influido por el gradiente eléctrico y el gradiente de concentración de la membrana (figura 1.1 C).



El Na^+ tiende a entrar favorecido tanto
Por su gradiente de concentración (GQ)
Como por su gradiente eléctrico (GE)

El K^+ tiende a entrar favorecido por su GE
pero el GQ tiende a desplazarlo hacia el
exterior

Figura 1.1 Distribución asimétrica de electrolitos entre el medio interno y externo de una célula animal.

1.3 Las propiedades eléctricas de las células nerviosas

Una vez establecida la permeabilidad de la membrana, el paso de iones relacionado con su gradiente de concentración y gradiente eléctrico, procederemos a explicar qué ocurre con el potencial eléctrico en el interior y exterior de la membrana así como su forma de reaccionar ante algunos elementos ionizados como el (Na^+), el (K^+), y el (Cl^-).

1.3.1 El voltaje y la corriente transmembranales

La acumulación de cargas negativas en el interior celular produce una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y exterior celulares, también conocido como **voltaje transmembranal** o **potencial de membrana**. El voltaje transmembranal se mide en el interior tomando como referencia el medio extracelular (voltaje cero o tierra). Los potenciales transmembranales de células en reposo son negativos y sus valores fluctúan entre -35 y -90 milivoltios (mV).³ En neuronas, el potencial de membrana varía entre -45 y -90 mV de acuerdo con el tipo celular, mientras que en las fibras musculares esqueléticas es cercano a -90 mV.

1.3.2 El potencial de reposo y el potencial de equilibrio

El potencial de la membrana se debe a tres factores: a) la acumulación de cargas negativas en el interior celular; b) las concentraciones de K^+ y Na^+ a ambos lados de la membrana, y c) la permeabilidad de la membrana a estos iones. En reposo la permeabilidad al K^+ es mayor que la del Na^+ , y por ello las concentraciones de K^+ a ambos lados de la membrana determina el potencial membranaral en reposo.

1.3.3 La ecuación de Nemst

El movimiento de iones (y por tanto de cargas) a través de la membrana reajusta el potencial de membrana. Sin embargo, el flujo iónico neto en equilibrio, así como la corriente transmembranal son nulos. Se dice que al potencial en el que un ion alcanza el equilibrio se le conoce como **potencial de equilibrio**. El potencial de equilibrio de un ion se puede conocer por medio de sus concentraciones en ambos lados de la membrana aplicando la *ecuación de Nemst* que a continuación se presenta:³

$$E_i = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[I]_o}{[I]_i}$$

donde:

E_i = potencial de equilibrio de un ion

R = constante de gases

T = temperatura en grados Kelvin

z = valencia del ion

F = constante de faraday

$[I]_i$ = concentración iónica intra

$[I]_o$ = concentración iónica extra

Si K^+ es el principal ion permeable a través de la membrana, en teoría el potencial de membrana en reposo debería ser igual al potencial de equilibrio del K^+ (E_K) y debería ser predicho por la ecuación de Nernst de manera que:

$$E_m = E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$$

Donde E_m es el potencial de la membrana en reposo. La figura 1.2 muestra la relación entre el potencial de membrana y $[K]_o$. Los valores de las líneas que se muestran en la gráfica están dados por experimentos que se realizaron modificando $[K]_o$ y dejando constante el producto de $[K]$ y $[Cl]$ para no alterar la concentración interna de $[K]^+$ así como también la aplicación de la ecuación de Nernst de acuerdo al comportamiento teórico de K^+ .

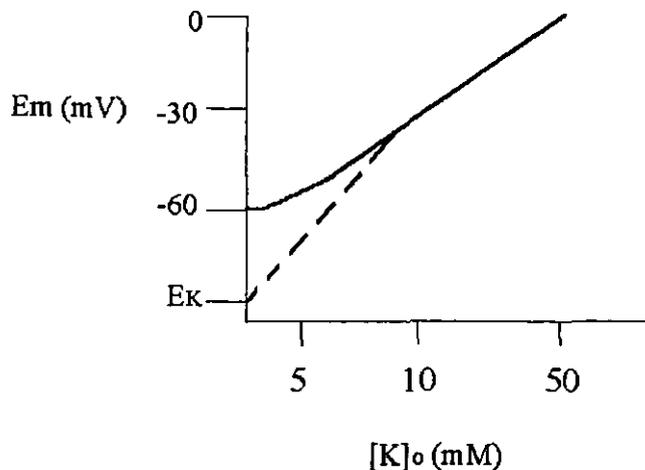


Fig 1.2 El potencial de membrana (E_m) en reposo depende de la concentración extracelular de K^+ . La línea completa muestra el potencial de membrana y la línea entrecortada muestra el comportamiento teórico de acuerdo con la ecuación de Nernst. Tomado de Fernández de Miguel, 1998.

El caso de Na^+ es interesante, ya que su gradiente electroquímico está invertido con respecto al del K^+ , lo cual es relevante para la generación de impulsos. El Na^+ siempre tiende a entrar a la célula, acarreando cargas positivas y despolarizando a la membrana. En reposo la permeabilidad de la célula al Na^+ es baja, y el Na^+ que entra es bombeado continuamente hacia fuera.

El Cl^- se mueve con relativa facilidad de un lado a otro de la membrana. Sin embargo, en la mayoría de las células conocidas, su flujo no modifica el voltaje. El Cl^- produce sólo un cambio transitorio en el potencial de la membrana. Esto se debe a que aunque E_{Cl} y E_K son similares, las concentraciones internas son mucho menores que las de K^+ , y cambios ligeros en la concentración interna del Cl^- son suficientes para reajustar su potencial de equilibrio.

1.3.4 Desvío del potencial de la membrana de la ecuación de Nernst

De acuerdo con la ecuación de Nernst, si el único ion responsable del potencial de membrana fuera el K^+ , la membrana debería responder linealmente a cambios de concentración extracelular. Sin embargo en la realidad esto no ocurre. Lo cierto es que, la membrana celular no es exclusivamente permeable al K^+ , sino que en condiciones de reposo, lo es de manera parcial al Na^+ . Aun cuando su permeabilidad es limitada hay una corriente despolarizante continua de Na^+ hacia el interior celular, que despolariza ligeramente a la membrana. Entonces el potencial de membrana se desvía de E_K . Cuanto se aleja el potencial de reposo de E_K , depende de cuán permeable sea la membrana al Na^+ .

Goldman, Hodgkin y Katz, analizaron este fenómeno de manera similar a Nernst pero consideraron las concentraciones y las permeabilidades de otros iones, entre

ellos el Na^+ . Su análisis supone que la diferencia de concentraciones iónicas, y por lo tanto de voltaje; son constantes en cada punto de la membrana. Debido a esto, la ecuación que desarrollaron la llamaron ecuación de campo constante:

$$E_m = 58 \log \frac{P_{\text{Na}}[\text{Na}]_o + PK[\text{K}]_o + PCI[\text{Cl}]_i}{P_{\text{Na}}[\text{Na}]_i + PK[\text{K}]_i + PCI[\text{Cl}]_o}$$

P = permeabilidad de cada ion y el resto de los parámetros se encuentran definidos en la ecuación de Nernst. Cabe aclarar que debido a que el Cl^- tiene cargas negativas, de nuevo sus concentraciones se expresan en orden inverso a las de los iones cargados positivamente.

Para analizar más fácilmente esta ecuación, se eliminará al Cl^- cuya contribución es limitada, se dividirán los términos entre PK , y al cociente P_{Na} / PK se llamará α . La ecuación quedará así:

$$E_m = 58 \log \frac{\alpha[\text{Na}]_o + [\text{K}]_o}{\alpha[\text{Na}]_i + [\text{K}]_i}$$

Estos cambios en la ecuación permite analizar la contribución del Na^+ al potencial de membrana. Si la permeabilidad de Na^+ es muy pequeña en comparación con la de K^+ (α es muy pequeña), la contribución del Na^+ al potencial de reposo se vuelve nula. En este caso, el potencial de membrana estaría definido fundamentalmente por el cociente $[\text{K}]_o / [\text{K}]_i$. Sin embargo, un incremento en la permeabilidad al Na^+ (α se incrementa) produciría una despolarización como la de la figura 1.2.

De la ecuación de campo constante también se deduce que si la membrana cambia su permeabilidad al Na^+ se genera un flujo de ese ion hacia el interior de la membrana y el potencial de la membrana se mueve hacia E_{Na} . Sin embargo, las células en reposo son capaces de mantener una concentración reducida de Na^+ en su interior debido a su expulsión continua a expensas de ATP (trifosfato de adenosina).

1.3.5 Bombeo del Na^+ y K^+ en el mantenimiento del potencial de reposo

Las ATPasas Na^+ / K^+ sacan tres iones Na^+ e introducen dos iones K^+ por ciclo a expensas de una molécula de ATP. Así el influjo de Na^+ en reposo es contrarrestado por su bombeo activo hacia fuera de modo que el ATPasa Na^+ / K^+ participa dinámicamente en el mantenimiento del potencial de reposo.

Como se conoce la cantidad de iones que salen del Na^+ (3) y los que se introducen de K^+ (2) por cada ciclo de bombeo, se puede añadir el cociente 3/2 a la ecuación de campo constante quedando de la siguiente manera:

$$E_m = 58 \log \frac{\alpha[Na]_o + \frac{3}{2}[K]_o}{\alpha[Na]_i + \frac{3}{2}[K]_i}$$

Esta ecuación es conocida como estacionaria y fue propuesta a partir de la ecuación de campo constante y aunque con algunas reservas es más apropiada para expresar el potencial de membrana en reposo.³

1.4 El modelo eléctrico de la membrana

1.4.1 La fuerza impulsora de un ion

A partir de las corrientes iónicas que participan en el potencial de la membrana en reposo y de sus vías independientes podemos generar un modelo eléctrico de la membrana. Para ello se representarán algunos de los componentes como sus equivalentes en un circuito eléctrico. La diferencia de concentraciones, y por lo tanto de cargas, de cada especie iónica a ambos lados de la membrana constituyen la **fuerza impulsora** de cada ion; esto es, un índice de la fuerza con la que el ion tiende a moverse al compartimiento opuesto. La fuerza impulsora para los iones es la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del ion, de modo que para el K^+ la fuerza impulsora se define como $(V_m - E_K)$, mientras que para el Na^+ se define como $(V_m - E_{Na})$. Una expresión similar se utilizaría para el cloro.

La fuerza iónica desde el punto de vista eléctrico se puede representar como una batería. La acumulación de las cargas en la batería tienen la capacidad de generar corrientes iónicas en la medida en que la membrana permita el flujo de iones. Esto no ocurre libremente, sino que la membrana ejerce cierta resistencia selectiva. Para cada ion la resistencia está en serie con la batería y, debido a que para cada especie iónica la vía es independiente de las demás, cada batería con su resistencia se conecta en paralelo a las restantes. En el caso del K^+ o el Cl^- la resistencia del flujo en reposo es pequeña, pero en el caso del Na^+ es selectivamente grande. Otra manera de expresar la permeabilidad de la membrana es utilizando el inverso de la resistencia, o sea la conductancia (g).

Tras haber definido lo anterior, se puede aplicar una función que asocie estos términos para expresar cuantitativamente el flujo de iones. Esto se hace mediante la Ley de Ohm.

1.4.2 La ley de Ohm

En condiciones ambientales fijas, la ley de Ohm dice que la diferencia de potencial a través de una resistencia (R) es directamente proporcional a la corriente (I) que pasa por ella

$$V = RI$$

Está claro que la relación corresponde a una ecuación lineal, donde la resistencia es la pendiente de la curva que asocia al voltaje y a la corriente. La resistencia tiene unidades en Ohms (Ω). De modo alternativo, la conductancia (g)

es el recíproco de la resistencia, y en ocasiones es cómodo expresar la ley de Ohm en términos de la conductancia:

$$g=I/V$$

Podemos ahora sustituir los términos de la fuerza impulsora y de la permeabilidad que ya hemos definido en la ecuación de Ohm, para generar una expresión de las corrientes que fluyen en el reposo. Entonces, para el K^+ , la corriente se expresa como:

$$I_K = g_K (V_m - E_K),$$

Y para el Na^+ :

$$I_{Na} = g_{Na} (V_m - E_{Na})$$

1.4.3 Circuito equivalente de la membrana

La relación anterior entre corrientes, voltajes y resistencias o permeabilidades puede también ser representada como un circuito equivalente que incorpora los elementos correspondientes a cada ion y la ATPasa Na^+ / K^+ . (El mantenimiento de la distribución iónica transmembranal, requiere procesos activos que consumen energía en forma de ATP para volver a implementar los gradientes iónicos. La ATPasa es una bomba o transportador activo que contribuye en parte al mantenimiento del potencial de membrana). Debido a que para cada especie iónica hay una vía de permeabilidad independiente (canales iónicos selectivos), a cada ion se le asigna su propia batería que representa la fuerza impulsora, y cuya polaridad refleja la dirección en la que fluye la corriente. Ver figura 1.3 Por su misma independencia, la batería se conecta en paralelo. Además, la permeabilidad restringida en la membrana a iones requiere que cada batería sea conectada en serie a una resistencia eléctrica, que representa el recíproco de la conductancia. Mientras que la resistencia al flujo de K^+ es relativamente baja (permeabilidad alta), la resistencia al flujo del Na^+ , es comparativamente grande (permeabilidad baja). El gradiente de Cl^- se representa de modo similar, si bien debido a su carga negativa el sentido en el que se representa la batería del Cl^- es inverso al de la batería de Na^+ , aunque el movimiento de ambos iones sea en la misma dirección. Al modelo se le añadirán las bombas de Na^+ y K^+ .

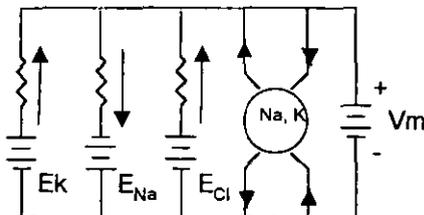


Figura 1.3 Modelo eléctrico de la membrana en reposo.

La conducta de la membrana estudiada hasta ahora contempla las corrientes iónicas en condiciones de reposo. Sin embargo en células excitables la

estimulación de la membrana mediante la inyección de corriente da lugar a respuestas que requieren un análisis detallado. Se generó un modelo en el que las fuerzas electroquímicas y las permeabilidades iónicas de la membrana se representan con baterías y resistencias. A partir de esto, se añadirá un nuevo componente la **capacitancia**, y se simplificará el circuito para analizar de qué manera responde a la inyección de corriente.

1.4.4 La resistencia membranal R_m

Ya se comentó que la membrana en reposo ejerce una resistencia al flujo de corriente. A la resistencia global de la membrana se le llama **resistencia membranal** (R_m). Físicamente r_m procede de la estructura lipídica de la membrana que es hidrofóbica, y de las conductancias basales de los diferentes iones. Estas conductancias en reposo son por lo general pequeñas excepto para el K^+ y el Cl^- y se debe a la apertura y cierre de los canales iónicos en reposo. Si todos los canales iónicos permanecieran cerrados en reposo, r_m sería prácticamente infinita y por lo tanto no habría corriente transmembranal.

Los valores de r_m dependen del tamaño celular. A mayor superficie membranal mayor número de canales y, por lo tanto, menor resistencia (suponiendo que un número de canales constantes por unidad de superficie). La resistencia membranal medida en el cuerpo de las células de distintos diámetros es muy variable.

Es necesario recordar que el citoplasma no es un conductor perfecto, sino que ejerce una resistencia al flujo de corriente. La resistencia del citoplasma también se conoce como resistencia interna (r_i). Aunque sus valores son pequeños (de 70 a 300 Ω aproximadamente) comparados con los de r_m , sí afectan las mediciones electrofisiológicas, ya que al inyectar corriente en una neurona e fluye a través de r_m y r_i . Por ello los cambios de voltaje al inyectar corriente reflejan la combinación de estas dos resistencias, conocida como **resistencia de entrada**. Podemos entonces aplicar la ley de Ohm para relacionar el voltaje y la corriente transmembranales:

$$r_{\text{entrada}} = V_m / I,$$

donde

$$r_{\text{entrada}} = 0.5 (r_m r_i)^{1/2}$$

1.4.5 La capacitancia membranal C_m

Desde el punto de vista eléctrico la interfase entre la bicapa lipídica de la membrana celular y las soluciones interna y externa añade un elemento nuevo al circuito: el **capacitor**. Este es un elemento eléctrico formado por un material no conductor (como la propia bicapa lipídica), que separa a dos elementos

conductores, como las soluciones intra y extracelulares. Este capacitor está conectado en paralelo con los otros elementos membranales y produce efectos notables en la respuesta membranal.

Los capacitores almacenan energía. Por esta razón su carga no es instantánea, como en el caso de las resistencias, sino que su curso temporal depende de su propia capacidad de almacenar cargas. La corriente que fluye a través de un capacitor depende de la tasa del cambio del voltaje, y se expresa como.

$$I_c = C(dV / dt).$$

Debido a que la corriente es a su vez una derivada de la carga entre el voltaje,

$$I = (dq / dt),$$

Podemos combinar las dos ecuaciones para definir la capacitancia:

$$C = q / V.$$

O sea que la capacitancia nos indica cuánta carga se puede almacenar en un cierto voltaje. Las unidades de capacitancia son los faradios (F) y en elementos electrónicos convencionales se expresan como microfaradios (μF), nanofaradios (nF), o picofaradios (pF).

Debido a su capacidad de almacenar cargas, la capacitancia da a la señal características temporales que son relevantes para el manejo de la señal en células excitables. La capacitancia membranal C_m proviene de la bicapa lipídica no conductora, que separa al citoplasma del medio externo, siendo ambos conductores. El valor de C_m se ha medido en distintas células y se ha llegado a la conclusión de que es constante, con un valor cercano a $1\mu\text{f} / \text{cm}^2$. Por esta razón, conociendo C_m , se puede determinar la superficie membranal de la célula.

1.4.6 El circuito $R_m C_m$ (resistencia membranal y capacitancia membranal)

El modelo eléctrico de la membrana de una célula esférica en reposo puede simplificarse al expresar todas las resistencias mediante una sola; la interacción entre la membrana y las soluciones intra y extracelulares será representada como un capacitor; conectado también en paralelo como se muestra en la figura 1.4. El voltaje transmembranal es el mismo en todos los sitios de la célula. Esta condición no se cumple en células con geometrías cilíndricas, como las dendritas o axones neuronales, o en células musculares.

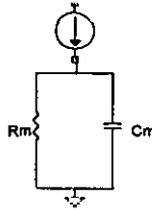


Figura 1.4 Muestra el circuito eléctrico equivalente de la resistencia y capacitancia de la membrana.

La combinación $R_m C_m$ en paralelo adquiere la propiedad de un filtro que elimina las señales eléctricas rápidas, o sea de alta frecuencia. Por esta razón se le conoce como filtro "pasa bajos". Si se inyecta a la membrana un pulso cuadrado de corriente el cambio de voltaje depende exponencialmente del tiempo. El tiempo que tarda el voltaje en hacerse estacionario depende del producto $R_m C_m$.

Se analizará el curso temporal de esta respuesta a partir del flujo de corriente a través de los componentes del circuito $R_m C_m$ en el momento en que termina el pulso de corriente ($I_m = 0$). En ese momento una parte de la corriente fluye a través del capacitor y la otra a través de la resistencia membranal. Podemos entonces expresar a la corriente membranal como la suma de las corrientes capacitiva (I_c) y resistiva (I_R), dando lugar a la siguiente ecuación:

$$I_m = I_c + I_R = C_m (dv/dt) + (V/R_m) = 0$$

Si dividimos entre C_m tenemos que:

$$I_m = (dv/dt) + (V/ R_m C_m) = 0$$

La resultante es una ecuación diferencial de primer orden cuya solución nos muestra que, al término del pulso de corriente, el voltaje membranal decae a lo largo del tiempo en forma exponencial:

$$V(t) = V_0 e^{-t/ R_m C_m}$$

Donde $V(t)$ es el voltaje en función del tiempo; V_0 es el voltaje inicial de la membrana; e es la base de los logaritmos naturales ($e = 2.73$) y t es el tiempo. A primera vista podemos evaluar la ecuación a tiempo cero y a un tiempo infinitamente largo. Cuando el tiempo tiende a cero, $V(t) = V_0$; cuando el tiempo tiende a infinito, $V(t) = 0$.

1.5 El potencial de acción

Una vez que la amplitud de las respuestas membranales ante un estímulo sobrepasa cierto nivel llamado **umbral**, las respuestas dejan de ser graduadas para convertirse en impulsos "todo o nada" de amplitud fija, llamados **potenciales de acción o impulsos nerviosos**. (Fernández, de Miguel. 1998)

La mayor parte del trabajo en electrofisiología que se hizo a partir de los 30's estaba principalmente dirigido a tres objetivos: a) caracterizar mejor las propiedades del impulso nervioso por medio de una mejor instrumentación; b) entender el significado fisiológico del potencial de acción, esto es el papel de las fibras nerviosas como acarreadoras de información, y ; c) elucidar la esencia del impulso nervioso, esto es, la física y la química de la excitación.

Así mismo, experimentos realizados en los años 30's por Cole y Curtis, mostraron que durante el impulso nervioso hay una caída drástica de la resistencia membranal, de alrededor de $2000 \Omega/\text{cm}^2$. Sin embargo, era notorio que el potencial de acción no sólo llegaba a los 0 mV, sino que se hacía positivo, en contraste con lo que se esperaría si se tratara de un cortocircuito simple.

1.5.1 La amplitud del potencial de acción.

En reposo la permeabilidad al Na^+ es muy pequeña comparada con la permeabilidad al K^+ . Sin embargo, la fuerza electroquímica que impulsa al Na^+ a entrar a la célula es enorme, por lo que si su permeabilidad se incrementa y sobrepasa la permeabilidad al K^+ , el flujo de Na^+ al interior haría que el potencial de la membrana se aproximara a E_{Na} . A partir de esa idea, Hodgkin y Katz , realizaron experimentos estimulando eléctricamente al axón de calamar gigante con diferentes concentraciones externas de Na^+ . La conclusión de esos experimentos fue que, para que se diera el potencial de acción, la permeabilidad al Na^+ debía aumentar significativamente y sobrepasar con mucho a la del K^+ . La entrada de Na^+ al interior de la celular acarrearía las cargas positivas necesarias para despolarizar a la célula y ocasionar la fase de ascenso del potencial de acción.³

1.5.2 La reconstrucción del potencial de acción.

Hodgkin y Huxley plantearon una ecuación que debería predecir la forma y duración del potencial de acción. La ecuación se fundamenta en que la corriente membranal es la suma de las corrientes iónicas individuales, la corriente capacitiva y la corriente de fuga, por lo que la ecuación quedaría de la siguiente manera:

$$I_m = C \frac{dv}{dt} + g_{K(\text{max})} n^4 (E_m - E_K) + g_{\text{Na}(\text{max})} m^3 (E_m - E_{\text{Na}}) + g_l (E_m - E_l)$$

Donde $g_l(E_m - E_l)$ es la corriente de fuga. A partir de una solución más elaborada de esta ecuación, basándose en las propiedades de cable del axón, Hodgkin y Huxley calcularon el cambio de voltaje que la corriente producía a lo largo del tiempo.

Al reconstruir la forma del potencial de acción a partir de las conductancias a Na^+ K^+ en base al voltaje y al tiempo, demostraron que el impulso se debe a estas dos corrientes iónicas donde la entrada de Na^+ produce la despolarización rápida de la membrana y la salida de K^+ junto a la inactivación de corriente de Na^+ , la repolariza.³

Una vez que ya se explicó como se comportan las células, sus membranas, su composición de elementos iónicos, su flujo de corrientes iónicas, y su modelo eléctrico; hablaremos de la manera en cómo se comunican intercelularmente para concluir el proceso de lo que implica un registro intracelular. A continuación se revisan algunos de estos conceptos.

1.6 Sinapsis eléctricas y químicas

Las conexiones que una neurona establece con otra neurona, con fibras musculares o con células secretoras se llaman **sinapsis**. Existen dos tipos de sinapsis: eléctricas y químicas. Ambas se distinguen entre sí por su morfología y sus mecanismos de funcionamiento. En las sinapsis eléctricas, la corriente se propaga directamente de una neurona a la otra a través de poros que comunican los espacios intracelulares de ambas células. En las sinapsis químicas, la llegada de impulsos a la terminal de una célula (terminal presináptica) produce la liberación de transmisor al espacio extracelular y su reconocimiento por la terminal de la célula contigua (postsináptica). En las sinapsis químicas, la célula postsináptica se puede excitar o inhibir. A continuación describiremos algunos aspectos de las sinapsis químicas y las sinapsis eléctricas.

1.6.1 Sinapsis eléctricas

En el sistema nervioso, a las uniones eléctricas se les llama sinapsis eléctricas. Éstas participan en la generación de respuestas conductuales rápidas, que son determinantes para la sobrevivencia del animal.

La característica más sobresaliente de las uniones eléctricas es que la corriente se propaga directamente y sin retardo de una célula a la siguiente. Entre sus funciones están mediar respuestas sincrónicas de células excitables en tejidos como el corazón y el sistema nervioso y posiblemente el paso de segundos mensajeros de una célula a las otras.

Las sinapsis eléctricas también permiten la propagación de potenciales sinápticos de una neurona a la contigua, de manera que la actividad sináptica puede ser compartida y en algunos casos permiten una comunicación eficiente a bajas temperaturas.

Las sinapsis eléctricas se forman en estrechamientos del espacio intermembranal. En estos sitios, hay poros llamados conexones que atraviesan ambas membranas, permitiendo la propagación de la corriente de una célula a la otra. Los conexones son canales protéicos, cuyo centro forma un canal que permite el flujo de iones y moléculas de tamaño menor o igual al de la glucosa. Vistos desde la cara interna de la membrana, los conexones tienen apariencia hexagonal. Esto se debe a que cada membrana contribuye al conexón con seis subunidades que se ensamblan formando un hexágono con un poro en el centro. La cara extracelular de las seis subunidades de cada membrana queda en contacto con la de sus homólogas de la membrana contigua. De este modo, ambas células contribuyen de manera equitativa al conexón. En las sinapsis eléctricas no ha sido posible determinar por métodos morfológicos la presencia de terminales pre o postsinápticas.

1.6.2 Sinapsis químicas

En 1950, Bernard Katz y Paul Fatt hicieron una observación en la placa neuromuscular de la rana que constituyó un parteaguas para el entendimiento de los mecanismos de la transmisión sináptica química: en ausencia de estimulación hay pequeñas despolarizaciones espontáneas en el potencial de membrana de la fibra muscular postsináptica. La amplitud de estas despolarizaciones varía de manera escalonada, con una desviación estándar de aproximadamente 10%. Katz y sus colaboradores interpretaron estas fluctuaciones como la respuesta postsináptica a la liberación espontánea de paquetes de acetilcolina. A estos paquetes de contenido regular se les llamó **cuantos** y los potenciales postsinápticos producidos por un cuanto fueron llamados **potenciales miniatura**. Por lo tanto, el cuanto sería la unidad que compone al potencial sináptico, de manera que un impulso sincronizaría la liberación de múltiples cuantos.

Los estudios del grupo de Katz se llevaron a cabo en la placa neuromuscular de la rana o en la sinapsis gigante del calamar. Ambas son sinapsis periféricas especializadas en dar respuestas rápidas, todo o nada y con mecanismos plásticos restringidos. Algunos de los postulados de la teoría clásica se han extendido a otras sinapsis; otros se han modificado de acuerdo con la especialización neuronal. Una característica de las sinapsis químicas es que entre la llegada del impulso a la terminal presináptica y la liberación, hay una latencia conocida como **retardo sináptico**. Este retardo varía entre 0.2 y 1.5 milisegundos de una terminal a otra y se debe fundamentalmente a la latencia de apertura de los canales de calcio.³

1.6.3 POTENCIAL SINAPTICO

Cuando el flujo de iones a través de receptores ionotrópicos genera una corriente transmembranal que cambia el potencial de la membrana neuronal se habla de un **potencial sináptico**.

La forma y duración de los potenciales sinápticos en el sitio de origen dependen de: a) las propiedades cinéticas de apertura y cierre de los canales receptores y b) el tiempo en el que el transmisor permanece en el espacio intersináptico.

1.6.4 Mecanismos de integración en neuronas.

Las entradas sinápticas se establecen predominantemente en las arborizaciones dendríticas neuronales y se requiere que los potenciales sinápticos se propaguen pasivamente desde las dendritas hasta el cono axonal, en donde se producen los impulsos. Para integrar la información sináptica, las neuronas establecen un compromiso entre la cinética de los potenciales sinápticos, las propiedades de su membrana y la geometría de sus arborizaciones.

1.6.5 Cinética del potencial sináptico directo.

Por las propiedades de filtración de la membrana, la forma y duración del potencial sináptico son relevantes para el procesamiento de información neuronal. Las señales rápidas son más afectadas por la filtración que las lentas. Por ello, para entender la integración neuronal es importante conocer los mecanismos de

procesamiento de señales. Los potenciales sinápticos directos tienen crecimiento rápido de 0.1 a 2 milisegundos. El bombardeo simultáneo de los receptores postsinápticos induce el paso sincrónico de los canales del estado cerrado al estado abierto. Esto define el tiempo de subida del potencial sináptico. La fase de caída del potencial sináptico se inicia cuando los canales se encuentran abiertos y el transmisor es removido del espacio intersináptico por transportadores o enzimas. En este momento, los canales empiezan a cerrarse. La constante de tiempo de caída del potencial sináptico es igual a la constante de tiempo de cierre de los canales.

1.7 Microelectrodo y su modelo eléctrico.

El microelectrodo es el transductor que convierte corriente eléctrica en corriente iónica y viceversa. En la electrofisiología son usados diversos tipos de electrodos, pero los más comunes son los de plata clorada (cloruro de plata). Estos microelectrodos están conformados por un tubo capilar de vidrio que le da cuerpo al microelectrodo, y en el interior se tiene una solución salina y alambre de plata clorada.

La relación lineal entre la diferencia de potencial y el flujo de corriente como lo describe la ley de Ohm se aplica a soluciones acuosas iónicas. La conductancia de la solución es la suma de las conductancias contribuida por cada especie de ion. Cuando la corriente fluye a través de un canal iónico, éste es acarreado selectivamente por su correspondiente ion en la solución. La corriente es acarreada por lo menos por dos tipos de iones (un anión y un catión)

La conductividad de una disolución electrolítica depende de la naturaleza y la concentración de las especies que aparecen como solutos en la disolución. Así mismo, esta conductividad depende de la concentración de los electrolitos, en gran parte porque esta concentración determina el número de iones en un volumen determinado de la disolución contenida entre los electrodos.

Estos microelectrodos forman un filtro pasa bajas formado por la alta resistencia del microelectrodo y la capacitancia generada por la solución dentro del tubo capilar, la pared de vidrio de la micropipeta y la solución del baño. En la figura 1.5 se muestra el circuito eléctrico del microelectrodo.

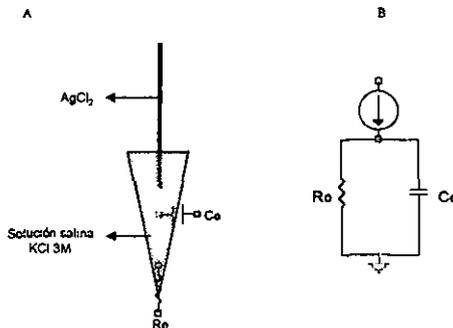


Figura 1.5 Muestra al microelectrodo (A). Circuito eléctrico del microelectrodo y fuente de corriente ideal (B)

Como se requiere inyectar corriente a la célula desde el interior del microelectrodo, podemos agregar una fuente de corriente ideal al modelo eléctrico del mismo como puede verse en la figura 1.5 (B) y realizar un análisis en la frecuencia a este circuito.

El circuito eléctrico de la figura 1.5 B puede ser representado por su circuito equivalente como se muestra a continuación en la figura 1.6.

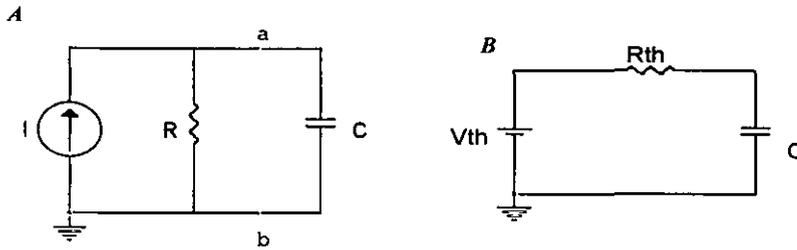


Figura 1.6 En la figura A puede observarse el circuito RC donde los puntos a y b separan el circuito del capacitor del la fuente de corriente y la resistencia, y en la figura B se representa el circuito equivalente de Thevenin del circuito de la izquierda.

Para poder calcular el circuito equivalente de Thévenin, es necesario calcular su voltaje y resistencia de Thévenin. Para ello dividimos el circuito izquierdo de la figura 1.6 por medio de los puntos a y b; para encontrar el equivalente de Thévenin ponemos la fuente de corriente en circuito abierto y vemos la impedancia que existe de los puntos a y b hacia la fuente, en este caso R que será la resistencia de Thévenin; para calcular el voltaje de Thévenin tendríamos que ver el voltaje que se encuentra entre los puntos A y B, que en este caso está dado por el producto de la fuente de corriente por la resistencia, una vez calculado el voltaje y la resistencia de Thévenin podemos plantear el circuito equivalente como se muestra en la figura 1.6 B.

Del circuito equivalente tenemos que:

$$V_o = V_c = \frac{Z_c V_{th}}{R + Z_c}$$

$$\frac{V_o}{V_{th}} = \frac{1}{R + \frac{1}{j2\pi f C}}$$

$$\frac{V_o}{V_{th}} = \frac{\frac{1}{j2\pi fC}}{j2\pi fRC + 1}$$

$$\frac{V_o}{V_{th}} = \frac{1}{1 + j2\pi fRC}$$

como $\omega = 2\pi f$ y V_o es el voltaje a la salida mientras que V_{th} es el voltaje a la entrada. Esta última ecuación es una relación entre la salida y la entrada, es decir una función de transferencia, la cual podemos describir de la siguiente forma .

$$H = \frac{1}{1 + j\omega RC}$$

si $\omega_0 = \frac{1}{RC}$ entonces

$$H = \frac{1}{1 + j\frac{\omega}{\omega_0}}$$

como vemos esta función de transferencia está en función de la frecuencia. La respuesta en frecuencia del circuito describe la razón de magnitud de $\frac{V_o}{V_{in}}$ y de los desfases a medida que ω se incrementa.

Entonces para analizar la respuesta en frecuencia de la última expresión tenemos que

$$H = \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^2}}$$

$$\phi = -\tan^{-1} \frac{\omega}{\omega_0}$$

Si evaluamos la ecuación de la magnitud en función de ω podemos generar la siguiente tabla.

ω / ω_0	Magnitud de H	H db	Fase de H en°
0.1	0.995	-0.0435	-5.7
0.5	0.89	-1.0121	-26.6
0.764	0.79	-2.0474	-37.4
1	0.7	-3.0980	-45
1.31	0.6	-4.4369	-52.6
2	0.44	-7.1309	-63.4
5	0.19	-14.4249	-78.7
10	0.1	-20	-84.3

Ahora estos valores representados de manera gráfica quedan de la siguiente manera:

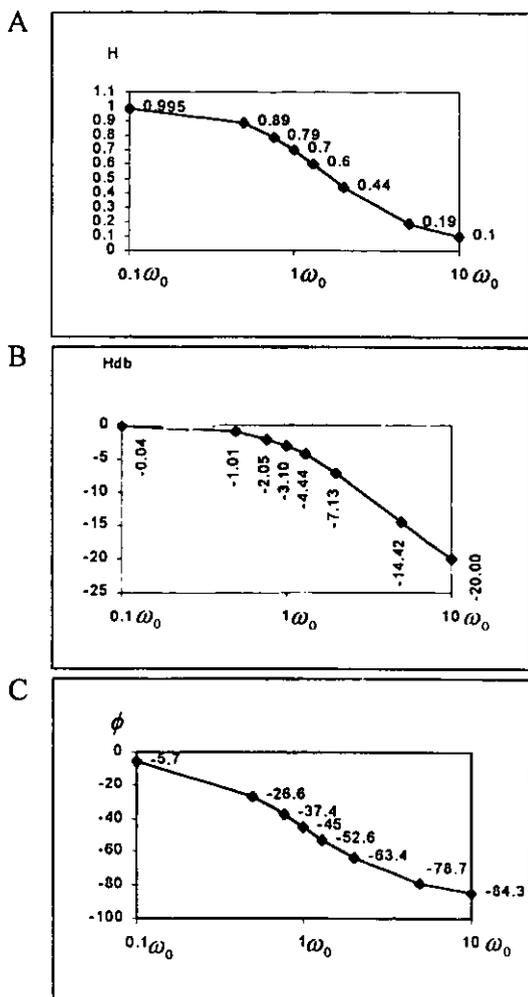


Figura 1.7 La gráfica A nos muestra la magnitud de la salida en función de la frecuencia, la gráfica B la magnitud en decibels contra la frecuencia y la gráfica C nos muestra el desfase en función de la frecuencia.

Como puede verse, en las gráficas A y B, H disminuye conforme aumenta la frecuencia (estas gráficas están normalizadas en función de la frecuencia de corte ω_0), cuando tenemos una frecuencia de $10 \omega_0$ la señal se atenúa hasta un valor de 0.1 o en -20 dB, comportamiento típico de la función de transferencia que representa al circuito RC es un circuito paso bajas.

Para tener una idea del intervalo que puede tomar la frecuencia del corte del microelectrodo veamos la siguiente tabla; recordando que:

$$\omega_0 = 2\pi f = \frac{1}{RC}$$

$$f_c = \frac{1}{2\pi RC}$$

C = 10 pF	
R	f
R 10 M	1591.5 Hz
R 20 M	795.77 Hz
R 30 M	530.5 Hz

C = 5 pF	
R	f
R 10 M	3183.1 Hz
R 20 M	1591.54 Hz
R 30 M	1061.033 Hz

De estas dos tablas observamos que conforme aumentan la resistencia y la capacitancia del electrodo, reduce el ancho de banda del filtro paso bajas que se forma por la resistencia y capacitancia del microelectrodo.

Por lo tanto, para poder aumentar el ancho de banda del filtro paso bajas y por ende la velocidad de inyección de corriente y velocidad de registro del amplificador es necesario eliminar el efecto del capacitor del microelectrodo y todas las capacitancias a la entrada del amplificador.

CAPITULO 2

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN AMPLIFICADOR PARA REGISTRO INTRACELULAR

2.1 El seguidor de voltaje

Para el diseño del amplificador de registro intracelular se utiliza como transductor un microelectrodo de alta resistencia el cual tiene como función el convertir una corriente ionica en una corriente eléctrica y viceversa.

Para poder registrar la diferencia de potencial en el interior de la célula, el microelectrodo se introduce en el interior y el otro lado del microelectrodo se acopla a un amplificador operacional en configuración de seguidor. El amplificador en configuración de seguidor nos proporciona una impedancia de entrada alta (aprox 10^{12} ohms) lo que permite un acoplamiento adecuado de voltaje con la resistencia del microelectrodo.

En un amplificador operacional en configuración de seguidor de voltaje se cumple que el voltaje a la salida es igual al voltaje de entrada, puesta en forma de ecuación nos queda.

$$V_o = V_{in}$$

Además la corriente a la entrada del amplificador es igual a cero, lo que implica que no existe una caída de potencial a través del microelectrodo y por lo tanto en ambos lados del microelectrodo el potencial es el mismo, es decir, el potencial de la célula; de tal manera que el voltaje a la salida del seguidor será el voltaje de la célula.

Físicamente este seguidor se encuentra montado en el circuito impreso de un cabezal y la forma en que se conecta el microelectrodo con la entrada del amplificador operacional es a través de un conector BNC; cabe mencionar que el chasis de este conector está conectado a una guarda la cual tiene el mismo potencial de la célula, con la finalidad de reducir capacitancias parásitas a la entrada del amplificador y reducir el ruido.

Este amplificador operacional en configuración de seguidor debe ser de bajo ruido.

En la figura 2.1 se muestra el diagrama del seguidor con la guarda conectada al chasis del conector BNC, el microelectrodo conectado al seguidor y al interior de la célula.

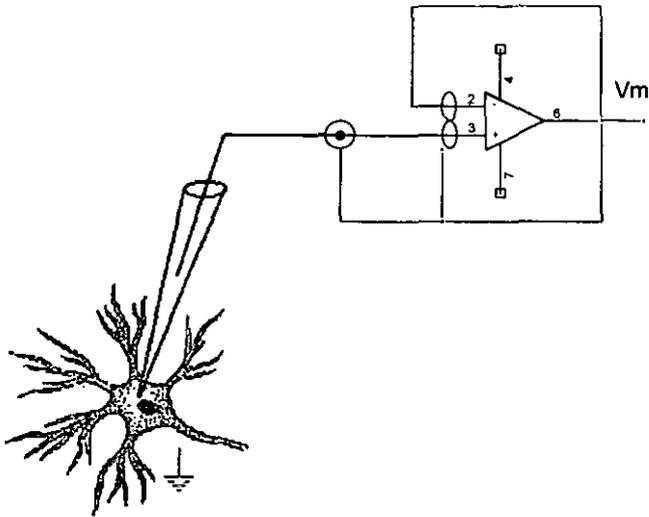


Figura 2.1 En la figura se muestra un amplificador en configuración de seguidor acoplado a un microelectrodo de alta resistencia, el seguidor contiene una guarda para reducir las capacitancias parásitas en la entrada.

Las señales que podemos medir con un amplificador de registro intracelular son el potencial de membrana, los potenciales sinápticos y los potenciales de acción.

El potencial de reposo de las células nerviosas de la sanguijuela se encuentran alrededor de los -50 mV , los potenciales sinápticos miniatura miden alrededor de 0.5 mV y están montados sobre el potencial de reposo de la célula. Esto puede observarse en la figura 2.2 que muestra de manera gráfica este tipo de señales con sus respectivas mediciones reales.

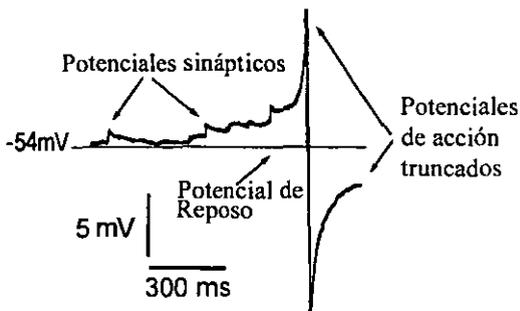


figura 2.2 Un potencial de reposo de -54 mV y montado encima de éste potenciales sinápticos típicos y un potencial de acción. (Tomado de Fernández de Miguel 1996).

2.2 Convertidor de voltaje-corriente

De la figura del seguidor vemos que este circuito es capaz de registrar el voltaje intracelular tomando como referencia el medio extracelular. Sin embargo se tiene la necesidad de inyectar corriente al interior de la célula y registrar el voltaje en respuesta a ese estímulo.

Debido al tamaño de las neuronas en estudio de alrededor $100 \mu\text{m}$ de diámetro con una capacitancia de membrana cercana a 30.0 nF (considerando una neurona esférica y sabiendo la capacitancia específica de las células es de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$)³ y a la necesidad de seguir la dinámica del sistema, es necesario inyectar grandes cantidades de corriente en periodos breves. Así mismo, la inyección intracelular de colorantes requiere de pulsos prolongados de varios nanoamperios.

Por lo tanto, se requiere tener la capacidad de inyectar corriente de $\pm 1 \text{ nA}$ o $\pm 10 \text{ nA}$ además de poder inyectar corriente de una fuente externa. Por lo que es necesario una fuente de corriente para estimular a la célula a través del microelectrodo. La corriente de esta fuente debe ser independiente de la resistencia del microelectrodo.

Para resolver este problema se utilizó un convertidor de voltaje a corriente conocido como puente activo como se muestra en la figura 2.3, que inyecta corriente al microelectrodo a través de una resistencia, la cual en uno de sus extremos tendrá el voltaje del electrodo (V_e) y en el otro extremo tendrá al voltaje del electrodo (V_e) más una parte proporcional del voltaje de control (V_{control}). Estos últimos ($V_e + K V_{\text{control}}$) son generados por el puente activo.

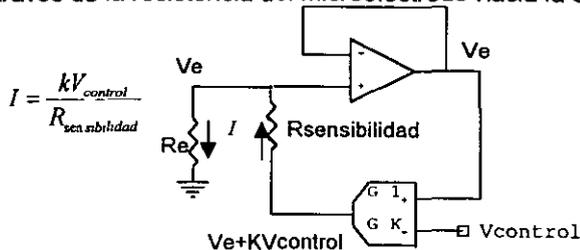
Ahora para saber cuanta corriente fluye a través de la resistencia, puede calcularse por medio de la ley de Ohm quedando de la siguiente manera:

$$(V_e + K V_{\text{control}}) - V_e = R_{\text{sensibilidad}} I$$

Simplificando esta ultima expresión y despejando la corriente nos queda:

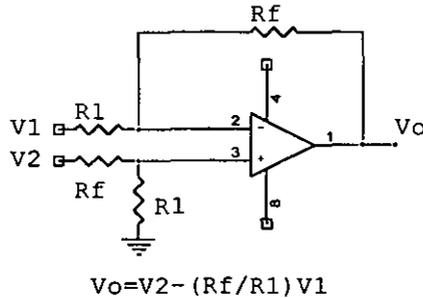
$$I = \frac{K V_{\text{control}}}{R_{\text{sensibilidad}}}$$

La figura 2.3 ejemplifica el concepto de un puente activo que genera la corriente que fluirá a través de la resistencia del microelectrodo hacia la célula.



2.3 Funcionamiento de un puente activo usado para convertir una señal de corriente en una de voltaje

Para diseñar el puente activo, utilizamos un amplificador operacional en configuración de diferenciador con dos ganancias diferentes entre ambas entradas como puede verse en la figura 2.4



2.4 Circuito diferencial con diferente ganancia en cada entrada

Para demostrar la ecuación que define la función del circuito mostrado en la figura 2.4 aplicando el principio de superposición, tenemos que el voltaje a la salida es la suma del voltaje a la salida debido a cada entrada en forma independiente, esto es:

$$V_o = V_{o1} + V_{o2}$$

Es decir, el voltaje a la salida es igual al voltaje a la salida debido a V1 más el voltaje a la salida debido a V2.

El voltaje de salida debido a V1 se calcula eliminando el efecto de V2 (para eliminar el efecto de las fuentes de voltaje, se cortocircuitan) por lo que el circuito quedaría en configuración de amplificador inversor y por lo tanto:

$$V_{o1} = -\frac{R_f}{R_1}V_1$$

De igual forma para calcular la salida debido a V2 eliminamos el efecto de V1 y el circuito quedaría en configuración de amplificador no inversor, por lo tanto:

$$V_{o2} = \left(1 + \frac{R_f}{R_1}\right) \left(\frac{R_1}{R_1 + R_f}\right) V_2$$

reduciendo la expresión anterior:

$$V_{o2} = V_2$$

por lo tanto:

$$V_o = V_2 - \frac{R_f}{R_1} V_1$$

Si de la configuración del circuito anterior V_2 es conectada a la salida del seguidor, y la salida del circuito diferencial se conecta a la entrada del seguidor a través de una resistencia de sensibilidad ($R_{sensibilidad}$) como se representa en la figura 2.5 en la cual se observa que la corriente que circula por la resistencia de sensibilidad ($R_{sensibilidad}$) será igual a la corriente que circula por la resistencia del electrodo (R_e), generando así una caída de potencial en dicha resistencia. Este voltaje del electrodo estará presente a la entrada del seguidor y por ende a la salida del mismo, el cual entrará al puente activo para salir amplificado con una ganancia unitaria.

Por otro lado, el voltaje V_1 se llamará voltaje de control ($V_{control}$). Al aplicarlo a la entrada negativa del puente activo a través de R_1 , pasará a la salida del puente activo multiplicado por un factor de $K = -\frac{R_f}{R_1}$.

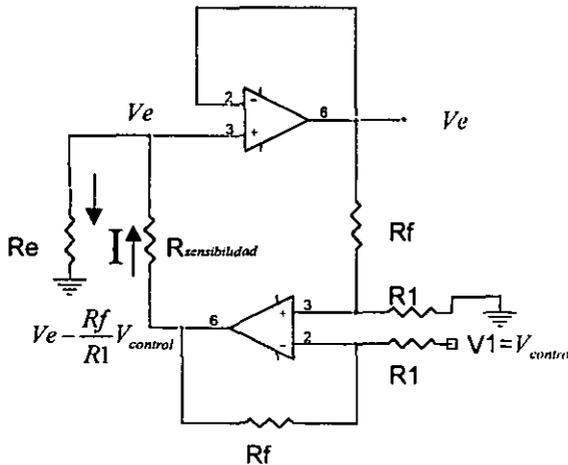
Tomando en cuenta ambas entradas, la salida total del circuito puente activo será:

$$V_e - \frac{R_f}{R_1} V_{control}$$

La corriente que pase a través de la resistencia de sensibilidad estará dada por la diferencia de potencial en sus dos extremos dividido por la resistencia de sensibilidad, expresado mediante la ley de Ohm tenemos que:

$$\left[V_e - \frac{R_f}{R_1} V_{control} \right] - V_e = R_{sensibilidad} I$$

$$I = \frac{-\frac{R_f}{R_1} V_{control}}{R_{sensibilidad}}$$



La figura 2.5 muestra el circuito puente activo como convertidor de voltaje corriente para hacer pasar una corriente independiente de la resistencia del microelectrodo.

El signo negativo nos indica que la corriente fluye en sentido contrario al dibujado en la figura, por lo tanto si queremos que la corriente fluya en el sentido indicado en la figura $V_{control}$ deberá ser negativo.

De la última expresión vemos que la corriente depende de los valores de las resistencias y el voltaje $V_{control}$.

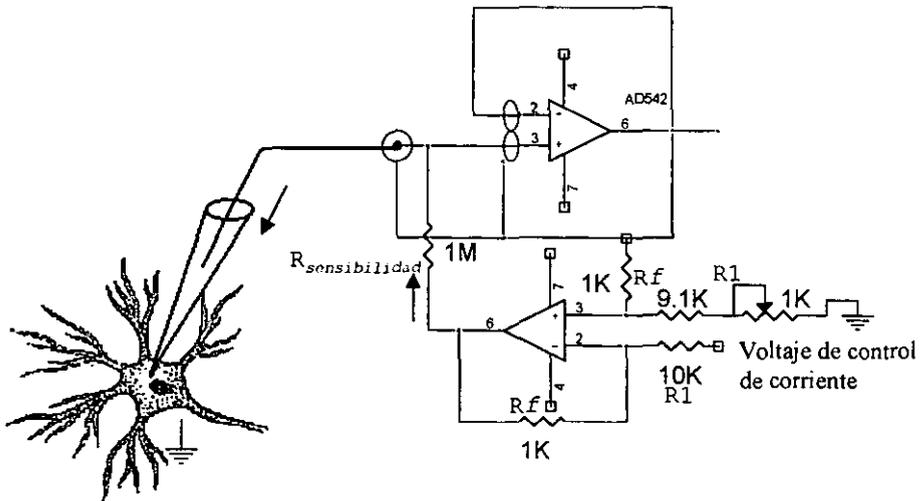
En el diseño del amplificador se fijaron los valores de $R_f=10K\Omega$ y $R1=1K\Omega$ (estas resistencias son de precisión al 1%) quedando la última ecuación como:

$$I = \frac{0.1(-V_{control})}{R_{sensibilidad}}$$

de esta última expresión tenemos que la corriente depende del valor de $V_{control}$ que es el voltaje a la entrada del amplificador (que está limitado por el voltaje de alimentación del mismo entre +/- 15 V) y del valor de la resistencia de sensibilidad, si deseamos pasar una corriente de 1 nanoamperio por cada 10 mV el valor de $R_{sensibilidad}$ será de $1M\Omega$.

De esta forma si deseamos pasar una corriente de 10 nA el voltaje de $V_{control}$ deberá ser de -100 mV.

La corriente máxima que podemos inyectar a la célula depende del valor máximo de voltaje que podamos aplicar en $V_{control}$ y del valor de la resistencia del microelectrodo. La figura 2.6 muestra el circuito del convertidor de voltaje corriente.



2.6 La figura muestra un circuito real para poder inyectar corriente el interior de la célula

Si el convertidor de voltaje a corriente recibe del control de inyección de corriente un voltaje negativo esto generara una inyección de corriente positiva que hiperpolarizara la célula y por el contrario si recibe un voltaje positivo se inyectara corriente negativa que despolarizara la célula.

Las necesidades requeridas en la inyección de corriente del amplificador de registro intracelular es que tenga una capacidad de inyectar corriente de +/- 1nA o 10 nA además de poder inyectar corriente de una fuente externa.

Para lograr estos objetivos se diseñó el circuito mostrado en la figura 2.7 el cual se explica a continuación.

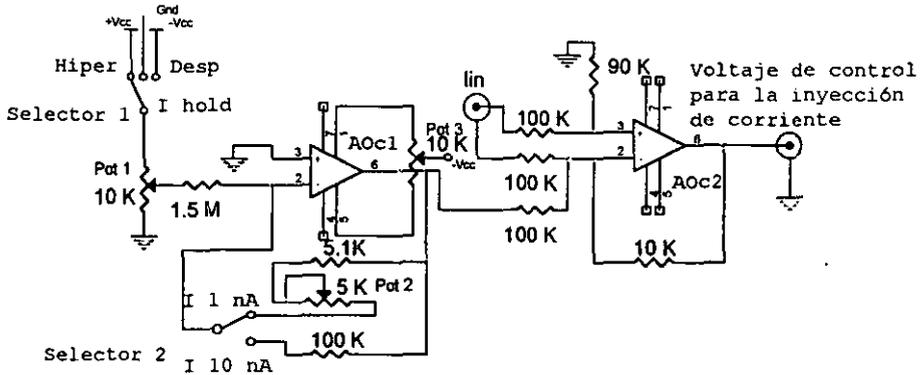


Diagrama 2.7 para generar el voltaje de inyección de corriente. El selector 1 selecciona que tipo de corriente se va a inyectar, el selector 2 selecciona el intervalo de corriente que será inyectada. I_{in} es la entrada para una estimulación externa.

El voltaje de control para la inyección de corriente tiene dos amplificadores operacionales de bajo ruido etiquetados como AOC1 y AOC2, el primero tiene como objetivo convertir un voltaje de 0 a +/- 15 V en un rango de voltaje de 0 a +/- 1 V o de 0 a +/- 100mV (según se seleccione la ganancia del amplificador operacional) mientras que el segundo amplificador recibe la salida del primero para atenuarlo por un factor de 0.1 además de recibir de forma diferencial la señal de estimulación externa y también atenuándola por el mismo factor.

Por medio del selector1 seleccionamos tres opciones de voltaje de alimentación las cuales realizarán las siguientes funciones:

- 1.- Si el selector selecciona $+V_{cc}$ (+15 V) inyectará corriente negativa despolarizante.
- 2.- Si el selector 1 selecciona Gnd (0 V) no inyectara corriente.
- 3.- Si el selector 1 selecciona $-V_{cc}$ (-15 V) inyectara corriente positiva hiperpolarizante.

El voltaje seleccionado por el selector 1 alimentará al potenciómetro P1 (Este potenciómetro es el control para inyectar corriente en un rango de 0 a 1 nanoamperios o de 0 a 10 nanoamperios según la posición del selector 2) que funciona como divisor de voltaje variando de 0 a 15 Volts, a su vez alimenta a la entrada del amplificador AOC1 a través de una resistencia de 1.5 MΩ.

El amplificador operacional AOC1 está en configuración de inversor, al cual se le puede seleccionar la ganancia a través del selector 2 que selecciona la resistencia de realimentación.

Sabemos que para un amplificador operacional en configuración de inversor se cumple la siguiente ecuación:

$$V_o = -\frac{R_f}{R_i} V_{in}$$

para este caso tenemos que el voltaje máximo que entra al amplificador es el de la fuente +/- 15 V el cual puede ser dividido por el potenciómetro 1 para ser alimentado a través de la resistencia de 1.5 MΩ (o un arreglo de resistencias que cumplan con este valor)

Considerando lo anterior, del diagrama vemos que si la resistencia de realimentación seleccionada por el selector 2 es de 10 KΩ, de la fórmula tenemos que:

$$V_o = -\frac{10K}{1.5M} 15V = 100mV$$

Este voltaje de 100mV alimentará al amplificador AOC2 que lo atenuará por un factor de 0.1 para obtener a la salida un voltaje de control de 10 mV lo que generará una corriente de 1 nA.

Cabe mencionar que el valor de resistencia de 10 KΩ está dado por una resistencia de 5.1KΩ en serie con un potenciómetro de 5KΩ, el cual es ajustado a un valor de 4900 Ω. El potenciómetro 2 nos permite calibrar la ganancia y ajustar la salida del amplificador AOC1 en 100 mV.

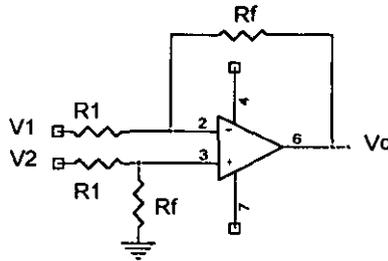
Si el selector 2 selecciona como resistencia de realimentación la de 100 KΩ tenemos que:

$$V_o = -\frac{100K}{1.5M} 15V = 1V$$

Este voltaje de 1V alimentará al amplificador AOC2 que lo atenuará por un factor de 0.1 para obtener a la salida un voltaje de control de 100 mV lo que generará una corriente de 10 nA.

Los amplificadores utilizados tienen dos entradas para compensar su propio voltaje de corrimiento, para lo cual se conecta el potenciómetro 3 de 10 KΩ en las terminales 5 y 1 como puede verse en el amplificador AOC1.

El amplificador AOc2 está compuesto de dos configuraciones básicas, la de un sumador inversor y la de un inversor diferencial. La señal de salida del amplificador operacional AOc1 es atenuada por un factor de 0.1 por la configuración operacional AOc2 y sumada a una señal externa que entra de forma diferencial a través del conector BNC que se muestra en la entrada de AOc2. En la figura 2.8 se muestra el circuito operacional en configuración de amplificador diferencial.



$$V_o = R_f/R_1 (V_2 - V_1)$$

FIGURA 2.8 Amplificador operacional en forma diferencial.

Cabe mencionar que un amplificador diferencial resta de la señal de la entrada positiva a la señal de la entrada negativa y la diferencia la amplifica por el factor dado por la relación de R_f/R_1 , el utilizar un amplificador de forma diferencial ayuda a disminuir el ruido de modo común a las entradas.

2.3 Monitor de Corriente

Como herramienta de control es necesario que el amplificador de registro intracelular tenga una salida en la cual se pueda monitorear la cantidad de corriente inyectada al interior de la célula, los amplificadores del laboratorio cuentan con esa salida pero la señal monitoreada es muy pequeña por lo que es necesario agregar una etapa de amplificación.

El monitor de corriente está formado por un amplificador inversor con ganancia de 10. Como puede verse en la figura 2.9 este amplificador es alimentado por el voltaje de control de corriente. Como el cabezal tiene una sensibilidad de 10 mV / nA, que son generados por el voltaje de control de corriente, con base a lo anterior entonces cada 100 mV medidos a la salida del monitor de corriente se deberá interpretarse como 1 nA de corriente.

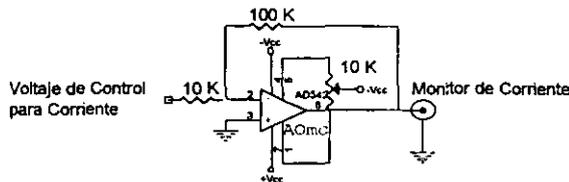


Figura 2.9 Circuito para monitorear la corriente.

La salida del amplificador AOmc tendrá la misma forma de la señal de corriente inyectada debido a que el voltaje de control es de signo contrario al de la señal de corriente inyectada.

2.4 Compensación de efectos capacitivos

En el punto anterior definimos el mecanismo para inyectar corriente al interior de la célula. En La figura 2.6 se mostró el circuito para inyectar corriente a la célula a través del microelectrodo; ahora podemos completar la figura 2.6 utilizando los modelos eléctricos de la membrana celular y el microelectrodo como se muestra en la figura 2.10.

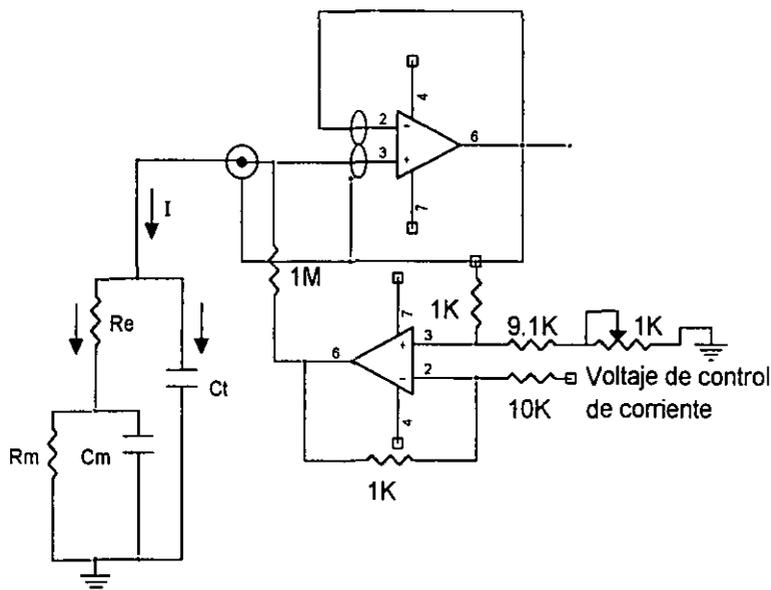


Figura 2.10 Circuito para inyectar corriente al interior de la célula, parte de esta corriente de estimulación puede fugarse a través de la capacitancia total del microelectrodo

Como puede verse en la figura 2.10 parte de la corriente inyectada se fuga hacia tierra a través de la capacitancia total (C_t) a la entrada del seguidor de voltaje (capacitancia del electrodo más la capacitancia del amplificador operacional).

La velocidad de respuesta del amplificador de registro intracelular está comprometida con la capacitancia total a la entrada del circuito. Como ya se mencionó, estas capacitancias y la resistencia del microelectrodo forman un filtro paso bajas, esto es, las señales de alta frecuencia van a tierra a través de la capacitancia lo cual reduce el ancho de banda del registro del sistema.

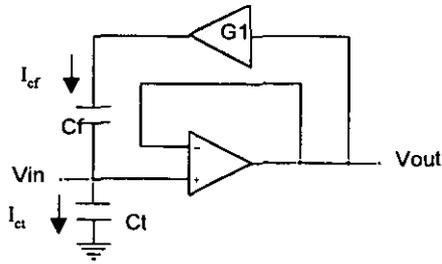
La corriente de estimulación puede ser de dos tipos corriente directa o corriente alterna, si la corriente es directa la corriente que se fugará a través de la capacitancia será cero debido a que la reactancia de un capacitor está dada por:

$$X_c = \frac{1}{j\omega C}$$

Como en la corriente constante la frecuencia es igual a cero de la ecuación anterior tenemos que la reactancia capacitiva es infinita por lo cual el capacitor se puede representar como un circuito abierto y en consecuencia la corriente inyectada fluirá totalmente hacia el interior de la célula a través de la resistencia del microelectrodo.

En el caso de que la corriente de estimulación sea variable en el tiempo entonces con base a la ecuación anterior la impedancia de la capacitancia tendrá un valor finito y una parte de la corriente inyectada se fugará a través de la capacitancia a tierra.

Como necesitamos que la corriente inyectada fluya completamente hacia el interior de la célula debemos compensar la corriente fugada a través de la capacitancia. Una forma de realizar esta compensación es disminuyendo el nivel del medio de cultivo pues la capacitancia del microelectrodo depende de la profundidad de este en el medio de cultivo, otra forma de lograr el mismo efecto es engrosando la pared de vidrio del microelectrodo, para hacer la distancia más grande entre los conductores que forman el capacitor ($C = \frac{\epsilon A}{d}$) y por ende se reduce la capacitancia. Estas dos formas de reducir la capacitancia son de manera física, sin embargo una forma de realizarlo de forma electrónica es usando una técnica llamada **compensación de capacitancia negativa** que permite reducir cualquier valor de capacitancia remanente. Esta técnica consiste en colocar a la salida del seguidor de voltaje un amplificador con una ganancia adecuada para inyectar corriente a través de un capacitor, la corriente deberá ser igual a la fugada por la capacitancia total a la entrada del seguidor a tierra, la ganancia optima será antes de que la corriente inyectada provoque un sobrepaso. Si la ganancia es muy grande el circuito oscilará con consecuencias desastrosas para la célula; la figura 2.11 muestra de forma esquemática la idea de compensación de capacitancia negativa.



C=Capacitor de realimentación
 Ct=Capacitancia total a la entrada

Figura 2.11 técnica de compensación de capacitancia negativa la cual consiste en inyectar una corriente igual que se fuga por Ct a través Cf por medio de un amplificador con una ganancia ideal.

La corriente que fluye a través del capacitor C_t está dada por:

$$I_{ct} = C_t \frac{dV}{dt}$$

I_{ct} = la corriente total que fluye por el capacitor

C_t = Capacitancia total (capacitancia del electrodo más la capacitancia a la entrada del amplificador).

V = Voltaje en el capacitor.

Una cantidad de corriente igual a la fugada será inyectada por medio del capacitor de realimentación que se encuentra a la salida del circuito de compensación de capacitancia negativa, el cual tiene una ganancia óptima para lograr este fin.

Para definir cuál es el rango de capacitancia que se necesita compensar, a continuación se describen las pruebas que se realizaron para medir el valor de la capacitancia total a la entrada.

Con el uso de un amplificador de registro intracelular del laboratorio, se introdujo el microelectrodo en el baño y se midió la resistencia del mismo pasando una corriente constante de un nanoamperio a través del microelectrodo para producir una caída de voltaje el cual fue medido con el osciloscopio. Posteriormente se inyectaron pulsos cuadrados de corriente de 1, 10, 100, 1000, 10000 Hz para visualizar en el osciloscopio el efecto del circuito RC que forma el microelectrodo (filtro paso bajas) y se midió la constante de tiempo de ese circuito para posteriormente calcular el valor de la capacitancia con la fórmula:

$$C = \tau / R$$

Donde:

C= Capacitancia total a la entrada

τ = Constante de tiempo

R= Resistencia del electrodo

Por otro lado sabemos que la capacitancia de la micropipeta varía dependiendo de la profundidad a la que se encuentre inmersa en el baño, a mayor profundidad mayor capacitancia.

A continuación se presentan los valores obtenidos de capacitancia a diferentes profundidades para un electrodo de $74 \text{ M}\Omega$.

R= $74 \text{ M}\Omega$	
$\tau_1 = .5 \text{ ms}$	$C_1 = 6.7 \text{ pf}$
$\tau_2 = .6 \text{ ms}$	$C_2 = 8.1 \text{ pf}$
$\tau_3 = .7 \text{ ms}$	$C_3 = 9.4 \text{ pf}$

De estos últimos datos vemos que es suficiente tener la capacidad de compensar hasta 10 pf como valor máximo.

En la figura 2.12 se muestra el circuito para controlar la ganancia del circuito de compensación de capacitancia negativa.

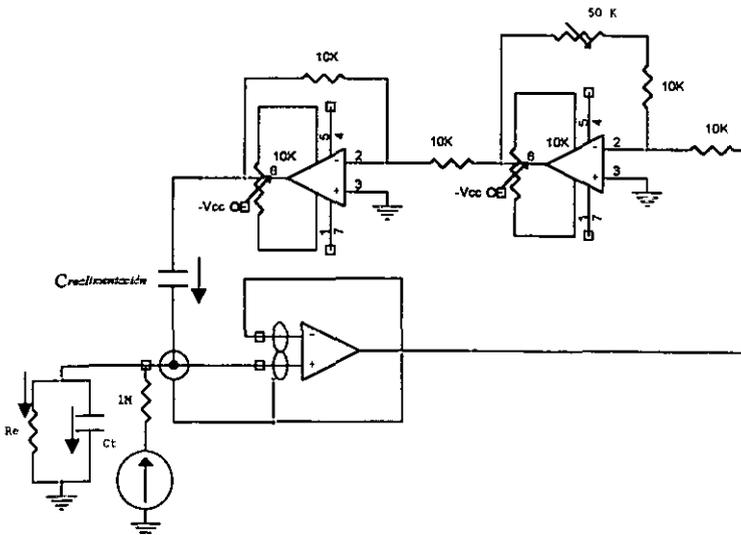


Figura 2.12 Muestra el control de ganancia para la compensación de capacitancia

Este diagrama nos muestra el circuito de compensación de capacitancia negativa. El voltaje a la salida del seguidor alimentara al amplificador inversor CC2 El cual tiene una ganancia variable en donde la mínima ganancia que toma será unitaria, el potenciómetro de realimentación controlara la ganancia para la compensación de la capacitancia. El amplificador CC1 tiene una ganancia unitaria y tiene la función de invertir la señal de voltaje recibida del amplificador CC2. La corriente que se fuga a través de la capacitancia total (Ct) es:

$$I_{ct} = C_t \frac{dV}{dt}$$

por otro lado la corriente que pasa por el capacitor de realimentación (Cf) es:

$$I_{cf} = C_f G \frac{dV}{dt}$$

Como la corriente I_{ct} debe ser igual a la corriente de I_{cf} relacionando ambas ecuaciones tenemos que:

$$G = \frac{C_t}{C_f}$$

de esta última expresión si $C_t=11 \text{ pF}$ y $C_f =2.2 \text{ pF}$ entonces la ganancia máxima que debe tener el circuito de compensación de capacitancia negativa es:

$$G = \frac{11 \text{ pf}}{2.2 \text{ pf}} = 5$$

Donde G es la ganancia del amplificador en configuración de amplificador inversor.

Por cuestiones prácticas de los valores de los componentes comerciales, el potenciómetro de control de ganancia del amplificador CC2 es de $50 \text{ K}\Omega$ y por lo tanto la ganancia total de ese amplificador será de 6 con lo que tendremos un rango de compensación de capacitancia de 13.2 pF .

2.5 Compensación de Resistencia

Al inyectar corriente a la célula a través del microelectrodo existe una caída de potencial a través de éste; la señal que registra el cabezal es enviada al preamplificador a la entrada de amplificador AOs1 (ver figura 2.14), es el potencial de membrana, más la caída de potencial a través del electrodo (V_m+V_e) donde $V_e = I R_e$ como se definió anteriormente. La señal que nos interesa registrar es el I

cambio de potencial a través de la membrana por lo cual tenemos que restar la parte de la señal debido a la caída de potencial del electrodo. Además se necesita aumentar la capacidad de compensación de resistencia a 200 MΩ, ya que estos amplificadores también serán utilizados para realizar inyecciones intracelulares de colorantes para las cuales se utilizan microelectrodos de resistencia mayores a 100 MΩ.

Para poder realizar la compensación del electrodo se utilizó el amplificador AOs1 en una configuración de sumador, el cual suma las señales (Vm+Ve) +(- Ve). Este último componente es generado de la siguiente manera: La caída de voltaje a través de un electrodo es directamente proporcional al flujo de corriente la cual podemos calcular por la ley de Ohm,

$$V_e = R_e I_e$$

Por otro lado la corriente que fluye a través del electrodo es controlada por un voltaje:

$$I_o = 0.1 V_{control} / R_s$$

Si relacionamos ambas ecuaciones y la dejamos en términos de voltajes tenemos:

$$V_e / V_{control} = 0.1 R_e / R_s$$

Lo que nos indica que existe una relación de proporcionalidad entre ambos voltajes, el cual podemos aprovechar de la siguiente manera como lo indica la figura 2.13

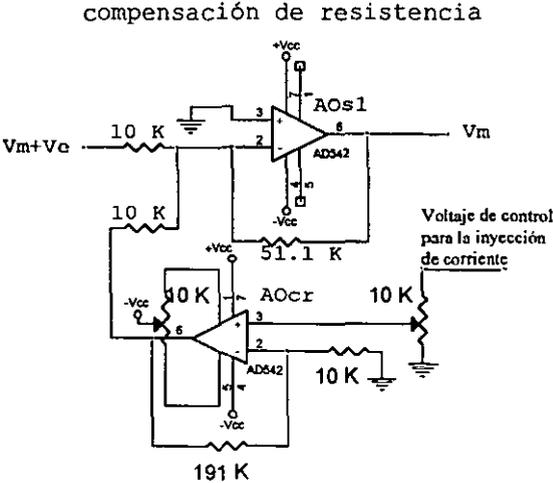


FIGURA 2.13 El circuito para compensar resistencia del electrodo toma una muestra del voltaje de control para la inyección de corriente el cual amplifica y regula para restarlo en AOs1.

En el diagrama observamos que el voltaje de control para inyección de corriente alimenta al potenciómetro (Pot 1) que funciona como un divisor de voltaje, el cual a su vez es amplificado por un factor de 20.1 en el amplificador AOcr que está en una configuración de amplificador no inversor que tiene la siguiente relación entrada salida:

$$V_o = (R_f/R_1 + 1) V_i$$

La salida de AOcr es sumada por el amplificador AOs1 a la señal $V_m + V_e$ (cabe mencionar que el voltaje $V_{control}$ es de signo contrario al del flujo de corriente inyectada por lo que al sumarse en AOs1 realmente se resta) logrando con esto eliminar la componente debido a la caída de potencial en la resistencia del electrodo.

El amplificador de registro intracelular se diseñó para compensar electrodos de hasta 200 M Ω , esto se calculó de la siguiente manera:

Sabemos que el voltaje de saturación en los amplificadores operacionales es un poco menor al voltaje de alimentación en este caso +/- 15 Volts, considerando un voltaje de saturación de +/- 14 y una resistencia de electrodo de 200 M Ω , por ley de Ohm obtenemos.

$$I = V/R$$

$$I = 14 \text{ V} / 200\text{M} = 70 \text{ nA}$$

Como el cabezal tiene una sensibilidad de 10 mV por 1 nA, entonces 70 nA equivale a un voltaje de control de 0.7 Volts. Por lo tanto la ganancia es

$$V_{elec}/V_{control} = 14 \text{ V} / 0.7 \text{ V} = 20$$

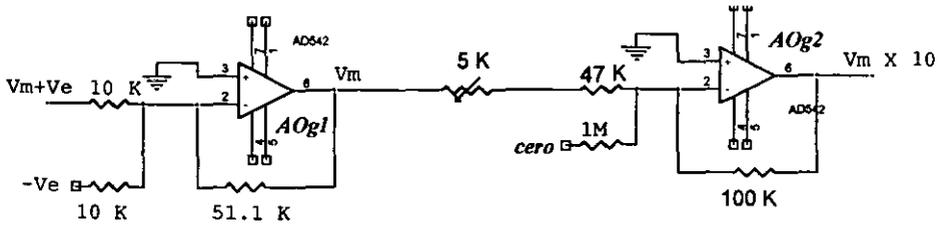
Que es la ganancia que tiene el amplificador AOcr.

2.6 Ganancia x 10 del Preamplificador.

El amplificador de registro intracelular fue diseñado con una etapa de preamplificación con una ganancia de 10 antes de tener la amplificación total adecuada. Esto es con el propósito de acondicionar la señal y tener una salida adicional para monitorear el potencial de reposo de la membrana, la cual es necesaria para saber en qué condiciones se encuentra la célula (para las células en estudio este potencial de reposo se encuentra al rededor de los -50 mV).

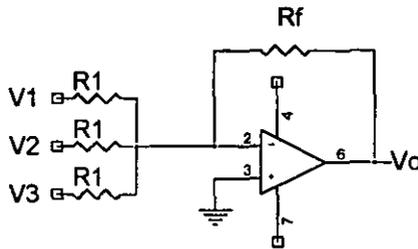
La etapa de preamplificación recibe el voltaje de membrana (V_m) más el voltaje de la caída de potencial en el microelectrodo.

En la figura 2.14 se muestra el circuito de la etapa de preamplificación. El amplificador AOg1 de la figura está en configuración de sumador inversor.



2.14 Circuito para obtener una ganancia de 10 el voltaje de Vm (voltaje membranar)

Como ya se sabe un amplificador en configuración de sumador inversor está regido por la siguiente ecuación (véase figura 2.15)



$$V_o = (-R_f/R_1)(V_1 + V_2 + V_3)$$

2.15 Circuito amplificador en configuración de inversor

El amplificador operacional AOG1 en la figura cumple con dos funciones básicas: suma la señal ($V_m + V_e$) con $(-V_e)$, este último generado por el control de compensación de resistencia del electrodo. El resultado de esta suma es el voltaje de membrana (V_m) que es amplificada por un factor de 5.11 y es invertida la señal. Posteriormente para que el voltaje de membrana (V_m) alcance una amplificación de $\times 10$, la señal que sale del amplificador AOG1 es amplificada nuevamente en el amplificador AOG2 por un factor de 1.96 y vuelve a invertir la señal. El amplificador operacional AOG2 está en una configuración de amplificador inversor y su ganancia esta definida por la resistencia de 100K entre la suma de la resistencia de 47K más 4.02K, este último valor de resistencia es una parte del valor del potenciómetro de 5K que tiene como función el ajustar el valor de salida a una ganancia exacta de 10.

2.7 Control del cero

Los amplificadores operacionales presentan un voltaje de corrimiento a la entrada, lo que provoca que la salida sea distinta de cero, de la misma manera el uso de dos electrodos en el registro intracelular suelen tener una diferencia de

potencial que en ocasiones puede llegar a ser de varios cientos de milivolts, esto es debido al punto de contacto entre los diferentes conductores y a las diferentes concentraciones en la soluciones (solución de la pipeta y solución del medio). Por ejemplo electrodos con una concentración de KCl 3Molar y las soluciones fisiológicas generan una diferencia de potencial de alrededor de 110 mV. Por tal motivo es necesario tener un control para compensar el corrimiento el cual llamaremos control del cero (referencia). En la figura 2.16 se muestra el circuito para generar este control del cero el cual se explica a continuación.

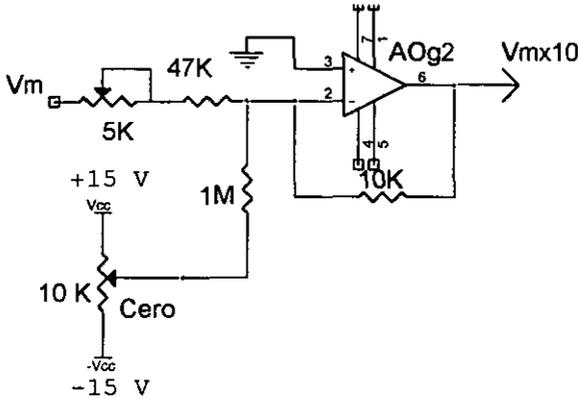


figura 2.16 circuito para generar este control del cero

El circuito para el control del cero es muy simple; el potenciómetro de 10 KΩ funciona como el control del cero y esto lo hace realizando la función de un divisor de voltaje que varía desde 15 V hasta -15 V y alimenta a la entrada negativa del amplificador AOg2 a través de una resistencia de 1MΩ. La ganancia del amplificador para esta señal de entrada es de -0.1 generada por la relación de resistencias $-\frac{R_f}{R_i} = -\frac{100K}{1M}$, por tal motivo la señal del cero se presentará a la salida variando entre un rango de -1.5 V hasta 1.5 V.

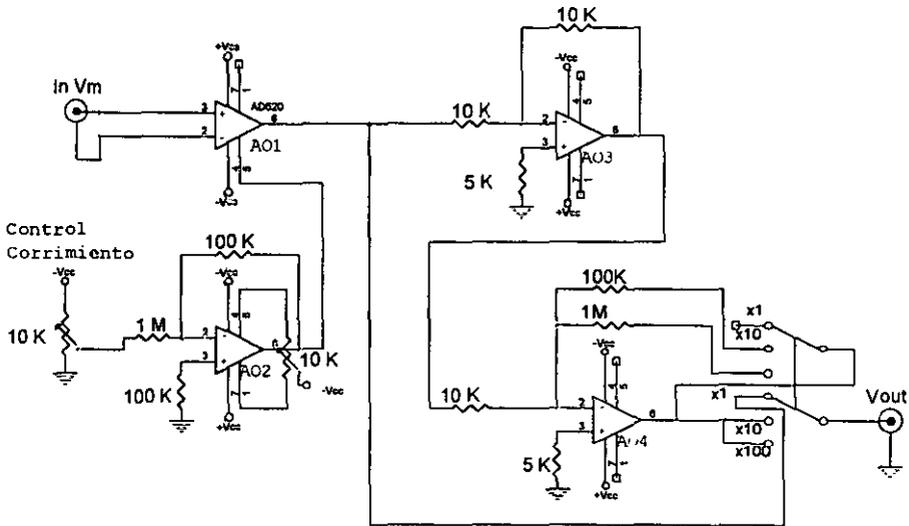
Cabe aclarar que el amplificador AOg2 está en configuración de sumador inversor, y las señales que suma es la del cero más el voltaje de membrana. El voltaje de membrana termina a la salida de este amplificada por un factor de 10, por lo cual el rango de la señal de "Cero" que aparece a la salida del amplificador AOg2 se considera como amplificador por 10, teniendo con esto un rango real de control de "Cero" de -0.15V hasta 0.15 V.

2.8 Etapas subsecuentes de amplificación

Las etapas de amplificación tienen como finalidad mejorar la relación señal ruido y terminar de acondicionar la señal para poder ser digitalizada y almacenada en la computadora. La amplificación de la señal no debe sobrepasar un voltaje de

+/- 10 V. Pues es el valor máximo de entrada que el convertidor analógico digital puede recibir; por otro lado debemos recordar que la máxima amplificación que podemos tener en la salida del último amplificador es menor al de la fuente de alimentación para este caso en particular +/- 15 V. Esto debemos tenerlo en cuenta para poder registrar la señal de interés sin saturarla. Para eso es necesario seleccionar el factor adecuado de amplificación.

La etapa de amplificación consta de cuatro amplificadores operacionales como se muestra en la figura 2.17. La etapa de amplificación puede analizarse en tres partes: a) amplificador de acople, b) corrimiento, c) amplificación.



2.17 Diagrama general de la etapa de amplificación

2.8.1 La etapa de acoplamiento

El amplificador AO1 es un amplificador de instrumentación con una ganancia unitaria, la finalidad de este amplificador es acoplar los voltajes a la entrada y reducir el ruido que se presenta de modo común a la entrada y también es utilizado para compensar el corrimiento. Este amplificador recibe a la entrada el voltaje de la célula amplificada previamente por un factor de 10 en la etapa de control.

Cuando se introduce el microelectrodo en al interior de la célula el potencial de reposo de la misma es de aproximadamente -54 mV por lo que al ser amplificado por un factor de 10 por el preamplificador este voltaje pasará a ser de -0.54 V por lo que al querer seguir amplificando la señal por otro factor de 10 o 100 los amplificadores tienden a saturarse por lo cual es necesario controlar el corrimiento a la entrada de la etapa del amplificador.

2.8.2 Corrimiento

El corrimiento es un nivel de DC que varía de 0 a 1.5 Volts el cual es generado por el amplificador AO2 que está en configuración de amplificador inversor con una ganancia de 0.1 y la entrada es alimentada por un potenciómetro que varía de 0 a -15 V. Este nivel de corriente directa (DC) es conectado en la terminal (pin 5) del amplificador AO1 en donde sirve de referencia.

2.8.3 Amplificación.

La etapa de amplificación es realizada por los amplificadores operacionales A03 y A04 los cuales están en configuración de amplificadores inversores, el amplificador A03 invierte la señal con una amplificación unitaria, mientras que el amplificador A04 vuelve a invertir la señal además de amplificar por un factor de 10 o 100 según se seleccione por un selector.

La salida de la etapa de amplificación es controlada por un selector el cual selecciona el factor de amplificación con el que saldrá la señal, los factores de amplificación puede ser por 1, 10 o 100.

2.9 Construcción del amplificador para registro intracelular

La construcción del amplificador de registro intracelular se realizó en dos módulos a) el módulo del cabezal y b) el módulo de la de la etapa de controles.

2.9.1 El cabezal

El cabezal es el modulo donde se monta el microelectrodo (transductor) que recibe la señal y es el mecanismo que sirve para estimulara la célula.

Es el encargado de sensar las señales de la célula y se conecta a la etapa de controles para recibir V_{cc} , $-V_{cc}$, gnd (tierra), la señal de control de capacitancia y la señal del control para la inyección de corriente; y envía a la etapa de controles solamente la señal de potencial de membrana más la caída de potencial en la resistencia del microelectrodo ($V_m + V_e$).

El cabezal está conformado por los circuitos seguidor de voltaje, convertidorde voltaje corriente y el de compensación de capacitancia negativa; los cuales fueron presentados anteriormente. Estos circuitos están montados sobre una tarjeta impresa de dos caras. La figura 2.18 muestra el circuito completo del cabezal.

Cabezal

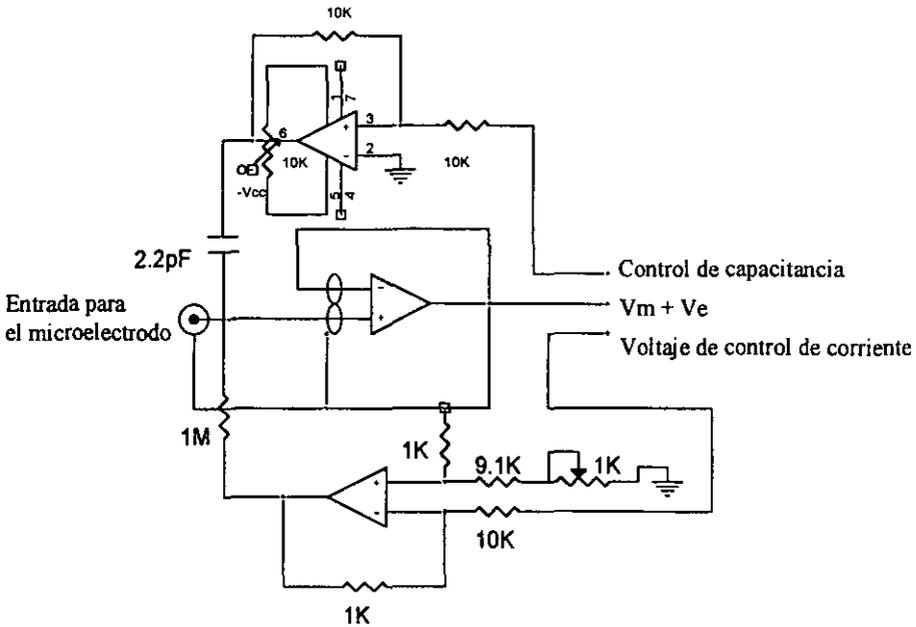


figura 2.18 circuito del cabezal, formado por un seguidor de voltaje, un puente activo y la compensación de capacitancia negativa.

2.9.2 Etapa de controles.

Este módulo contiene dos tarjetas impresas, la tarjeta de control principal y la tarjeta de amplificación y manejo del corrimiento para el potencial de membrana.

En la figura 2.19 se muestra el circuito completo de la tarjeta de control principal la cual contiene los controles de inyección de corriente, control compensación de capacitancia, control del Cero, compensación de resistencia, conector para el cabezal y salida preamplificada por 10 para manejo del potencial de membrana y alimentación para la etapa de amplificación.

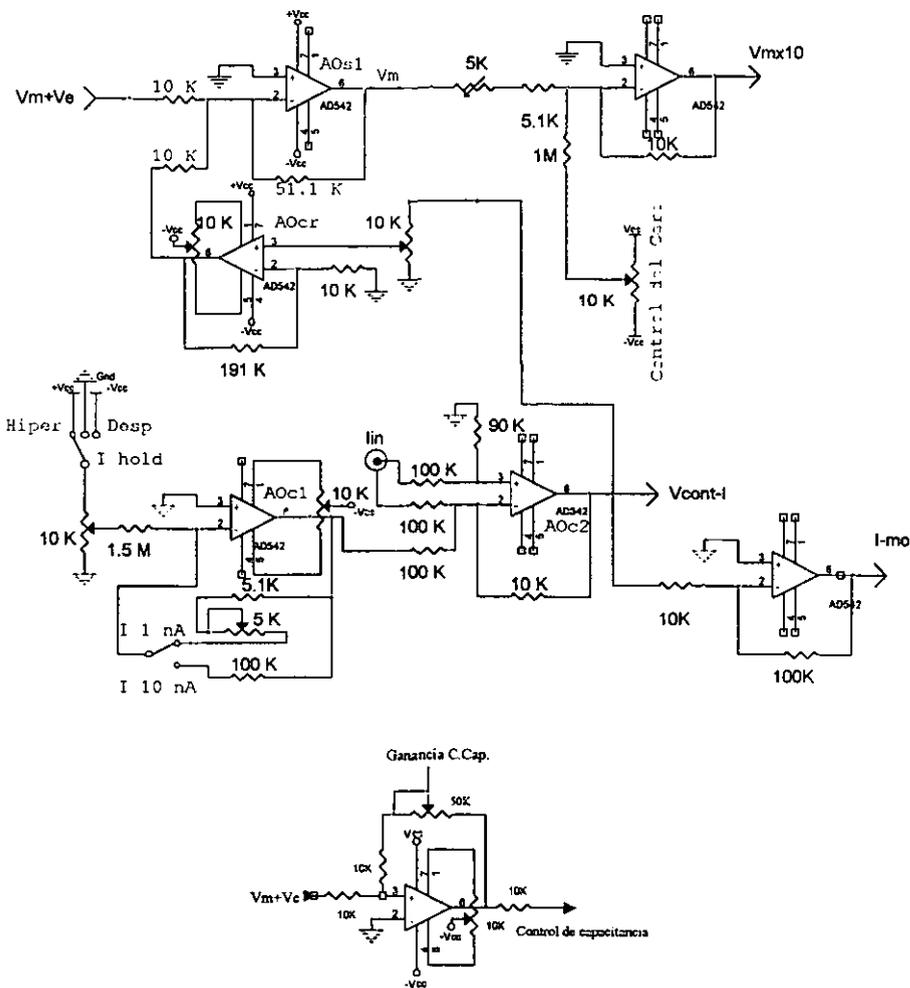


Figura 2.19 Diagrama general del preamplificador.

El circuito de la tarjeta de amplificación fué mostrada en la figura 2.19. Esta tarjeta recibe la señal preamplificada por 10 de la tarjeta de control principal para ser amplificada según se seleccione un selector rotacional de tres posiciones también esta tarjeta tiene un corrimiento de 0 a 1.5 V para manejar el potencial de membrana.

CAPITULO 3

PRUEBAS Y RESULTADOS

Para saber si el amplificador diseñado cumplió con las especificaciones, se tuvieron que realizar una serie de pruebas que comprobaran su funcionamiento.

3.1 Pruebas de control del Cero

El control de cero fue diseñado para tener intervalo de ± 150 mV, para probar esto tuvimos que conectar el amplificador y aterrizar el chasis a tierra física para disminuir el ruido externo así como el de 60 Hz. Después con el amplificador encendido, se puso a tierra la entrada del cabezal con la finalidad de observar el rango de control del cero y la medición del ruido del amplificador.

La figura 3.1 muestra el rango de control del corrimiento el cual varía de +150mV hasta -150 mV.

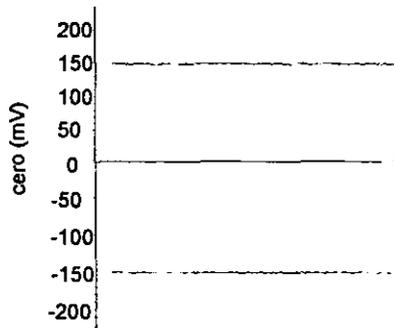


Figura 3.1 Rango de control de corrimiento medido directamente de la salida del amplificador de registro intracelular.

Para poder medir el ruido una vez aterrizada la entrada del cabezal, se fijó la referencia en cero, midiéndose el ruido a varias escalas de amplificación, observando que en una amplificación de 10 tenemos un ruido de 1mV pico a pico, en la amplificación de 100, el ruido disminuyó a 0.5 mV y finalmente a una amplificación de 1000 disminuyó a 0.3 mV.

3.2 Pruebas para medir la inyección de corriente

Uno de los requerimientos de este proyecto fue el de tener la capacidad de inyección de corriente de ± 1 nA y ± 10 nA, para probar su funcionamiento se conectó a la entrada del cabezal una resistencia de $10\text{ M}\Omega$, se seleccionó el selector para inyectar 1 nA y se puso el control de inyección al máximo (1 nA), así

mismo la salida del amplificador lo conectamos en un osciloscopio y a un convertidor analógico digital para poder medir la salida del amplificador de registro intracelular, así mismo, para poder interpretar la señal de salida del amplificador de registro intracelular aplicamos la ley de Ohm; sabiendo que por cada nA de corriente inyectado a través de la resistencia de $10M\Omega$, debe provocarse una caída de voltaje de 10 mV, si seleccionamos una ganancia por un factor de 10 en la salida del amplificador, tenemos que observar en el osciloscopio una señal de 100 mV, pero si seleccionamos la escala de amplificación de salida del amplificador de registro intracelular a 100, en el osciloscopio se deberá observar una señal de 1V de amplitud que representara también 1 nA de corriente.

Por medio de una tarjeta de adquisición de datos y la computadora, se programaron para obtener la lectura de la salida del amplificador de registro intracelular de una forma directa en el monitor, los resultados pueden verse en la gráfica de la izquierda de la figura 3.2.

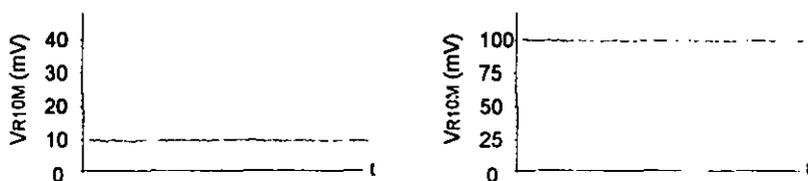


Figura 3.2 La gráfica de la izquierda muestra la caída de potencial de una R_{10M} al pasarle una corriente de 1 nA. La gráfica de la derecha muestra la caída de potencial en una resistencia de $10M$ al inyectarle una corriente de 10 nA.

Después de esto, se procedió a probar la inyección de corriente de 10 nA, con el mismo procedimiento de 1nA citado anteriormente. En la gráfica de derecha de la figura (3.2), se muestra la caída de potencial de 100 mV de una resistencia de $10M\Omega$ correspondiente a una inyección de 10 nA .

3.3 Pruebas de compensación de capacitancia

Para probar la compensación de capacitancia utilizamos el siguiente modelo RC (figura 3.3).

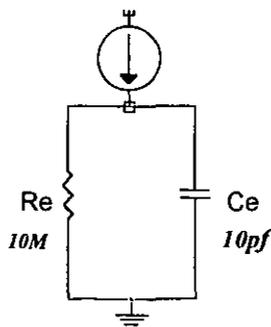


Figura 3.3 Muestra el modelo eléctrico de un microelectro de una resistencia de $10M\Omega$ y una capacitancia de 10pF.

Se inyectaron pulsos de corriente utilizando la entrada de estimulación externa a una frecuencia de 250 Hz para evitar la mayor atenuación de la señal (tomando en cuenta que la frecuencia de corte del circuito del modelo eléctrico es de 1591.5 Hz) con el objetivo de ver la carga y descarga del capacitor del circuito de la figura 3.3. y después se compenso la capacitancia para lograr ver cuadrada nuevamente los pulsos que corresponden a la caída de potencial de la resistencia, esto se ilustra en la siguiente figura 3.4

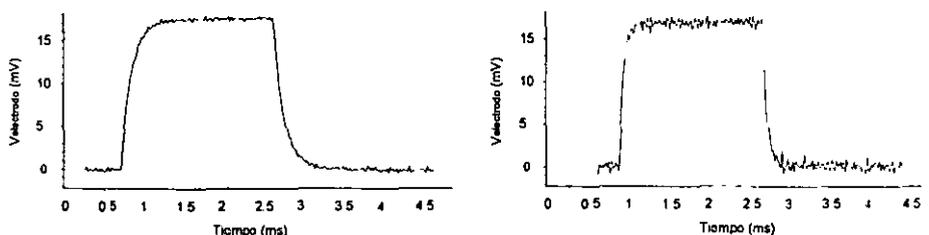


Figura 3.4 La gráfica de la izquierda nos muestra la carga y descarga del capacitor debido a la inyección de pulsos cuadrados de corriente. La gráfica de la derecha muestra la compensación de la capacitancia, para dejar aproximadamente sólo el efecto de caída de potencial en la resistencia.

Cabe aclarar que si se compensa de más la señal de registro tenderá a oscilar, esto lo podemos observar en la gráfica de la figura 3.5.

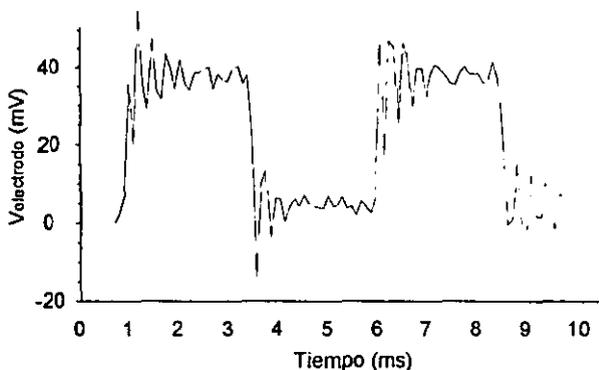


Figura 3.4 que muestra la sobrecompensación de capacitancia.

3.4 Pruebas de compensación de resistencia

Una vez compensada la capacitancia, también podemos comprobar la compensación de la resistencia. La señal cuadrada corresponde únicamente a la caída de potencial en la resistencia de 10 MΩ que simula la resistencia del microelectrodo. Por lo tanto para compensar necesitamos restar una señal cuadrada similar pero de signo contrario (esto lo hace el circuito para compensar resistencia). Los resultados se observan en la figura 3.6.

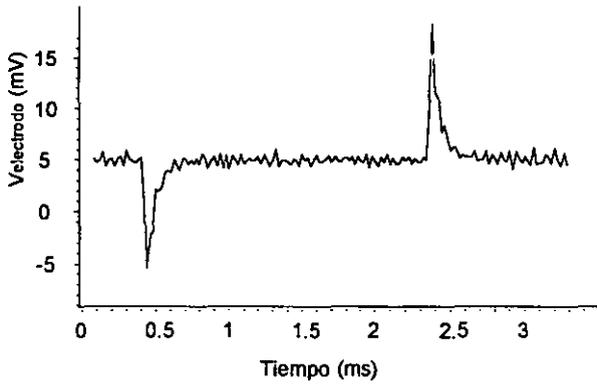


Figura 3.6 Gráfica que muestra la compensación de la resistencia del circuito de la figura 3.3

3.5 Pruebas del modelo general de la célula y microelectrodo

Finalmente, probamos con un modelo eléctrico general de la célula y el microelectrodo, el cual se muestra en la figura 3.7.

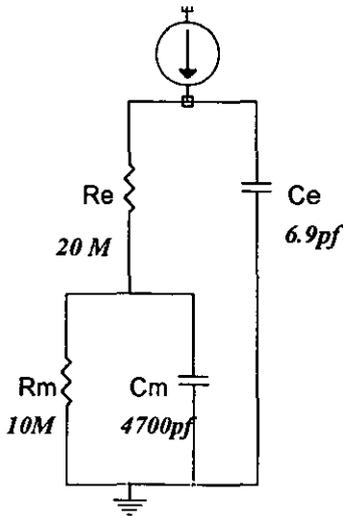


Figura 3.7 Diagrama que representa al modelo eléctrico de la membrana y el microelectrodo.

El modelo eléctrico mostrado en la figura 3.7 fue estimulado con pulsos cuadrados de corriente a baja frecuencia para obtener la señal mostrada en la gráfica de la izquierda de la figura 3.8.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Como lo que nos interesa registrar son cambios de voltaje a través de la membrana celular, compensamos la caída de potencial de la resistencia del microelectrodo y nos que da la señal mostrada a la derecha de la figura 3.8 que es la respuesta de $R_m C_m$.

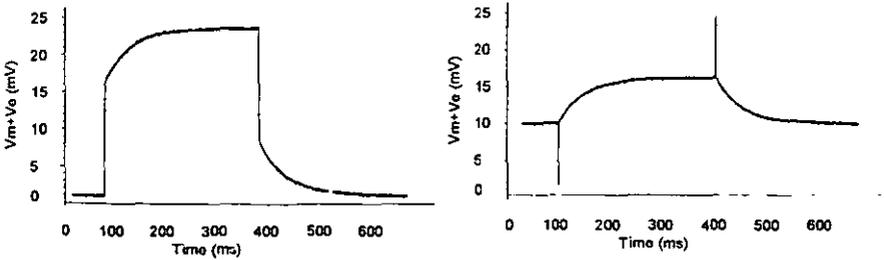


Figura 3.8 La gráfica de la izquierda nos muestra la caída de potencial en la membrana ($R_m C_m$) más la caída de potencial en la resistencia del electrodo. La gráfica de la derecha nos muestra la respuesta de $R_m C_m$.

3.6 Pruebas reales del amplificador en células vivas.

Una vez realizadas todas las pruebas del amplificador con los modelos eléctricos, se procedió a registrar las señales intracelulares en un ganglio del sistema nervioso de la sanguijuela. En la figura 3.9 se muestran los resultados obtenidos al inyectar pulsos subumbrales de 1.7 nA (inyección de corriente en el cual la célula no alcanza a disparar) divididos en tres gráficas. En la gráfica A se muestra el potencial de membrana más la caída de potencial en la resistencia del microelectrodo debido al pulso de 1.7 nA de corriente de estimulación con duración de 100 ms. En la gráfica B, se muestra la compensación de la resistencia del electrodo de la gráfica A, además podemos ver que tanto en el inicio como en el final del pulso de corriente después de la compensación hay unos picos que se presentan por falta de compensación de capacitancia. En la gráfica C, muestra el voltaje de membrana después de la compensación de la resistencia y la compensación de la capacitancia, así mismo podemos ver que al compensar capacitancia se incrementa un poco el ruido de la señal.

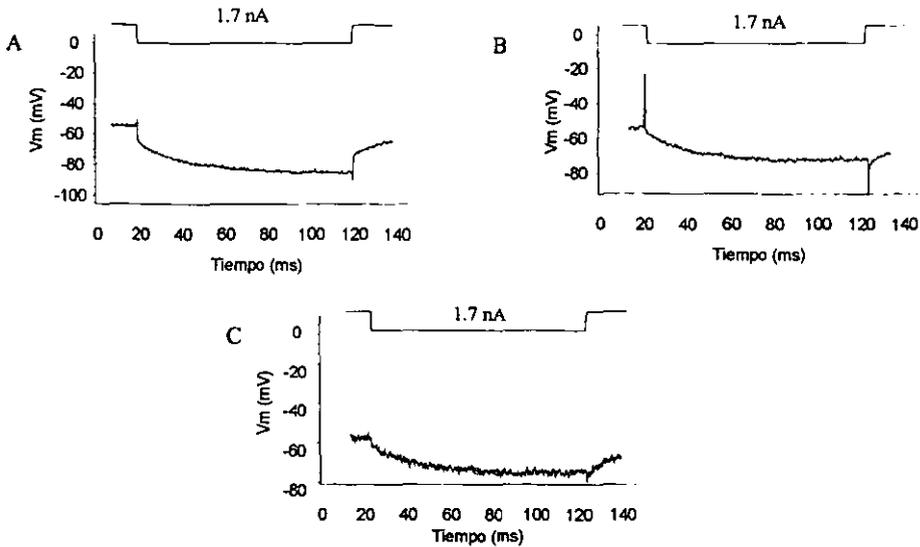


Figura 3.9 (A) el potencial de membrana más la caída de potencial de la resistencia del electrodo, (B) el potencial de membrana después de compensar la resistencia del microelectrodo y (C) el potencial de membrana una vez compensada la resistencia y compensación de capacitancia .

Una vez que se inyectaron pulsos de corrientes subumbrales para ver la respuesta pasiva de la célula, se procedió a incrementar la corriente de estimulación para lograr ver los potenciales de acción en respuesta a este estímulo, en este caso bastó con inyectar pulsos de corriente de 2 nA. En la figura 3.10 se muestran dos gráficas, en la gráfica A podemos ver los potenciales de acción debido a una inyección de corriente de 2 nA con una duración de 50 ms. En la gráfica B, observamos los potenciales de acción debido a un pulso de corriente de 2 nA con una duración de 20 ms.

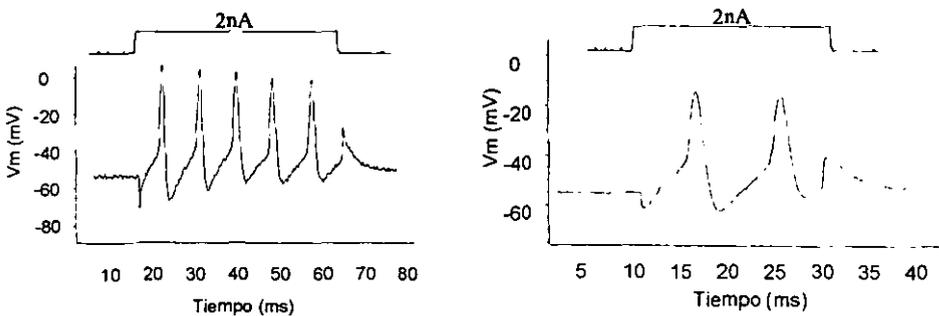


Figura 3.10 Potenciales de acción debido a la inyección de corriente de 2 nA (gráfica A), con una duración de 50 ms. En la gráfica B, observamos los potenciales de acción debido a un pulso de corriente de 2 nA con una duración de 20 ms.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados, podemos concluir que el amplificador diseñado para hacer registros intracelulares de potenciales sinápticos miniatura cumplió con las características esperadas.

Este amplificador consta de dos módulos físicos: el cabezal y la etapa de control. El cabezal quien es el encargado de sensar por primera vez las señales de la célula y de comunicarse con la etapa de control tiene como característica particular ser de dimensiones pequeñas para ser montado en un manipulador.

Por su parte, la etapa de control tiene la capacidad de inyectar corrientes de 0 a 1 ó de 0 a 10 nanoamperios seleccionados a través de un selector. Si se compara con los amplificadores utilizados en el laboratorio, quienes sólo tienen capacidad para inyectar un solo intervalo de corriente.

Así mismo, tiene una entrada diferencial para una estimulación externa de corriente.

Su compensación de resistencia es de hasta 200 M Ω , y su compensación de capacitancia tiene un rango de 0 a 10 pico faradios.

El control del "Cero" es de +/- 150 mV para manejar el desajuste generado por los potenciales de unión de presentan los microelectrodos.

Tiene una amplificación fija de 10x para una salida especial para monitorear el voltaje de reposo de la célula.

Tiene una amplificación variable de 10x, 100x y 1000x. Además cuenta con un corrimiento de voltaje para el control del potencial de membrana.

Sin embargo la relación señal ruido obtenida a una escala de amplificación de 1000 fue de -1.9 db por lo que no se pudo alcanzar el objetivo de 12 db que se esperaban, pues el ruido del amplificador se incrementa al utilizar los microelectrodos de alta resistencia inmersos en el medio de cultivo, sin embargo este prototipo de amplificador de registro intracelular se puede mejorar, atacando puntos específicos dentro del diseño, ya que uno de los problemas a los que se tuvo que enfrentar en el diseño fue el de limitar los intervalos de controles y conocer su aportación en el incremento del ruido, dándonos cuenta que la etapa más crítica en el diseño que genera mas ruido es la compensación de

capacitancia negativa, por lo que se buscará otra alternativa para realizar esta compensación de capacitancia o mejorar la misma.

En general el amplificador funciona como se esperaba ya que de los resultados obtenidos y mostrados en el capítulo anterior se pudo registrar potenciales de membrana sin ningún problema y además de realizar tinciones celulares en las cuales se pudo compensar completamente la resistencia del electrodo que con los otros amplificadores no se había podido realizar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Coughlin, R. y Driscoll, F. 1999. *Amplificadores operacionales y circuitos integrados lineales*. Hispanoamericana
2. E. Mortimer, C. 1983. *Química*. México. Iberoamericana
3. Fernández, F. 1998. *Biología funcional de los animales*. México
4. Luces, F. 1992. *Introducción a los amplificadores operacionales*. México. Limusa
5. *The axon guide. For electrophysiology & Biophysics laboratory techniques*, June 1993. USA
6. Resnick, H. 1994. *Física 2*. Cecsa
7. Wolf, S y Smith, R. 1992. *Guía para mediciones electrónicas y prácticas de laboratorio*. Prentice-hall. Hispanoamericana