

## Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica

Volumen 26  
Volume

Número 2  
Number

Septiembre 2005  
September

*Artículo:*

Desarrollo de un software de estimulación y adquisición de señales eléctricas celulares, basado en una tarjeta comercial de adquisición de datos

Derechos reservados, Copyright © 2005:  
Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica, AC

Otras secciones de  
este sitio:

- 📖 Índice de este número
- 📖 Más revistas
- 📖 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 📖 *Contents of this number*
- 📖 *More journals*
- 📖 *Search*



# Desarrollo de un software de estimulación y adquisición de señales eléctricas celulares, basado en una tarjeta comercial de adquisición de datos

Velasco N.D.,\* Ávila-Pozos R.,\*\* Godínez F.R.\*\*\*

\* Licenciatura en Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.

\*\* Centro de Investigación en Matemáticas, ICBI, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

\*\*\* Laboratorio de Biofísica, DCBI, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.

Correspondencia:

Velasco N.D.

Av. San Rafael Atlixco Núm. 186, Col. Vicentina, Deleg. Iztapalapa, 09340 México, D.F. Tel: 58-04-64-37.

E-mail: gfjr@xanum.uam.mx

Artículo recibido: 9/noviembre/2005

Artículo aceptado: 15/diciembre/2005

## RESUMEN

El estudio de las propiedades eléctricas de las células excitables y algunas no excitables, ha sido indispensable para conocer los mecanismos por los cuales la actividad eléctrica induce y regula la función celular. Las técnicas de fijación de corriente y de voltaje son herramientas imprescindibles para el estudio del comportamiento eléctrico de las células. En ambas técnicas, es indispensable la aplicación de protocolos de estimulación estándares, y simultáneamente, registrar las respuestas eléctricas inducidas en las células. Comúnmente se emplean convertidores D/A y A/D para la generación de las señales de estimulación y la adquisición sincrónica de la respuesta eléctrica celular respectivamente. Comercialmente existen hardware y software para estos propósitos, el cual es comúnmente empleado por biofísicos y electrofisiólogos. Además del elevado costo del software comercial, las compañías no proveen al investigador los programas fuente, con lo cual se ve limitado en la generación de protocolos de estimulación. En este trabajo, presentamos el desarrollo de un software de estimulación y adquisición de señales eléctricas celulares (SEASEC) que permite generar protocolos de estimulación y adquisición comúnmente empleados en electrofisiología a nivel celular y además, permite implementar una diversidad de señales de estimulación de interés y que no es posible realizar con los paquetes comerciales. El software está diseñado para emplearse en amplificadores de fijación de voltaje y de corriente de cualquier marca, generando y adquiriendo las señales con unidades y escalas apropiadas. La generación de los diferentes protocolos se realiza de manera fácil y rápida en ambiente windows. La tarjeta de conversión que fue seleccionada permite la adquisición de las señales electrofisiológicas más rápidas por amplio ancho de banda. Los datos se almacenan en formato compatible con los programas de análisis comúnmente empleados en electrofisiología.

## Palabras clave:

Fijación de voltaje, fijación de corriente, conversión A/D y D/A, software de adquisición y estimulación.

## ABSTRACT

The study of the electric properties of the excitable cells and some not excitable, has been indispensable to know the mechanisms

by which the electric activity induces and to regulate the cell function. Voltage and Current Clamp techniques are indispensable tools for the study of the electric behavior of the cells. In both techniques, is indispensable the standard stimulation protocols application, and simultaneously, to record the electric activity induced in the cells. Commonly Digital to Analog and Analog to Digital Converters for the generation of the stimulation signals and the synchronous acquisition of the cellular electrical answer are used respectively. There are hardware and software for these purposes, which commonly are used by biophysicists and electrophysiologists. In addition to the high cost of the commercial software, the companies do not provide to the investigator the source programs, with which it is limited in the generation of stimulation protocols. In this work, we presented the development of an acquisition and stimulation software that allows generating protocols of stimulation and acquisition commonly used in electrophysiology at cellular level and in addition, allows to implement a diversity of stimulation signals of interest and that is not possible to make with the commercial packages. This software is designed to be used with Voltage and Current clamp amplifiers of any mark, generating and acquiring the appropriate signals with units and scales. The generation of the different protocols is made of way fast and easy in ambient Windows. The conversion card that was selected allows the acquisition of the faster electrophysiology signals due its bandwidth. The data are stored in compatible format with the programs of analyses commonly used in electrophysiology.

**Key words:**

Voltage clamp, current clamp, DAC, ADC, acquisition and stimulation software.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las propiedades eléctricas de las células excitables ha sido vital para la comprensión de los mecanismos íntimos por los cuales las células inician y regulan la función celular comandada por la actividad eléctrica<sup>1</sup>. Ejemplos típicos de células excitables son las musculares, glandulares y nerviosas, en las cuales la actividad eléctrica induce la contracción, la liberación de hormonas y el procesamiento de información, respectivamente. El estudio de las propiedades eléctricas de las células se ha extendido a las células no excitables, en las cuales, a pesar de no presentar patrones eléctricos característicos de las células excitables (potenciales de acción), los cambios en su potencial de membrana juegan un papel relevante en la función celular<sup>1,2</sup>. Un ejemplo típico son las células del sistema inmune en donde la activación de los linfocitos T inducida por antígeno es inhibida cuando se afectan los cambios lentos de su potencial de membrana<sup>3</sup>.

El estudio detallado de las propiedades eléctricas de las células se ha desarrollado con el em-

pleo de dos técnicas fundamentales: La técnica de fijación de corriente y la técnica de fijación de voltaje<sup>4,5</sup>. Con la técnica de fijación de corriente se aplican pulsos rectangulares de corriente y se observan los cambios asociados en el potencial de la membrana de las células. Con la técnica de fijación de voltaje, se aplican pulsos rectangulares o rampas de voltaje y se observan las corrientes de membrana inducidas. En ambas técnicas, es indispensable la aplicación de pulsos rectangulares de diferente polaridad, duración y amplitud. En los protocolos de estimulación normalmente se introducen datos como el número de pulsos, la magnitud y polaridad del primer pulso, el incremento en amplitud de los pulsos subsiguientes y el intervalo de tiempo entre ellos. Las  $n$  respuestas eléctricas inducidas en la célula por los  $n$  pulsos se almacenan en un archivo para su posterior análisis<sup>2,4</sup>.

La Figura 1 ilustra los protocolos de estimulación más empleados con la técnica de fijación de voltaje.

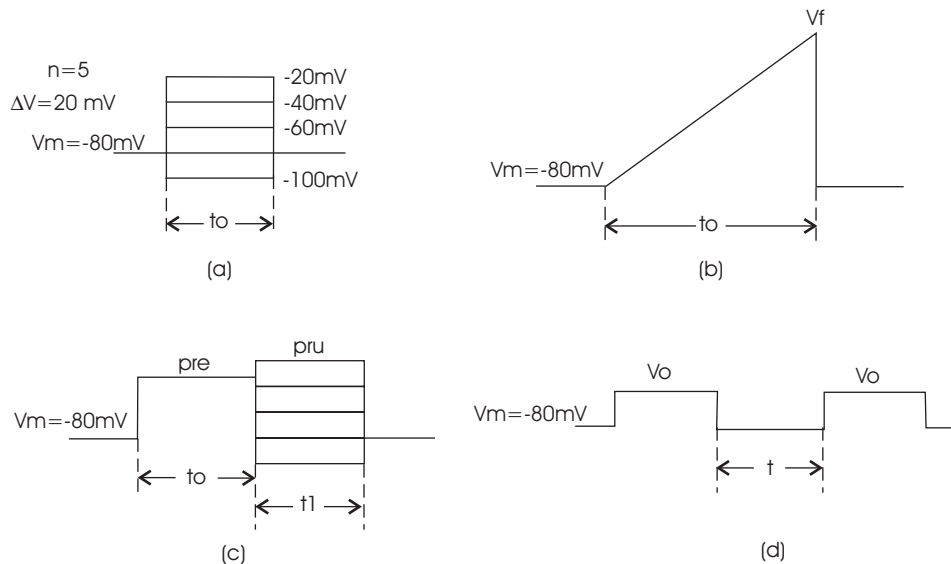
En la Figura 1a los pulsos tienen la misma duración, pero diferente amplitud, e inducen la apertura

ra de los canales iónicos voltaje dependientes. Con estos datos, se construyen curvas corriente-voltaje y se puede analizar la cinética de las corrientes iónicas<sup>1,2,4</sup>. Cuando se desea estudiar los canales iónicos voltaje dependientes en estado estable, frecuentemente se aplican rampas de fijación del voltaje como se muestra en la Figura 1b. Para la obtención de los potenciales de inversión de las corrientes iónicas se emplean protocolos como el mostrado en la Figura 1c. La obtención del potencial de inversión nos permite conocer la especie iónica a la cual es permeable el canal iónico voltaje dependiente; además, el análisis del curso temporal de la corriente de cola nos da información de la cinética de cierre de los canales iónicos<sup>1,2,4</sup>; en la Figura 1c, el prepulso induce una corriente iónica de valor constante; al final del prepulso se genera una corriente de cola cuya magnitud varía por la aplicación del segundo pulso o pulso de prueba. Para el estudio del tiempo de recuperación de la inactivación de los canales iónicos se utilizan protocolos como el presentado en la Figura 1d: se aplican dos pulsos de la misma duración y amplitud, de los cuales el primero induce la corriente iónica, y si el tiempo  $t$  entre los pulsos es pequeño, el segundo pulso produce una corriente de menor mag-

nitud, por lo cual  $t$  se incrementa hasta obtener dos corrientes iónicas de la misma amplitud inducidas por los dos pulsos. En la Figura 2 se muestran las corrientes iónicas inducidas por la aplicación de un protocolo de estimulación<sup>1,2,6</sup> como el ilustrado en la Figura 1a.

En el caso de la técnica de fijación de corriente, el protocolo de pulso de estimulación es similar al ilustrado en la Figura 1a. En este caso, los pulsos rectangulares no son de voltaje sino de corriente. La aplicación de pulsos rectangulares de corriente a las células excitables cambia su potencial de membrana  $V_m$ . Normalmente se aplican pulsos de corriente tanto negativos como positivos. Los pulsos rectangulares negativos y positivos subumbrales son indispensables para el estudio de las propiedades eléctricas pasivas de las células, y los pulsos de corriente positivos supraumbrales son necesarios para inducir potenciales de acción en las células excitables<sup>1,2,4</sup>. En la Figura 3 se muestra un ejemplo del protocolo de pulsos y del cambio en el potencial de membrana que inducen

Los amplificadores de fijación de voltaje y de fijación de corriente están diseñados de tal manera que los pulsos de estimulación que soportan son siempre de voltaje<sup>4</sup>. En el caso de la técnica de



**Figura 1.** Protocolos típicos empleados en la técnica de fijación de voltaje. **(a)** A partir de un potencial de  $-80$  mV se aplican 5 pulsos de voltaje de la misma duración ( $t_0$ ) con incrementos de  $20$  mV. **(b)** A partir de un potencial de membrana de  $-80$  mV se aplica una rampa de fijación de voltaje hasta alcanzar el potencial  $V_f$  en un tiempo  $t_0$  y posteriormente retornar al potencial inicial. **(c)** A partir de un potencial de membrana de  $-80$  mV se aplica un prepulso (pre) de amplitud y duración ( $t_0$ ) constante, seguido de un pulso de prueba (pru) de duración constante ( $t_1$ ) pero de amplitud variable. **(d)** A partir de un potencial de membrana de  $-80$  mV se aplican dos pulsos de amplitud constante  $V_0$  de la misma duración; el intervalo de tiempo  $t$  entre los pulsos es variable. Estos protocolos se emplean comúnmente en la técnica de fijación de voltaje para inducir corrientes de membrana por la apertura de canales iónicos dependientes del voltaje en células excitables.

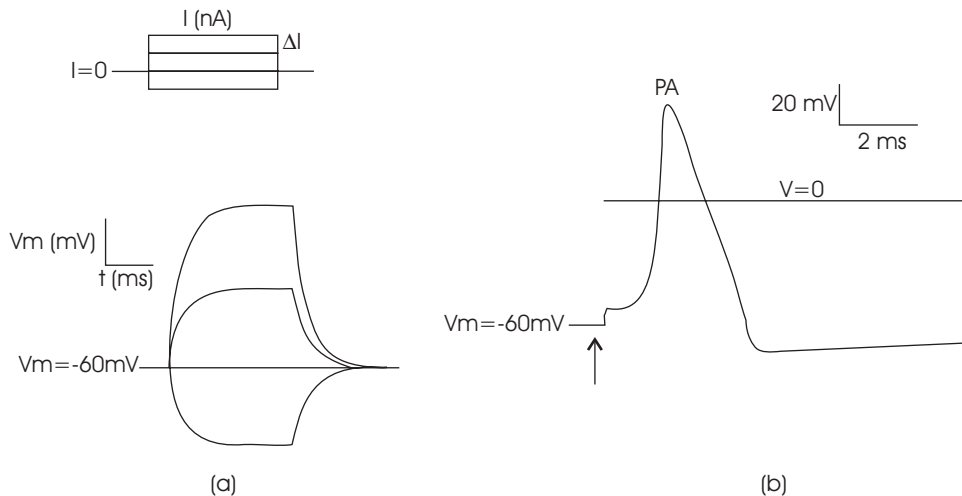
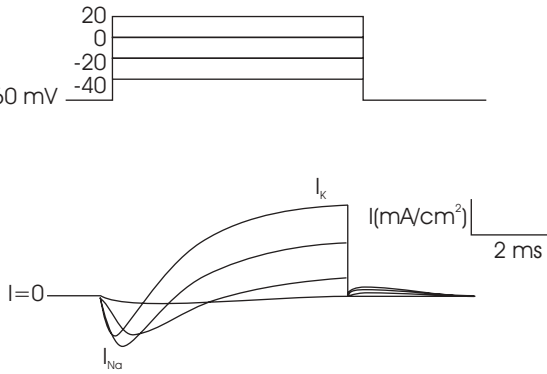
fijación de voltaje, los pulsos rectangulares de voltaje generados por un estimulador y que se aplican a la entrada del amplificador, son multiplicados por algún factor, para que los pulsos de fijación de voltaje sean adecuados para las células; por otro lado, la corriente iónica inducida es multiplicada por una

factor y convertida a voltaje a la salida del amplificador, para obtener una señal de salida con una relación corriente de membrana/voltaje de salida. En la técnica de fijación de corriente, el pulso rectangular de voltaje a la entrada del amplificador es transformado a corriente con una relación corriente de estimulación/voltaje de entrada y el cambio en el potencial de membrana por la corriente inyectada es multiplicado por un factor a la salida del amplificador<sup>2,4,6</sup>. En la Figura 4 se ilustran las entradas y salidas de los amplificadores de fijación de voltaje y de corriente.

Los amplificadores de fijación de corriente y de fijación de voltaje comerciales presentan diferentes relaciones para la señal de entrada ( $I_m/V$  y  $\Delta V_e/V$ , respectivamente) así como diferentes relaciones para la señal de voltaje de salida ( $V_m/V$  e  $I_m/V$ , respectivamente).

Los diferentes protocolos de estimulación para ambas técnicas, se realizan empleando un convertidor D/A y las respuestas eléctricas de las células son adquiridas y almacenadas a través de un convertidor A/D. Es crítico en este trabajo experimental contar con un sistema de estimulación y de adquisición de señales apropiado. Un sistema de este tipo, como se muestra en la Figura 5, consta de una tarjeta de conversión A/D y D/A así como de un software de control de la tarjeta<sup>4,7</sup>.

**Figura 2.** Pulsos de fijación del voltaje inducen corrientes iónicas. En la figura superior los 4 pulsos rectangulares de fijación del voltaje aplicados a partir de un potencial de membrana de -60 mV, cambian el potencial a valores menos negativos, despolarizando la célula e induciendo la apertura de los canales voltaje dependientes, con lo cual se generan corrientes iónicas negativas de sodio ( $I_{Na}$ ) y positivas de potasio ( $I_K$ ). Cada pulso de fijación de voltaje induce un trazo de corriente iónica.



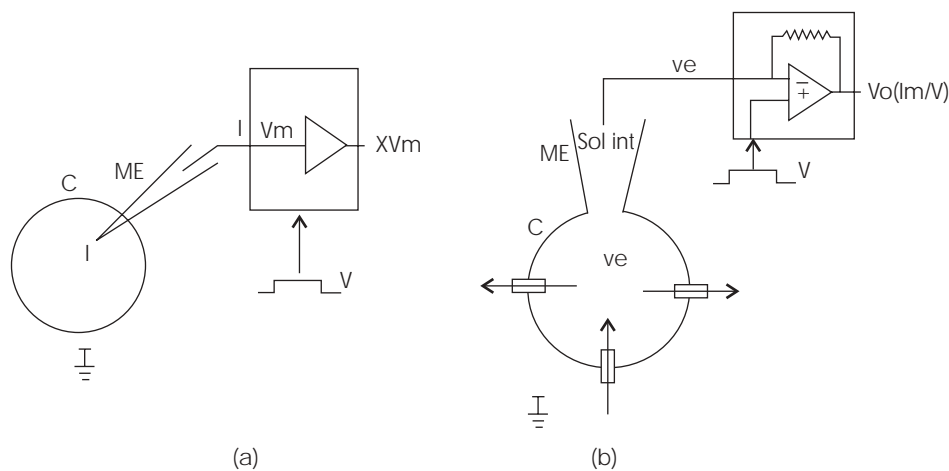
**Figura 3.** Pulsos de corriente empleados en la técnica de fijación de corriente. En (a) se aplican 4 pulsos de fijación de corriente: el primero es negativo y posteriormente incrementan en un valor  $\Delta I$  constante. La magnitud de la corriente aplicada en la mayoría de las células es pequeña, en el rango de los nA; la corriente induce un cambio en el potencial de membrana el cual es inicialmente de -60 mV. Los pulsos de corriente cambian el potencial hiperpolarizando (haciéndolo más negativo) o despolarizando (haciéndolo menos negativo), con un curso temporal exponencial; la despolarización no es lo suficientemente grande para desencadenar potenciales de acción. En (b) se induce un potencial de acción (PA) por la aplicación de un pulso rectangular de corriente (al tiempo indicado por la flecha) de magnitud breve pero lo suficientemente grande (supraumbral) para despolarizar la célula al voltaje umbral en el que se originan los potenciales de acción.

La tarjeta de conversión debe tener suficiente ancho de banda para adquirir señales de gran rapidez, como los potenciales de acción de las interneuronas; o bien, corrientes iónicas de gran rapidez o transitorios capacitivos no lineales rápidos. El control de la tarjeta de conversión D/A y A/D no puede realizarse con software de propósito general, por lo cual es necesario adquirir paquetes de cómputo especializados para este tipo de trabajo experimental.

Existen diversos paquetes de cómputo en el mercado internacional. Las compañías internacionales ofrecen paquetes especializados en electrofisiología a nivel celular que incluyen la tarjeta de conversión, y en la mayoría de los casos, son suficientes para la caracterización de las propiedades eléctricas de diferentes tipos celulares. Sin embargo, estos sistemas presentan algunos inconvenientes como son su elevado costo, poca amabilidad con el usuario y la ausencia de los programas fuente que impiden al usuario realizar cambios en los protocolos de estimulación o la adquisición, de acuerdo a la exigencia experimental. La generación de las señales y protocolos de estimulación están limitados a los que suministran las compañías. Esta limitación, en algunos casos, obliga a los usuarios a no emplear los protocolos más idóneos para

su tema de investigación en un tipo celular dado o más grave aún, a abandonar dicho proyecto.

En este trabajo presentamos un paquete de cómputo para la generación de señales de estimulación y la adquisición simultánea de las repuestas eléctricas celulares (SEASEC) que puede ser empleado tanto en la técnica de fijación de corriente como en la de fijación de voltaje. Emplea una tarjeta de conversión de gran ancho de banda con respecto a las señales electrofisiológicas de mayor frecuencia. Permite generar los protocolos de estimulación comúnmente empleados y almacenar los datos de las respuestas eléctricas celulares en un formato compatible con el software comercial más utilizado para el análisis de este tipo de señales; asimismo, cuenta con la opción para almacenar los datos en código ASCII, lo que facilita la compatibilidad con programas de análisis de propósitos generales. El programa corre en ambiente windows y proporciona un ambiente amigable para la generación de protocolos de estimulación y adquisición. Cuenta con parámetros de entrada de acuerdo a las características de los diferentes amplificadores para la generación y el despliegue de las señales en unidades apropiadas. El paquete de cómputo que se presenta, queda libre previa solicitud a la UAM Iztapalapa y a los coautores. El paquete inclu-



**Figura 4.** Amplificadores de fijación de corriente y de fijación del voltaje. Los amplificadores se conectan eléctricamente a las células (C) a través de un microelectrodo (ME). Al amplificador de fijación de corriente (a) se le aplica un pulso rectangular de voltaje  $\Delta V$ , el amplificador convierte este pulso en un pulso de corriente  $\Delta I$  el cual se inyecta a la célula; el cambio en el potencial de membrana ( $V_m$ ) inducido por la corriente  $\Delta I$  se mide a través del mismo microelectrodo; el voltaje  $V_m$  de la célula es multiplicado a la salida del amplificador ( $XV_m$ ). En (b) se ilustra el amplificador de Fijación del voltaje, se aplica el pulso rectangular de voltaje  $\Delta V$  a la entrada del amplificador el cual es multiplicado por un factor para aplicar el pulso de fijación de voltaje  $\Delta V_e$ , el cambio en el potencial de membrana de la célula produce la apertura de los canales iónicos generando corrientes iónicas ilustradas por las flechas, las corrientes pueden ser entrantes o salientes; el amplificador es un convertidor corriente a voltaje por lo cual la señal de corriente  $I_m$  se observa como una señal de voltaje a salida ( $V_o$ ) del amplificador con una relación lineal de  $V/I_m$  sol int indica la solución electrolítica que da continuidad eléctrica entre el amplificador y la célula.

ye los programas fuente para que el usuario pueda realizar los cambios pertinentes de acuerdo a sus exigencias experimentales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

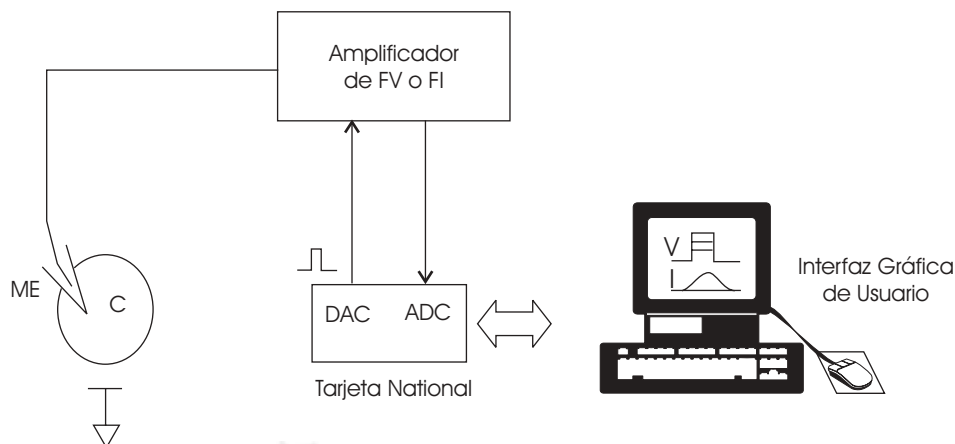
Se empleó una computadora personal con un procesador Pentium III y una tarjeta de conversión digital *National Instruments* PCI-MIO-16E-1 con un cable conector SH6850. Para el diseño del SEASEC se empleó el software *Labwindows / CVI* versión 5.0<sup>8-11</sup> y el software de adquisición de datos NIDAQ versión 6.1<sup>1-3</sup>. Para la adquisición de datos se empleó un buffer sencillo para una frecuencia de muestreo de hasta 512,000 muestras/seg. Se programaron los convertidores de la tarjeta *National* de la siguiente manera: el convertidor D/A en modo bipolar y rango  $\pm 10$  V y el convertidor A/D en modo bipolar con rango definido por el usuario de  $\pm 5$  V o  $\pm 1$  0V<sup>8-11</sup>.

Se evaluó el SEASEC con las dos técnicas más empleadas en electrofisiología celular. Se utilizaron los amplificadores Axopatch 200A (Axon Instruments) y Dagan 8100. El amplificador Axopatch se utilizó para evaluar el desempeño del SEASEC con las técnicas de fijación de voltaje y de fijación de corriente empleando un modelo eléctrico de membrana celular. El amplificador "Dagan" se utilizó para evaluar el SEASEC con la técnica de registro intracelular para lo cual se registró la actividad eléctrica de neuronas.

Se programaron los convertidores<sup>12</sup> digital analógico D/A y analógico digital A/D de la tarjeta de conversión PCI-MIO-16E-1 de *National Instruments* para que su inicio de operación fuera por hardware, es decir, al recibir un pulso de disparo externo generado por el programa, por lo que de esta manera la estimulación-adquisición se realiza de manera síncrona.

Se inició construyendo la interfaz gráfica de usuario con controles numéricos de entrada, botones y gráficas de visualización de señales, como se puede observar en la Figura 6 (las imágenes en color se transformaron a escala de grises con fines de impresión).

Inicialmente se configura el software de acuerdo a las características del amplificador empleado. Una vez introducidos los parámetros del tipo de amplificador, el software realiza los ajustes y cálculos necesarios para la visualización correcta de la información, además de que se modifican todas las etiquetas correspondientes con las unidades correctas de voltaje o corriente. Si el amplificador es de fijación de voltaje, entonces en la sección "parámetros del amplificador", se introduce la relación mV/V del convertidor D/A (Relación DAC, Figura 6). Este dato frecuentemente se indica en el amplificador en el sitio de entrada de la señal de estimulación. Una vez introducido este dato, el convertidor D/A generará una señal de voltaje V, la cual es multiplicada por un factor, vía



**Figura 5.** Relación que guardan los diferentes elementos empleados en las técnicas de registro electrofisiológico a nivel celular. A través de un microelectrodo (ME) se tiene acceso eléctrico al interior celular y a través de un amplificador de fijación de voltaje (FV) o de fijación de corriente (FI) se aplican pulsos de estimulación utilizando un convertidor D/A (DAC). Las respuestas eléctricas de las células se obtienen como señales de voltaje, las cuales son adquiridas a través de un convertidor A/D (ADC). Las señales de estimulación como de respuesta celular son desplegadas en un monitor de una computadora personal. El software de control de la tarjeta de conversión es crítico para la generación de las señales de estimulación y la obtención de las respuestas eléctricas de las células.

el amplificador, para fijar el voltaje de la célula en el rango de los mV. Por otro lado, si el amplificador es de fijación de corriente, la relación que es seleccionada es I/V, en donde I tiene unidades de nA. Posteriormente, se introduce el valor de la relación, la cual también se indica en el panel del amplificador. Cuando se aplica un voltaje V a la entrada del amplificador de fijación de corriente, éste la convierte a corriente de manera lineal y será la que se inyectará a la célula. Cuando el usuario introduce los parámetros del convertidor D/A, automáticamente cambian las unidades del gráfico superior de la pantalla donde se despliegan las señales de estimulación con las unidades y magnitudes apropiadas. La introducción del valor y unidades de la relación del convertidor D/A se realiza únicamente cuando se corre por primera vez el programa, ya que posteriormente este parámetro es modificado sólo si se cambia el amplificador. Un procedimiento similar se realiza para el caso del convertidor A/D: si el amplificador es de

fijación de voltaje, se seleccionan las unidades mV/pA y se introduce el valor indicado en el amplificador. En los amplificadores de fijación de voltaje, la salida es de voltaje y su magnitud es lineal con la corriente transmembranal que se genera, por lo cual, al voltaje de salida en mV le corresponde un valor de corriente en pA. Asimismo, se introduce el factor de proporcionalidad entre el voltaje de salida y la corriente transmembranal. Una vez introducido este parámetro, las señales de corriente transmembranal son desplegadas en el monitor (gráfica inferior, Figura 6) con las unidades y magnitudes apropiadas. Para el caso del amplificador de fijación de corriente las unidades seleccionadas son V/mV que corresponden al voltaje de salida V del amplificador y el voltaje real de la célula en mV y posteriormente se introduce el factor de escalamiento. También en este caso, las unidades y factor de escalamiento para la conversión A/D (Relación ADC, Figura 6) se introducen sólo la primera vez que se corre el programa.

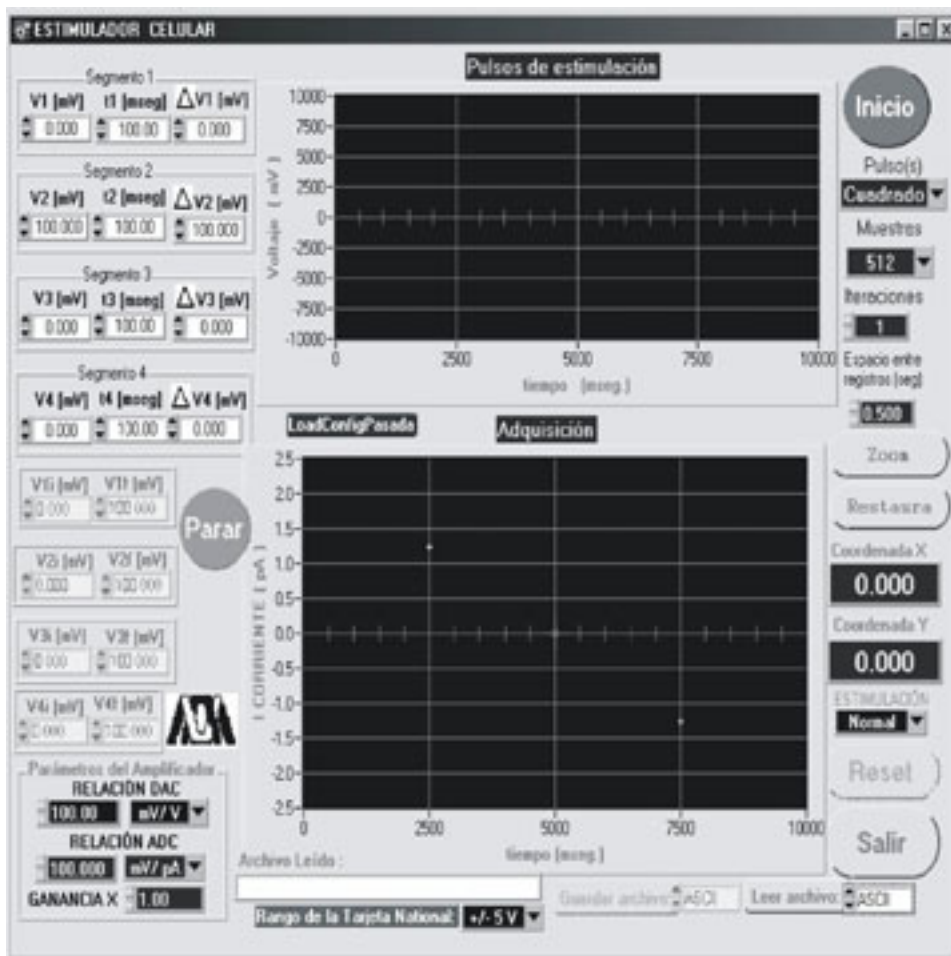


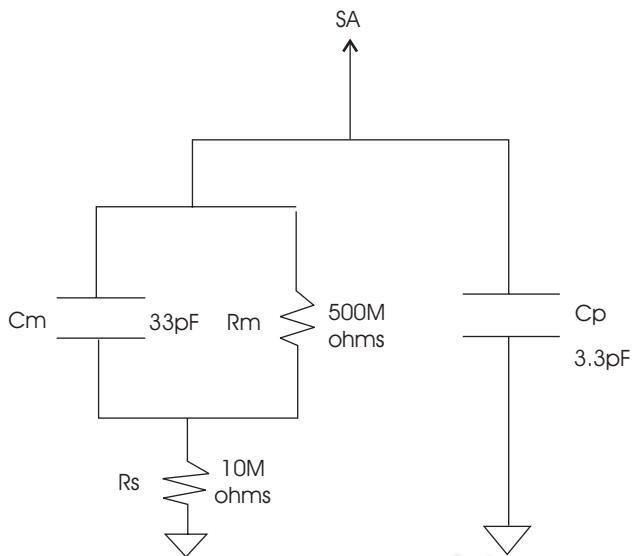
Figura 6. Imagen observada en el monitor al correr el programa de estimulación y adquisición sincrona. Con el auxilio de los botones correspondientes, se introducen los valores numéricos para la configuración de la tarjeta y la generación de los protocolos de estimulación y adquisición de las señales. Las gráficas permiten observar en tiempo real los pulsos de estimulación y las respuestas eléctricas evocadas.



Los amplificadores de fijación de voltaje y de corriente también cuentan con la posibilidad de amplificar la señal de salida por un factor seleccionado por el usuario. Para que las magnitudes de las señales desplegadas y adquiridas no se alteren, es indispensable introducir el factor de multiplicación de la señal (Ganacia X, Figura 6).

La tarjeta de conversión PCI-MIO-16E-1 de *National Instruments* puede operar en los rangos  $\pm 5$  V o  $\pm 10$  V. El usuario puede seleccionar por software el rango de operación de la tarjeta al que desea trabajar (Rango de la Tarjeta Nacional, Figura 6).

La introducción de todos los parámetros anteriores se realiza la primera vez que se corre el programa y no se modifican a menos que se emplee otro tipo de amplificador. Los siguientes parámetros que se introducen son variables y depende de los protocolos de estimulación y adquisición diseñados por el usuario. Primero se selecciona el tipo de señal (Pulso(s), Figura 6) que puede ser de tipo rectangular o rampa. Posteriormente, se selecciona el número de muestras (Muestras, Figura 6) cuyo valor puede ser de 512, 1,024, 2,048 ó 4,096; estos valores cubren con amplitud los utilizados normalmente. Es frecuente el empleo de más de un trazo de estimulación y adquisición de la señal, por lo cual el



**Figura 7.** Circuito eléctrico equivalente de la membrana celular utilizado para evaluar el sistema desarrollado. La resistencia y capacitancia de la membrana se indican por  $R_m$  y  $C_m$  respectivamente. La capacitancia del microelectrodo y resistencia en serie se indican por  $C_p$  y  $R_s$  respectivamente. La conexión eléctrica a la sonda del amplificador se indica por SA.

usuario cuenta con la opción de seleccionar el número de pulsos (Iteraciones, Figura 6). El tiempo entre cada pulso de estimulación o iteración puede afectar las propiedades eléctricas que se pretenden estudiar, por lo cual, el usuario puede introducir el valor del intervalo de tiempo entre ellos (Espacio entre registros, Figura 6) de acuerdo a sus condiciones experimentales.

Para generar los diferentes tipos de señales rectangulares de estimulación como las ilustradas en la Figura 1, el trazo de la señal de estimulación se dividió en cuatro segmentos, en cada uno de ellos es posible seleccionar la polaridad, la amplitud y la duración. Normalmente los protocolos de estimulación requieren de varios trazos de estimulación con incrementos en la amplitud de los pulsos rectangulares; por lo cual, cada segmento del trazo de estimulación cuenta con esta opción. Todos estos valores son introducidos por el usuario de acuerdo a las etiquetas que se muestran en la región superior izquierda del monitor (Figura 6). El usuario no tiene acceso a los parámetros indicados por las etiquetas inferiores en tono gris V1i, V1f, etc., ya que corresponden a los protocolos de generación de rampas; al seleccionar pulsos rectangulares, los parámetros de las rampas se inhabilitan.

Cuando en la etiqueta "Pulsos(s)" se selecciona "Triangular" la señal de estimulación consistirá de rampas. Las etiquetas V1i, V1f, V2i, aparecerán en negro, permitiendo el acceso para la introducción de valores, mientras que los botones de los parámetros de los pulsos rectangulares saldrán en tono gris y se inhabilita la introducción de valores. En este caso, también se dividió el trazo de estimulación en cuatro segmentos para que el usuario genere rampas con características diferentes como magnitud y pendiente.

Una vez que concluye la aplicación del protocolo de pulsos, todos los trazos de estimulación se despliegan en la ventana "Pulsos de estimulación" y las respuestas eléctricas de cada uno de los trazos de estimulación se despliegan en la ventana "Adquisición". A los trazos de estimulación y de respuesta eléctrica celular se les asignaron colores con el fin de identificar rápidamente la respuesta eléctrica evocada por un estímulo determinado.

Al final de la aplicación del protocolo de pulsos, el usuario cuenta con la opción de almacenar el conjunto de respuestas eléctricas adquiridas. El archivo de datos se almacena en código binario y en un formato compatible con el software de análisis más empleado en electrofisiología celular (Clam-

pfrit de Axon Instruments) y que se encuentra libre en la red. Además, este nuevo sistema cuenta con la opción de almacenar los datos en código ASCII para el empleo de software de análisis de propósitos generales.

Una vez almacenados los datos, es posible leer los archivos con el SEASEC tanto en código ASCII como binario, desplegándose en las ventanas los pulsos de estimulación y las respuestas eléctricas celulares, así como los valores numéricos utilizados en el diseño del protocolo de estimulación y adquisición. La ventana de respuestas eléctricas cuenta con un cursor (Cruz verde, Figura 6) que puede ubicarse a lo largo de la señal desplegando los valores de las coordenadas ("Coordenada X", "Coordenada Y", Figura 6) en unidades apropiadas. Asimismo, un botón "Zoom" en la interfaz sirve para ampliar y observar un área específica de interés de la gráfica de adquisición dependiendo de la colocación de unos cursores auxiliares blancos en cruz, mientras que el botón "Restaura", restablece la gráfica a su tamaño original.

El programa guarda automáticamente en un archivo de texto la última configuración utilizada por el usuario antes de salir del programa, y de esta manera el usuario puede cargarla en su próxima sesión de trabajo con un botón, para evitar introducir los valores que había utilizado.

El software puede funcionar en modo "Normal" o "Continuo" (Figura 6). En modo "Normal" se generan los protocolos de estimulación y adquisición ya descritos. En el modo "Continuo" se estimula-adquiere de manera continua hasta que el usuario detenga con un botón el proceso. En este modo, se refrescan las gráficas en cada iteración y no se guarda las adquisiciones. El modo "Continuo" es imprescindible para el usuario y consiste en la aplicación de un pulso de estimulación breve y de magnitud pequeña. Cuando se emplea la técnica de fijación de corriente sirve para medir la resistencia del microelectrodo, compensar las capacitancias parásitas, balancear el circuito puente y observar el cambio en el voltaje de salida por cambio en la resistencia de la pipeta cuando se ubica sobre la

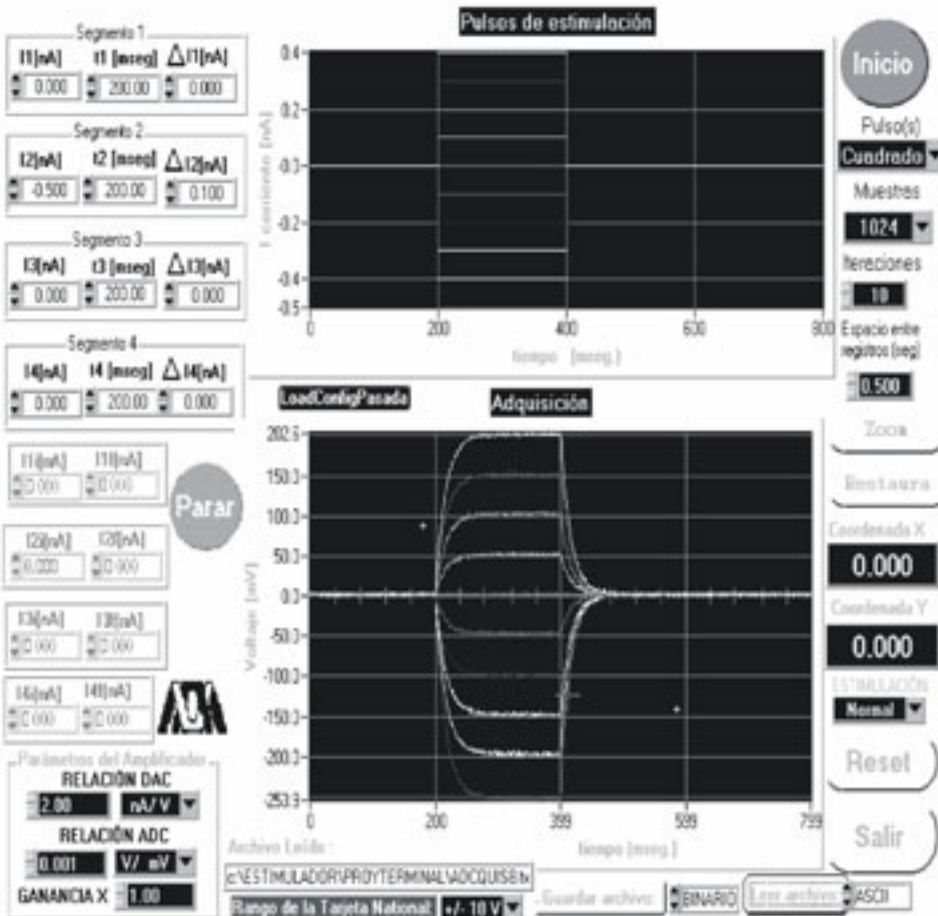


Figura 8. Imagen desplegada durante un experimento típico de fijación de corriente. Se aplicaron 10 pulsos de estimulación (10 Iteraciones). El segmento 2 tiene inicialmente -0.5 nA de magnitud y genera incrementos de 0.1 nA. La respuesta eléctrica se aprecia en la gráfica inferior, y muestra los cambios en el potencial con un curso temporal exponencial. Los datos fueron almacenados en ASCII, y posteriormente el archivo fue abierto para ilustrar su lectura con el SEASEC.

superficie de la membrana celular. En el caso de la técnica de fijación de voltaje, el modo "Continuo" permite medir la resistencia del microelectrodo, observar los cambios en la magnitud de la corriente cuando se forma el "gigasello", compensar la resistencia en serie y observar los transitorios capacitivos para su compensación<sup>4,6</sup>.

## RESULTADOS

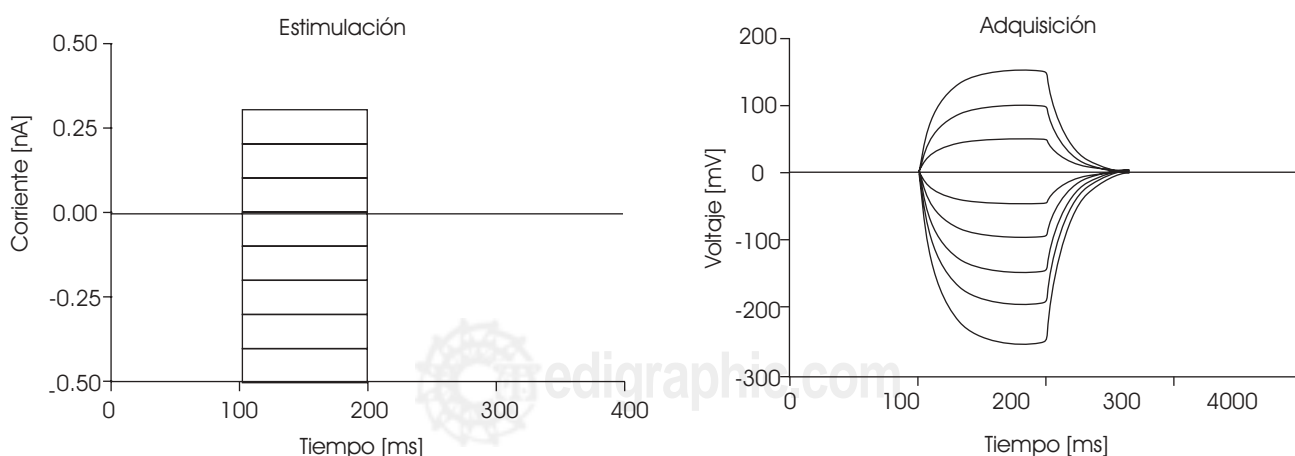
El SEASEC está diseñado para realizar estimulación y adquisición sincrónica; cuenta con una interfaz gráfica que hace interactuar al usuario de una manera fácil y rápida. En dos gráficas se visualizan la estimulación y adquisición de manera paralela correspondiente a cada iteración. La introducción de los parámetros del amplificador de registro (relación de escalamiento de las señales de entrada y de salida) permite el despliegue de los gráficos con los valores de las unidades de corriente y voltaje utilizados en las células. Se puede generar una gran variedad de protocolos de estimulación y adquisición de las señales. Cada pulso se divide en cuatro segmentos, de los cuales, el usuario define su duración, amplitud e incremento de amplitud.

En la Figura 7 se muestra el modelo eléctrico de la membrana celular, el cual reproduce las propiedades eléctricas pasivas de las membranas que además reproduce los artefactos eléctricos inherentes al empleo de microelectrodos.

Inicialmente se empleó el amplificador Axopatch en la configuración de fijación de corriente, por lo cual se introdujeron en la sección "Parámetros del amplificador" las características del equipo y

posteriormente se conectó el modelo eléctrico de membrana. La Figura 8 muestra un registro típico de estimulación con pulsos rectangulares de fijación de corriente (Estimulación) y los cambios en el potencial inducidos (Adquisición). En este caso, se ha seleccionado el segmento 2 para la generación de los pulsos de estimulación. En la gráfica inferior se puede apreciar la adquisición sincrónica de las respuestas a los estímulos, consistente en cambios en el potencial por la corriente aplicada. Durante un experimento de fijación de corriente, esta es la imagen que se despliega en el monitor. Una vez terminada la secuencia programada de generación de estímulo-adquisición de respuesta, el usuario puede almacenar los datos de las señales adquiridas para su lectura posterior. En la imagen de la Figura 8 se ilustra la lectura de un archivo de datos con el SEASEC donde se muestran los pulsos de estimulación, las respuestas eléctricas adquiridas y los valores numéricos que se emplearon en el diseño del protocolo de estimulación y adquisición. El SEASEC permite la lectura rápida de los archivos de datos de fijación de voltaje o de corriente. Al abrir el archivo de datos se muestran los trazos adquiridos y el software permite un análisis general de ellos, como medición de la magnitud y tiempo, empleando cursores con amplificación de segmentos de la señal.

Si el archivo de datos se almacena en código ASCII, éste puede ser abierto por software de propósito general para el análisis y graficación de las señales. En la Figura 9, se muestra un archivo generado y guardado por el SEASEC que posteriormente fue abierto con un software comercial de uso ge-



**Figura 9.** Registros en fijación de corriente. Se aplicaron 9 pulsos rectangulares de corriente con una amplitud inicial de -0.5 nA e incrementos de 0.1 nA, con una duración de 100 milisegundos.

neral. La base de datos del archivo conserva los valores y unidades reales de los pulsos de estimulación y de las señales adquiridas.

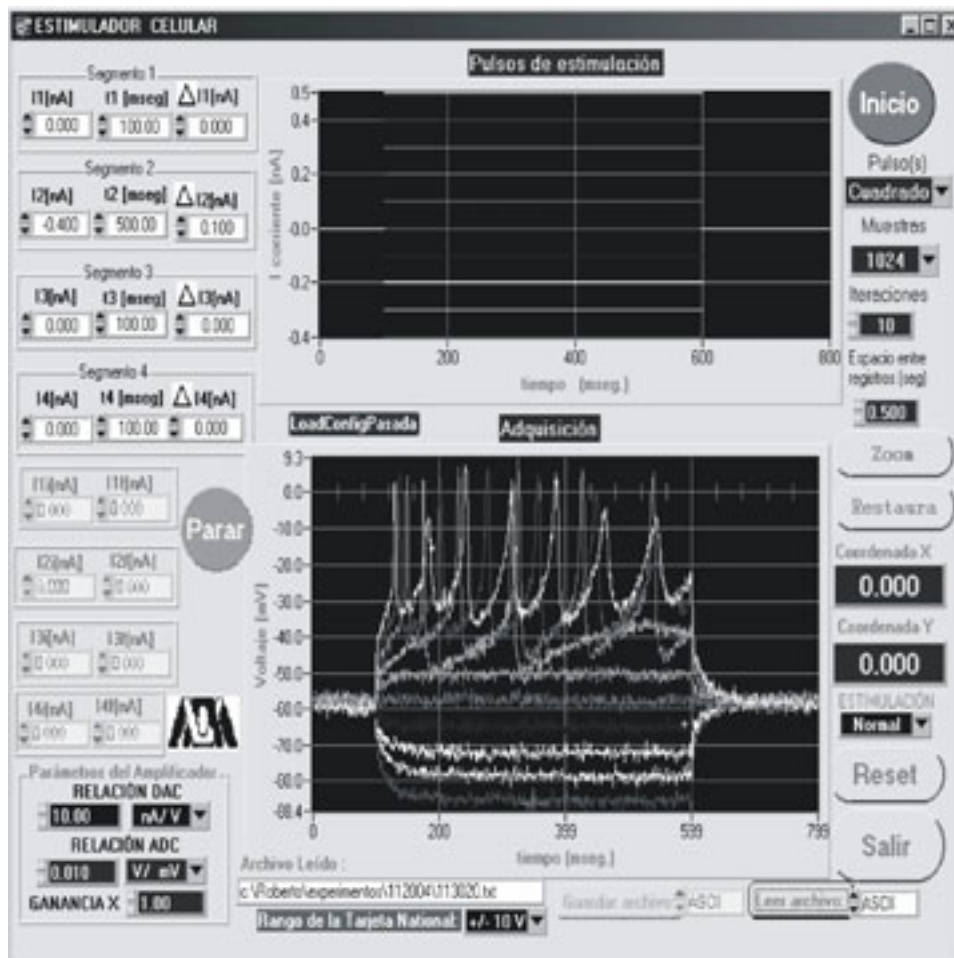
Finalmente, la evaluación del SEASEC con la técnica de fijación de corriente se llevó a cabo en un experimento real, en la cual se inyectó corriente a una neurona para observar los cambios en el potencial de membrana. La Figura 10 se obtuvo sin el modelo eléctrico de la membrana, y en su lugar se empleó un microelectrodo que fue insertado en una neurona para inyectarle pulsos rectangulares de fijación de corriente y observar los cambios asociados en el potencial de membrana de la neurona. La corriente negativa hiperpolariza la neurona y la corriente positiva de magnitud mayor desencadena espigas de potenciales de acción<sup>13,14</sup>.

Posteriormente, se evaluó el SEASEC en la configuración de fijación de voltaje con el empleo del modelo eléctrico de la membrana celular. En este caso se producen estímulos de voltaje y se observan las corrientes asociadas. En la Figura 11 se es-

timula con 6 pulsos rectangulares de fijación de voltaje iniciando en 0 mV de amplitud y con un incremento de 20 mV en cada trazo; asimismo, se muestran las corrientes asociadas a cada estímulo. El programa produce el cambio en las unidades de manera automática al pasar a esta técnica de registro.

Para destacar la versatilidad del SEASEC se muestra la siguiente figura, en la cual se empleó un protocolo de pulsos comúnmente utilizado en la técnica de fijación de voltaje tanto para la caracterización de las corrientes iónicas como para la obtención del potencial de inversión de la corriente de cola, curso temporal de la corriente de cola, etc.

El otro tipo de señal frecuentemente empleado para la caracterización de los canales iónicos es el de rampas de fijación del voltaje. En la Figura 13 se muestran dos rampas generadas y las respuestas adquiridas con el SEASEC, en donde el voltaje inicial, el voltaje final y la pendiente son diferentes. En



**Figura 10.** Imagen observada en el monitor durante un experimento real con la técnica de fijación de corriente. Se insertó un microelectrodo a una neurona para inyectar los pulsos rectangulares de corriente y observar los cambios en el potencial de membrana asociados. Los diferentes colores en los pulsos de estimulación y los correspondientes en la adquisición facilitan la visualización estímulo-respuesta.

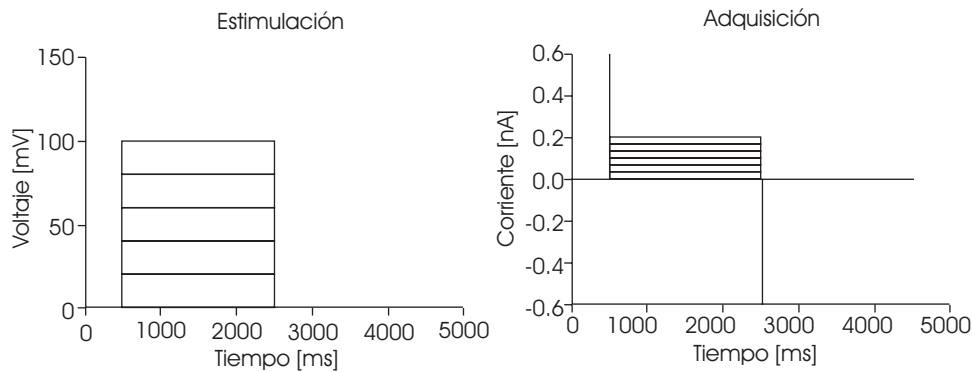
la señal de corriente se observan espigas al inicio y final de las rampas; estos transitorios corresponden a corrientes capacitivas que no se compensaron con el sistema de compensación de capacitancias parásitas del amplificador.

Un aspecto importante de la adquisición de señales electrofisiológicas a nivel celular, es la posibilidad de contar con un software para procesar y realizar un análisis exhaustivo de las señales adquiridas. Existe un paquete de cómputo ampliamente utilizado para estos propósitos (Clampfit de Axon Instruments), por lo cual consideramos importante que el SEASEC permitiera almacenar los datos en binario en un formato totalmente compatible con este software. En la Figura 14 se muestran los registros de los cambios en el potencial de membrana de una neurona por la inyección de pulsos rectangulares de corriente de polaridad negativa y positiva. Los datos fueron almacenados y el archivo fue abierto por el software de análisis comercial.

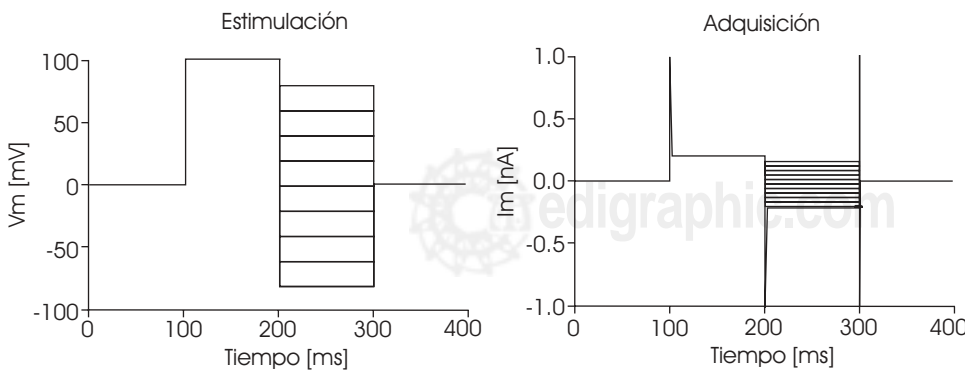
### DISCUSIÓN

El diseño del SEASEC tuvo como propósito que el usuario pudiera generar de manera fácil y rápida los protocolos de estimulación y adquisición de las señales comúnmente empleados en electrofisiología celular; además, cuenta con la posibilidad de almacenamiento de los datos en diferentes formatos compatibles con software de propósitos generales o específicos para este tipo de señales. Asimismo, permitir la lectura de los archivos y un análisis inicial de este tipo de señales.

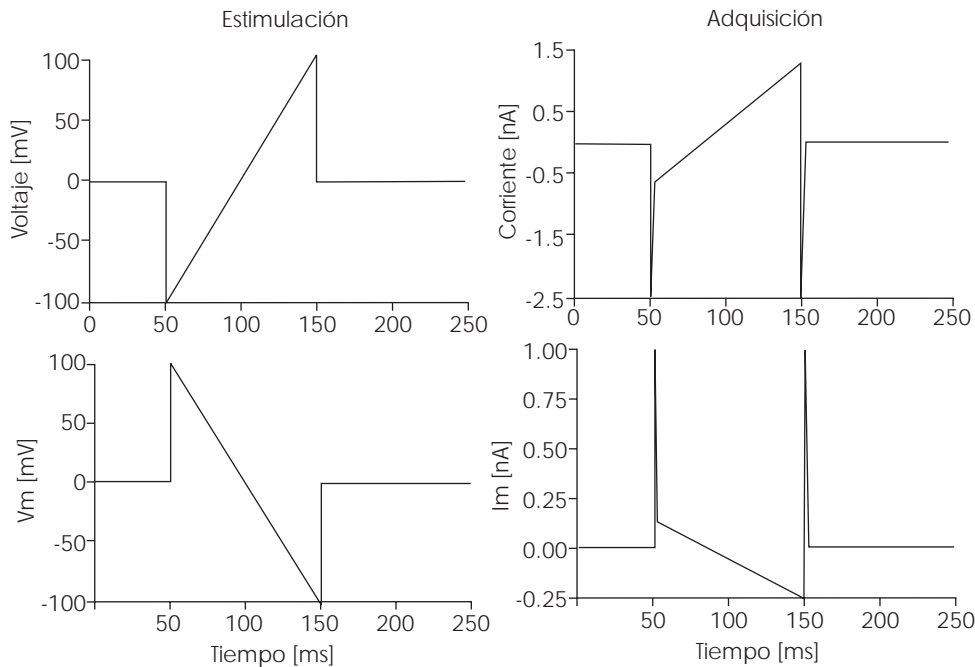
El usuario puede seleccionar el tipo de señal de estimulación ya sea pulsos rectangulares o rampas, los valores de la estimulación y adquisición, el tiempo de espera entre cada estímulo, el número de estímulos (iteraciones), la amplitud, el incremento de amplitud y la duración de cada uno de los 4 segmentos que forman el protocolo de estimulación. El SEASEC puede ser utilizado con las técnicas de fijación de voltaje, fijación de corriente y registro



**Figura 11.** Estímulos y respuestas en fijación de voltaje. Se aplicaron 6 pulsos rectangulares de voltaje con un inicio de 0 mV de amplitud e incrementos de 20 mV. En la gráfica derecha se muestra la corriente resistiva y la corriente capacitiva al inicio y final del pulso de estimulación. Note el cambio de unidades en las gráficas con respecto a las presentadas con la técnica de fijación de corriente.



**Figura 12.** Se aplicó un pre-pulso constante de 100 mV de amplitud seguido de 9 pulsos iniciando en -80 mV con incrementos de 20 mV. Las corrientes adquiridas se muestran a la derecha. Las espigas en las señales de corriente corresponden a corrientes capacitivas.

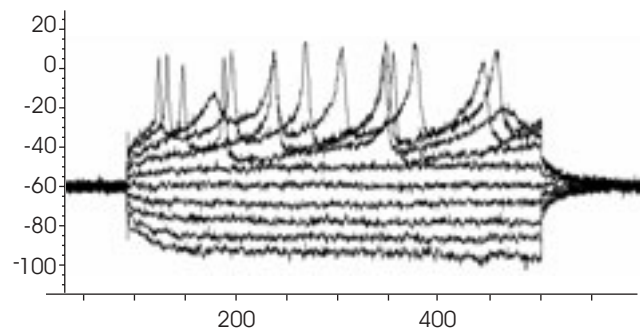


**Figura 13.** Rampas de fijación del voltaje. Se generaron dos rampas de la misma duración con voltaje inicial y final diferente. A la derecha se observan las corrientes evocadas por cada rampa; los transitorios de corriente al inicio y final de las rampas corresponden a las corrientes capacitivas.

intracelular con parámetros de entrada para los diferentes tipos de amplificadores comerciales. Se pueden observar los valores y las unidades correctas con las que se estimula y adquiere con una interfaz gráfica bajo el sistema operativo windows. La información se guarda y lee en formato binario y en ASCII. Al introducir los valores de las relaciones del amplificador que se utilizarán en el experimento, el usuario se evita hacer cálculos y ajustes.

El SEASEC presentado constituye una alternativa económica y potente para el registro y análisis inicial de las señales bioeléctricas a nivel celular. Un sistema básico que incluya una tarjeta de estas características, el paquete LabView y los conectores para la tarjeta tiene un costo de aproximadamente 2,000 USD. Los sistemas comerciales son muy costosos y por estar diseñados para amplificadores de la misma compañía, contienen una gran cantidad de parámetros innecesarios en la mayoría de los casos y que son poco amables con el usuario. Por ejemplo, la tarjeta Digidata y el software pClamp de Axon Instruments tienen un costo superior a los 10,000 USD. Por otro lado, los sistemas comerciales no brindan los programas fuente, razón por la cual, la generación de los protocolos de estimulación y adquisición está limitada a la que proveen dichos sistemas.

Ponemos el SEASEC a disposición del interesado, incluyendo toda la información y los programas fuente, para que realice las modificaciones necesarias



**Figura 14.** Registro de la actividad eléctrica de una neurona con la técnica de registro intracelular. Se aplicaron pulsos rectangulares de corriente y los cambios en el potencial de membrana se adquirieron y almacenaron. El archivo de datos fue abierto con el software comercial de análisis y procesamiento más frecuentemente utilizado en electrofisiología celular (Clampfit de Axon Instruments). La figura ilustra la compatibilidad entre el SEASEC y el software comercial.

cuando su trabajo experimental así lo requiera, siempre y cuando el paquete de cómputo no sea utilizado con fines comerciales.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. 3rd Edition. 2001.

2. Castellanos P, Godínez R, Jiménez J, Medina V. *Electrofisiología humana un enfoque para ingenieros*. Universidad Autónoma Metropolitana, 1994.
3. Lewis RS. Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2001; 19(1): 497-521.
4. *The Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques*. The axon instruments, Inc., USA 1993.
5. Velasco ND, Ávila-Pozos R, Godínez FR. Desarrollo de un paquete de cómputo para la adquisición de señales bioeléctricas a nivel celular, basado en la tarjeta PCI-MIO-16E-1 de National Instruments, Mem del XXVII Congreso Nal. de Ing. Bioméd, 98-101, 2004.
6. Marty A, Neher E. Tight seal whole cell recording. In: Sakmann B, Neher, eds. *Single Channel Recording*, Plenum, N.Y., 1983.
7. DAQ PCI E Series, "User Manual".
8. LabWindows/CVI, "Programmer Reference Manual".
9. LabWindows/CVI, "Standard Libraries Reference Manual".
10. LabWindows/CVI, "User Interface Reference Manual".
11. LabWindows/CVI, "User Manual".
12. Aitken, Jones, "Aprendiendo C en 21 Días". Prentice-Hall.
13. Cooke IM, Stuenkel E. Electrophysiology of invertebrate neurosecretory cells. In: Poisner AM, Trifaro J, (eds). *The Electrophysiology of the Secretory Cell*. Elsevier, Amsterdam, 1985: 115-164.
14. Ávila-Pozos R, Azpiroz J, Godínez R. Estudio comparativo de los patrones de actividad eléctrica en las neuronas peptidérgicas de los acociles *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*, Mem. del XXVII Congreso Nal. de Ing. Bioméd. 2004: 74-77.