

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DISEÑO DE UN SISTEMA  
DE FIJACIÓN DE VOLTAJE CON  
DOS SELLOS DE VASELINA  
PARA LA MEDICIÓN  
DE CORRIENTES EN  
FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

Tesis que para obtener el grado de  
**MAESTRO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

presenta

**ROBERTO ÁVILA POZOS**

asesor

**M. en C. RAFAEL GODÍNEZ FERNÁNDEZ**

México, D.F., mayo de 1996.

**SINODALES**

**M.en C. Rafael Godínez Fernández**

**Dr. Ismael Espinosa Espinosa**

**M.en C. Miguel Cadena Méndez**

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES TEÓRICOS	4
1.1. Propiedades pasivas de las membranas excitables	4
1.2. Bases iónicas del potencial de acción	19
1.3. La técnica de fijación de voltaje	22
1.4. Descripción de las corrientes de membrana bajo fijación de voltaje	28
1.4.1. La corriente de sodio	31
1.4.2. La corriente de potasio	35
1.4.3. La corriente de fuga	36
1.4.4. La corriente de calcio	36
1.4.5. El movimiento de carga	37
2. SISTEMA DE FIJACION DE VOLTAJE CON DOS SELLOS DE VASELINA	43
2.1. Primera versión	44
2.1.1. Análisis	48
2.1.2. Simulación	53
2.1.3. Resultados	63
2.2. Segunda versión	69
2.2.1. Análisis	69
2.2.2. Simulación	71
2.3. Tercera versión	79
2.3.1. Análisis	80
2.3.2. Simulación	85
2.3.3. Resultados	94
2.4. Discusión	101
2.5. Sistema de fijación de corriente	109
2.5.1. Análisis	109
2.5.2. Simulación	112
2.5.3. Resultados	113
APENDICES	
A. Medición de corrientes iónicas en fibras musculares esqueléticas	115
A.1. Disección de fibras	115
A.2. Montaje experimental	118
B. Simulador Micro-Cap II	123
BIBLIOGRAFIA	127

# **INTRODUCCIÓN**

Las técnicas de fijación de voltaje y corriente han sido ampliamente utilizadas por electrofisiólogos y biofísicos para el estudio de las corrientes transmembranales y potenciales de acción, respectivamente <sup>5,6,7,13,17,18,24,25,26,36,37</sup>. La comprensión de los mecanismos que dan origen a las corrientes iónicas a través de canales iónicos específicos, en membranas de células excitables, así como la generación y propagación del potencial de acción, ha mejorado con el desarrollo de las técnicas de fijación de voltaje y corriente <sup>5,6,7,13,17,18,24,25,26,36,37</sup>.

Las técnicas de fijación de voltaje permiten el análisis cinético de las corrientes iónicas por :

- el control espacial y temporal del potencial de membrana,
- la eliminación de corrientes capacitivas y
- la separación de las corrientes iónicas de interés, al elegir adecuadamente las soluciones intra y extracelular.

Actualmente existe una diversidad de sistemas de fijación de voltaje y corriente, cuyos diseños están supeditados a la morfología y tamaño de los diferentes tipos de células excitables <sup>7,17</sup>.

En este trabajo se presenta un nuevo diseño de sistema de fijación de voltaje y corriente para segmentos de fibras musculares esqueléticas, el cual sólo utiliza dos sellos de vaselina y tiene como características :

- mejorar la relación señal a ruido,
- eliminar los transientes capacitivos desde la etapa de entrada
- mejorar el ancho de banda y
- mejorar la compensación de la resistencia en serie, la cual es crítica para

la realización de mediciones precisas de la dependencia del voltaje de los canales iónicos.

El objetivo del presente trabajo es diseñar un sistema de fijación de voltaje capaz de realizar mediciones precisas de los fenómenos que suceden a nivel de la membrana, en músculo esquelético.

Para lograr lo anterior, se realizaron tres diseños de sistema de fijación de voltaje. Ya que el objetivo es diseñar y construir un sistema con características bien definidas, se efectuaron simulaciones con diferentes modelos de membrana. De igual forma, se realizaron pruebas del diseño correspondiente, con el equipo construido, utilizando los mismos modelos de membrana.

Los modelos de membrana utilizados, han sido descritos ampliamente en la literatura<sup>6,11,24,47</sup> y permiten caracterizar el comportamiento de un sistema de fijación de voltaje de manera confiable.

Finalmente, en el apéndice se presenta la descripción general del registro de corrientes utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos sellos de vaselina. Se detalla la disección de las fibras musculares, las soluciones utilizadas, el montaje experimental y la forma de realizar registros utilizando el equipo presentado anteriormente.

# 1. ANTECEDENTES TEÓRICOS

## 1.1. Propiedades pasivas de las membranas excitables

Las células excitables como las nerviosas y musculares, generan señales eléctricas por la apertura y cierre de canales iónicos. La capacidad de estas células para abrir o cerrar sus canales, permite controlar la permeabilidad de sus membranas y con ello regular la difusión de determinados iones bajo gradientes electroquímicos preestablecidos. La permeabilidad de la membrana y la difusión iónica pueden medirse directamente con isótopos radiomarcados<sup>37</sup>. Sin embargo, estas mediciones carecen de la resolución temporal necesaria para relacionar el movimiento iónico con las señales eléctricas que ocurren rápidamente en la célula. Para lograr mejorar la resolución temporal es necesario medir, no el cambio en la permeabilidad iónica, sino sus consecuencias : el flujo de corriente iónica y el cambio resultante en el potencial de membrana. Por lo tanto, se describirán las propiedades de los canales iónicos en términos eléctricos, esto es, mediante un modelo matemático simple derivado de un circuito eléctrico que describe las tres características críticas de las células excitables : los canales iónicos, los gradientes de concentración de los iones más relevantes y la capacidad de la membrana de almacenar energía<sup>6,36,37</sup>. En este modelo, llamado el circuito eléctrico equivalente, todas las propiedades funcionales importantes de la célula están representadas por un circuito eléctrico simple que consiste únicamente de conductancias (resistores), baterías y capacitores. Este modelo tiene dos características importantes :

Primera. Nos da una idea de cómo fluye la corriente debida al movimiento iónico.

Segunda. Las ecuaciones que describen este modelo son muy simples, mucho más simples que las ecuaciones que describen la permeabilidad de la membrana y la difusión iónica.

Entender los circuitos equivalentes que describen el comportamiento eléctrico de los diferentes tipos de células excitables, lleva a profundizar en los principios básicos de transmisión eléctrica en las células excitables y sirve como fundamento esencial para la interpretación de pruebas clínicas de la función eléctrica del nervio y el músculo, tales como electroencefalografía, electromiografía y electrocardiografía.

Las células excitables y las no excitables, tienen tres tipos de características eléctricas pasivas: conductancia (resistencia), fuerza electromotriz y capacitancia<sup>7,36,37</sup>.

La membrana celular es un mosaico de lípidos y proteínas de aproximadamente 8-10 nm de espesor. La superficie continua de la membrana está formada por una bicapa lipídica. Inmersas en esta bicapa, se encuentran varias proteínas. Los lípidos de la membrana son muy hidrofóbicos, esto es, son inmiscibles en agua. En contraste, los iones del espacio intra y extracelular son hidrofílicos : atraen fuertemente las moléculas de agua. Aunque la carga neta en una molécula de agua es cero, hay una separación de carga dentro de la molécula. Consecuentemente, las moléculas de agua tienen un momento dipolar. Como resultado de este desbalance de carga, el agua crea un ambiente polar. Los cationes son atraídos electrostáticamente a los átomos de oxígeno de la molécula de agua y los aniones son atraídos a los átomos de hidrógeno. Ya que los iones atraen agua, entonces se ven rodeados por una cápsula de agua llamada agua de hidratación. Un ion hidratado es muy pesado para ser disuelto efectivamente en la membrana. Si un ion perdiera su agua de hidratación, podría

disolverse fácilmente en la membrana. Tales eventos de deshidratación son raros, ya que la atracción electrostática entre los iones y el agua es muy fuerte. Un ion puede perder su agua de hidratación sólo si puede pasar del agua a otro medio polar. Los tallos de hidrocarbón de las moléculas de lípidos en la bicapa son no polares y por lo tanto no proveen el ambiente adecuado para que los iones pierdan su cápsula de agua. La bicapa es completamente impermeable a los iones. Los iones cruzan la membrana celular exclusivamente a través de unas proteínas especializadas, llamadas canales iónicos, que se encuentran inmersas en la membrana. En contraste con la bicapa lipídica, los canales iónicos proporcionan un ambiente polar efectivo para los iones. Estos canales son proteínas llamadas proteínas intrínsecas de la membrana <sup>7,36,37</sup>.

Los canales iónicos pueden dividirse en dos categorías <sup>7,36,37</sup> : pasivos y activos.

Los canales pasivos están siempre abiertos y se encuentran en todas las células. Los canales activos se encuentran sólo en las células excitables y tienen una compuerta, en algún lugar de la proteína, que puede estar abierta o cerrada. Las compuertas de estos canales pueden estar controladas por agentes químicos, por el potencial de membrana o por estímulos físicos. Muchos canales activos están cerrados cuando la membrana está en reposo. Los canales pasivos son importantes para determinar el potencial de reposo de la membrana. Los canales activos generan potenciales de acción, sinápticos y de receptor.

Los canales iónicos, ya sean pasivos o activos, pueden caracterizarse por su selectividad. Cada canal se comporta como si fuera un filtro de selectividad o un sitio de reconocimiento, el cual permite que sólo una especie de ion, usualmente de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) o calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), pase a través de él. Además, puede haber más de una clase de canal selectivo para el mismo

ion. Por ejemplo, hay una clase de canal sin compuerta de  $K^+$ , que es el responsable del flujo de  $K^+$  en el reposo, y una segunda clase de canal de  $K^+$ , con compuerta, que contribuye a la repolarización del potencial de acción <sup>7,36,37</sup>. Muchos canales no son perfectamente selectivos. Para propósitos de esta discusión, es conveniente asumir que cada canal es completamente selectivo.

Como los iones están distribuidos de manera desigual en ambos lados de la membrana, cada canal abierto contribuye a la generación de una diferencia de potencial eléctrico entre ambos lados de la membrana <sup>6,7,36,37</sup>. El potasio está presente en una concentración mayor dentro de la célula y por lo tanto, tiende a difundirse hacia el exterior a través de los canales abiertos (sin compuerta) de potasio. Esta difusión provoca una separación neta de cargas a través de la membrana. Las cargas positivas acumuladas en el exterior dejan una carga negativa acumulada en el interior. La diferencia de potencial eléctrico resultante tiene un valor igual al potencial de equilibrio del ion, en este caso potasio, dado por la ecuación de Nernst.

La combinación de un gradiente de concentración para el potasio y un canal selectivamente permeable, proporciona una ligera separación de carga a través de la membrana, que actúa como una fuente constante de potencial eléctrico. Una fuente de potencial eléctrico es llamada en este caso, batería iónica. La batería iónica generada de esta manera es el resultado de la difusión pasiva de potasio a través de los canales de potasio. Cada canal abierto funciona, al mismo tiempo, como una vía de conductancia con una resistencia diferente de cero. Cada canal iónico puede ser representado por una batería en serie con una conductancia, como se muestra en la figura 1.1. El valor de la batería está determinado por el gradiente de concentración para el ion. Para el potasio, el valor de la batería está dado por el potencial de equilibrio del potasio  $E_K$ .

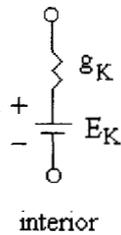


Figura 1.1. Un canal de K<sup>+</sup> puede ser representado por el circuito eléctrico equivalente, compuesto por una batería  $E_K$  en serie con una conductancia  $g_K$ .

Ya que los canales ofrecen una cierta resistencia al flujo de iones, la conductancia de cada canal puede ser representada por una resistencia. Llamaremos a la conductancia del canal de K<sup>+</sup>  $g'_K$  y a la resistencia del canal de K<sup>+</sup>  $R'_K$ . La resistencia de un canal es inversamente proporcional a su conductancia<sup>6,7,36,37</sup>.

$$R'_K = \frac{1}{g'_K}$$

La conductancia de un solo canal es una medida de la facilidad con la cual el ion se mueve a través del poro de una proteína, en respuesta a una diferencia de potencial. Cuando la célula presenta el potencial de membrana del reposo, la conductancia total del K<sup>+</sup> es igual al número de canales pasivos de K<sup>+</sup>  $N_K$ , multiplicado por la conductancia de un solo canal de potasio  $g'_K$ .

$$g_K = N_K * g'_K$$

La conductancia de la membrana al  $K^+$  está relacionada con la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , pero ambos términos no son equivalentes. La conductancia varía con la concentración iónica, mientras que la permeabilidad no. La permeabilidad está determinada por el estado de la membrana y la conductancia depende tanto del estado de la membrana como de la concentración iónica <sup>6,7,36,37</sup>.

Por analogía, todos los canales pasivos de  $Na^+$  y  $Cl^-$  pueden ser representados por una combinación similar de conductancia y batería, como se ilustra en la figura 1.2. Estos tres tipos de canales constituyen el mayor número de canales iónicos en la membrana.

Con esta representación eléctrica de los canales pasivos de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$ , podemos calcular el potencial de reposo de la membrana, usando un circuito equivalente simple. Para construir este circuito, sólo es necesario conectar los elementos que representan cada tipo de canal. Estos canales están en paralelo.

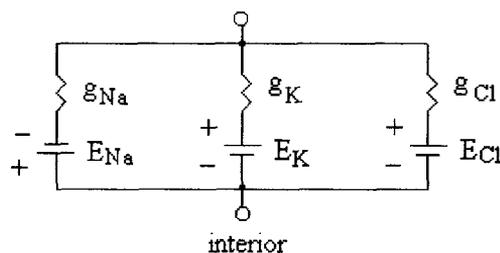


Figura 1.2. Cada tipo de canal pasivo, selectivo a un ion particular, está representado por una combinación de una batería y una conductancia colocadas en serie.

Para simplificar el cálculo del potencial de membrana, ignoraremos inicialmente los canales de  $Cl^-$  y consideraremos sólo los canales de  $K^+$  y  $Na^+$ .

Existe un número mayor de canales pasivos de  $K^+$  que de  $Na^+$ , por lo tanto, la conductancia de la membrana al  $K^+$  es mucho mayor que para el  $Na^+$ . Dados los valores para la conductancia y las baterías iónicas, es posible calcular el

potencial de membrana  $V_m$ . En la figura 1.3., la conductancia al potasio  $g_K$  es 20 veces mayor que la conductancia al sodio  $g_{Na}$ .

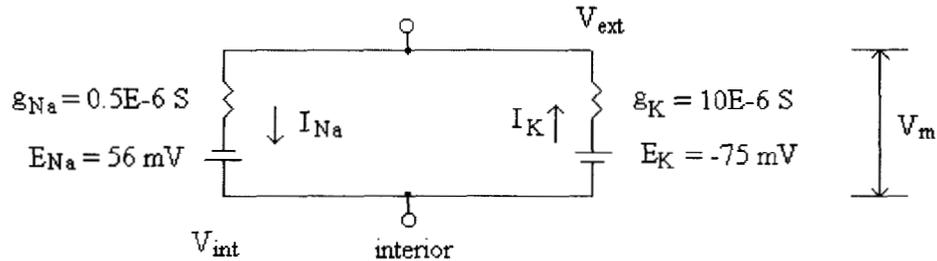


Figura 1.3. Circuito eléctrico equivalente para calcular el potencial de membrana en reposo. Para simplificar el análisis, se han omitido los canales de  $Cl^-$ .

El potencial de membrana  $V_m$  es constante en estado de reposo, por lo tanto, la corriente neta debe ser cero. Esto es :

$$I_{Na} + I_K = 0$$

Las corrientes de sodio  $I_{Na}$  y de potasio  $I_K$  pueden calcularse en dos pasos. Las ecuaciones para cada una de las ramas del circuito en la figura 1.3. son :

$$V_m = E_{Na} + \frac{I_{Na}}{g_{Na}}$$

$$V_m = E_K + \frac{I_K}{g_K}$$

Despejando para ambas corrientes tenemos :

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

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

Retomando la ecuación para la corriente neta :

$$I_{Na} + I_K = (V_m - E_{Na}) * g_{Na} + (V_m - E_K) * g_K = 0$$

Resolviendo para  $V_m$  :

$$\begin{aligned} V_m * (g_{Na} + g_K) &= E_{Na} * g_{Na} + E_K * g_K \\ V_m &= \frac{E_{Na} * g_{Na} + E_K * g_K}{g_{Na} + g_K} \end{aligned}$$

Esta ecuación permite calcular el voltaje de la membrana  $V_m$  para el circuito de la figura 1.3. Tomando los valores del circuito equivalente, el valor para  $V_m$  es de, aproximadamente, -69 mV.

Una forma más general para el cálculo del potencial de membrana en reposo está dada por :

$$V_m = \frac{E_K * g_K + E_{Na} * g_{Na} + E_{Cl} * g_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}}$$

Esta ecuación es similar a la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz <sup>36,37</sup>. Si la conductancia para un ion es mucho mayor en relación con los otros iones, entonces el voltaje de la membrana  $V_m$  se aproximará al valor del potencial de Nernst para ese ion.

Además de las baterías y las conductancias, existe un tercer elemento pasivo muy importante : la capacitancia de la membrana. En general, la capacitancia se presenta cuando existen dos materiales conductores separados

por un material aislante. En las células, los materiales conductores son el citoplasma y el líquido extracelular. El material aislante es la membrana celular, específicamente la bicapa lipídica <sup>6,7,36,37</sup>.

Un circuito eléctrico equivalente, más completo, de las propiedades pasivas de la membrana, se presenta en la figura 1.4.

La propiedad fundamental del capacitor es su capacidad para almacenar cargas, de signos opuestos, en sus dos superficies conductoras. Esta separación de cargas ocurre cuando existe una diferencia de potencial entre ambos lados del capacitor.

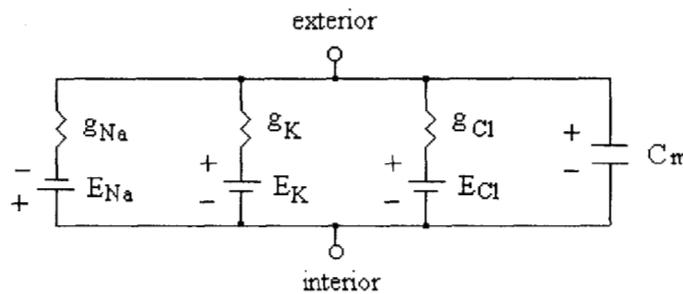


Figura 1.4. Circuito equivalente de las propiedades pasivas de la membrana. Se ha incluido la capacitancia de la membrana  $C_m$ .

Para determinar cómo afecta la capacitancia de la membrana a la razón de cambio del potencial de membrana, nos referiremos al circuito equivalente simplificado, mostrado en la figura 1.5. En esta figura, la membrana celular está representada por un capacitor  $C_m$  en paralelo con un resistor  $R_m$ , el cual representa los canales iónicos pasivos. Las baterías iónicas pueden ignorarse para propósitos de esta discusión, ya que las baterías afectan sólo el valor absoluto del potencial de membrana  $V_m$  y no su razón de cambio. Podemos

trabajar sólo con las propiedades pasivas de la membrana si consideramos que los efectos de pulsos de corriente despolarizantes son muy pequeños para abrir un número significativo de canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje (canales activos).

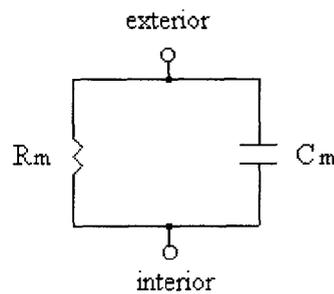


Figura 1.5. Circuito eléctrico simplificado. Este circuito puede utilizarse para examinar los efectos de la capacitancia de la membrana  $C_m$  de una célula, en respuesta a una corriente inyectada. La conductancia de todos los canales ha sido agrupada en un solo elemento resistivo  $R_m$ . Las baterías que representan las fuerzas electromotrices que genera la difusión iónica, han sido despreciadas.

Cuando se inyecta corriente a la célula para cambiar su potencial de membrana, el cambio en el potencial de membrana ( $\Delta V_m$ ) está retrasado con respecto al pulso de corriente. Para explicar este retraso, debemos entender primero los dos tipos de corriente que fluyen a través de la membrana : la corriente iónica  $I_i$  (que es una corriente resistiva) y la corriente capacitiva  $I_c$ . La corriente total de la membrana  $I_m$  es la suma de estos dos tipos de corriente :

$$I_m = I_i + I_c$$

La corriente iónica representa el movimiento de iones a través de los canales iónicos de la membrana. Por ejemplo, los iones de  $\text{Na}^+$  se mueven, a través de los canales de  $\text{Na}^+$ , del exterior al interior de la célula.

La corriente capacitiva representa un cambio en la carga neta almacenada en la capacitancia de la membrana.

Un análisis del curso temporal de  $I_c$  e  $I_i$ , revela la razón del retraso entre  $I_m$  y  $\Delta V_m$ . Recordando que el potencial  $V$  a través de un capacitor es proporcional a la carga  $Q$  almacenada, tenemos :

$$V = \frac{Q}{C}$$

Para que un cambio en el potencial  $\Delta V_m$  ocurra a través de la membrana, debe haber cambio en la carga almacenada en la capacitancia de la membrana.

$$\Delta V_m = \frac{\Delta Q}{C}$$

Este  $\Delta Q$  está producido por el flujo de corriente capacitiva  $I_c$ . La corriente está definida como el movimiento neto de cargas positivas por unidad de tiempo. El valor de la corriente capacitiva es igual al la razón con la cual cambia la carga almacenada en el capacitor.

$$I_c = \frac{dQ}{dt}$$

El cambio total en la carga del capacitor de la membrana  $\Delta Q$ , es el producto del valor promedio de la corriente capacitiva  $I_c$  y la duración de la misma

( $\Delta t = t_2 - t_1$ ). Si la corriente capacitiva  $I_c$  tiene un valor constante, este producto simplemente es

$$\Delta Q = I_c * \Delta t$$

En caso contrario, si la corriente capacitiva  $I_c$  varía con el tiempo, éste producto puede obtenerse al integrar  $I_c$  sobre todo el intervalo de tiempo  $\Delta t$  <sup>36,37</sup>.

La capacitancia y la resistencia de la membrana están en paralelo y por lo tanto, el potencial en estos dos elementos debe ser igual en todo momento. El potencial a través del capacitor no puede cambiar hasta que la carga almacenada en sus laminillas haya cambiado, esto es :

$$\Delta V_m = \Delta Q / C$$

Inicialmente toda la corriente fluye por el capacitor para cambiar la carga en sus laminillas. Sin embargo, conforme el pulso continúa y  $\Delta Q$  se incrementa, más y más corriente debe fluir a través del resistor, ya que en cualquier instante la caída de voltaje en la resistencia de la membrana  $\Delta V_m = I_i * R$  debe ser igual al voltaje en el capacitor  $\Delta V_m = \Delta Q / C$ . Con el tiempo, una porción mayor de la corriente de la membrana fluye por el resistor, y queda una fracción menor para cargar el capacitor ; por ello, la razón de cambio del voltaje de la membrana  $V_m$  decrece con el tiempo. Cuando  $\Delta V_m$  alcanza su máximo valor, toda la corriente de la membrana fluye a través de la resistencia y el valor de  $\Delta V_m$  es  $\Delta V_m = I_m * R_m$ , como se muestra en la figura 1.6. Al final del pulso de corriente, ésta fluye por la malla RC y el capacitor se descarga a través del resistor.

La capacitancia de la membrana tiene el efecto de reducir la razón con que cambia el voltaje de membrana ante pulsos de corriente <sup>36,37</sup>. Si la membrana tuviera únicamente propiedades resistivas, un pulso de corriente aplicado a la

membrana, cambiaría instantáneamente el potencial de membrana y tendría la misma forma que el pulso aplicado, como se muestra en la figura 1.7. Por otra parte, si la membrana tuviera sólo propiedades capacitivas, el potencial de membrana cambiaría lentamente y su forma, en respuesta al mismo pulso de corriente, sería la de una rampa, como se aprecia en la figura 1.7.

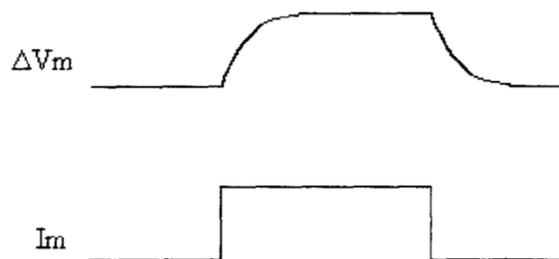


Figura 1.6. El curso temporal de  $\Delta V_m$  es retrasado por la capacitancia de la membrana. Cuando  $V_m$  cambia por efecto de inyectar corriente a la célula,  $\Delta V_m$  se retrasa con respecto al pulso de corriente.

Ya que la membrana tiene ambos comportamientos, capacitivo y resistivo en paralelo, el cambio resultante en el potencial de membrana ante un pulso de corriente tiene una forma intermedia entre las dos respuestas puras, como puede verse en la figura 1.7.

La pendiente al inicio del pulso de corriente en la gráfica de  $V_m$  contra tiempo es la misma que la del comportamiento capacitivo puro, mientras que la pendiente al final del pulso es igual a la del comportamiento resistivo puro.

Para describir el comportamiento de las membranas biológicas, es frecuente emplear modelos eléctricos. Éstos modelos son aproximaciones a las membranas reales. Podemos decir que una célula excitable en reposo se

comporta como un simple circuito RC <sup>6,7,36,37</sup>. Este tipo de respuesta se puede obtener con el análogo eléctrico presentado en la figura 1.5.

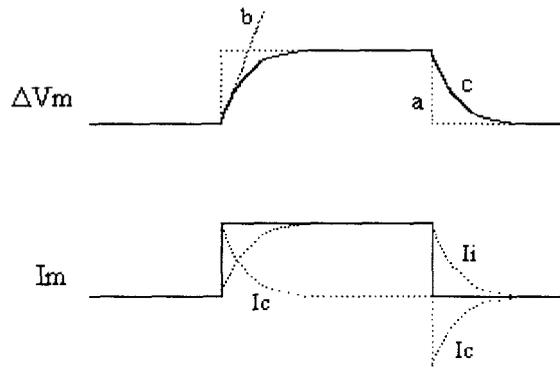


Figura 1.7. Respuesta de la membrana ante un pulso rectangular de corriente (c). Esta respuesta tiene una forma intermedia entre el comportamiento resistivo puro (a) y el comportamiento capacitivo puro (b). El producto de la resistencia de la membrana  $R_m$  con la capacitancia de la membrana  $C_m$  es llamado constante de tiempo de la membrana  $\tau$ . La corriente de la membrana  $I_m$  se muestra con línea continua, mientras que con líneas discontinuas se muestran la corriente iónica (resistiva)  $I_i$ , así como la corriente capacitiva  $I_c$ .

$V_m$  es el potencial de membrana a cualquier tiempo,  $R_m$  es la resistencia de la membrana y  $C_m$  es la capacitancia de la membrana. Si se aplica una corriente  $I(t)$  a este circuito se dividirá en dos componentes : una corriente  $I_r$  que fluye por la resistencia y una corriente  $I_c$  que circula por el elemento capacitivo. Por lo tanto, la corriente total

$$I(t) = I_r + I_c$$

Podemos escribir  $I_r$  como

$$I_r = \frac{V_m}{R_m}$$

De manera similar  $I_c$

$$I_c = C_m \frac{dV_m}{dt}$$

Por lo tanto, la ecuación para la corriente total queda de la forma :

$$I(t) = \frac{V_m}{R_m} + C_m \frac{dV_m}{dt}$$

Si aplicamos un pulso de corriente de amplitud  $i$ , la solución para la ecuación anterior está dada por  $V_m = i * R_m (1 - e^{-t/\tau})$ , donde  $\tau = R_m * C_m$ .  $V_m$  es, en este caso, una despolarización (si  $i > 0$ ).

La constante de tiempo de la membrana,  $\tau$ , determina la rapidez con la que  $V_m$  crece después del inicio del estímulo. Por ejemplo, cuando  $t = \tau$ ,  $V_m = (0.632)i * R_m$ . Para este tiempo, la despolarización ha alcanzado el 63.2% del valor final. Después de varias constantes de tiempo, el valor de  $V_m$  se aproxima a  $i * R_m$ .

Cuando el pulso de corriente ha terminado, la ecuación para la respuesta en voltaje es  $V_m = i * R_m (e^{-t/\tau})$ .

El método usual para medir la resistencia de la membrana de una célula excitable es aplicar una corriente conocida,  $i$ , durante un tiempo lo suficientemente largo para que se produzca un cambio en el potencial en estado estable. Entonces, la resistencia de la membrana  $R_m$  puede calcularse como  $V_m/i$ . La constante de tiempo,  $\tau$ , puede medirse como el tiempo requerido para que  $V_m$  alcance el 63.2% de  $i * R_m$ . Finalmente, la capacitancia de la membrana  $C_m$  puede calcularse como  $\tau/R_m$ .

## 1.2. Bases iónicas del potencial de acción.

Cada célula tiene una membrana que separa los fluidos intra y extracelular, los cuales tienen diferente composición iónica. La membrana celular consiste en una bicapa lipídica. Esta membrana es por definición, en términos eléctricos, un capacitor, ya que separa las cargas <sup>6,7,36,37</sup>.

Cada membrana biológica tiene una permeabilidad específica que produce una comunicación entre el medio intracelular y el medio extracelular. Las membranas excitables tienen unas vías de comunicación altamente especializadas que se encuentran en la bicapa lipídica. Estos canales son los responsables del potencial de membrana; esto puede explicarse si se aprecia que dichos canales proveen un contacto físico entre los fluidos delimitados por la membrana, moviendo los iones de acuerdo a sus gradientes electroquímicos. En equilibrio, el voltaje de la membrana puede describirse matemáticamente como una función de las concentraciones iónicas, al integrar la ecuación de electrodifusión de Nernst-Planck. Debe considerarse que en las células excitables, muchos de los iones no están distribuidos en equilibrio, pero se encuentran en una situación de estado estable, la cual es mantenida por las bombas iónicas que transportan iones en contra de sus gradientes electroquímicos, utilizando energía de procesos metabólicos <sup>6,36</sup>.

La ecuación diferencial de Nernst-Planck puede integrarse sólo si se asumen ciertas condiciones. La ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz, ampliamente utilizada en biología para describir el potencial de membrana, se deriva de la ecuación de Nernst-Planck con dos condiciones que se consideran para su integración. Primero, que el gradiente eléctrico a través de la membrana es constante, y segundo, que los coeficientes de difusión de los iones en la membrana son constantes.

Si reducimos la composición iónica de los fluidos intra y extracelular a tres iones significativos,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz para el potencial de la membrana es <sup>6,36,37</sup>

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{Na}}[\text{Na}]_o + P_{\text{K}}[\text{K}]_o + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_i}{P_{\text{Na}}[\text{Na}]_i + P_{\text{K}}[\text{K}]_i + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_o}$$

donde los términos  $P_{\text{Na}}$ ,  $P_{\text{K}}$  y  $P_{\text{Cl}}$  son los coeficientes de permeabilidad para el  $\text{Na}^+$ , el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , respectivamente y representan características específicas de la membrana. Los corchetes indican las concentraciones iónicas y los subíndices  $o$  e  $i$  sirven para indicar si la concentración es externa o interna, respectivamente.  $R$ ,  $T$  y  $F$  son la constante de los gases, temperatura absoluta y constante de Faraday, respectivamente.

Las células excitables están especializadas, ya que tienen vías de selección iónica que permiten cambiar transitoriamente el voltaje de la membrana desde valores negativos de reposo (el interior negativo con respecto al exterior) hasta valores positivos. Este proceso es llamado el potencial de acción. Las características del potencial de acción pueden describirse con el siguiente experimento. Si un pulso de corriente, pequeño y corto (estímulo), se pasa a través de la membrana de una célula excitable y ese estímulo es mayor o igual a un valor umbral, hay un cambio en el potencial de membrana (respuesta), y la amplitud y el curso temporal de la respuesta son no lineales en relación al estímulo aplicado. Para pulsos que decrecientan la magnitud del potencial de membrana, hay un umbral sobre el cual la amplitud de la respuesta es casi independiente de la amplitud del estímulo. Durante esta respuesta o potencial de acción, la resistencia de la membrana decrece drásticamente y cambian las características de permeabilidad de la membrana. En reposo, la membrana es

permeable a los iones de potasio y casi impermeable a los iones de sodio. En este caso, el potencial de membrana, llamado potencial de reposo, se comporta como un electrodo de potasio, y su valor puede aproximarse por la ecuación de Nernst

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i} \equiv E_K$$

En esta ecuación, el coeficiente de permeabilidad de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz se cancela, ya que el potencial está definido exclusivamente por el gradiente de  $K^+$  a través de la membrana (los coeficientes de permeabilidad para los otros iones son iguales a cero). Dado que la concentración de  $K^+$  es generalmente más grande en el interior que en el exterior de la célula, el potencial de membrana en reposo será negativo.

Cuando la membrana de una célula excitable es estimulada, las propiedades de selectividad cambian y experimentan un proceso cíclico. La membrana pasa de ser muy selectiva al  $K^+$  a ser muy selectiva al  $Na^+$  y vuelve a ser muy selectiva al  $K^+$ . Cuando la membrana se torna muy selectiva al  $Na^+$ , el potencial de membrana se comporta como un electrodo de  $Na^+$  y en general tiene un signo opuesto al del potencial de reposo, ya que los iones de  $Na^+$  están distribuidos en los fluidos intra y extracelular de manera contraria a los iones de  $K^+$ .

Los potenciales de acción son el resultado de los cambios que se presentan en la permeabilidad de las membranas celulares, a diferentes iones, los cuales tienen diferentes potenciales de equilibrio. El potencial de equilibrio se define como el potencial al cual el gradiente químico (concentración iónica) cancela al gradiente eléctrico.

### 1.3.La técnica de fijación de voltaje

Gran parte del progreso en la comprensión de las corrientes iónicas a través de canales específicos en la membrana celular, se debe al desarrollo de las técnicas de fijación de voltaje <sup>6,7,17,36,37</sup>. Estos métodos permiten el análisis cinético de las corrientes iónicas por :

- 1) el control espacial y temporal del potencial de membrana,
- 2) la eliminación de las corrientes capacitivas, y
- 3) la separación de la corriente iónica de interés, al elegir adecuadamente las soluciones intra y extracelular.

Muchas de las propiedades de los canales iónicos en la membrana celular, se obtienen con experimentos que utilizan la fijación de voltaje. En general, el método permite el flujo iónico a través de la membrana celular, para ser medido como una corriente eléctrica, mientras el voltaje de la membrana está bajo control experimental con un amplificador de retroalimentación <sup>6,7,17,36,37</sup>.

Este método fue desarrollado inicialmente por Cole <sup>13</sup> en 1949 y por Hodgkin, Huxley y Katz <sup>26</sup> en 1952, para ser usado en axón gigante de calamar. Desde entonces a la fecha, se han realizado muchas modificaciones a la técnica, y el análisis de fijación de voltaje se ha extendido a una amplia gama de células.

La utilidad de la fijación de voltaje reside, primero, en el hecho de que permite la separación de las corrientes iónicas de las capacitivas. Segundo, es más fácil obtener información sobre el comportamiento de un canal, midiendo corrientes iónicas en un área de la membrana con un voltaje uniforme y controlado, que cuando el voltaje está cambiando libremente en el tiempo y entre diferentes regiones de la membrana. Esto es muy claro en el caso de la apertura y

cierre de muchos canales iónicos que son afectados por el potencial de membrana <sup>36,37</sup>.

Los métodos de fijación de voltaje son usados para medir las corrientes iónicas de una célula o de grandes áreas de la membrana que contiene miles de canales; tales corrientes son llamadas corrientes macroscópicas.

La técnica de 'patch clamp' <sup>7,17,23</sup> ha extendido la aplicación del método de fijación de voltaje para el registro de corrientes iónicas que fluyen a través de un solo canal.

La base de la fijación de voltaje puede entenderse si se considera el circuito equivalente, simplificado, de la membrana celular. Este circuito está mostrado en la figura 1.5.  $C_m$  es la capacitancia de la membrana, mientras los canales, que permiten el flujo de corrientes iónicas  $I_i$  a través de la membrana, están representados por un resistor  $R_m$ . La corriente  $I_m$  que fluye a través del circuito será la suma de  $I_i$  y la corriente en el capacitor

$$I_m = I_i + C_m \frac{dV}{dt}$$

En los experimentos de fijación de voltaje se utilizan estímulos cuadrados o rectangulares, de tal forma que el voltaje cambie de un nivel a otro, tan rápido como sea posible. Bajo estas condiciones, una breve espiga de corriente capacitiva fluye cuando se presentan los bordes del pulso, pero cuando el voltaje es estable,  $dV/dt$  es cero y la corriente capacitiva es cero. La corriente iónica puede obtenerse libre de corriente capacitiva una vez que ha pasado el cambio de voltaje, como se ilustra en la figura 1.8.

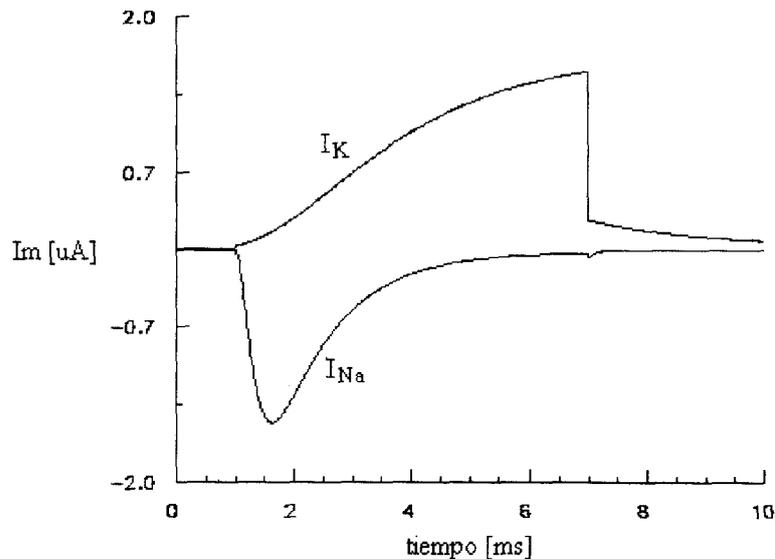


Figura 1.8. Registro típico de una célula bajo fijación de voltaje, cuando al aplicar un pulso rectangular, el potencial de membrana se lleva a un nivel en el que los canales iónicos se abren. El curso temporal es, típicamente, del orden de milisegundos.

Las corrientes iónicas medidas proporcionan información sobre las propiedades de los canales y los mecanismos por los cuales se abren y cierran. Otros estudios se concentran en componentes de las corrientes capacitivas, los cuales están relacionados con las compuertas de los canales <sup>6</sup>.

Para una preparación biológica en particular, el sistema de fijación de voltaje utilizado debe contar con criterios para determinar la exactitud del control del voltaje y la velocidad de fijación de voltaje <sup>7,11,17,18,23,24,25,26,37,38,39,41,44,45</sup>.

### Control del potencial de membrana

La exactitud con la cual el voltaje de la membrana es controlado, depende de que se tenga un amplificador de fijación con ganancia suficientemente grande. Esto puede verse si se considera el esquema de fijación de voltaje mostrado en la figura 1.9 <sup>7,11,17,23,24,37,38,39,41,44,45</sup>.

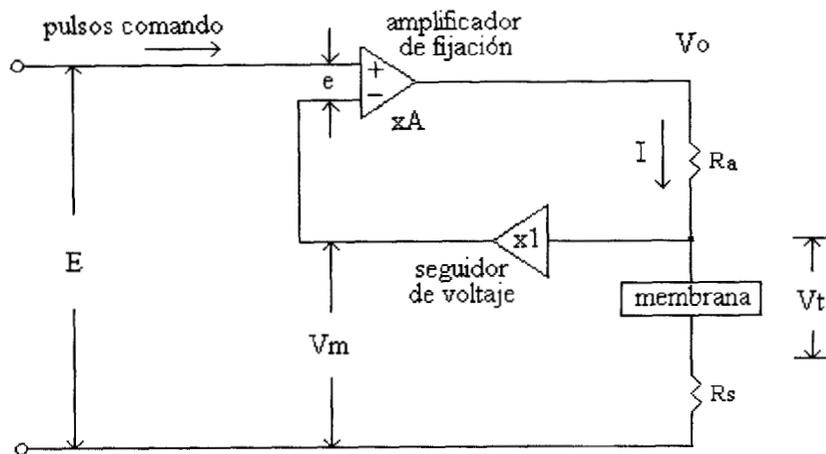


Figura 1.9. Esquema simplificado del sistema de fijación de voltaje donde se toman en cuenta los efectos de la resistencia en serie  $R_s$ . Al funcionar el sistema, el voltaje  $V_m$  se aproxima al valor del pulso comando  $E$ , pero  $V_m$  no es el voltaje a través de la membrana  $V_t$ , sino la suma de éste más el voltaje producido por la corriente que circula por  $R_s$ .

El potencial de membrana es medido por el seguidor de voltaje, el cual tiene una impedancia de entrada muy grande, por lo cual la corriente de entrada es despreciable. El amplificador de fijación, de ganancia  $A$ , compara el potencial de membrana con el potencial de comando  $E$ , y pasa corriente a través de la resistencia de acceso  $R_a$  (la cual puede consistir de la resistencia del microelectrodo y la resistencia citoplásmica) para controlar  $V_m$ . La salida del amplificador  $V_o$ , está dada por

$$V_o = e * A = A(E - V_m)$$

Esta salida se divide entre la resistencia de acceso  $R_a$  y la membrana (por el momento asumiremos que la resistencia en serie  $R_s$  es igual a cero).

$$V_o = V_m + I * R_a$$

Sustituyendo  $V_o$  y reorganizando para  $V_m$  tenemos :

$$V_m = E \frac{A}{1+A} - \frac{I * R_a}{1+A}$$

De esta manera, conforme la ganancia  $A$  se incrementa, el potencial de membrana se aproxima al potencial comando y se reduce el efecto de la resistencia de acceso.

#### Resistencia en serie

En la práctica, hay normalmente una resistencia en serie entre la membrana y los electrodos de registro <sup>7,17</sup>. Esta resistencia está representada por  $R_s$  en la figura 1.9.

La velocidad de la respuesta y la fidelidad del fijador están limitadas por la resistencia en serie  $R_s$ . Esta resistencia se debe principalmente a las propiedades del electrodo de registro, a la resistencia en serie entre la célula y el electrodo de referencia y a las propiedades del amplificador de fijación. Dado que  $R_s$  está en serie con la resistencia y la capacitancia de la membrana, tiene dos efectos <sup>7,17</sup> :

1. Una resistencia en serie grande limita la velocidad de la respuesta. Para una resistencia de membrana grande, comparada con  $R_s$ , la constante de tiempo para cargar la célula es  $\tau = R_s * C_m$

2. Una resistencia en serie grande provoca errores en el potencial medido, dependiendo de la relación entre  $R_s$  y la resistencia de la membrana  $R_m$ .

Para lograr un error menor al 1% de la señal, ésta relación debe ser mayor de 1:100.

Cuando una corriente  $I$  fluye a través de la membrana, esta resistencia  $R_s$  ocasiona una discrepancia entre el potencial de membrana medido  $V_m$  y la diferencia de potencial real a través de la membrana  $V_t$ . El tamaño del error es  $I \cdot R_s$  y el problema se torna más serio cuando la corriente de membrana es grande. El procedimiento usual es medir  $R_s$  y decidir si el error  $I \cdot R_s$  es significativo. En caso de ser significativo, puede lograrse una compensación para  $R_s$  sumando una señal proporcional a la corriente de la membrana, escalada apropiadamente, con el voltaje de comando del amplificador de fijación. Comunmente la compensación se logra usando un potenciómetro, y el nivel típico de compensación está entre el 80 y el 90% <sup>7,17,18,24</sup>. Al intentar mejorar el nivel de compensación, el sistema de fijación de voltaje comienza a oscilar.

La resistencia en serie generalmente se mide bajo condiciones de fijación de corriente <sup>7,17,24</sup>, aplicando pulsos de corriente  $I$ . Teóricamente, la respuesta en voltaje muestra primero un salto de tamaño  $I \cdot R_s$ , seguido de una subida en voltaje con una pendiente inicial igual a  $I/C_m$ , donde  $C_m$  es la capacitancia de la membrana.

La resistencia en serie  $R_s$ , puede ser reducida usando amplificadores de fijación con ganancia dependiente de frecuencia o utilizando electrodos con la resistencia más baja posible.

### Velocidad de fijación

Para separar las corrientes capacitivas de las iónicas <sup>7,17</sup>, el cambio en el potencial de membrana debe terminar antes de la activación de los canales iónicos.

La velocidad máxima de cambio en el voltaje de la membrana está limitada por la corriente máxima que fluye a través de la membrana y por la capacitancia de la misma

$$\left(\frac{dV}{dt}\right)_{\max} = \frac{I_{\max}}{C_m}$$

El fijador de voltaje debe estar capacitado para cambiar el potencial de membrana lo suficientemente rápido para que el transiente de corriente capacitiva ocurra antes del tiempo en el que la corriente iónica es medida. Claramente, esta exigencia debe ser mayor cuando interesa medir corrientes iónicas rápidas<sup>6,7,17</sup>.

Los sistemas de fijación de voltaje tienen dos, y algunas veces más, constantes de tiempo<sup>7,11,17,18,23,24,25,26,37,38,39,41,44,45</sup> en su circuito de retroalimentación y estos sistemas tienden a oscilar conforme se incrementa la ganancia. Los retrasos en el sistema de fijación son ocasionados por las constantes de tiempo del amplificador de control. Habrá también un retraso en la medición del potencial de membrana causado por la capacitancia a la entrada del seguidor de voltaje y la capacitancia parásita del microelectrodo, cuando éste es usado. Este retardo puede reducirse usando un seguidor de voltaje con compensación de capacitancia.

La ganancia del sistema de control necesita ser grande, para asegurar un buen control del voltaje.

#### 1.4. Descripción de las corrientes de membrana bajo fijación de voltaje

Cuando una célula excitable es despolarizada de su potencial de reposo (aproximadamente -90 mV en el músculo) a un potencial cercano a 0 mV, por un repentino cambio en el potencial de membrana usando la técnica de fijación de voltaje, la corriente que fluye por la membrana consiste de un transiente de

corriente saliente (corriente positiva) extremadamente rápido, seguido por un transiente de corriente entrante (corriente negativa) y, ligeramente retrasada, una corriente saliente (corriente positiva) sostenida. Los cursos temporales de estas corrientes pueden apreciarse en la figura 1.10.

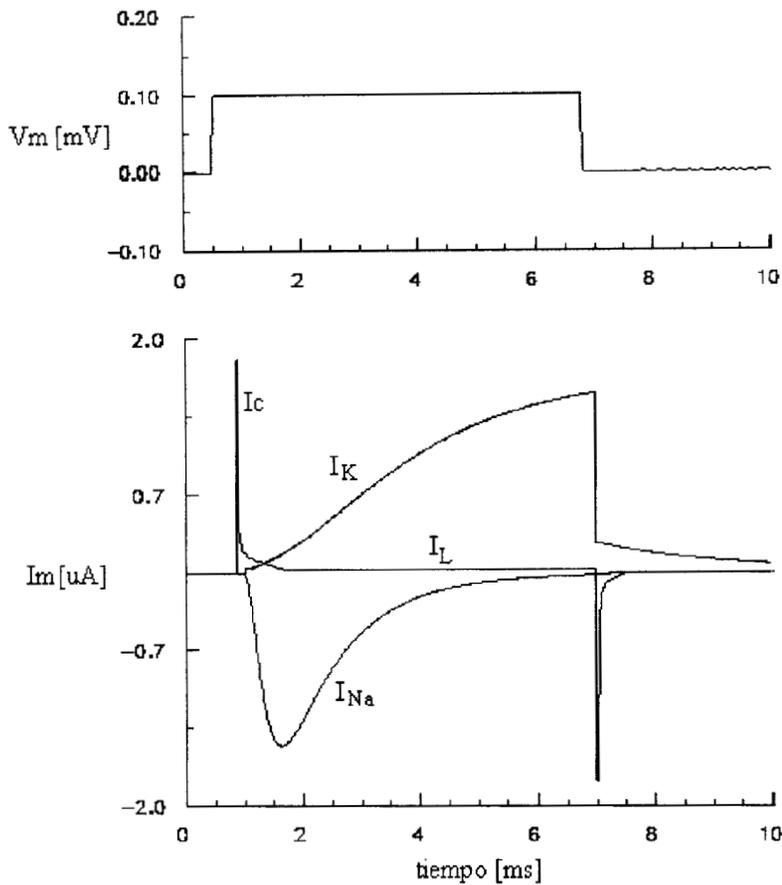


Figura 1.10. Los componentes de la corriente de membrana en fijación de voltaje. (a) pulso de voltaje (potencial de membrana), (b) corriente capacitiva, (c) corriente de  $\text{Na}^+$ , (d) corriente de  $\text{K}^+$  y (e) corriente de fuga.

Hodgkin y Huxley <sup>25,26</sup>, en sus artículos clásicos, identificaron las diferentes especies iónicas que originan la corriente total de la membrana, al reemplazar el ion sodio del medio externo por colina, la cual no atraviesa fácilmente a la membrana. El transiente rápido de corriente saliente, al inicio del pulso de voltaje,

está identificado con la carga de la capacitancia de la membrana. La corriente entrante es generada por iones de  $\text{Na}^+$ , mientras que la corriente saliente retrasada es atribuida a los iones de  $\text{K}^+$ , los cuales se encuentran en grandes concentraciones dentro de la célula. También ha sido identificada una corriente lineal e independiente del tiempo y se le ha llamado corriente de fuga.

Hodgkin y Huxley <sup>25,26</sup> realizaron un estudio muy detallado de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en función del voltaje y el tiempo. Sus resultados fueron expresados en términos matemáticos en un conjunto de ecuaciones diferenciales ahora llamadas ecuaciones de Hodgkin y Huxley <sup>6,7,17,36,37</sup>.

Para una región de la membrana, la corriente total  $I_m$  es la suma de la corriente capacitiva  $I_c$  y la corriente iónica  $I_i$ . Evidencias recientes indican que la capacitancia de la membrana tiene dos componentes <sup>6</sup> : uno que es dependiente del voltaje de la membrana  $C_v(V_m)$  y otro que no depende del voltaje  $C_o$ . De esta manera, la corriente total está dada por

$$I_m = [C_v(V_m) + C_o] \frac{dV_m}{dt} + I_i$$

En la formulación original de Hodgkin y Huxley <sup>6,7,17,36,37</sup>, la capacitancia de la membrana estaba descrita por una constante  $C_m$ . Por lo tanto, la corriente total estaba dada por

$$I_m = C_m \frac{dV_m}{dt} + I_i$$

La corriente iónica está descrita como la suma de tres componentes

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_L$$

donde  $I_{Na}$  es la corriente debida a los iones de sodio,  $I_K$  es la corriente originada por los iones de potasio e  $I_L$  es la corriente de fuga.

#### 1.4.1. La corriente de sodio

La corriente entrante de  $Na^+$  es originada por despolarizaciones que abren los canales de  $Na^+$ .

La tetrodotoxina (TTX), una droga obtenida de un pez, bloquea específicamente los canales de sodio. La TTX bloquea la corriente que pasa a través de los canales de sodio. Se ha encontrado que la TTX, en concentraciones bajas, decrementa la amplitud de la corriente de  $Na^+$  sin afectar la cinética, sugiriendo que la droga está bloqueando algunos canales y otros no. Evidencia disponible indica que cada molécula de TTX reacciona con un solo canal y esta propiedad ha sido utilizada para controlar el número de canales activos en la superficie de la membrana. La saxitonina (STX), tiene una acción similar sobre la corriente de  $Na^+$ , aunque su estructura es diferente <sup>5,6,13,20,26,46,48</sup>.

La corriente de  $Na^+$  producida por un pulso despolarizante tiene una fase sigmoideal rápida, llamada activación, y después una fase que decrece exponencialmente, llamada inactivación <sup>5,6,13,20,26,46,48</sup>, mientras se mantiene la despolarización. La cinética de la activación y la inactivación es dependiente del voltaje y por lo tanto el potencial de la membrana tiene una doble acción en la corriente de  $Na^+$ . La inactivación de la corriente de  $Na^+$  durante una despolarización sostenida puede prevenirse perfundiendo a la célula con la enzima pronasa <sup>6,48</sup>. Bajo estas circunstancias, la corriente de  $Na^+$  sólo se activa y puede observarse una corriente entrante sostenida por varios milisegundos. Si la

despolarización se mantiene durante cientos de milisegundos, la corriente de  $\text{Na}^+$  se inactiva por un proceso diferente llamado inactivación lenta de  $\text{Na}^+$ . Este proceso no es bloqueado por la pronasa.

Hodgkin y Huxley <sup>6,7,17,36,37</sup> expresaron la corriente de  $\text{Na}^+$  como un producto de la conductancia al  $\text{Na}^+$   $g_{\text{Na}}$  y la diferencia de potencial  $V_m - V_{\text{Na}}$ . Cuando se analizan los resultados de experimentos con fijación de voltaje, se ha encontrado que la máxima conductancia de  $\text{Na}^+$  es una función sigmoideal del voltaje que satura a voltajes muy positivos.

La conductancia al  $\text{Na}^+$ ,  $g_{\text{Na}}$ , es una función del voltaje y el tiempo. Hodgkin y Huxley <sup>6,7,17,36,37</sup> dividieron la conductancia al  $\text{Na}^+$  en dos componentes : uno de activación y otro de inactivación. Por simplicidad asumieron que estos componentes son completamente independientes; sin embargo, nuevas evidencias indican que la inactivación está acoplada al proceso de activación.

La conductancia al  $\text{Na}^+$   $g_{\text{Na}}$ , según Hodgkin y Huxley <sup>6,7,17,36,37</sup> está expresada de la siguiente manera

$$g_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} m^3 h$$

donde  $\bar{g}_{\text{Na}}$  es la conductancia total máxima al  $\text{Na}^+$  (es igual al número de canales por la conductancia de un solo canal abierto),  $m^3$  es una función adimensional del tiempo y el voltaje y representa la fracción de los canales que se encuentran en estado activado, y  $1-h$  representa la fracción de canales que están inactivados, por lo que  $h$  representa la fracción de los canales que no se encuentran en estado de inactivación.  $m$  y  $h$  varían entre 0 y 1, y su razón de cambio está dada por una ecuación diferencial ordinaria de primer orden, de la forma

$$\frac{dx}{dt} = (1-x) \alpha_x - \beta_x x$$

donde x puede ser m o h. Las constantes  $\alpha_m$  o  $\alpha_h$  y  $\beta_m$  o  $\beta_h$  son funciones del voltaje de la membrana y adquieren nuevos valores instantáneamente ante cambios en el potencial de membrana.

Una interpretación molecular de estas ecuaciones es que m es la fracción de hipotéticas partículas en la posición correcta para abrir el canal de sodio;  $m^3$  indica que serían tres estas partículas, y representa la fracción de canales activados. Por otra parte, 1-h representa la fracción de otro conjunto de partículas en la posición correcta para bloquear o inactivar los canales. El producto  $m^3h$  proporciona la fracción de canales abiertos.

La corriente de sodio está dada por la expresión

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h (V_m - V_{Na})$$

Cuando la membrana es despolarizada repentinamente (inicio del pulso), m se incrementa exponencialmente y h decrece también exponencialmente, pero con una constante de tiempo mayor. El curso temporal de m, h,  $m^3$  y  $m^3h$  se ilustran en la figura 1.11.

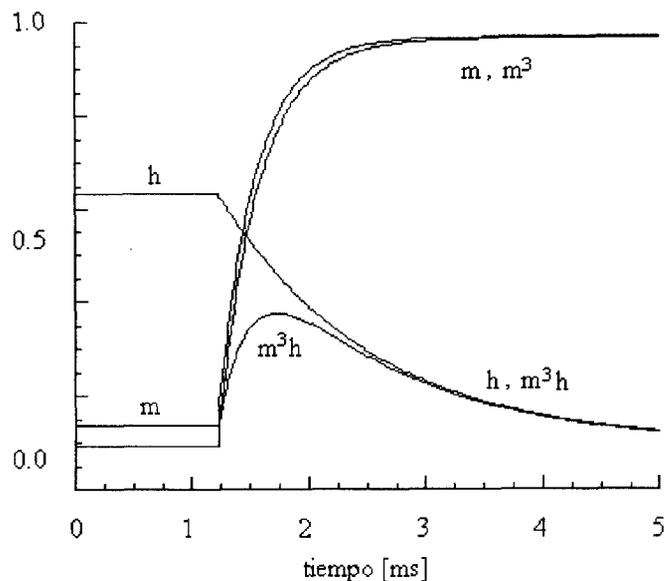


Figura 1.11. Curso temporal de los parámetros de activación e inactivación. Las curvas de líneas continuas muestran el curso temporal de  $m$ ,  $m^3$ ,  $h$  y  $m^3h$ , para una polarización estable de 120 mV desde el potencial de reposo. Nótese el retraso en el inicio de  $m^3$  cuando la membrana se despolariza.

Si el pulso de voltaje se termina abruptamente (final del pulso) y se repolariza al potencial de reposo antes de que la inactivación de los canales de sodio haya reducido la corriente de  $\text{Na}^+$ , puede observarse una corriente entrante que decrece rápidamente (corriente de cola) <sup>6</sup>. Esta corriente fue interpretada como una corriente de  $\text{Na}^+$  que sucede por el aumento del factor  $(V_m - V_{\text{Na}})$  y no cierra instantáneamente los canales al repolarizar. Esta corriente posteriormente decrece, porque el parámetro de activación  $m$  regresa a su condición de reposo. Nótese que  $m$  decrece más lentamente que  $m^3h$ .

#### 1.4.2. La corriente de potasio

La corriente saliente retrasada de la figura 1.10, es atribuída a los iones de potasio<sup>6,13,24,25,26,34,44,45,46</sup>. Esta corriente de K<sup>+</sup> tiene un retardo más largo y una subida más lenta que en la corriente de Na<sup>+</sup>. Para el caso de las fibras nerviosas, la corriente de K<sup>+</sup> no presenta inactivación. Sin embargo, en fibras musculares se ha encontrado la existencia de una fase de inactivación para esta corriente<sup>24</sup>.

La descripción formal de la corriente de K<sup>+</sup>, propuesta por Hodgkin y Huxley<sup>6,7,17,36,37</sup>, es muy similar a la descripción de la corriente de Na<sup>+</sup>, excluyendo el parámetro de inactivación y elevando el parámetro de activación a la cuarta potencia para lograr el retardo pronunciado de la corriente de K<sup>+</sup>. La expresión para esta corriente está dada por

$$I_K = \bar{g}_K n^4 (V_m - V_K)$$

donde todos los términos tienen significados análogos a los de la corriente de Na<sup>+</sup>. El parámetro n está dado por la ecuación diferencial, donde se sustituye n por x. V<sub>Na</sub> y V<sub>K</sub> son los potenciales de equilibrio o inversión de sodio y potasio, respectivamente.

Hasta ahora no se ha encontrado una droga que bloquee la corriente de K<sup>+</sup> de manera selectiva como el TTX bloquea los canales de sodio<sup>6</sup>. El tetraetilamonio (TEA), no tiene efecto cuando es aplicado fuera de la célula, pero puede bloquear la corriente de K<sup>+</sup> cuando es aplicado en el interior, afectando su cinética al tapar un canal de potasio abierto<sup>6</sup>. El mismo mecanismo fue propuesto para algunos derivados del TEA, los cuales producen bloqueo e inducen un proceso parecido a la inactivación de corriente de K<sup>+</sup>. Los efectos de los

compuestos derivados de TEA han sido demostrados también en el nodo de Ranvier <sup>6</sup>.

#### 1.4.3. La corriente de fuga

Hodgkin y Huxley <sup>6,7,17,36,37</sup> encontraron que las corrientes de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> no eran suficientes para explicar toda la corriente iónica y definieron una corriente de fuga que no tiene selectividad específica y no depende del voltaje ni del tiempo <sup>6</sup>. Esta corriente está descrita por la ecuación

$$I_L = g_L (V_m - V_i)$$

donde  $g_L$  es la conductancia de fuga y  $V_L$  es el potencial de equilibrio de la corriente de fuga.  $g_L$  y  $V_L$  son constantes. Sin embargo, Adelman y Taylor <sup>6</sup> encontraron que  $g_L$  es una función del potencial de membrana y este hecho ha sido confirmado en experimentos de movimiento de carga y corrientes de compuerta.

#### 1.4.4. La corriente de calcio

La existencia de permeabilidad al Ca<sup>++</sup> en células excitables, ha sido observada desde hace aproximadamente 40 años <sup>9,19,40,42,46,51</sup>. Los canales de calcio juegan un papel crucial en el acople de la excitación de la membrana con las respuestas celulares, tales como la secreción o la contracción <sup>9,19,40,42,46,51</sup>. Los canales de calcio son frecuentemente modulados por hormonas o por neurotransmisores. Se sabe que los canales de calcio son poros, capaces de transferir millones de iones por segundo, que tienen propiedades dependientes

del voltaje claramente distinguibles de las bombas o mecanismos de intercambio iónico.

La activación de la corriente de  $\text{Ca}^{++}$  se refiere a la apertura de los canales de calcio en respuesta a una despolarización. En muchos tejidos, la activación se aproxima a un nivel estable unos milisegundos después del pulso de despolarización, antes de que ocurra la inactivación. El máximo nivel de activación depende del nivel de la despolarización <sup>9,19,40,42,46,51</sup>.

La inactivación se refiere al declive en la conductancia al  $\text{Ca}^{++}$ , apreciable en muchas células excitables durante una despolarización mantenida. Cuando esto ocurre, la inactivación de los canales de calcio es mucho más lenta que la activación. La inactivación de los canales de calcio puede verse no solo como una relajación de la corriente de  $\text{Ca}^{++}$  durante una despolarización, sino también como una depresión del pico de la corriente de  $\text{Ca}^{++}$  durante una despolarización subsecuente <sup>9,19,40,42,46,51</sup>.

#### 1.4.5. Movimiento de carga

Una de las características relevantes de la permeabilidad iónica de las membranas excitables, es su dependencia del voltaje. Hodgkin y Huxley<sup>6,7,17,36,37</sup> encontraron que la conductancia al  $\text{Na}^+$  tiene una dependencia de voltaje muy fuerte, en una región muy cercana al potencial de reposo. Ellos propusieron que los grupos cargados o dipolos, en la membrana, se mueven como resultado de cambios en el campo eléctrico y que este movimiento de carga es el responsable de la apertura y cierre de los canales, por algún cambio conformacional aun no especificado <sup>1,2,3,6,14,29</sup>. La cantidad de carga requerida para producir relaciones funcionales de conductancia contra potencial de membrana, puede estimarse con ayuda de un modelo muy simple <sup>1,2,3,6,14,29</sup>. En este modelo se asume que cierta cantidad de carga está asociada con cada canal, y la posición de la carga

determina si el canal está abierto o cerrado. Supóngase que la carga móvil tiene sólo dos posiciones estables. La ecuación cinética que gobierna la transición entre las dos posiciones estables es :



donde  $Q1$  y  $Q2$  son la cantidad total de carga en la posición 1 y 2, respectivamente.  $\alpha$  y  $\beta$  son constantes de velocidad.

La razón de cambio de  $Q2$  está dada por la ecuación diferencial :

$$\frac{dQ2}{dt} = \alpha Q1 - \beta Q2$$

Si se define la carga total como  $Q_T$

$$Q_T = Q1 + Q2$$

entonces, podemos escribir la ecuación diferencial como

$$\frac{dQ2}{dt} = \alpha (Q_T - Q2) - \beta Q2$$

$\alpha$  y  $\beta$  son funciones del voltaje a través de la membrana y conforme la membrana se despolariza,  $\alpha$  se incrementa y  $\beta$  decrece.

Las expresiones para  $\alpha$  y  $\beta$  están dadas por :

$$\alpha = A \exp\left(\frac{e z l (E - E_0)}{2 k T}\right)$$

$$\beta = A \exp\left(\frac{-e z l (E - E_0)}{2 k T}\right)$$

La constante A incluye la temperatura T, las constantes de Boltzmann y Planck, y un coeficiente de transmisión, el cual no necesita especificarse en detalle para la presente discusión. E es el campo eléctrico a través de la membrana, l la distancia que se mueve la carga, z la valencia del grupo cargado y e es la carga electrónica. E<sub>0</sub> es el campo al cual las dos constantes,  $\alpha$  y  $\beta$ , son iguales.

Si el campo es constante a través de la membrana y se asume que la carga se mueve a través de todo el espesor de la membrana, se puede reemplazar el producto E l por V<sub>m</sub>, el potencial de membrana.

La solución de la ecuación diferencial, que satisface las condiciones iniciales Q<sub>2</sub> = Q<sub>0</sub> en t = 0, es :

$$Q_2 = Q_\infty - (Q_\infty - Q_0) e^{-(\alpha + \beta) t}$$

donde

$$Q_\infty = Q_T \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

En estado estable, la solución de la ecuación diferencial es

$$Q_2 = \frac{Q_T}{1 + \exp(-ze(V_m - V_o/kT))}$$

La corriente producida por este movimiento de carga esta definida como

$$I = \frac{dQ_2}{dt} = (\alpha + \beta)(Q_\infty - Q_0)e^{-(\alpha + \beta)t}$$

que es una simple exponencial que decae con una constante de tiempo igual a  $(\alpha + \beta)^{-1}$

Hodgkin y Huxley <sup>6,7,17,36,37</sup> no detectaron esta corriente. Los primeros en reportarlo fueron Armstrong y Bezanilla <sup>5</sup>, y más tarde Keynes y Rojas <sup>6</sup>.

El movimiento de carga está confinado a la membrana y consecuentemente, se comporta como una corriente capacitiva <sup>1,2,3,6,14,29,31,32,33,35</sup>. De la ecuación para Q<sub>2</sub> puede verse que la carga se mueve como una función no lineal del voltaje <sup>1,2,3,6,14,29</sup>.

El movimiento de carga puede ser, cualitativamente, similar a las corrientes de compuerta registrados en axón de calamar <sup>5,50</sup>, las cuales juegan un papel muy importante en la activación de los canales de sodio. Sin embargo, cuantitativamente, las diferencias son claras. En músculo, la cantidad de carga por cm<sup>2</sup> de membrana (superficie + sistema T) es aproximadamente tres veces la registrada en axón de calamar, y el curso temporal es de 20 a 100 veces más lento <sup>50</sup>. Esto hace improbable que el movimiento de carga en músculo pudiera estar ligado al movimiento de la compuerta en los canales de sodio <sup>50</sup>.

Aunque el papel fisiológico del movimiento de carga, en el músculo, se desconoce, hay algunas propiedades que sugieren que este movimiento está ligado estrechamente con el acople excitación-contracción <sup>2,4,9,10,27,30,38,47,50</sup>.

Dichas propiedades son :

1) El rango del potencial de membrana en el cual ocurre el movimiento de carga, es el rango en el cual muchas de las propiedades eléctricas y mecánicas del músculo están fuertemente reguladas. 2) El movimiento de los grupos cargados, desde una posición en el reposo hacia una nueva posición durante la despolarización, y el regreso a la posición original durante la repolarización, podría involucrar un movimiento de algunos Armstrongs. Este movimiento correspondería al inicio y final de un movimiento molecular.

Estas propiedades permiten suponer que el movimiento de carga, en el musculo, es factor importante en la liberación de iones de  $Ca^{++}$  y en el acople excitación-contracción <sup>2,4,9,10,19,27,30,38,40,42,47,50</sup>.

Se ha descrito anteriormente la cinética de los diferentes fenómenos que se registran a nivel de la membrana celular. También se manifestó la importancia de una medición precisa de estos eventos. La técnica de fijación de voltaje resulta muy útil para estos propósitos.

El método de fijación de voltaje utilizado, varía de acuerdo a los diferentes tipos celulares.

Para el caso de fibras musculares esqueléticas, se ha utilizado un sistema de fijación de voltaje presentado por Hille y col <sup>24</sup>. en 1976, sin que hasta la fecha se le hayan realizado cambios sustanciales.

El presente trabajo presenta un sistema de fijación de voltaje con dos sellos de vaselina, para fibras musculares esqueléticas, que ofrece ventajas sobre los sistemas descritos anteriormente en la literatura.

## 2. SISTEMA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE CON DOS SELLOS DE VASELINA

Uno de los diseños de fijación de voltaje más utilizados para el caso de fibras musculares esqueléticas, es el presentado por Hille y Campbell<sup>24</sup> en 1976. En este sistema se emplean segmentos de fibras musculares que, al estar cortados por sus extremos, permiten mantener una continuidad eléctrica hacia el interior celular, así como controlar su contenido iónico. Un diagrama a bloques de dicho sistema, se presenta en la figura 2.1.

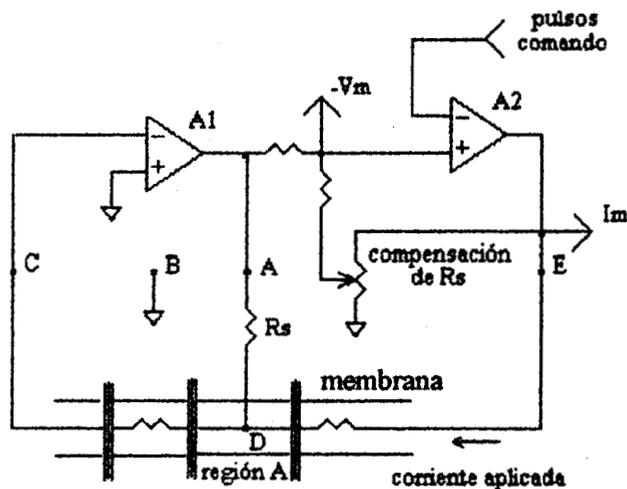


Figura 2.1. Diagrama a bloques del sistema de fijación de voltaje presentado por Hille en 1976. El amplificador A1 mide el potencial transmembranal y mantiene en tierra virtual el punto D. El amplificador A2 compara el voltaje del pulso comando con el voltaje de salida de A1 e inyecta una corriente  $I_m$  al interior de la fibra muscular (punto D).

Este sistema utiliza tres sellos de vaselina. El amplificador A1 mantiene el interior de la fibra en tierra virtual (puntos D y C). Idealmente, no hay flujo de corriente en la fibra a la izquierda del punto D. Se considera que el potencial de reposo en la membrana muscular es de aproximadamente -90 mV. El sistema tiene un control para ajustar el potencial de mantenimiento hasta que el voltaje en

la región A sea de 90 mV. Cuando se inyecta una corriente  $I_m$  en la región E, ésta fluye a través de la membrana muscular en la región A. Si se aplica un pulso comando con un estimulador en el amplificador A2, se inyecta una corriente al interior de la fibra muscular (punto E), cambiando el potencial transmembranal al valor del pulso comando. En este sistema, la eliminación de corrientes capacitivas se realiza posteriormente a todo el proceso de fijación de voltaje.

Sin embargo, este diseño presenta algunas desventajas :

1. La eliminación de los transiente capacitivos es sólomente cosmética, obligando a una amplificación de la señal en varias etapas, para evitar la saturación de los amplificadores operacionales, con lo cual se degrada la relación señal a ruido.
2. La compensación de la resistencia en serie se ve limitada, ya que cada etapa de amplificación agrega una constante de tiempo de respuesta que tiende a generar una mayor inestabilidad por la retroalimentación positiva del circuito de compensación.
3. La velocidad de la respuesta y la fidelidad del sistema de fijación de voltaje, también se ven limitadas por la resistencia  $R_s$ , a través de la cual se inyecta corriente a la membrana.

## 2.1. Primera versión

El sistema de fijación de voltaje y corriente propuesto se ha diseñado para la medición y registro de fenómenos en la membrana de fibras musculares esqueléticas (corrientes iónicas, corrientes capacitivas lineales y no lineales y potenciales de acción). Este sistema utiliza únicamente dos sellos de vaselina.

Más adelante se describirá la disección de la fibra, así como su montaje en la camarilla experimental y la colocación de los sellos de vaselina.

El sistema se ha implementado con amplificadores operacionales LF353, que se eligieron por las siguientes características <sup>28, 43, 49</sup> :

- entrada FET
- bajo nivel de ruido
- alta ganancia
- amplio ancho de banda
- no requiere ajuste de dc

Los circuitos necesarios para lograr este sistema, se construyeron con resistores de carbono con tolerancia de 1 %, y capacitores de cerámica con tolerancia de 10 %. Los potenciómetros son de 10 vueltas.

Las primeras versiones del sistema no incluyen la etapa de fijación de corriente. Esta versión se ilustra mediante un diagrama a bloques en la figura 2.2. Como parte del desarrollo, después de la simulación se realizaron pruebas sobre el circuito real, para cotejar los resultados teóricos con los experimentales.

Los resultados presentados de las pruebas realizados sobre el sistema real de fijación de voltaje, corresponden únicamente a la primera versión (para ilustrar el inicio de este trabajo), así como a la última (para mostrar el mejor diseño y su funcionamiento) y a la que incluye fijación de corriente. Los resultados de las versiones intermedias no se presentan, ya que estas versiones solo son parte de la evolución natural del presente trabajo.

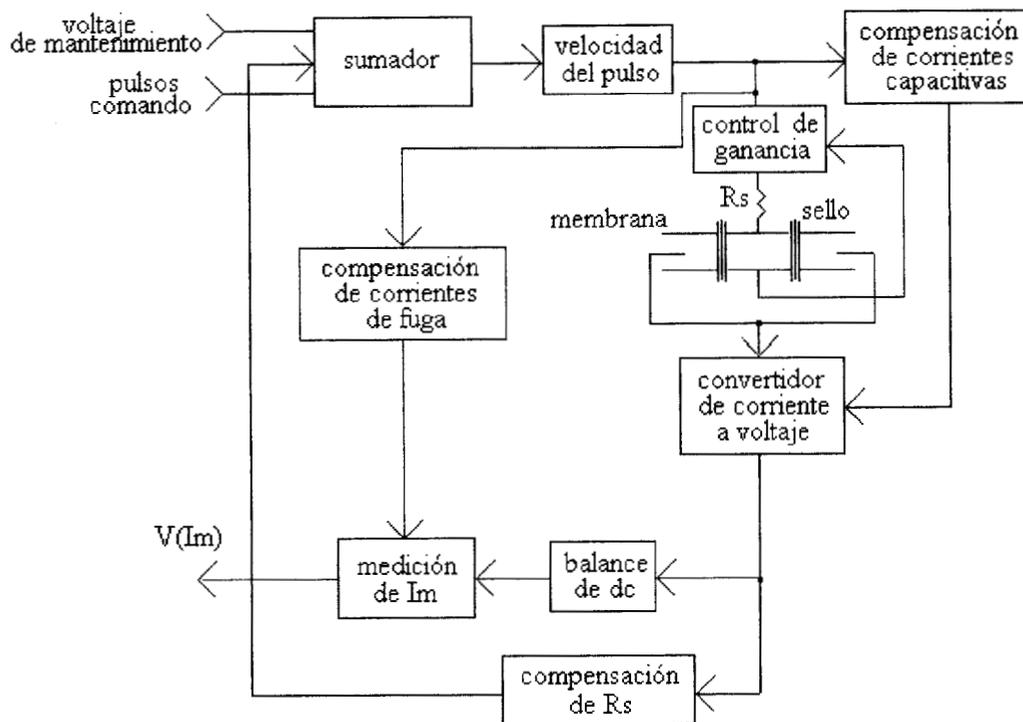


Figura 2.2. Diagrama a bloques de la primera versión del sistema de fijación de voltaje. Esta versión consta de nueve etapas.

Este diagrama está compuesto por nueve bloques. La primera etapa consta de un sumador, en el cual se suma el voltaje de los pulsos comando y un voltaje para ajustar el nivel de dc introducido por los elementos del circuito. Éste último voltaje se emplea para asegurar que cuando no se aplican pulsos comando, el voltaje de membrana sea igual a cero. También se suma una fracción del voltaje proporcional a la corriente de membrana, para compensar los efectos introducidos por la resistencia en serie.

Para disminuir el nivel de dc y el ruido que normalmente presentan los estimuladores o las tarjetas de conversión digital/analógico, el pulso de estimulación es dividido 10 veces. De esta manera, si se aplica un pulso comando de 1 V, la fibra muscular siente en realidad un pulso de 100 mV.

Por otra parte, como los pulsos de estimulación vienen acompañados por

espigas que se presentan al inicio y final, en el siguiente bloque se emplea un filtro pasa bajas para eliminar dichas espigas y para disminuir la velocidad del pulso comando, evitando con ello pequeñas oscilaciones en el sistema de fijación de voltaje. Esto permite atenuar las espigas de las corrientes capacitivas que pudieran saturar al convertidor de corriente a voltaje.

La salida de la segunda etapa es conducida, por una parte, a un bloque de eliminación de corrientes capacitivas. Este bloque consta de dos filtros pasabajas, los cuales, gracias a un ajuste fino de la frecuencia de corte y al acoplar su salida a un capacitor, generan corrientes capacitivas de constante de tiempo variable. La señal generada en este bloque es de signo opuesto al de la corriente capacitiva originada en la membrana y ambas se suman, alegebraicamente, a la entrada del convertidor de corriente a voltaje. Este hecho es muy importante, ya que con ello se amplía el ancho de banda de la respuesta del sistema. En esta primera versión, se utilizan sólo dos constantes de tiempo, con lo cual se elimina únicamente el transiente capacitivo más rápido y de mayor amplitud, y las componentes en frecuencia más cercanas a este primer transitorio.

La salida de la segunda etapa también alimenta al bloque de compensación de corrientes de fuga. En esta etapa se pretende eliminar un nivel de dc introducido por las corrientes que se fugan a través de los sellos y por los componentes resistivos de la membrana. La salida de esta etapa se aplica en un bloque donde se proporciona a la salida un voltaje proporcional a la corriente de la membrana, que es en realidad el sitio en donde monitoreamos la corriente de membrana.

En esta primera versión, se cuenta con una etapa que controla la ganancia del sistema, manteniendo la idea del modelo básico de fijación de voltaje. Ya se ha comentado que una mejor fijación del voltaje depende de una mayor ganancia.

Posteriormente se encuentra la etapa del convertidor de corriente a voltaje.

Debe notarse que con este convertidor se logra fijar el potencial interno de la célula al nivel del potencial de reposo (potencial de mantenimiento), y esta situación se mantiene durante todo el experimento. A esta etapa llega la suma de un dc para compensar el voltaje introducido por los electrodos (lo que se conoce como balance de los electrodos) y un potencial que sirve para llevar a la célula a niveles determinados de voltaje (lo que se llama potencial de mantenimiento).

La importancia de la compensación de la resistencia en serie es que, de no hacerse, el voltaje real que llega a la fibra es menor que el aplicado en la primera etapa del sistema. Dado que los efectos de la resistencia en serie se hacen presentes cuando las corrientes que se aplican a la célula fluyen por  $R_s$ <sup>7</sup>, se toma el voltaje que entrega el convertidor, como resultado de la corriente de la membrana, y se escala por medio de un potenciómetro, antes de sumarlo en la primera etapa. De esta manera, el voltaje utilizado para la compensación tiene el mismo comportamiento temporal que la corriente de la membrana. Al realizar este arreglo, el circuito constituye un sistema de retroalimentación positiva.

El circuito completo de la primera versión del sistema de fijación de voltaje, se presenta con detalle en la figura 2.3.

### 2.1.1. Análisis

Para realizar el análisis del sistema de fijación de voltaje, se escribirán las ecuaciones de salida para cada uno de los amplificadores, dejándose indicados estos valores a lo largo del desarrollo.

La etapa del sumador, tiene como ecuación para el voltaje de salida  $V_{A1}$

$$V_{A1} = -\left(\frac{R_2}{R_6}\right)(V_{dc} + PC + FV_{Rs})$$

$$R_2 = R_3 = R_4$$

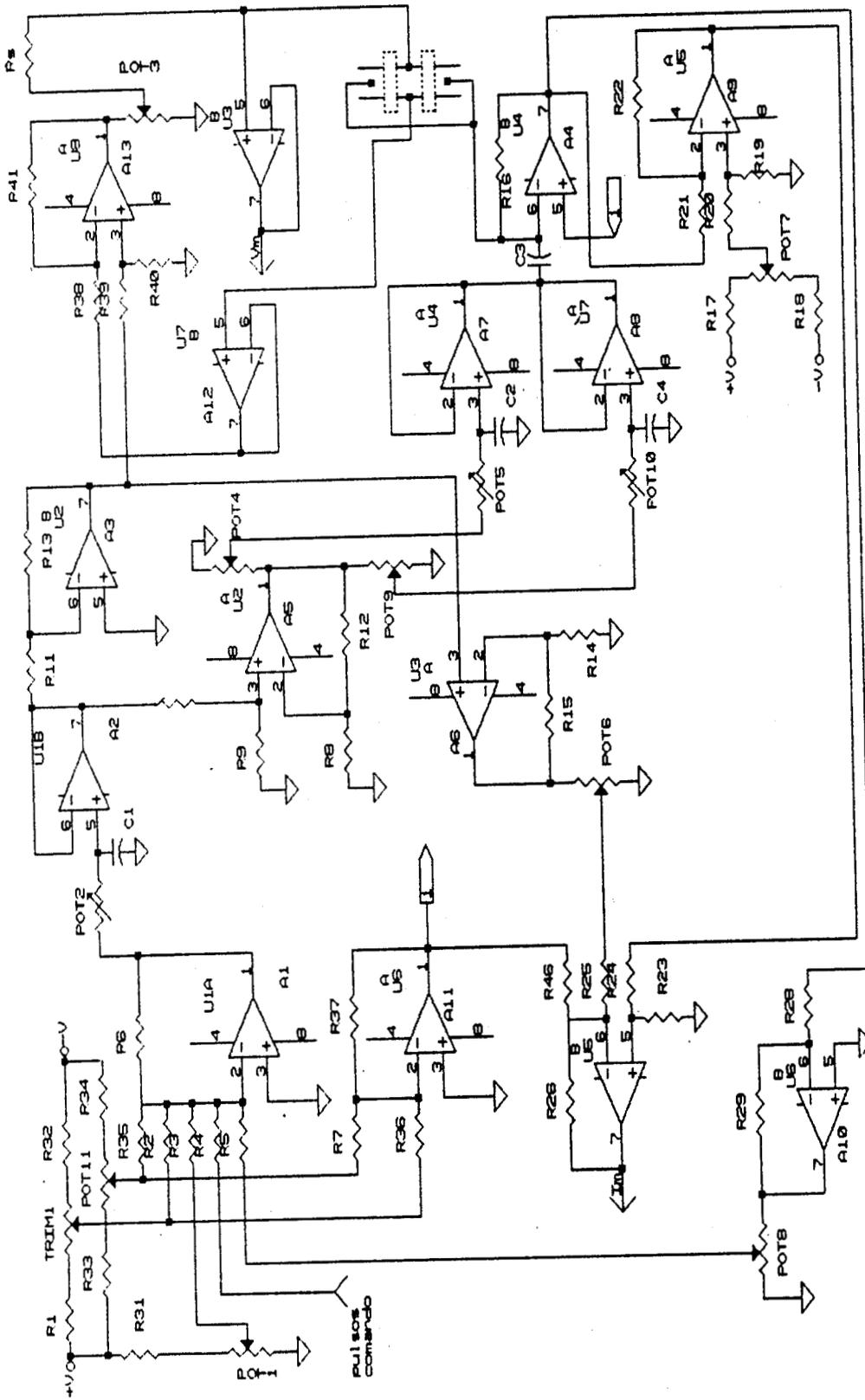


Figura 2.3. Circuito eléctrico de la primera versión de sistema de fijación de voltaje diseñado para dos sellos de vaselina.

donde  $V_{dc}$  es el voltaje aplicado para compensar el nivel de dc introducido por los elementos activos del circuito; PC es el voltaje de los pulsos comando y  $FV_{Rs}$  es una fracción del voltaje proporcionado para compensar la resistencia en serie.

A la salida del amplificador A2 el voltaje es

$$V_{A2} = \left( \frac{1}{1 + SCIR_{P2}} \right) V_{A1}$$

$R_{P2}$  es la resistencia del potenciómetro 2. La salida  $V_{A2}$  corresponde a un filtro pasa bajas, con frecuencia de corte igual a  $(R_{P2}C1)^{-1}$

Siguiendo con el análisis del circuito, la salida del amplificador A3 está dada por

$$V_{A3} = - \left( \frac{R13}{R11} \right) V_{A2}$$

Para el amplificador A11 la ecuación resultante es

$$V_{A11} = - \left( \frac{R36}{R37} \right) (V_{mtto} + V_{Ba1})$$

$$R7 = R36$$

La salida del amplificador A5 está dada por la ecuación

$$V_{A5} = \left( 1 + \frac{R12}{R8} \right) \left( \frac{R9}{R9 - R10} \right) V_{A2}$$

El amplificador A12 entrega a la salida el voltaje de la membrana  $V_m$ , el cual es retroalimentado, vía el amplificador que controla la ganancia, para lograr

una mejor fijación de voltaje.

$$V_m = V_{A3}$$

El amplificador A7 está configurado como un circuito pasa bajas, cuya ecuación es

$$V_{A7} = \left( \frac{1}{1 + SC2R_{P5}} \right) FV_{A5}$$

donde  $R_{P5}$  es la resistencia del potenciómetro 5;  $FV_{A5}$  es una fracción del voltaje que entrega a la salida el amplificador A5. Esta fracción está determinada por el potenciómetro 4. La frecuencia de corte de este filtro es  $(R_{P5}C2)^{-1}$

De manera similar, el amplificador A8 está configurado como filtro pasa bajas; por lo tanto, el voltaje de salida para el amplificador A8 es

$$V_{A8} = \left( \frac{1}{1 + SC4R_{P10}} \right) FV_{A5}$$

donde  $R_{P10}$  es la resistencia del potenciómetro 10;  $FV_{A5}$  es una fracción del voltaje que entrega el amplificador A5. Esta fracción está determinada por el potenciómetro 9. La frecuencia de corte de este filtro es  $(R_{P10}C4)^{-1}$

A la entrada del convertidor de corriente a voltaje, la corriente es

$$I_T = I + I_c$$

donde  $I_T$  es la corriente total que ingresa al convertidor;  $I$  es la corriente que se obtiene al aplicar un pulso de voltaje  $FV_{A13}$  a la fibra (o al modelo, en su momento) e  $I_c$  es la corriente capacitiva obtenida a partir del voltaje entregado por

los amplificadores A7 y A8.

De esta manera, a la salida del amplificador A4 (convertidor de corriente a voltaje) se tiene

$$V_{A4} = -(I_T R_{16} - V_{A11}) = -((I + I_c) R_{16} - V_{A11})$$

pero

$$I_c = C3 \left( \frac{dV_{A7}}{dt} + \frac{dV_{A8}}{dt} \right)$$

por lo tanto

$$V_{A4} = V_{A11} - \left( I + C3 \frac{dV_{A7}}{dt} + C3 \frac{dV_{A8}}{dt} \right) R_{16}$$

Nótese que  $V_{A3}$  es de signo opuesto a  $V_{A5}$ , por lo que en realidad, a la entrada del convertidor de corriente a voltaje, las corrientes  $I$  e  $I_c$  se están restando.

Para el amplificador A6

$$V_{A6} = \left( 1 + \frac{R_{15}}{R_{14}} \right) V_{A3}$$

En la salida del amplificador A9, la señal está determinada por

$$V_{A9} = \left( \frac{R_{19}}{R_{19} + R_{20}} \right) \left( 1 + \frac{R_{22}}{R_{21}} \right) V_{cte} - \left( \frac{R_{22}}{R_{21}} \right) V_{A4}$$

$V_{cte}$  es un voltaje constante, utilizado para compensar un nivel de dc que va acumulándose en cada etapa del sistema.

La ecuación para  $I_m$ , que en realidad es un voltaje proporcional a la corriente de la membrana, es

$$V(I_m) = R_{26} \left( V_{A9} \frac{R_{Pz}}{R_{Pz} + R_{24}} \right) \left( \frac{1}{R_{25}} + \frac{1}{R_{26}} + \frac{1}{R_{46}} \right) - \left( \frac{1}{R_{25}} FV_{A6} + \frac{1}{R_{46}} V_{A11} \right)$$

donde  $FV_{A6}$  es una porción del voltaje entregado por el amplificador A6. Esta fracción está dada por el potenciómetro 6.  $R_{Pz}$  es la resistencia presentada por el potenciómetro z.

Para compensar la resistencia en serie se utiliza una porción del voltaje proporcionado por el amplificador A10, cuya ecuación es

$$V_{Rs} = - \left( \frac{R_{29}}{R_{28}} \right) V_{A4}$$

Finalmente, la ecuación para el voltaje entregado por el amplificador A13, el cual sirve para determinar la ganancia del sistema de fijación de voltaje, es

$$V_{A13} = \frac{R_{41}}{R_{38}} V_{A12} - \left( \frac{R_{40}}{R_{39} + R_{40}} \right) \left( 1 + \frac{R_{41}}{R_{38}} \right) V_{A3}$$

### 2.1.2. Simulación

Para probar el sistema de fijación de voltaje, se utilizaron modelo eléctricos que simulan el comportamiento de la membrana celular y los sellos de vaselina.

El primer modelo empleado para la caracterización del sistema de fijación de voltaje, es muy similar al empleado por Hille <sup>24</sup> en su sistema con tres sellos de vaselina. Dicho modelo se presenta en la figura 2.4.  $R_s$  es la resistencia en serie,

resistencia en serie,  $R_g$  representa la resistencia que ofrecen los sellos de vaselina,  $R_m$  y  $C_m$  son la resistencia y la capacitancia de la membrana, respectivamente,  $R_a$  es la resistencia axial de una fibra cilíndrica (de acuerdo con la teoría de cable) y  $R_i$  es la resistencia interna de la fibra muscular <sup>7, 36, 37</sup>.

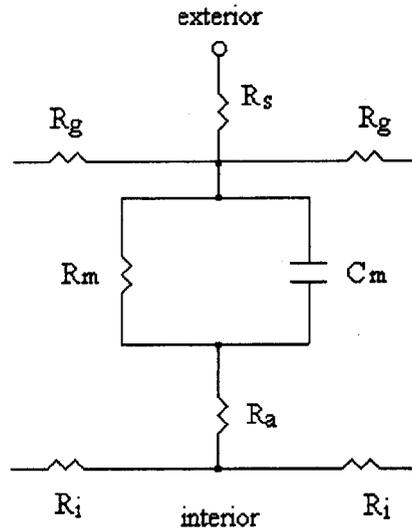


Figura 2.4. Modelo de membrana y fibra muscular bajo dos sellos de vaselina, similar al propuesto por Hille y Campbell.  $R_s$  es la resistencia en serie,  $R_g$  representa la resistencia que ofrecen los sellos de vaselina,  $R_m$  y  $C_m$  son la resistencia y la capacitancia de la membrana, respectivamente,  $R_a$  es la resistencia axial de una fibra cilíndrica y  $R_i$  es la resistencia interna de la fibra muscular.

Al aplicar pulsos comando a este modelo, se observó, cualitativamente, que la velocidad de respuesta del sistema es superior a la reportada por otros autores. Esto se puede ver en el curso temporal del voltaje y la corriente de la membrana.

Se pensó que dicha superioridad se debía, en parte, a la escasa complejidad del modelo de fibra muscular empleado. Este hecho propició que se utilizara un modelo más complejo. El modelo utilizado posteriormente, es el propuesto por Chandler y Hui<sup>11</sup>, el cual considera también las propiedades

capacitivas de la fibra bajo el sello de vaselina, a diferencia del modelo utilizado anteriormente. Este modelo puede verse en la figura 2.5.

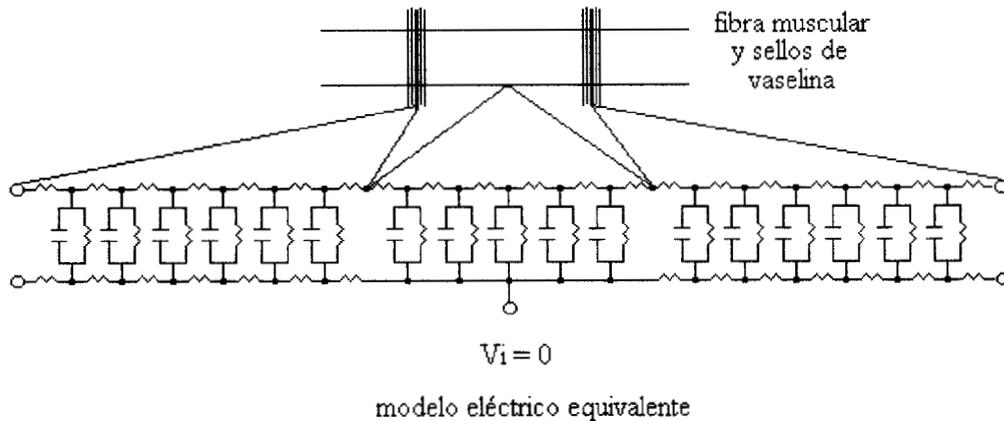


Figura 2.5. Modelo de membrana y fibra muscular propuesto por Chandler. En la región bajo sello de vaselina, cada circuito RC simula  $50 \mu\text{m}$  de longitud de fibra. En la región aislada, cada circuito RC simula  $100 \mu\text{m}$  de longitud de fibra.

Antes de realizar modificaciones sobre esta primera versión, se realizaron varias simulaciones para caracterizar el comportamiento del sistema ante diversas condiciones. La simulación se llevó a cabo en una computadora personal con un procesador 80486 a 40 MHz. El programa utilizado para este fin, es el Microcap II versión 4.51 de Spectrum.

Con esta herramienta, se pudo corroborar que el sistema diseñado es más rápido que otros sistema, además de que se realizaron cambios en la versión original, con la certeza de que los cambios propuestos proporcionaban un mejor comportamiento en el sistema de fijación de voltaje.

Al realizar las simulaciones, empleando el modelo de fibra muscular propuesto por Chandler <sup>11</sup>, se registraron las siguientes cuatro características :

- velocidad del pulso comando,
- compensación de la resistencia en serie,

- resta de componentes capacitivos y
- compensación de la corriente de fuga.

El diseño también permite la compensación de los niveles de dc que están presentes en el sistema.

La simulación se llevó a cabo con el siguiente protocolo de pulsos de estimulación.

- pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.
- $V_{mtto}$  0 V,  $V_{Bal}$  0 V

En este caso, el voltaje de mantenimiento es igual a cero, puesto que el modelo sólo simula las propiedades pasivas de la membrana. El voltaje de mantenimiento se aplica cuando se llevará a la célula a un estado en el que las propiedades de la membrana han cambiado.

La velocidad del pulso comando está determinada por una constante de tiempo variable, la cual limita la frecuencia del pulso de estimulación. Para observar el comportamiento del equipo a diferentes velocidades del pulso comando, se compensó la corriente de fuga. La figura 2.6. presenta la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando el sistema opera con el 20 % de la ganancia. En la figura 2.7 se muestra la respuesta a velocidad máxima. Al variar la velocidad entre los valores máximo y mínimo, se aprecia en la respuesta un cambio en amplitud y una variación en los componentes de frecuencia.

La compensación de la resistencia en serie es una de las características más importantes de este equipo. La compensación lograda se obtiene con la disposición del lazo de retroalimentación, que resulta ser diferente a la propuesta

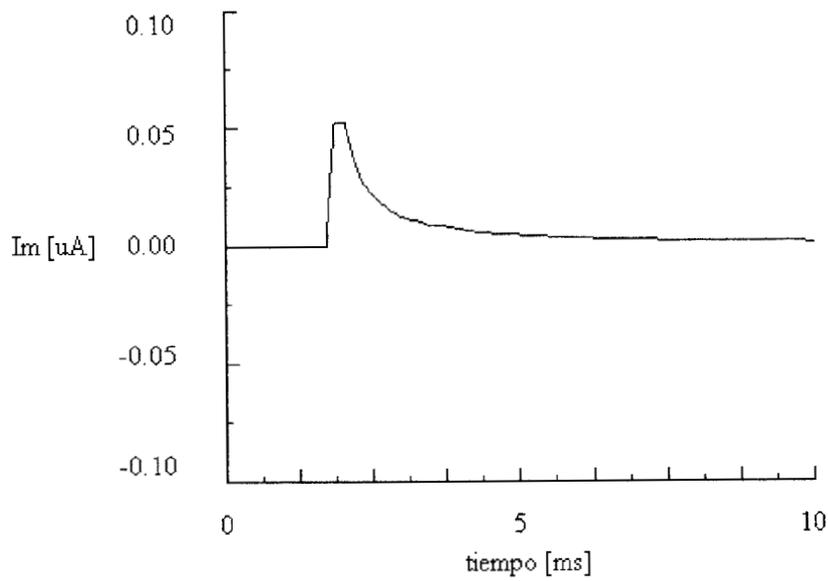


Figura 2.6. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada y la ganancia del sistema es del 20%.

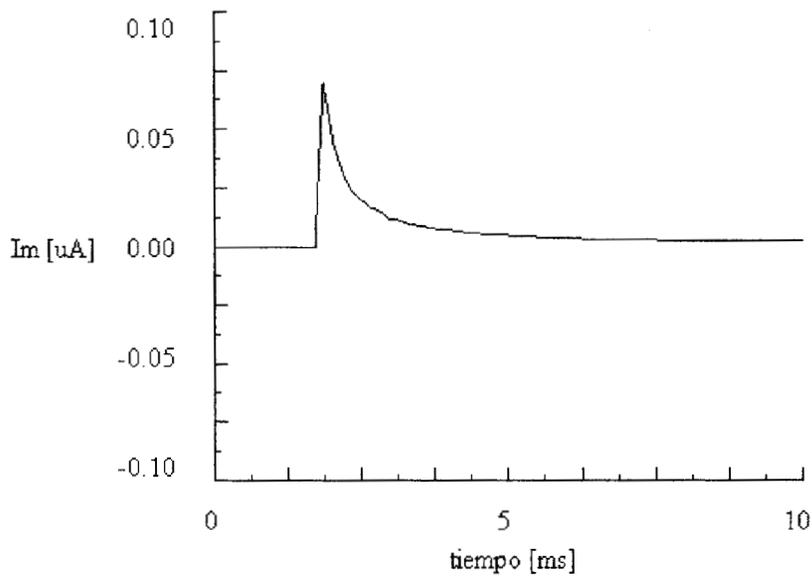


Figura 2.7. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la máxima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada y la ganancia del sistema es del 20%.

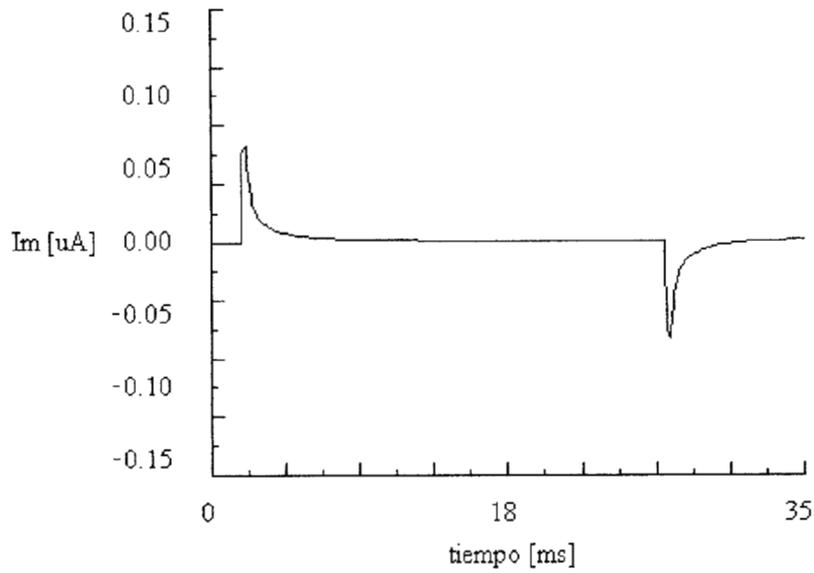


Figura 2.8. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, la ganancia del sistema es del 20% y se compensa la resistencia en serie.

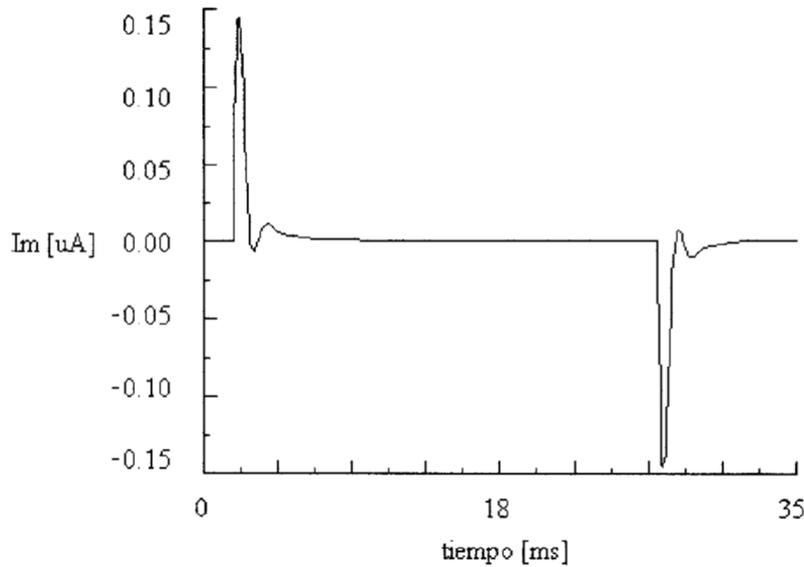


Figura 2.9. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, la ganancia del sistema es del 20% y la resistencia en serie está sobrecompensada.

en otros trabajos. El rango de compensación varía con respecto a la velocidad del pulso. Los datos graficados se obtuvieron utilizando la velocidad mínima del equipo. Las señales medidas para reportar los niveles de compensación se tomaron a la salida del amplificador A1 (pulso comando dividido entre 10) y a la entrada de la fibra muscular (en este caso representada a través de un modelo eléctrico).

La compensación óptima se encuentra en el punto anterior al momento en donde el equipo comienza a oscilar, como se aprecia en la figura 2.8. Al compensar la resistencia en serie, se recupera gran parte de la magnitud del pulso comando. En la figura 2.8. puede apreciarse cómo al compensar la resistencia en serie, incrementa la magnitud de los transientes capacitivos.

En la figura 2.9. puede verse que cuando se sobrecompensa la resistencia en serie, se recupera la totalidad de la magnitud del pulso comando, pero se introduce inestabilidad al sistema.

La compensación de los transientes capacitivos no se realiza a la salida del equipo. Por esta razón, es posible efectuar la eliminación de estos componentes sin tener que recurrir a la creación de una señal analógica que asemeje el comportamiento capacitivo de la membrana celular y de los sellos de vaselina, para después restarla de la señal en estudio.

Puede apreciarse en la figura 2.10. que la compensación elimina gran parte de los componentes de alta frecuencia. La primera constante de tiempo utilizada en esta versión, permite la eliminación del transiente capacitivo más rápido y de mayor amplitud. Para eliminar la totalidad de la corriente capacitiva lineal, es necesario agregar otra u otras constantes de tiempo. La figura 2.11. muestra la compensación de las componentes de frecuencia diferentes a las eliminadas con la primera constante de tiempo. Para las pruebas realizadas, se utilizó la mínima velocidad del equipo. En todos los casos, la ganancia en el

sistema es del 20 %. La figura 2.12., presenta la compensación de las corrientes capacitivas, utilizando las dos constantes de tiempo propuestas. Compruebe el efecto de la compensación de corrientes capacitivas, al comparar con la figura 2.8a., en donde se ilustra la respuesta del modelo antes de compensar, en la misma escala de tiempo.

La compensación de la corriente de fuga es importante, debido a la necesidad de eliminar la presencia de corrientes que se fugan a través de los sellos y por los componentes resistivos de la membrana celular. Esta fuga origina que la señal resultante presente un nivel de dc indeseado. Puede verse el efecto de esta corriente de fuga cuando la señal, después del transiente capacitivo, no regresa a la línea basal en donde se origina. En las simulaciones realizadas y presentadas en las figuras 2.6 a 2.12. la corriente de fuga está compensada.

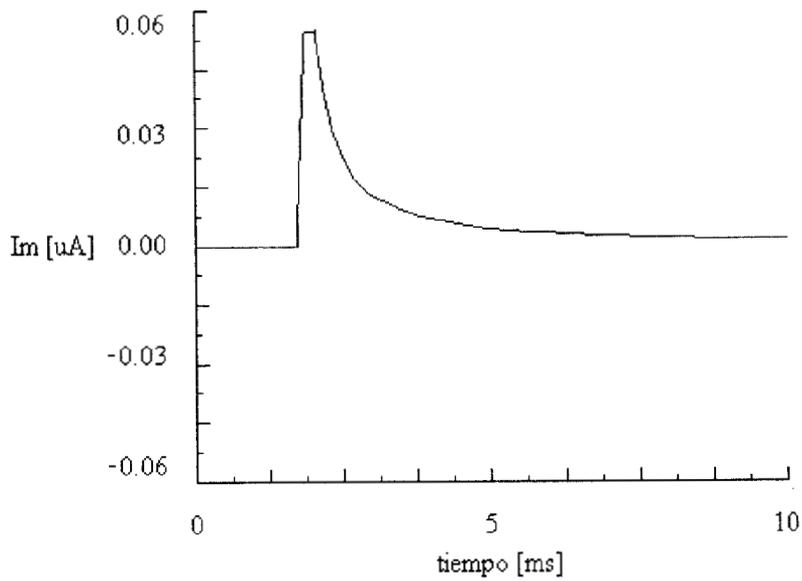


Figura 2.8a. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de  $100$   $\text{mV}$  de amplitud y  $25$   $\text{ms}$  de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, la ganancia del sistema es del  $20\%$  y se compensa la resistencia en serie.

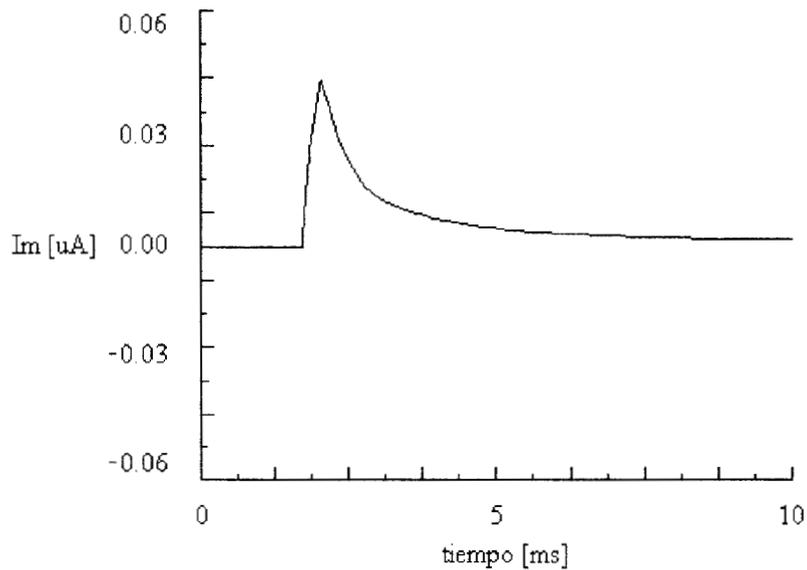


Figura 2.10. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de  $100$   $\text{mV}$  de amplitud y  $25$   $\text{ms}$  de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, la ganancia del sistema es del  $20\%$  y se compensan las corrientes capacitivas más rápidas. Compare con la figura 2.8a.

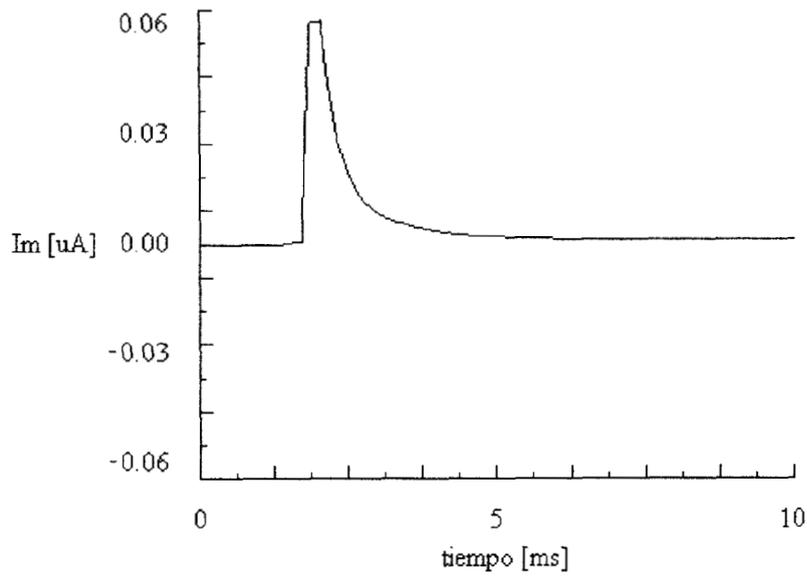


Figura 2.11. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, la ganancia del sistema es del 20% y se compensan las corrientes capacitivas con la segunda constante de tiempo. Compare con la figura 2.8a.

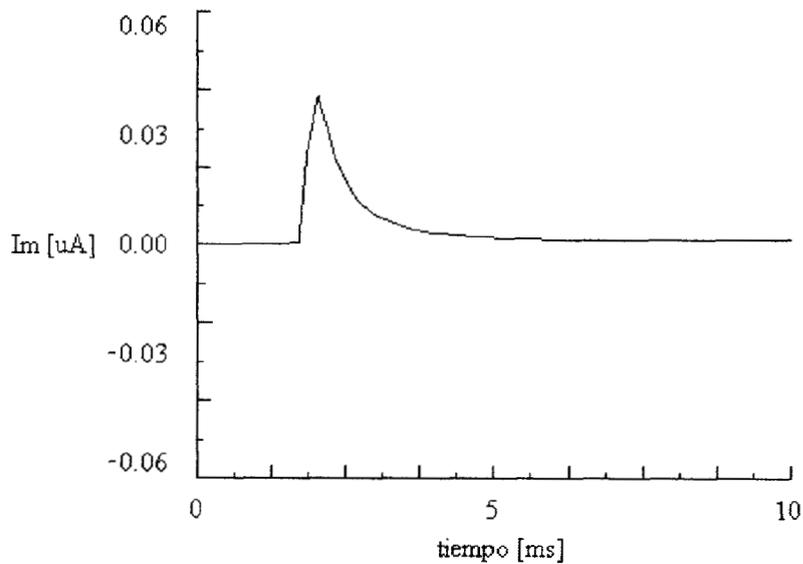


Figura 2.12. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, la ganancia del sistema es del 20% y se compensan las corrientes capacitivas con las dos constantes de tiempo. Compare con la figura 2.8a.

### 2.1.3. Resultados

Para la obtención de los resultados presentados a continuación, se empleó el modelo de fibra muscular propuesto por Chandler y Hui<sup>11</sup>. Este modelo fue implementado con resistores de carbono de tolerancia 1% y capacitores de cerámica de tolerancia 2%. La adquisición de las señales se realizó con una tarjeta DigiData 1200 y el paquete pClamp, ambos de Axon Instruments. Se aplicaron pulsos de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Estos resultados pueden cotejarse con los obtenidos durante la simulación.

Puede notarse en la figura 2.13. que debido a la baja ganancia que se logra en esta versión, la relación señal a ruido no es buena, y por lo tanto, este diseño no cumple con uno de los requerimientos propuesto al inicio del trabajo.

Por otra parte, en la misma figura, se aprecia el comportamiento del equipo cuando se trabaja con la mínima velocidad del pulso comando. Si se compara con la figura 2.14., cuando se aplica la máxima velocidad del pulso comando, se puede notar que las espigas de corriente capacitiva se hacen más grandes.

En la figura 2.15., se muestra la respuesta de la membrana cuando se realiza la compensación de la resistencia en serie. Nótese que la amplitud de la señal es mayor si se le compara con la figura 2.13. Este hecho da una idea de cuánto puede compensarse la resistencia en serie. Sin embargo, el nivel de compensación no puede determinarse con precisión debido a la baja ganancia que puede emplearse en este diseño. Cabe mencionar que cuando se aplica una mayor ganancia, el sistema tiende a oscilar.

En la figura 2.16. se ilustra la sobrecompensación de la resistencia en serie. En este caso, la amplitud de la señal es mayor que en el caso anterior y la relación señal a ruido sigue siendo inadecuada.

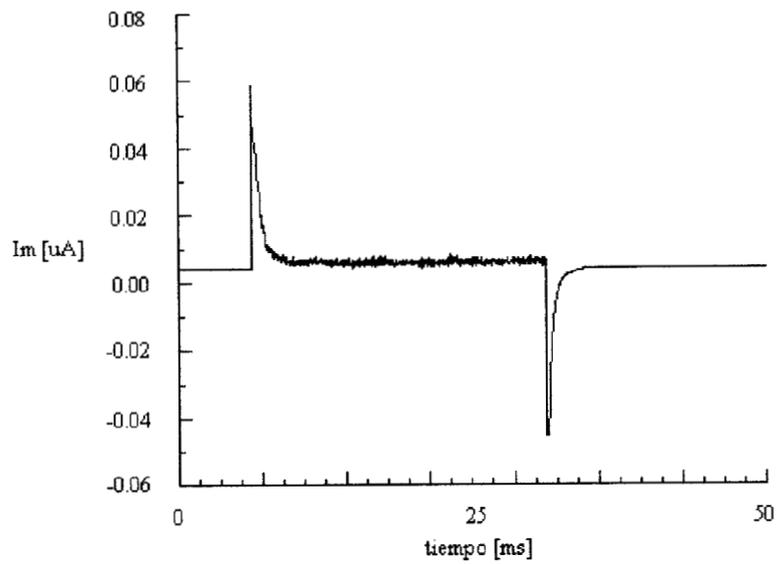


Figura 2.13. Respuesta del modelo de membrana a velocidad mínima, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

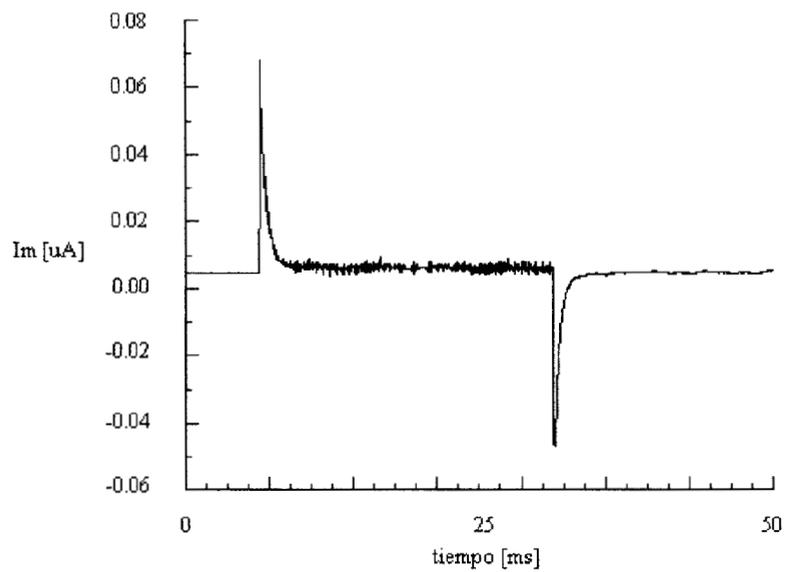


Figura 2.14. Respuesta del modelo de membrana a velocidad máxima, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

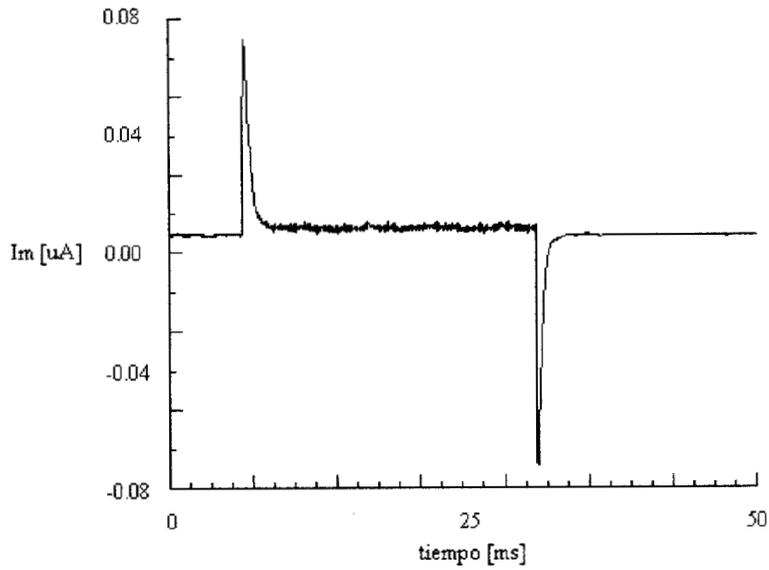


Figura 2.15. Respuesta del modelo de membrana a velocidad mínima y compensando la resistencia en serie, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

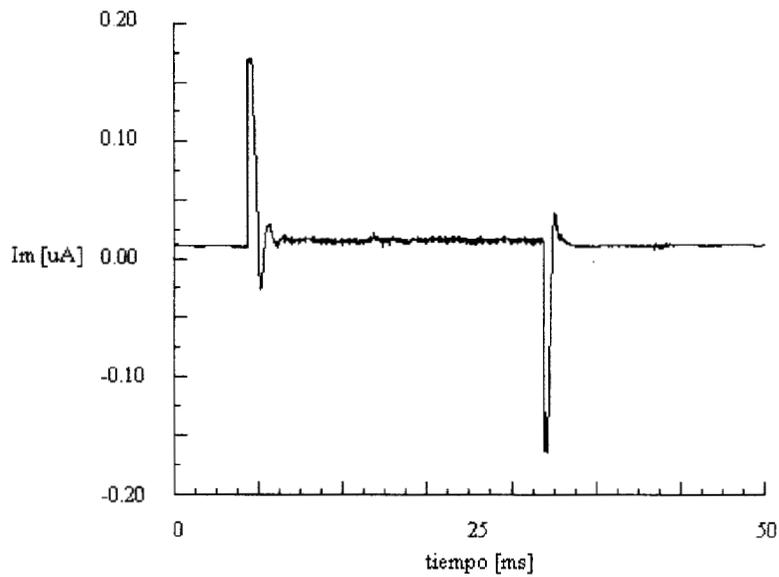


Figura 2.16. Respuesta del modelo de membrana a velocidad mínima y sobrecompensando la resistencia en serie, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

En la figura 2.17. se puede ver cómo disminuye la amplitud del transiente capacitivo más rápido, cuando se aplica la compensación de las corrientes capacitivas con la primera constante de tiempo. Este hecho es más notorio si se compara esta figura con las figuras 2.13. y 2.15.

La figura 2.18., ilustra la compensación de la corriente capacitiva, cuando se aplica la segunda constante de tiempo. Puede verse que el transiente capacitivo eliminado con la otra constante, permanece con la misma magnitud, mientras que las componentes que se encuentran adelante de esta espiga, son atenuadas a diferencia del caso anterior. Este efecto también puede analizarse en relación a los resultados presentados en las figuras 2.13. y 2.15.

En la figura 2.19. se presenta la sobrecompensación de la corriente de fuga. Puede verse claramente cómo desciende la señal de la corriente más allá del nivel que presentaba en el estado inicial (antes de la primera espiga). Por otro lado, la figura 2.20. muestra la mejor compensación de la corriente de fuga.

En todos estos casos, puede verse que la relación señal a ruido no es buena. Sin embargo, el funcionamiento de este diseño de sistema de fijación de voltaje arroja otros resultados interesantes : los mecanismos de compensación realizan su labor adecuadamente y por lo tanto, se requiere mejorar la ganancia, conservando los circuitos de compensación.

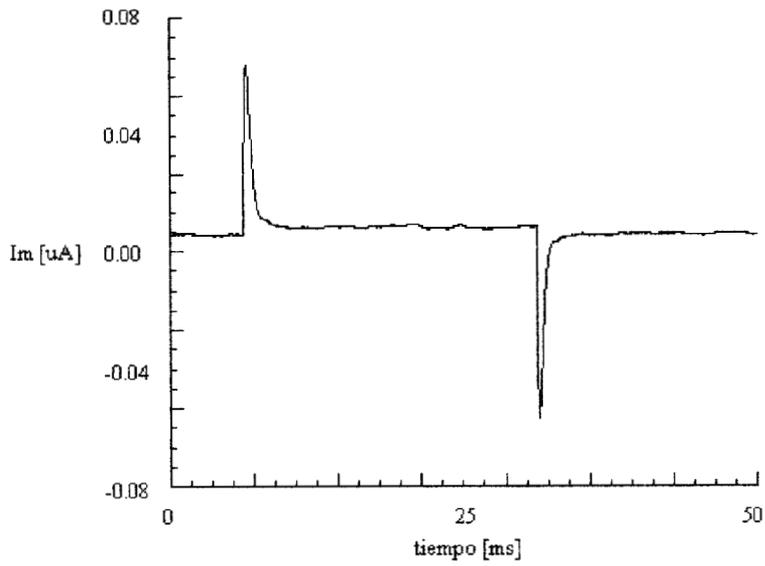


Figura 2.17. Respuesta del modelo de membrana a velocidad mínima y compensando la corriente capacitiva con la primera constante de tiempo, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

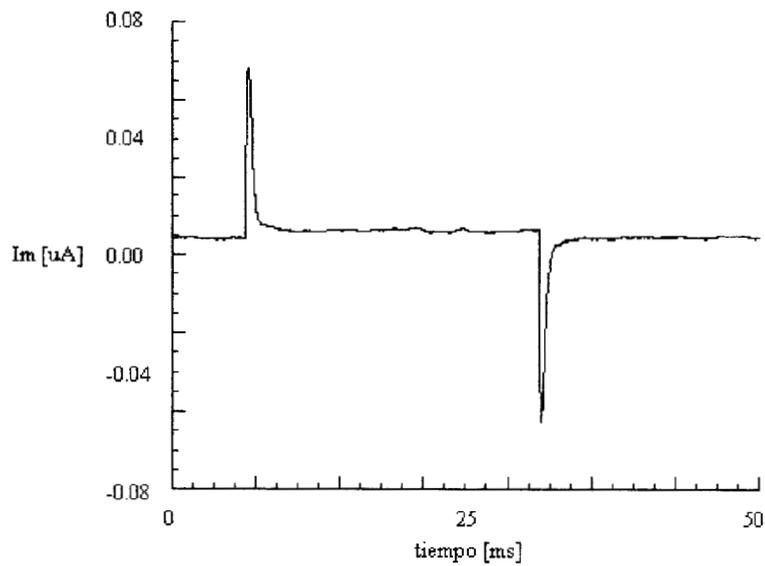


Figura 2.18. Respuesta del modelo de membrana a velocidad mínima y compensando la corriente capacitiva con la segunda constante de tiempo, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

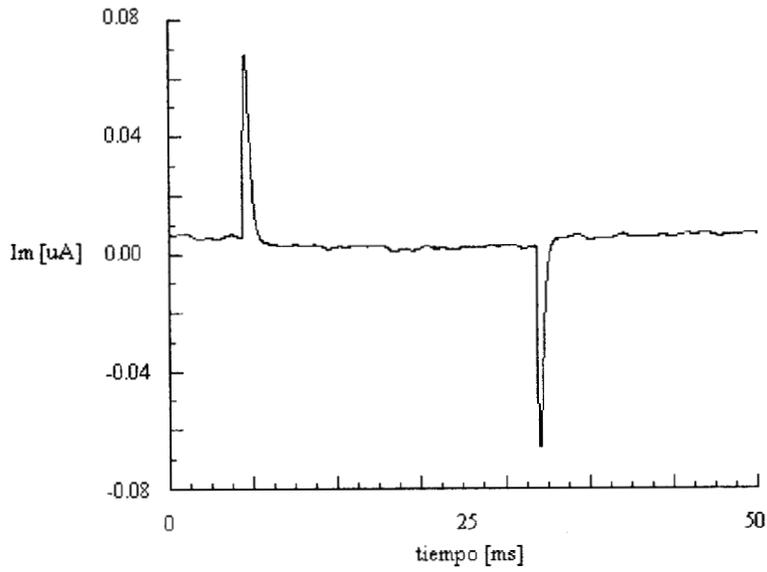


Figura 2.19. Respuesta del modelo de membrana a velocidad mínima y sobrecompensando la corriente de fuga, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

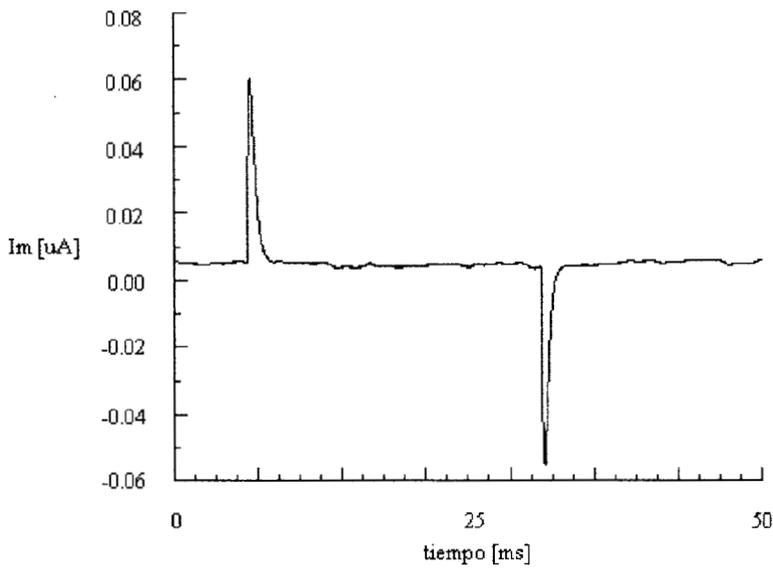


Figura 2.20. Respuesta del modelo de membrana a velocidad mínima y compensando la corriente de fuga, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

## 2.2. Segunda versión.

La segunda versión presentada, es básicamente el circuito propuesto en la primera versión. La diferencia en este segundo diseño es que se cambia el sitio en donde se aplica el potencial de mantenimiento, y se utiliza la idea propuesta por Chandler <sup>11, 24</sup> de mantener el potencial interno de la fibra en cero. Después de algunas pruebas, se encontró que este cambio proporcionaba una mayor excursión en la ganancia del sistema y se mejora la relación señal a ruido.

### 2.2.1. Análisis

El análisis de esta versión, se hace refiriéndose al circuito de la figura 2.21. En este circuito, la salida para el amplificador A1 es

$$V_{A1} = -\frac{R6}{R2} (V_{dc} + PC + V_{mtto} + FV_{Rs} + V_{Bal})$$

donde  $V_{dc}$  es el voltaje para compensar el nivel de dc causado por los elementos del circuito; PC es el potencial de los pulsos comando;  $V_{mtto}$  es el potencial de mantenimiento;  $FV_{Rs}$  es una fracción del voltaje proporcional a la corriente de la membrana, que sirve para compensar los efectos causados por la resistencia en serie, y  $V_{Bal}$  es un voltaje para eliminar el dc introducido por los electrodos de estimulación y registro.

A la salida del amplificador A5, la expresión es diferente a la presentada en el análisis anterior. La expresión para el voltaje a la salida de A5 es

$$V_{A5} = \left(\frac{R9}{R9 + R10}\right)\left(1 + \frac{R12}{R8}\right) V_{A2} - \left(\frac{R12}{R8}\right) V_{A11}$$

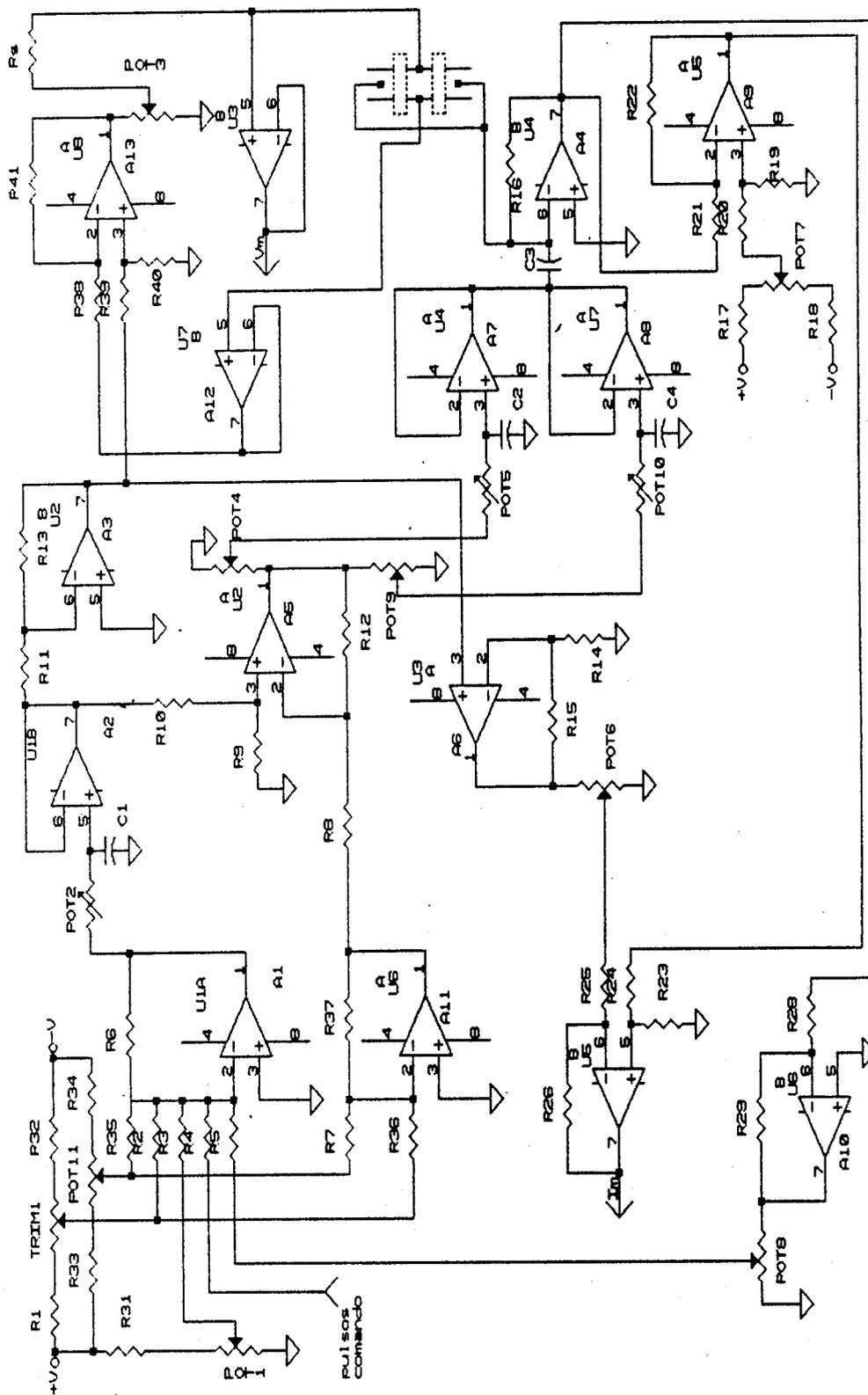


Figura 2.21. Diagrama eléctrico de la segunda versión de sistema de fijación de voltaje

Otra ecuación que resulta ser diferente, comparando con el análisis de la primera versión, es la expresión para la salida del convertidor de corriente a voltaje, en donde se está forzando al interior de la célula a un potencial igual a cero, como se ha propuesto en anteriormente.

La ecuación para A4 es

$$V_{A4} = (I_c + I)R_{16}$$

donde I es la corriente registrada en la membrana e  $I_c$  es la corriente utilizada para realizar la compensación de corrientes capacitivas.

Con estos pequeños cambios, se lograron mejores resultados que los obtenidos en la primera versión. Para corroborar lo anterior, se realizó la simulación con el mismo protocolo que en la primera versión.

### 2.2.2. Simulación

La simulación se llevó a cabo en una computadora personal con un procesador 80486 a 40 MHz. El programa utilizado para este fin, es el Microcap II versión 4.51 de Spectrum. El protocolo de pulsos es el mismo que el empleado en el caso anterior.

En la figura 2.22. se presenta el comportamiento del equipo cuando no se han aplicado las compensaciones de las corrientes capacitivas y de la resistencia en serie. Presenta compensación de la corriente de fuga, cuando se aplica un pulso con la mínima velocidad. La ganancia aplicada es del 100 %, con lo que se obtiene una mejora sustancial en relación a la primera versión mostrada. El hecho de contar con una ganancia grande, permite un mejor control del potencial de membrana.

En la figura 2.23. se ilustra el comportamiento del equipo cuando la ganancia es del 50 %. Nótese que la amplitud en la señal de corriente decrece también en un 50 %. En este caso, la corriente de fuga ha sido compensada, y se aplica un pulso de velocidad mínima.

Al aplicar un pulso rápido, esto es, de máxima velocidad, puede apreciarse un incremento en la magnitud de la señal de corriente, debido a que el  $dv/dt$  es mayor. Este efecto puede apreciarse en la figura 2.24. La corriente de fuga está compensada y la ganancia del sistema es de 100 %.

Cuando se compensa el efecto de la resistencia en serie, el transiente de mayor frecuencia crece en magnitud. La figura 2.25. muestra el comportamiento del sistema cuando se realiza la compensación de la resistencia en serie. Compárese esta figura con la 2.22. La amplitud de la señal de corriente es ligeramente mayor cuando se compensa la resistencia en serie. Las condiciones utilizadas para la obtención de esta figura fueron : corriente de fuga compensada, velocidad mínima del pulso y ganancia del 100 %.

La figura 2.26. presenta la sobrecompensación de la resistencia en serie, bajo las mismas condiciones. Es claro que en este caso, la magnitud de la señal es mayor que en cualquiera de los casos anteriores, lo que significa que se está sumando más de lo necesario para realizar la compensación.

Cuando se realiza la compensación de las corrientes capacitiva, se tiene la posibilidad de aplicar dos constantes de tiempo. Cuando se aplica la primera constante de tiempo, se está eliminando el transiente más rápido y de mayor amplitud, como se aprecia en la figura 2.27.

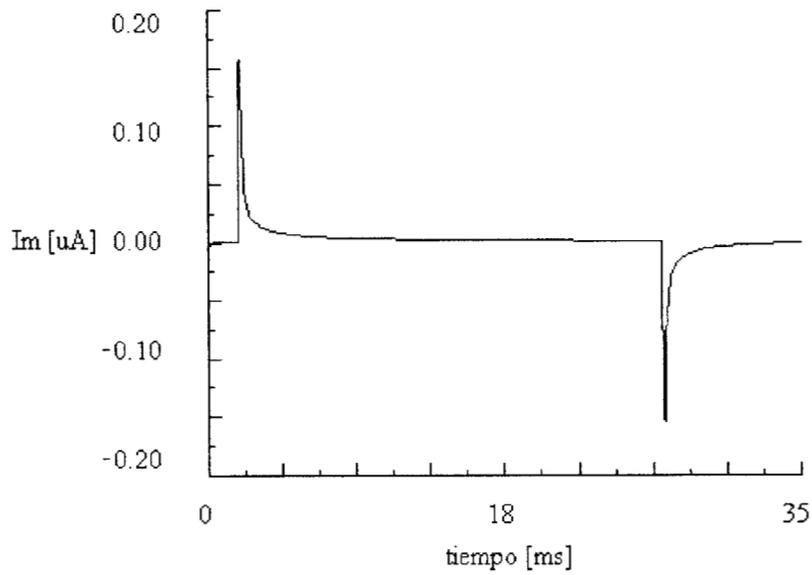


Figura 2.22. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada y la ganancia del sistema es del 100%.

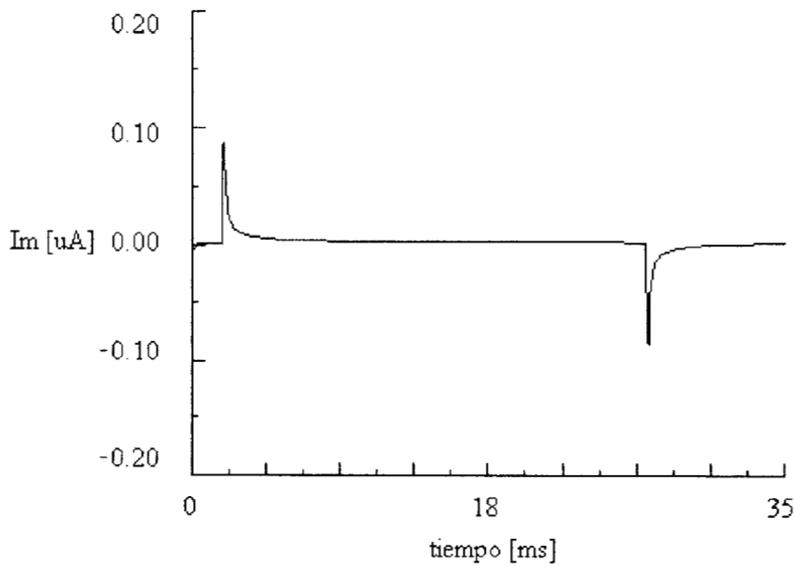


Figura 2.23. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada y la ganancia del sistema es del 50% .

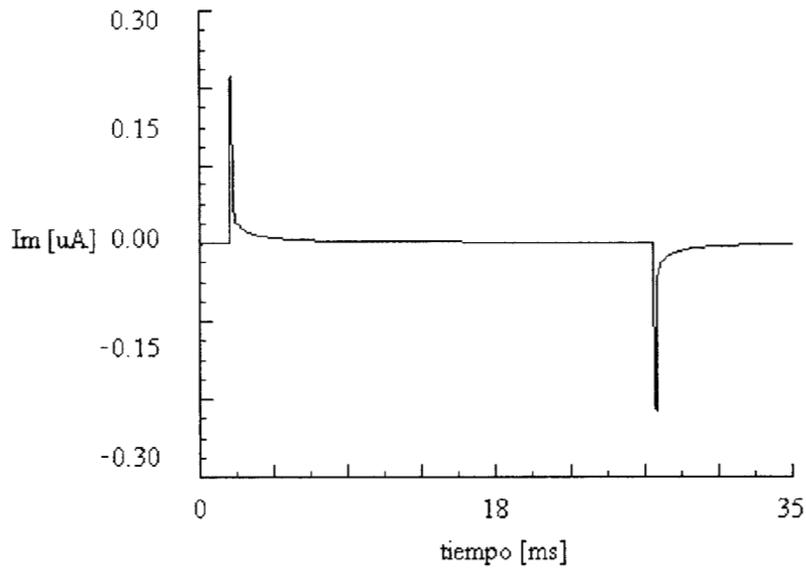


Figura 2.24. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la máxima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada y la ganancia del sistema es del 100%.

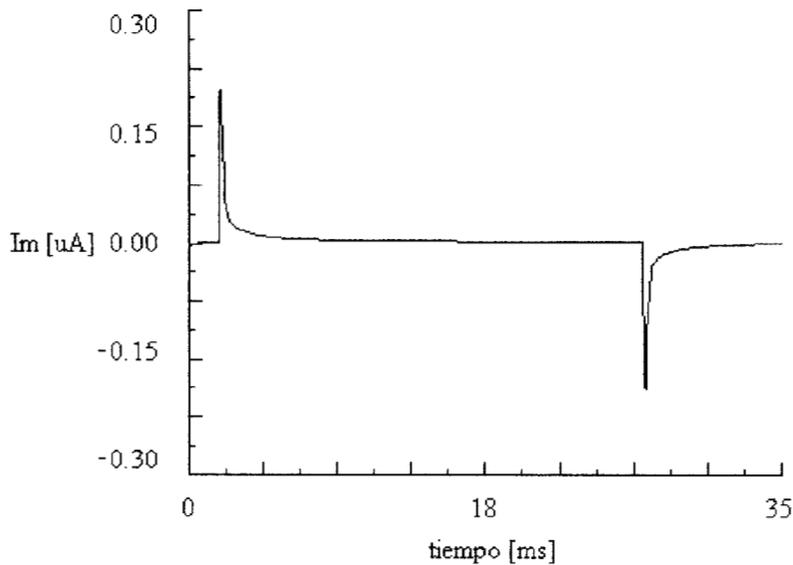


Figura 2.25. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, así como la resistencia en serie, y la ganancia del sistema es del 100% .

Si se compara la figura 2.27. con la 2.25, podrá notarse la diferencia en amplitudes de los trazos de mayor frecuencia. Este hecho resulta más evidente cuando se compara con la figura 2.25a. donde la escala de tiempo y amplitud es la misma que cuando se realiza la compensación

Cuando funciona la segunda constante de tiempo, el transiente de mayor amplitud permanece intacto, mientras que las componentes siguientes se ven atenuadas por el sistema de compensación. Este hecho se ilustra en la figura 2.28. Comparando esta figura con la 2.25a. se puede ver que la señal decae más rápidamente y que la magnitud del transiente no se ve afectada.

Finalmente, la figura 2.29. presenta el comportamiento del sistema cuando han sido aplicadas las dos constantes de tiempo. Nótese que el resultado es la combinación de los efectos de cada una de las constantes. En esta figura se puede apreciar cómo disminuye la amplitud del transiente de mayor tamaño, y también disminuye el tiempo que se requiere para regresar al nivel inicial.

En las figuras 2.27. a la 2.29. se aplicó un pulso de velocidad mínima, se compensó la resistencia en serie y la corriente de fuga, y se aplicó una ganancia del 100 %.

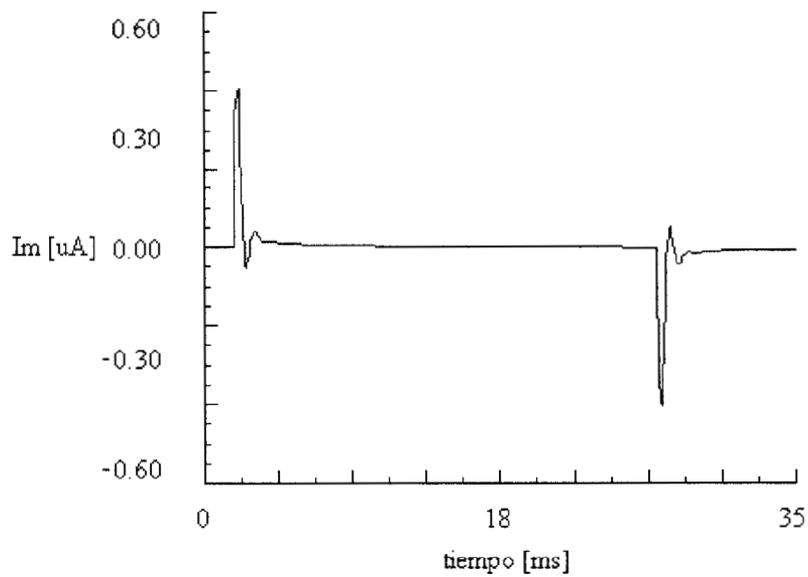


Figura 2.26. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada; la resistencia en serie está sobrecompensada, y la ganancia del sistema es del 100% .

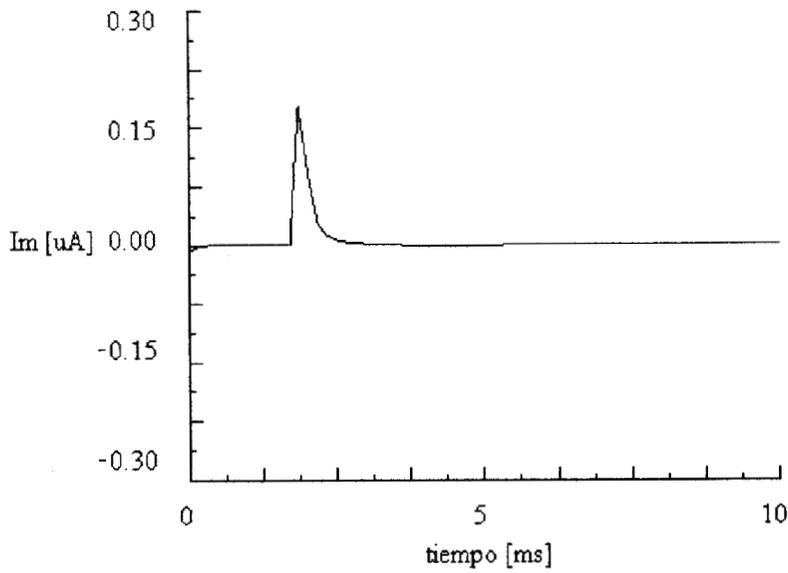


Figura 2.28. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso; han sido compensadas la corriente de fuga, la resistencia en serie y la corriente capacitiva con la segunda constante de tiempo; la ganancia del sistema es del 100%. Compare con la figura 2.25a.

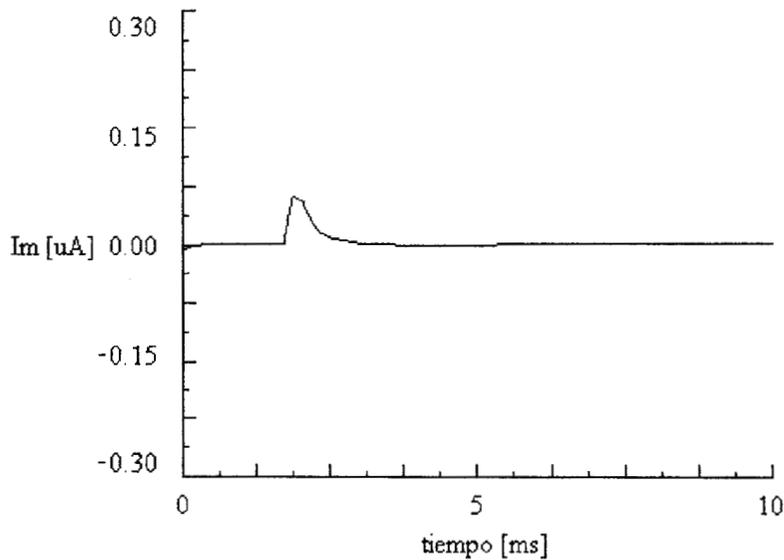


Figura 2.29. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso; han sido compensadas la corriente de fuga, la resistencia en serie y la corriente capacitiva con las dos constantes de tiempo; la ganancia del sistema es del 100%. Compare con la figura 2.25a.

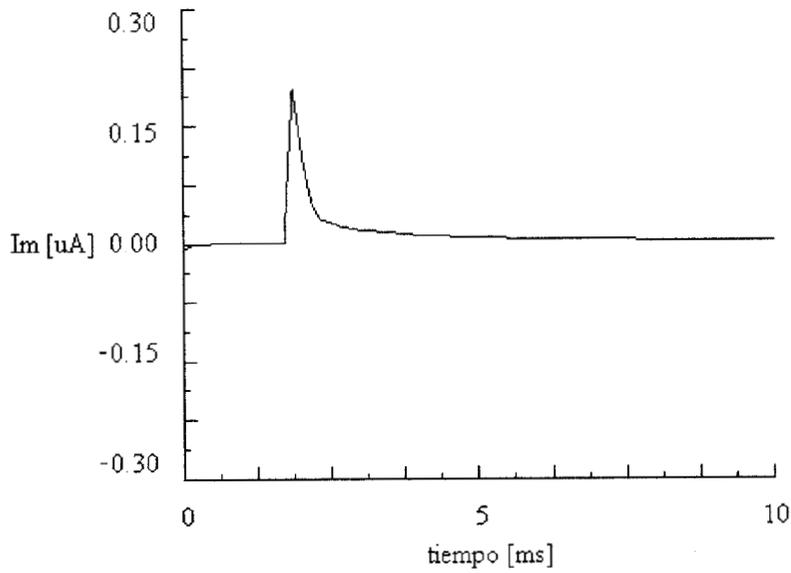


Figura 2.25a. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso, cuando la corriente de fuga ha sido compensada, así como la resistencia en serie, y la ganancia del sistema es del 100% .

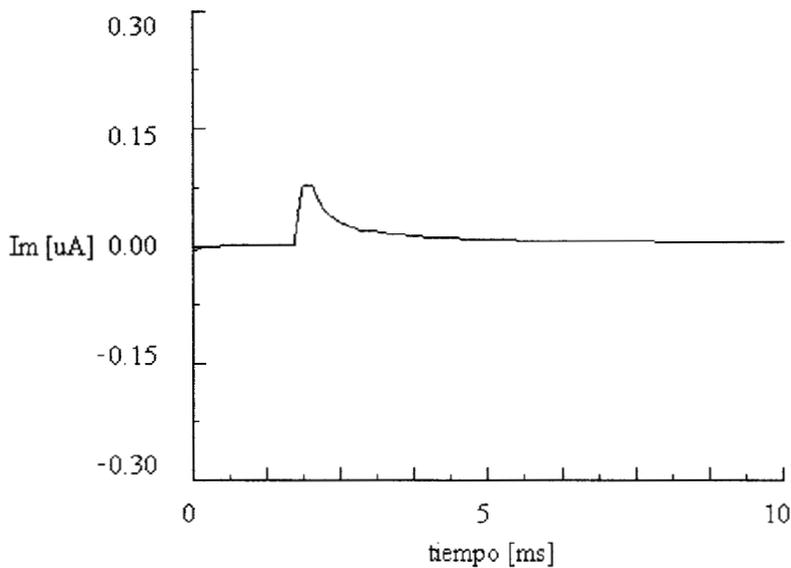


Figura 2.27. Simulación de la respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, ante un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Se ilustra la respuesta a la mínima velocidad del pulso; han sido compensadas la corriente de fuga, la resistencia en serie y la corriente capacitiva con la primera constante de tiempo; la ganancia del sistema es del 100%. Compare con la figura 2.25a.

### 2.3. Tercera versión

La tercera versión que se presenta, es el mejor diseño desarrollado, como consecuencia del trabajo previamente realizado. Esta versión presenta características de funcionamiento que la hacen superior a los anteriores circuitos aquí expuestos. Más adelante, dentro de la discusión, se ilustrarán las diferencias encontradas entre las tres versiones.

El diseño de la tercera versión, se muestra, mediante un diagrama a bloques, en la figura 2.30. En este caso, el sistema de fijación de voltaje cuenta con ocho etapas, ya que fue eliminada la etapa que controlaba la ganancia del sistema. Por otra parte, se elimina un lazo de retroalimentación, que se utilizaba para asegurar el nivel del voltaje fijado en la membrana.

Observando el comportamiento del diseño anterior, puede notarse que el mejor desempeño del sistema se presenta cuando se emplea el 100 % de la ganancia. Este hecho concuerda con la idea básica de la fijación de voltaje. Por lo tanto, si la ganancia no introduce inestabilidad en el sistema, puede eliminarse el circuito que realiza el control de dicha ganancia. Con esto, se eliminan dos amplificadores, con lo que disminuye la constante de tiempo del sistema y aumenta la velocidad de fijación.

El diagrama a bloque es similar al presentado en la primera versión.

Este diagrama contiene una etapa en la que se realiza la suma de las señales que se aplicarán a la célula, una etapa en la que se regula la velocidad del pulso aplicado, una etapa para compensar las corrientes capacitivas, una etapa para eliminar la corriente de fuga, una etapa para compensar el efecto introducido por la resistencia en serie, la etapa de fijación de voltaje, y una etapa para eliminar el nivel de dc que se introduce en cada etapa.

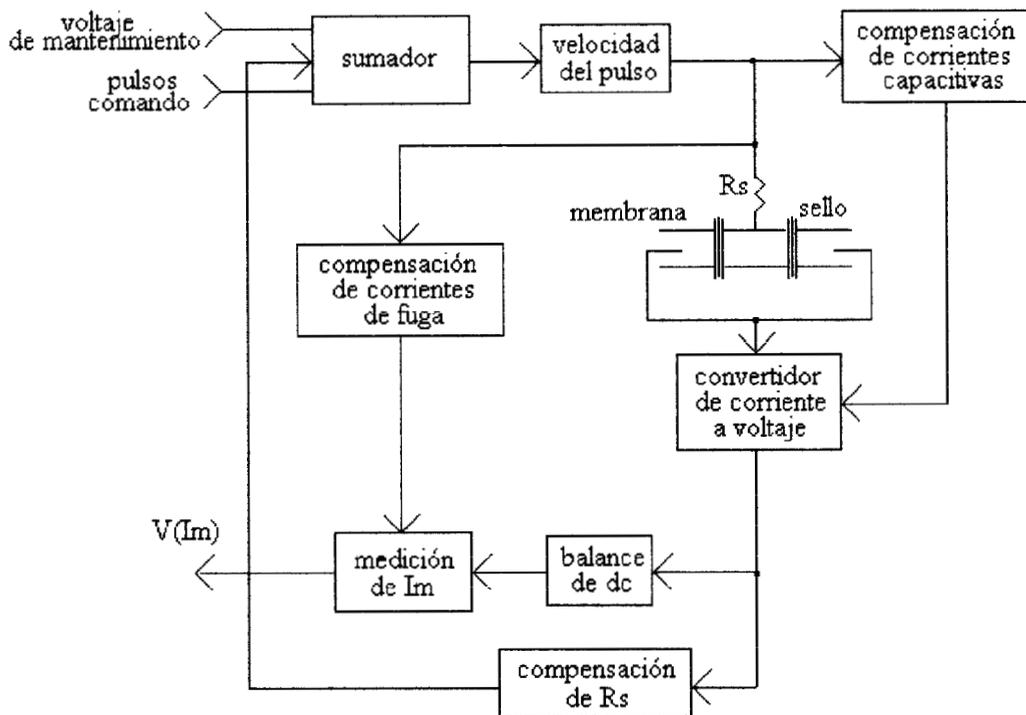


Figura 2.30. Diagrama a bloques de la tercera versión del sistema de fijación de voltaje.

### 2.3.1. Análisis

El análisis de esta versión se realizó tomando como referencia el circuito de la figura 2.31.

Para la primera etapa, el voltaje en el amplificador A1 es una suma. La expresión para ese voltaje es

$$V_{A1} = -(V_{dc} + PC + V_{mtto} + FV_{Rs} + V_{Bal}) \frac{R2}{R6}$$

$$R2=R3=R4=R5=R6=R35$$

donde  $V_{dc}$  es el voltaje aplicado para compensar el nivel de dc introducido por los elementos activos del circuito;  $PC$  es el voltaje de los pulsos comando;  $V_{mto}$  es el voltaje de mantenimiento, utilizado para llevar a la célula a su potencial de reposo;  $FV_{Rs}$  es una fracción del voltaje proporcionado para compensar la resistencia en serie; y  $V_{Bal}$  es un voltaje aplicado para compensar el potencial generado por los electrodos de estimulación y registro.

A la salida del amplificador A2, se tiene

$$V_{A2} = \left( \frac{1}{1 + SC1R_{P2}} \right) V_{A1}$$

$R_{P2}$  es la resistencia del potenciómetro 2. La salida  $V_{A2}$  corresponde a un filtro pasa bajas, con frecuencia de corte igual a  $(R_{P2}C1)^{-1}$

Siguiendo con el análisis del circuito, la salida del amplificador A3 está dada por

$$V_{A3} = - \left( \frac{R13}{R11} \right) V_{A2}$$

Para el amplificador A11 la ecuación resultante es

$$V_{A11} = \left( \frac{R_{P3}}{R7 + R_{P3}} \right) V_{mto}$$

donde  $R_{P3}$  es la resistencia presentada por el potenciómetro 3.

La salida del amplificador A5 está dada por la ecuación

$$V_{A5} = \left( 1 + \frac{R12}{R8} \right) \left( \frac{R9}{R9 + R10} \right) V_{A2} - \left( \frac{R12}{R8} \right) V_{A11}$$

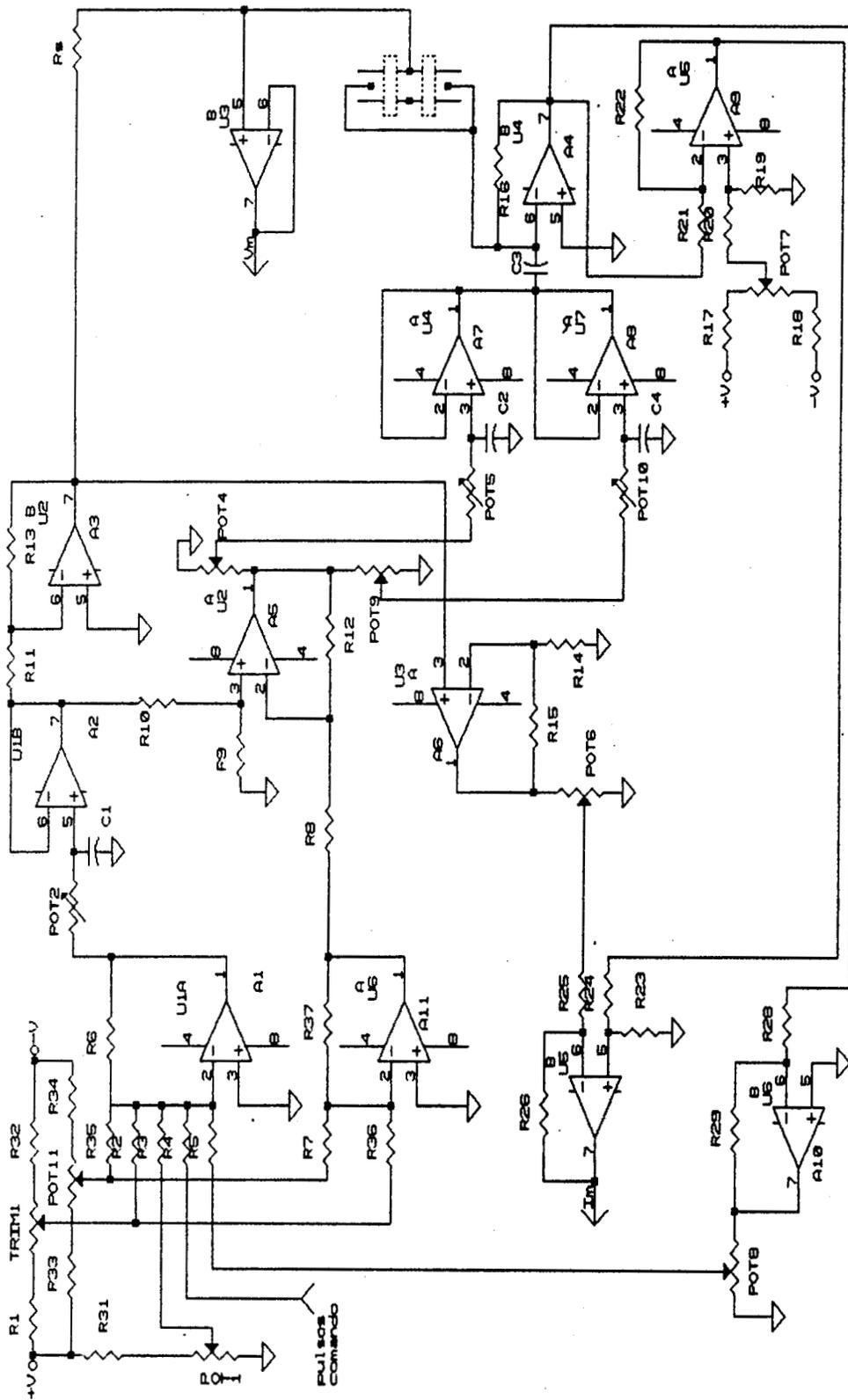


Figura 2.31. Diagrama eléctrico de la tercera versión del sistema de fijación de voltaje

El amplificador A12 entrega a la salida el voltaje de la membrana  $V_m$

$$V_m = V_{A3}$$

El amplificador A7 está configurado como un circuito pasa bajas, cuya ecuación es

$$V_{A7} = \left( \frac{1}{1 + SC2R_{P5}} \right) FV_{A5}$$

donde  $R_{P5}$  es la resistencia del potenciómetro 5;  $FV_{A5}$  es una fracción del voltaje que entrega a la salida el amplificador A5. Esta fracción está determinada por el potenciómetro 4. La frecuencia de corte de este filtro es  $(R_{P5}C2)^{-1}$

A la salida del amplificador A8, la salida está dada por

$$V_{A8} = \left( \frac{1}{1 + SC4R_{P10}} \right) FV_{A5}$$

que también es la ecuación de un filtro pasa bajas, donde  $R_{P10}$  es la resistencia ofrecida por el potenciómetro 10;  $FV_{A5}$  es una porción del voltaje proporcionado por el amplificador A5

A la entrada del convertidor de corriente a voltaje, la corriente es

$$I_T = I + I_c$$

donde  $I_T$  es la corriente total que ingresa al convertidor;  $I$  es la corriente que se obtiene al aplicar un pulso de voltaje  $V_{A3}$  a la fibra (o al modelo de fibra muscular)

e  $I_c$  es la corriente capacitiva obtenida a partir del voltaje entregado por el amplificador A7.

De esta manera, a la salida del amplificador A4 (convertidor de corriente a voltaje) se tiene

$$V_{A4} = I_r R_{16} = (I + I_c) R_{16}$$

pero

$$I_c = C_3 \left( \frac{dV_{A7}}{dt} + \frac{dV_{A8}}{dt} \right)$$

Nótese que  $V_{A3}$  es de signo opuesto a  $V_{A5}$ , por lo que en realidad, a la entrada del convertidor de corriente a voltaje, las corrientes  $I$  e  $I_c$  se están restando.

Para el amplificador A6

$$V_{A6} = \left( 1 + \frac{R_{15}}{R_{14}} \right) V_{A3}$$

En la salida del amplificador A9, la señal está determinada por

$$V_{A9} = \left( \frac{R_{19}}{R_{19} + R_{20}} \right) \left( 1 + \frac{R_{22}}{R_{21}} \right) V_{cte} - \left( \frac{R_{22}}{R_{21}} \right) V_{A4}$$

$V_{cte}$  es un voltaje constante, utilizado para compensar un nivel de dc que va acumulándose en cada etapa del sistema.

La ecuación para  $I_m$ , que en realidad es un voltaje proporcional a la corriente de la membrana, es

$$V(I_m) = \left(\frac{R_{23}}{R_{23} + R_{24}}\right)\left(1 + \frac{R_{25}}{R_{26}}\right) V_{A9} - \left(\frac{R_{25}}{R_{26}}\right) FV_{A6}$$

donde  $FV_{A6}$  es una porción del voltaje entregado por el amplificador A6. Esta fracción está dada por el potenciómetro 6,

Finalmente, para compensar la resistencia en serie se utiliza una porción del voltaje proporcionado por el amplificador A10, cuya ecuación es

$$V_{R_s} = -\left(\frac{R_{29}}{R_{28}}\right) V_{A4}$$

### 2.3.2. Simulación

Siguiendo la misma estrategia que en las versiones anteriores, antes de realizar pruebas sobre el circuito se efectuaron simulaciones que mostraran el comportamiento de este nuevo diseño. A partir de los resultados obtenidos en la simulación, se puede concluir que el presente diseño es mejor que los presentados anteriormente. Después de obtener resultados satisfactorios en la simulación, se realizaron pruebas en el circuito, utilizando el mismo modelo de fibra muscular, empleado en las primeras versiones.

La simulación se llevó a cabo en una computadora personal con un procesador 80486 a 40 MHz. El programa utilizado para este fin, es el Microcap II versión 4.51 de Spectrum.

La simulación se llevó a cabo con el siguiente protocolo de pulsos de estimulación : pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración,  $V_{mto}=0V$ ,  $V_{Bal}=0 V$ .

El modelo de membrana utilizado es el propuesto por Chandler y Hui <sup>11</sup> en 1991.

La figura 2.32. presenta el resultado de la simulación cuando no se ha compensado la corriente de fuga, ni la resistencia en serie, ni la corriente capacitiva. La velocidad del pulso de estimulación es la mínima. En la figura 2.33. se presenta la simulación cuando se aplica un pulso de máxima velocidad. Compare la magnitud de la señal de corriente con la figura 2.32. En este caso, la señal crece en la medida que crece el diferencial de tiempo.

La figura 2.34. ilustra la simulación cuando se ha aplicado un pulso de mínima velocidad, y se compensa la corriente de fuga. La compensación es evidente si se compara con la figura 2.32., en donde la señal de corriente no regresa a la línea basal en donde se origina, como sí sucede en la figura 2.34. El sistema tiene la capacidad de compensar y sobrecompensar esta corriente, por lo que en la figura 2.35. se ilustra la sobrecompensación de la corriente de fuga. En este caso, la señal de corriente decae más allá de la línea basal en donde se origina.

En la figura 2.36. se muestra la compensación de la resistencia en serie, cuando se aplica un pulso de velocidad mínima se ha compensado la corriente de fuga y la corriente capacitiva no se ha eliminado. Cuando se compensa la resistencia en serie, la señal de corriente crece, como es deseable. El control para la compensación de la resistencia en serie permite realizar sobrecompensaciones, como se muestra en la figura 2.37. Note que cuando se

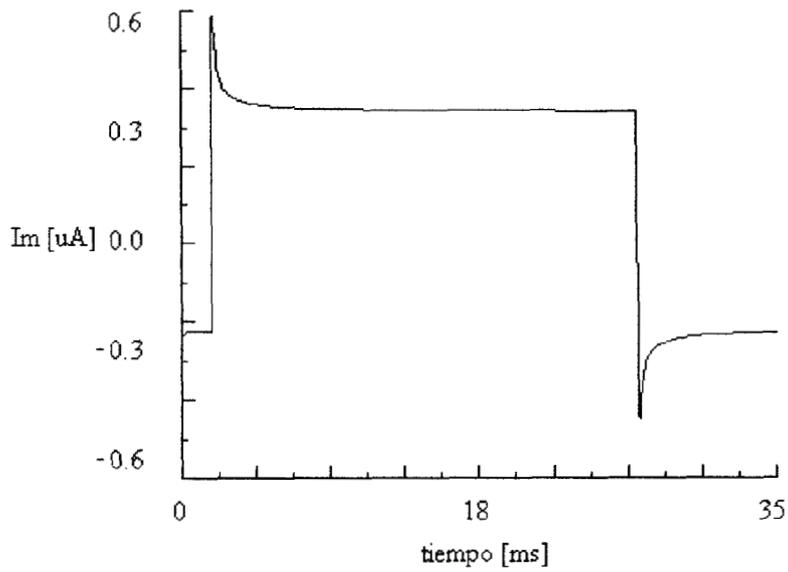


Figura 2.32. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de velocidad mínima. El sistema no tiene compensación de corriente de fuga, de corriente capacitivas ni de resistencia en serie.

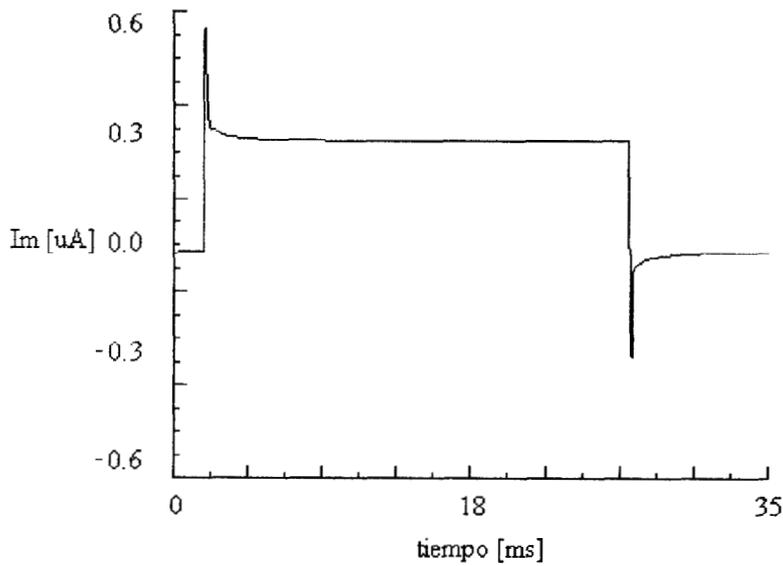


Figura 2.33. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de máxima velocidad. El sistema no tiene compensación de corriente de fuga, de corriente capacitivas ni de resistencia en serie.

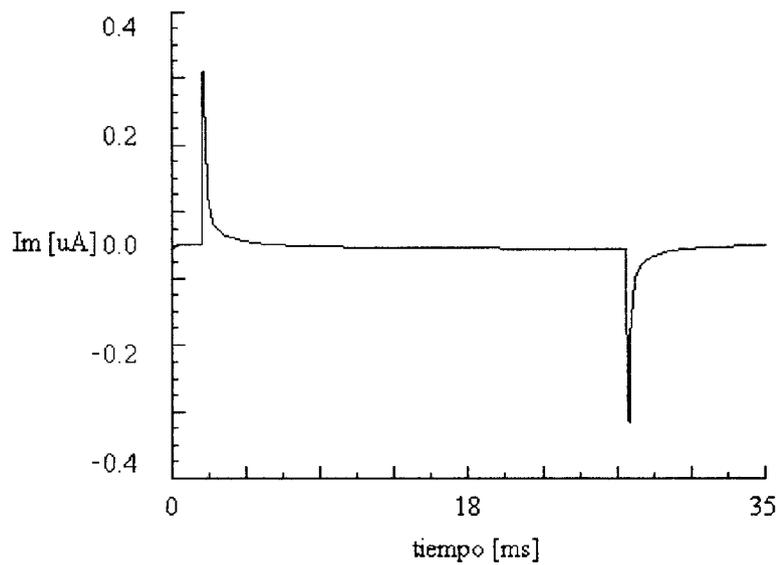


Figura 2.34. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. El sistema tiene compensación de corriente de fuga; no se ha compensado la corriente capacitiva ni la resistencia en serie.

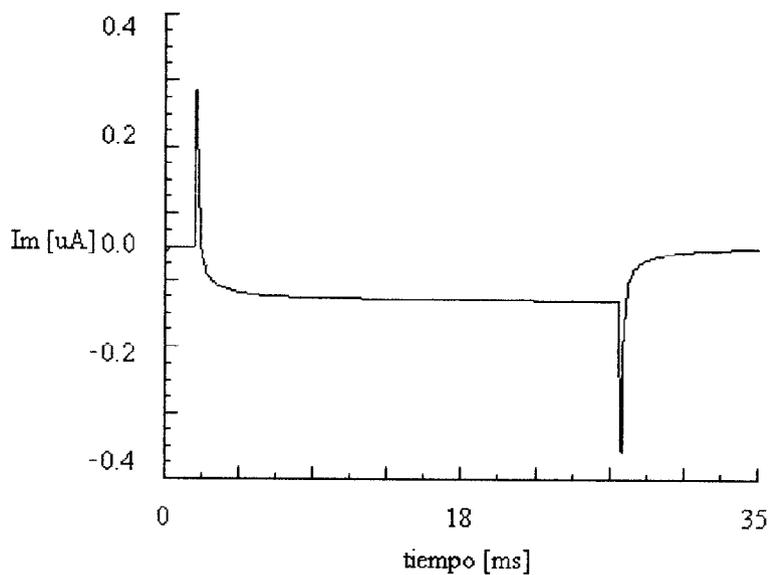


Figura 2.35. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. El sistema tiene sobrecompensación de corriente de fuga; no se ha compensado la corriente capacitiva ni la resistencia en serie.

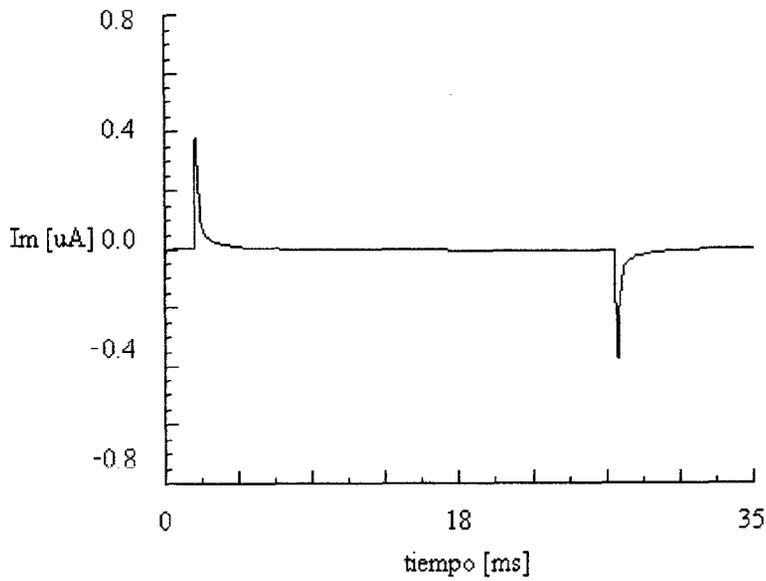


Figura 2.36. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. Se presenta la compensación de la corriente de fuga y de la resistencia en serie; no se ha compensado la corriente capacitiva.

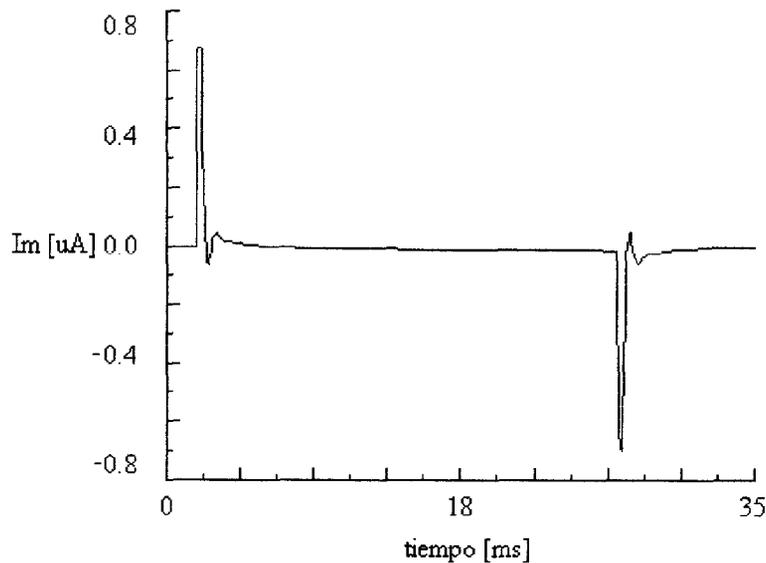


Figura 2.37. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. Se presenta la compensación de la corriente de fuga y la sobrecorrección de la resistencia en serie; no se ha compensado la corriente capacitiva.

pasa de la compensación a la sobrecompensación, el sistema comienza a oscilar. Cuando se aplica un pulso de máxima velocidad y se emplea el mismo nivel de compensación de resistencia en serie, la magnitud de la señal de corriente es aún mayor que la mostrada en la figura 2.36. Esto no significa que se logre una mejor compensación, ya que por las características del pulso de voltaje, el  $dv/dt$  es mayor y por lo tanto, al aplicar la compensación de la resistencia en serie, lo que se observa en realidad es una sobrecompensación. La simulación de la compensación de la resistencia en serie al aplicar un pulso rápido, se muestra en la figura 2.38.

En la figura 2.39. se presenta una compensación de la corriente capacitiva. Esta compensación se realiza con la primera constante de tiempo, la cual permite eliminar el transiente capacitivo más rápido. En este caso también se está compensando la corriente de fuga, la resistencia en serie y se aplicó un pulso de velocidad mínima. La figura 2.40. presenta la simulación de la compensación de la corriente capacitiva con la segunda constante de tiempo. En este caso, se están eliminando las componentes inmediatas al transiente capacitivo más rápido. Esto puede comprobarse si se compara con la figura 2.36., la velocidad con la que regresa la señal de corriente, a la línea basal, después del transiente capacitivo.

En la figura 2.41. se presenta la compensación de la corriente capacitiva realizada con las dos constantes de tiempo. En esta figura puede verse la suma de los efectos descritos anteriormente. Finalmente, en la figura 2.42. se presenta la sobrecompensación de la corriente capacitiva, lo que significa que se está restando una señal mayor a la generada en el modelo de membrana. En todos los casos de compensación de corriente capacitiva, se puede apreciar con mayor detalle el efecto de dicha comparación, si se comparan las señales de corriente con la presentada en la figura 2.36a.

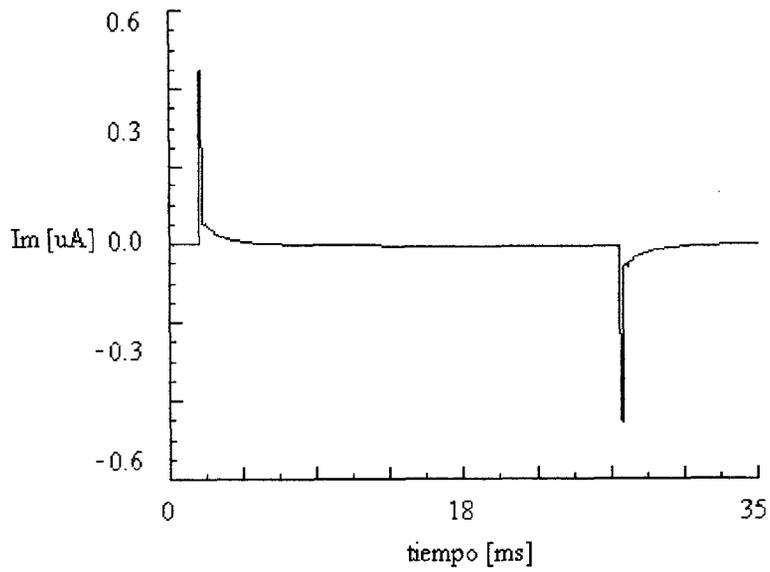


Figura 2.38. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de velocidad máxima. Se presenta la compensación de la corriente de fuga y de la resistencia en serie; no se ha compensado la corriente capacitiva.

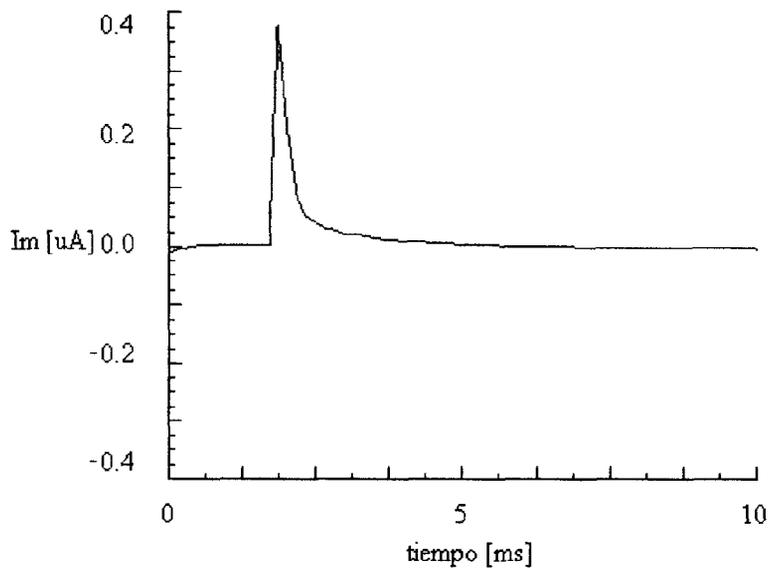


Figura 2.36a. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. Se presenta la compensación de la corriente de fuga y de la resistencia en serie; no se ha compensado la corriente capacitiva.

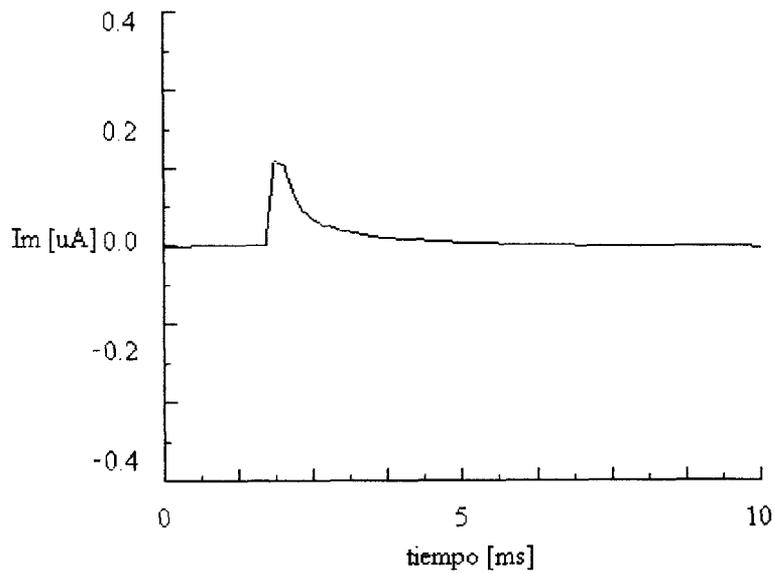


Figura 2.39 Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. Se presenta la compensación de la corriente de fuga, de la resistencia en serie y la compensación de la corriente capacitiva con la primera constante de tiempo. Compare con la figura 2.36a.

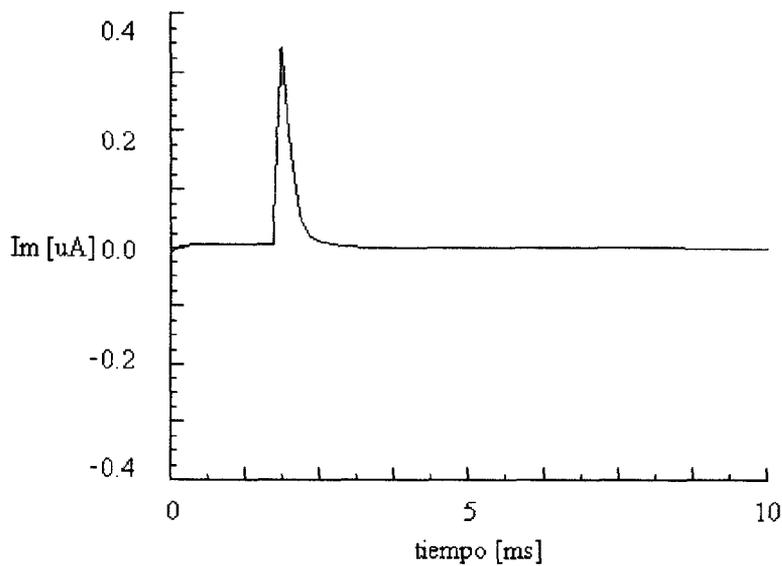


Figura 2.40. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. Se presenta la compensación de la corriente de fuga, de la resistencia en serie y la compensación de la corriente capacitiva con la segunda constante de tiempo. Compare con la figura 2.36a.

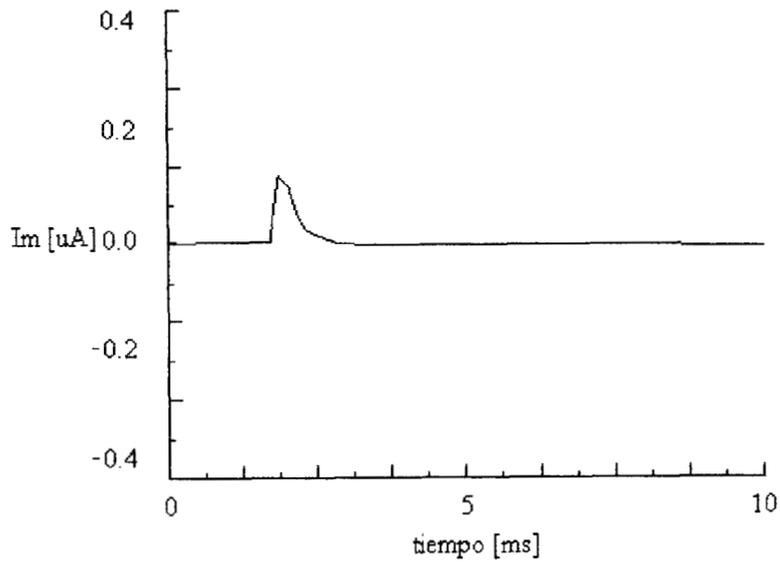


Figura 2.41. Simulación realizada sobre el modelo de membrana después de aplicar un pulso de 100 mV y 25 ms de duración, de velocidad mínima. Se presenta la compensación de la corriente de fuga, la resistencia en serie y la compensación de la corriente capacitiva con ambas constantes de tiempo. Compare con la figura 2.36a.

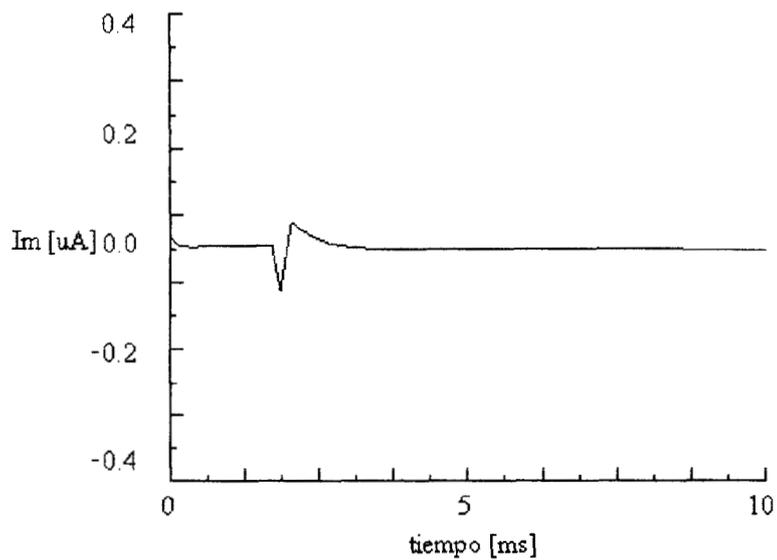


Figura 2.42. Simulación realizada sobre el modelo de membrana, después de aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración, de mínima velocidad. Se presenta la compensación de la corriente de fuga, de la resistencia en serie y la sobrecompensación de la corriente capacitiva. Compare con la figura 2.36a.

### 2.3.3. Resultados

Con esta configuración se verificó el funcionamiento del sistema de fijación de voltaje. Para llevar a cabo esta evaluación, se empleó nuevamente el modelo de membrana y fibra bajo sello, propuesto por Chandler <sup>11</sup> en 1990.

Para la obtención de los resultados presentados en esta sección, se utilizó una tarjeta DigiData 1200 y el paquete pClamp, ambos de Axon Instruments.

Esta información se obtuvo al aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

La velocidad del pulso comando está determinada por una constante de tiempo variable, la cual limita la frecuencia del pulso de estimulación. Para observar el comportamiento del equipo a diferentes velocidades del pulso comando, no se empleó compensación alguna. La figura 2.43. presenta la respuesta a la mínima velocidad del pulso, mientras que en la figura 2.44. se muestra la respuesta a velocidad máxima. Al variar la velocidad entre los valores mínimo y máximo, en la respuesta se aprecia una disminución en amplitud superior al 50 % del máximo valor de amplitud. Esto se debe a que el pulso de voltaje tarda más en llegar a su valor máximo, por lo que la magnitud de la corriente capacitiva disminuye.

La compensación de la resistencia en serie es una de las características más importantes de este equipo. En el peor de los casos, la compensación de la resistencia en serie obtenida con este equipo es superior al 90 %, cuando en otros sistemas la mayor compensación está entre 80 y 90 % <sup>11,13,24,44</sup>. La compensación lograda se obtiene con la disposición del lazo de retroalimentación y el amplificador de fijación, que resulta ser diferente a la propuesta en otros trabajos.

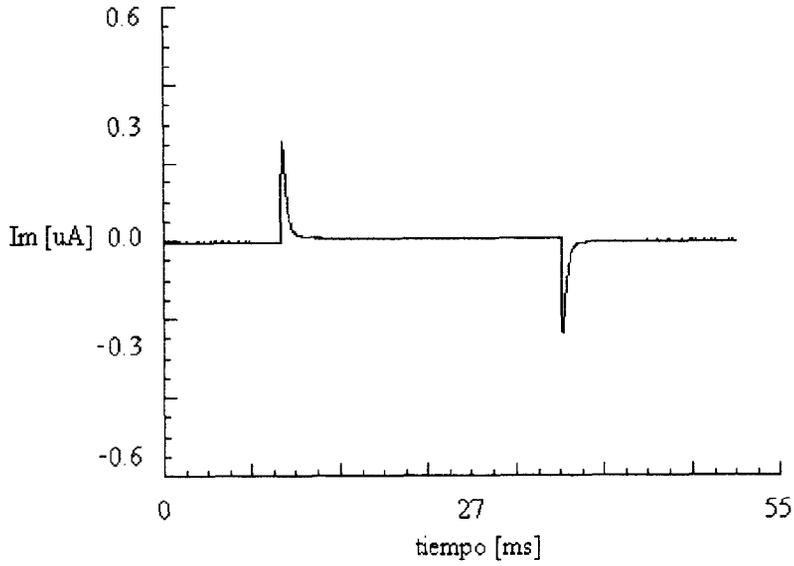


Figura 2.44. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad mínima y sin compensación de la resistencia en serie, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

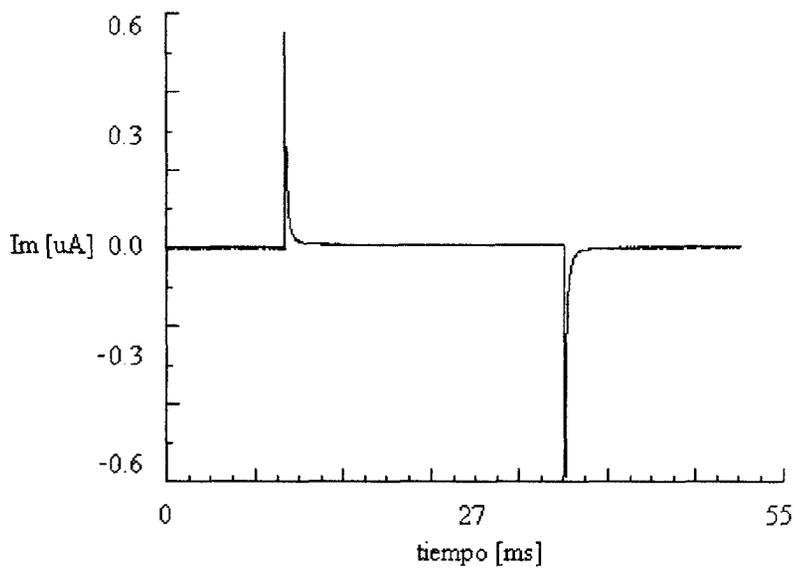


Figura 2.45. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad máxima y sin compensación de la resistencia en serie, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Nótese la menor duración y mayor amplitud del transiente capacitivo, en relación a la figura 2.5.

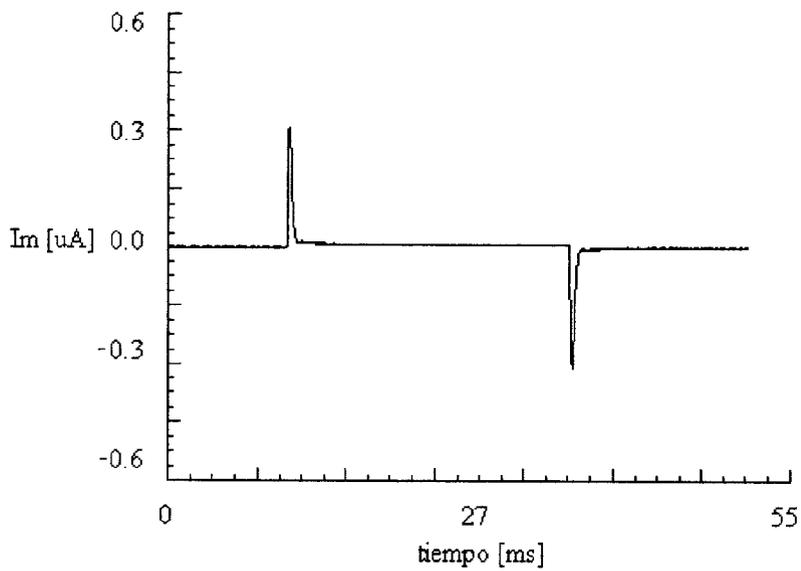


Figura 2.46. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad mínima y con compensación de la resistencia en serie, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Los transientes capacitivos son más rápidos que los de la figura 2.44.

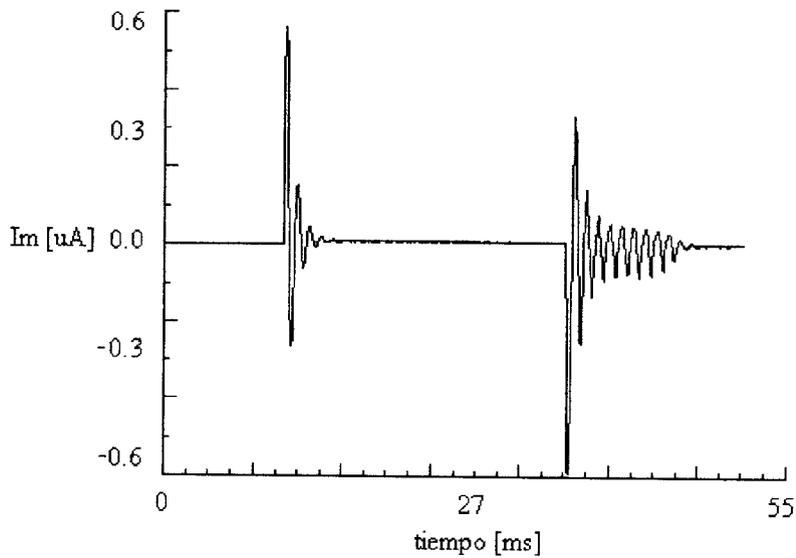


Figura 2.47. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad mínima y sobrecompensando la resistencia en serie, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. La sobrecompensación provoca la oscilación del sistema.

El rango de compensación varía con respecto a la velocidad del pulso. Los datos graficados se obtuvieron utilizando la velocidad mínima del pulso. Las señales medidas para reportar los niveles de compensación se tomaron a la salida del amplificador A1 y a la entrada de la fibra. La compensación óptima se encuentra en el punto anterior al momento en donde el equipo comienza a oscilar, como se aprecia en la figura 2.46. Al compensar la resistencia en serie, se recupera gran parte de la magnitud del pulso comando. En la figura 2.46. puede apreciarse cómo al compensar la resistencia en serie, aumenta la velocidad de fijación del voltaje, lo que se refleja en la disminución del  $\Delta t$  en la curva de los transientes capacitivos. En la figura 2.47. puede verse que cuando se sobrecompensa la resistencia en serie, se recupera la totalidad de la magnitud del pulso comando, pero se introduce inestabilidad al sistema.

La compensación de los transientes capacitivos no se realiza a la salida del equipo. En este sistema se resta la corriente capacitiva a la entrada del convertidor de corriente a voltaje, por lo que no hay riesgo de saturar los amplificadores con grandes transientes capacitivos. Esto proporciona un mayor ancho de banda y permite mejorar la relación señal a ruido.

Puede apreciarse en la figura 2.48. que la compensación elimina gran parte de los componentes de alta frecuencia. La constante de tiempo utilizada en esta versión, permite la eliminación del transiente capacitivo más rápido y de mayor amplitud. Para eliminar la totalidad de la corriente capacitiva lineal, es necesario agregar otra u otras constantes de tiempo. La amplitud de la señal resultante, cuando compensamos componentes capacitivos, decrece un 73 % con respecto a la amplitud máxima que se obtiene al compensar la resistencia en serie. En este caso, para las pruebas realizadas se utilizó la mínima velocidad del equipo.

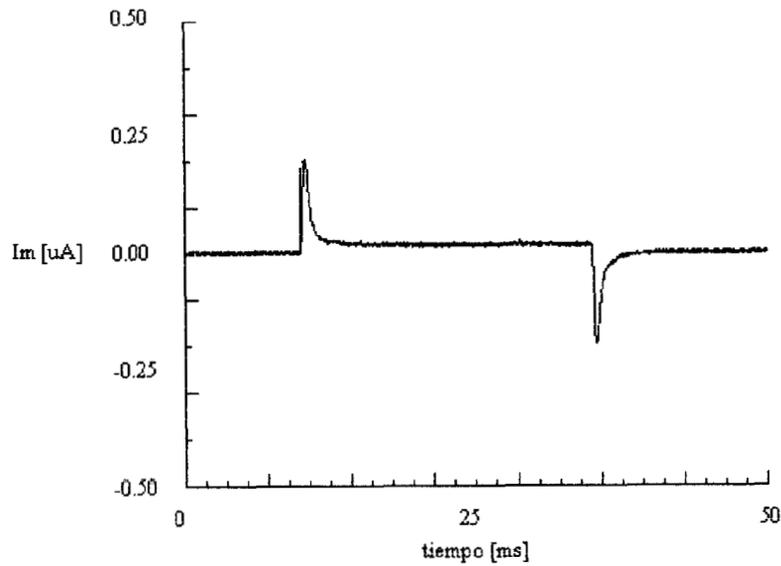


Figura 2.48. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad mínima, compensando la resistencia en serie y restando las corrientes capacitivas, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. Compare la amplitud de los transientes capacitivos con los de la figura 2.5.

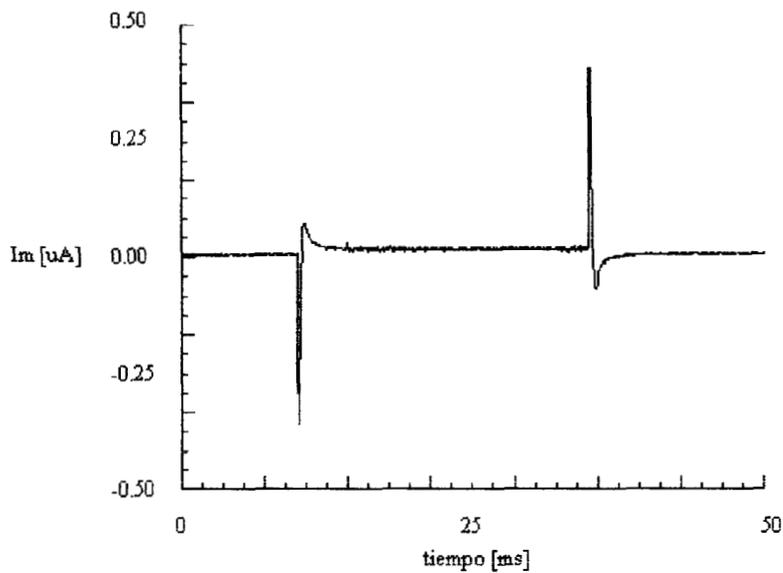


Figura 2.49. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad mínima, compensando la resistencia en serie y sobrecompensando las corrientes capacitivas, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

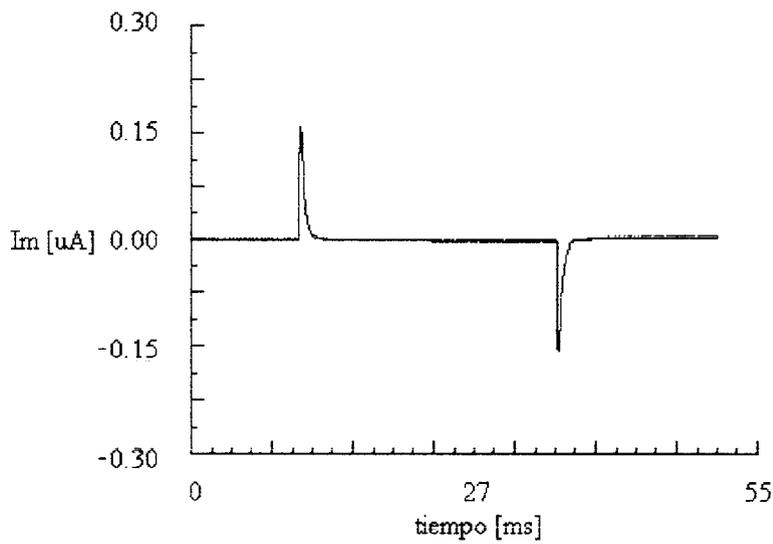


Figura 2.50. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad mínima, compensando la resistencia en serie y restando las corrientes de fuga, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración. La corriente de fuga se hace cero.

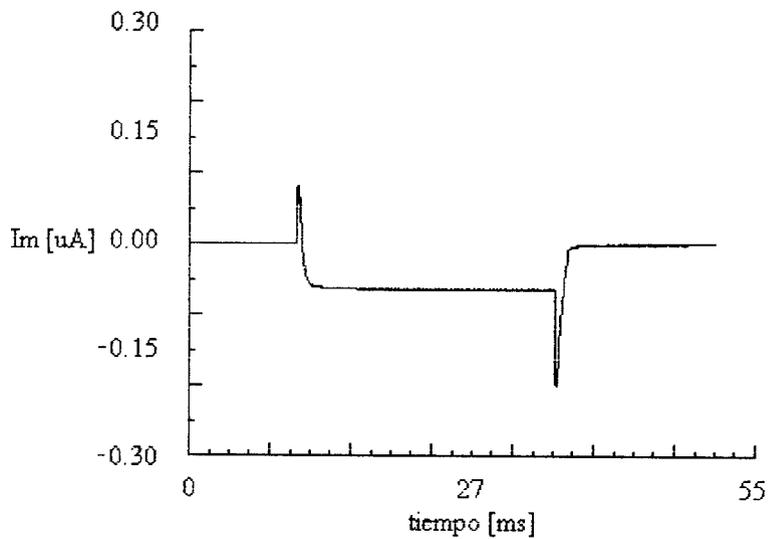


Figura 2.51. Respuesta del modelo de la membrana a velocidad mínima y compensando la resistencia en serie y sobrecompensando las corrientes de fuga, después de aplicar un pulso comando de 100 mV de amplitud y 25 ms de duración.

Cuando se sobrecompensa la resistencia en serie, se elimina la señal original al sustraerle una señal mucho mayor, como puede verse en la figura 2.49.

La compensación de la corriente de fuga es importante, debido a la necesidad de eliminar la presencia de corrientes que se fugan a través de los sellos y por los componentes resistivos de la membrana celular <sup>7, 36, 37</sup>. Esta fuga origina que la señal resultante presente un nivel de dc indeseado. Puede apreciarse el efecto de esta corriente de fuga cuando la señal, después del transiente capacitivo, no regresa a la línea basal en donde se origina (ver figura 2.44.). Durante estas pruebas se utilizó la velocidad mínima del equipo. Los resultados presentados en la gráfica de la figura 2.50. muestran una compensación óptima, puesto que no se presenta el nivel de dc y la señal regresa a la línea basal. En el otro caso, la sobrecompensación se aprecia en un nivel negativo de dc, como puede apreciarse claramente en la figura 2.51. El equipo tiene un rango muy amplio para realizar esta compensación.

## 2.4. Discusión

La técnica de fijación de voltaje es utilizada para el estudio de las propiedades eléctricas de las fibras musculares, tales como la cinética de las corrientes iónicas, la dependencia del voltaje de los canales iónicos, las corrientes capacitivas no lineales relacionadas con el acople excitación-contracción y el estudio de la placa neuromuscular <sup>6,36,37</sup>.

Este trabajo presenta un sistema de fijación de voltaje con dos sellos de vaselina para fibra muscular esquelética cortada, que a diferencia de otros diseños, mejora sustancialmente la relación señal a ruido, la compensación de la resistencia en serie y la eliminación efectiva (y no solo cosmética) de los transientes capacitivos.

Se realizaron varios diseños de sistema de fijación de voltaje. Se han presentado tres versiones, de las cuales la tercera es la que ofrece un mejor desempeño en relación a las características más importantes en un sistema de fijación de voltaje. La presentación de estas tres versiones, corresponde a la evolución y mejoramiento en el sistema de fijación de voltaje propuesto.

La diferencia más notable entre la primera versión y las siguientes, es el control de ganancia. En la primera versión, la ganancia está muy limitada, por lo que no es muy buena la fijación de voltaje y el ancho de banda de respuesta es pequeño. Recuérdese que el potencial al que se fija la membrana está determinado en gran parte por la ganancia en el amplificador de fijación. La baja ganancia de

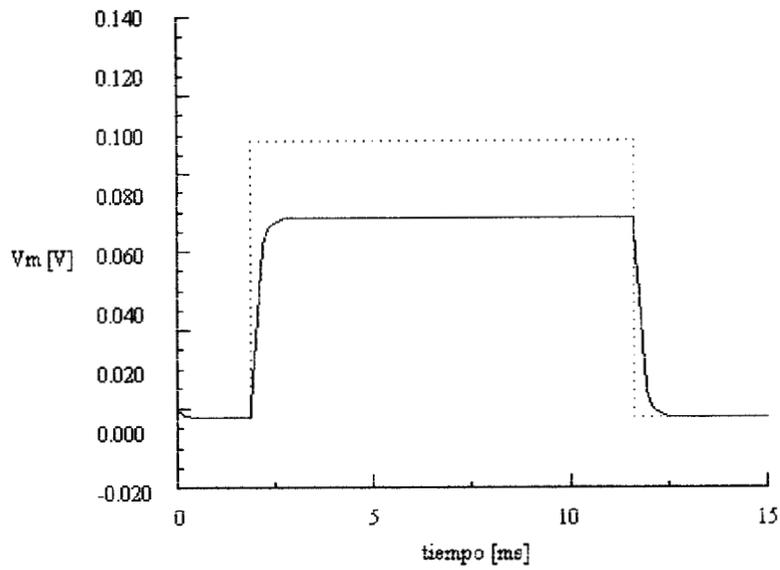


Figura 2.52. Registro del potencial de membrana, cuando se ha aplicado un pulso comando de 100 mV de amplitud y 10 ms de duración. Este resultado muestra la fijación de voltaje obtenida con la primera versión.

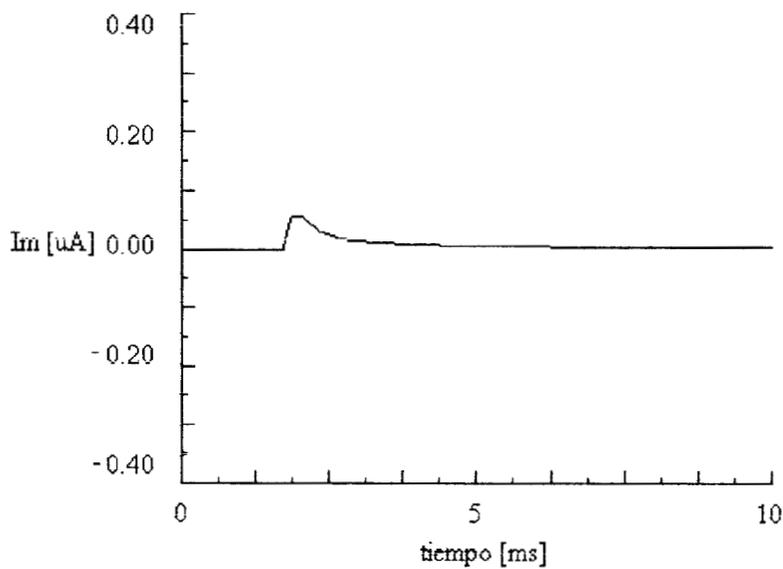


Figura 2.53. Respuesta del modelo de membrana ante un pulso de 100 mV de amplitud y 40 ms de duración, en la primera versión del sistema de fijación de voltaje. Se ilustra la respuesta cuando se ha compensado únicamente la corriente de fuga.

este sistema, no permite una buena relación señal a ruido. El pulso de fijación de voltaje obtenido en esta versión, se muestra en la figura 2.52. Observe el  $\Delta t$  existente entre la línea basal y el valor máximo del potencial. Resulta evidente que el potencial no está siendo fijado rápidamente. Un sistema de fijación de voltaje rápido, presentaría una señal de voltaje de membrana en forma de un pulso cuadrado (línea punteada). Por ello, en la medida que el potencial de membrana se aleja de esta forma cuadrada, disminuye la velocidad de fijación del sistema.

En el caso de la primera versión, la compensación de la resistencia en serie no es muy buena, ya que esta compensación también depende de la ganancia del sistema. La respuesta del modelo de membrana en fijación de voltaje, de esta primera versión, se ilustra en la figura 2.53. Compare la señal de corriente en esta figura, con la presentada en la figura 2.56. El hecho de que la amplitud de la señal de corriente sea menor en el caso de la primera versión se debe a que el potencial no está siendo fijado al valor del pulso comando, como puede verse en la figura 2.52.

La segunda versión no presenta limitación en la ganancia. Esto se logró al modificar la configuración en el amplificador de fijación. En esta versión, se mantiene el interior celular en tierra virtual, a diferencia de la primera versión, y de esta manera se mejora el control de ganancia y la velocidad de fijación. Cabe destacar que con esto aumenta el ancho de banda de la respuesta y se mejora la relación señal a ruido. En esta versión se mejora la compensación de la resistencia en serie, al mejorar el control de ganancia. La compensación de la resistencia en serie de la segunda versión, se ilustra en la figura 2.54. Compare este resultado con los mostrados en las figuras 2.53 y 2.56. Las diferencias

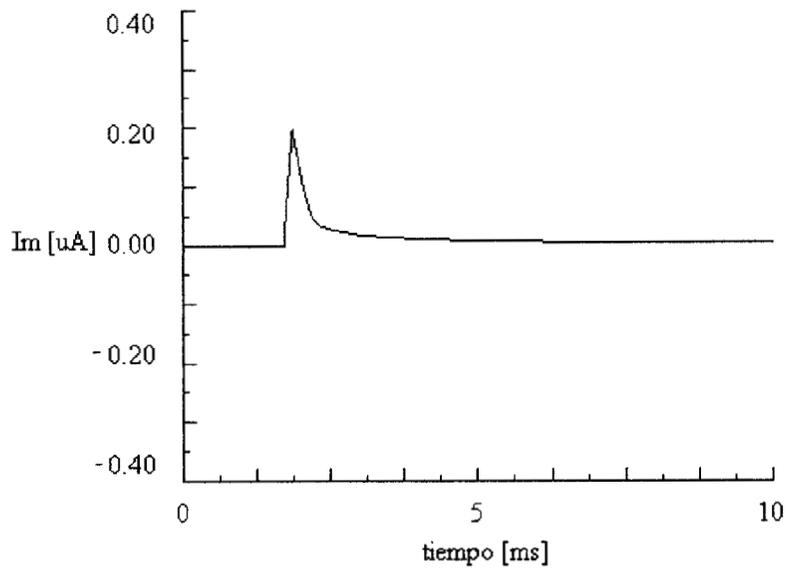


Figura 2.54. Respuesta del modelo de membrana ante un pulso de 100 mV de amplitud y 40 ms de duración, en la segunda versión del sistema de fijación de voltaje. Se presenta la respuesta cuando se ha compensado únicamente la corriente de fuga.

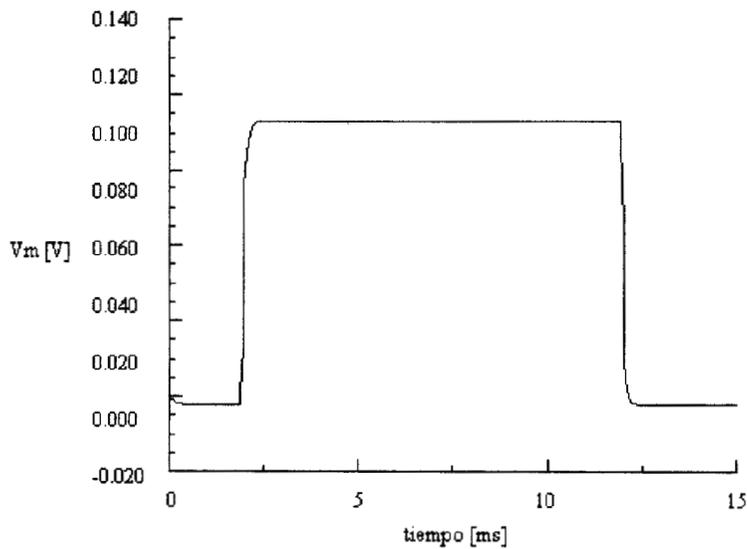


Figura 2.55. Registro del potencial de membrana, cuando se ha aplicado un pulso comando de 100 mV de amplitud y 10 ms de duración. Esta señal corresponde a la generada con la tercera versión de sistema de fijación de voltaje.

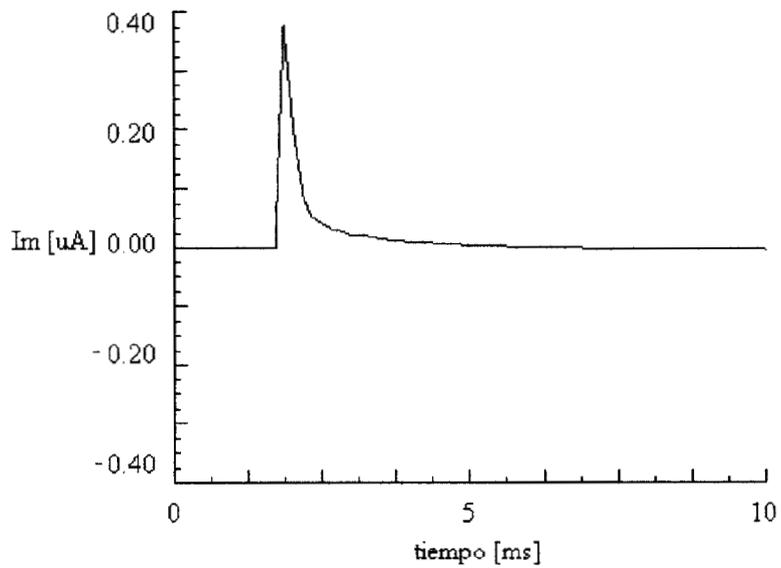


Figura 2.56. Respuesta del modelo de membrana al aplicar un pulso de 100 mV de amplitud y 40 ms de duración, en la tercera versión del sistema de fijación de voltaje. Se presenta la respuesta cuando sólo se ha compensado la corriente de fuga.

mostradas entre estas figuras se deben a la mejor compensación de la resistencia en serie, por lo que el valor del potencial se acerca al valor del pulso comando porque se está sumando adecuadamente la caída registrada en la resistencia en serie  $R_s$  <sup>7</sup>.

En la tercera versión, la velocidad de fijación es mejor que en los casos anteriores, puesto que se reduce el número de amplificadores, con lo que disminuye la constante de tiempo del sistema, permitiendo que el voltaje se fije rápidamente, como puede verse en la figura 2.56. Compare esta figura con el potencial de membrana mostrado en la figura 2.52. Es evidente que el pulso de la figura 2.56 es más rápido en comparación con el presentado en la figura 2.52. La amplitud del pulso es igual a la magnitud del pulso comando en el caso del voltaje mostrado en la figura 2.56.

En todos los casos es posible realizar la compensación de la corriente capacitiva y de la corriente de fuga. También en todos los casos, es posible restar el nivel de dc introducido por los elementos que componen el sistema, así como el nivel de voltaje introducido por los electrodos. En las tres versiones, estas compensaciones tienen un amplio rango de trabajo.

A partir de los resultados comentados, se puede concluir que la tercera versión de sistema de fijación de voltaje es la mejor.

Las características más relevantes de esta tercera versión son : la compensación de la resistencia en serie, la compensación de la corriente capacitiva y la compensación de la corriente de fuga.

La mayor compensación de la resistencia en serie (más del 90 %, cuando lo común es un valor inferior a este porcentaje <sup>7, 11, 24, 36, 37</sup>) aumenta la velocidad de fijación del voltaje, lo cual es deseable para una mejor separación de las corrientes capacitivas de las iónicas<sup>7, 11, 24, 36, 37</sup>; también nos brinda información más precisa de la dependencia del voltaje de los canales iónicos <sup>6</sup>, ya que el potencial transmembranal se ve modificado (alejándose del valor del pulso comando) por la corriente que fluye a través de la resistencia en serie. La mayor compensación de la resistencia en serie se logró por la reducción en la cantidad de amplificadores operacionales en el circuito fijador de voltaje, ya que cada uno de éstos agrega una constante de tiempo en la respuesta.

Otro factor que limita el ancho de banda del sistema de fijación de voltaje es la presencia de transientes capacitivos ocasionados por las capacitancias parásitas en los sellos de vaselina y por la capacitancia de la membrana. En el presente diseño, los transientes capacitivos son eliminados dentro del sistema encargado de mantener constante el voltaje, mejorando con esto su respuesta en frecuencia. Este sistema permite una mayor amplificación de la señal sin peligro de saturar los amplificadores por los transientes, como ocurre frecuentemente. Resulta muy importante este hecho, ya que la eliminación de transientes capacitivos es determinante para la adecuada separación de las corrientes iónicas de las capacitivas lineales y no lineales. A diferencia de otros

diseños<sup>11,13,17,18,24,26,44</sup> donde la compensación de la corriente capacitiva se realiza al final del sistema, esto es, de manera cosmética, la eliminación se realiza antes del convertidor de corriente a voltaje, por lo que de entrada se puede amplificar la señal de corriente tantas veces como se desee, sin riesgo de saturación, como ocurre en otros diseños.

El uso de un convertidor de corriente a voltaje para la medición de las corrientes evocadas, permite mantener en tierra virtual el interior celular y amplificar la señal desde la etapa de entrada <sup>15</sup> (el mismo convertidor) y no en cascada como es lo típico, mejorando la relación señal a ruido y haciendo innecesario utilizar un filtro para eliminar los componentes de alta frecuencia, como se hace en otros diseños <sup>11,13,17,18,24,26,44</sup>. Esto permite reducir el número de amplificadores utilizados para la buena fijación de voltaje y el registro de las corrientes de interés, con lo que a su vez disminuye la constante de tiempo del sistema y con esto aumenta la velocidad con la que este sistema fija el voltaje.

Este diseño permitirá a biofísicos y electrofisiólogos realizar mediciones más precisas de las corrientes iónicas transmembranales y del movimiento de carga. De esta forma, este diseño resultará muy útil en fibras musculares esqueléticas, en particular para el sistema tubular T, en donde la gran resistencia en serie  $R_s$  ha impedido cuantificar con exactitud la dependencia del voltaje de los canales de  $Ca^{++}$  y el movimiento de carga relacionado con el acople excitación contracción.

## 2.5. Sistema de fijación de corriente

Para disponer de un sistema que realice mediciones precisas sobre los fenómenos que ocurren a nivel de la membrana celular, resulta sumamente importante contar con un método que permita registrar qué sucede con el potencial de la membrana, cuando la corriente permanece constante. Este método es el que se denomina, sistema de fijación de corriente.

El sistema de fijación de corriente se realiza a partir del sistema de fijación de voltaje. El sistema de fijación de corriente propuesto está diseñado sobre la tercera versión del sistema de fijación de voltaje. Con esto, la tercera versión del sistema no solo es la mejor, sino la más versátil.

### 2.5.1. Análisis

Como ya se mencionó, la base del sistema de fijación de corriente es el sistema de fijación de voltaje, por lo que las ecuaciones que describen el comportamiento del sistema de fijación de voltaje han sido presentadas en dicha sección. El circuito eléctrico que presenta el sistema de fijación de corriente, se ilustra en la figura 2.57. El interruptor SW determina si el sistema realiza fijación de voltaje o de corriente. Las salidas para medir  $I_m$  y  $V_m$  son las mismas que en el sistema de fijación de voltaje.

Las ecuaciones que representan el comportamiento del sistema de fijación de corriente y que son diferentes de las presentadas en el sistema de fijación de voltaje son

$$V_{A12} = \frac{R41}{R38} ( V_m - V_{A13} )$$

donde  $V_m$  es igual al voltaje que entrega el amplificador A3, que es el voltaje al que se está fijando el potencial de membrana. La ecuación para  $V_{A3}$  fue descrita en secciones anteriores.

A la salida del amplificador A13 el voltaje es

$$V_{A13} = - \frac{R_{44}}{R_{43}} V_{FC}$$

donde  $V_{FC}$  es el voltaje medido en la membrana bajo fijación de corriente.

La señal de utilizada para realizar la fijación de corriente está descrita por la ecuación

$$FC = \frac{V_{A12} - V_m}{R_a}$$

donde  $V_m$  es igual a  $V_{FC}$  cuando el interruptor está en posición de fijación de corriente.

Figura 2.57. Diagrama eléctrico de la versión que contiene el sistema de fijación de corriente .

### 2.5.2. Simulación

La simulación del sistema de fijación de corriente, se realizó en un computador personal, con un procesador 80486 a 40 MHz. El programa utilizado para efectuar las simulaciones, es el Microcap II versión 4.51 de Spectrum.

En la simulación presentada a continuación, se emplearon pulsos de corriente de 5 ms de duración, y amplitudes de -125, -25, 0, 25 y 125  $\mu\text{A}$ .

Al igual que en las simulaciones anteriores, se utilizó el modelo de fibra muscular propuesto por Chandler y col.<sup>11</sup> en 1990.

El resultado de la simulación, presentado en la figura 2.58. ilustra el comportamiento del modelo de membrana, cuando se aplican pulsos de corriente de diferente amplitud.

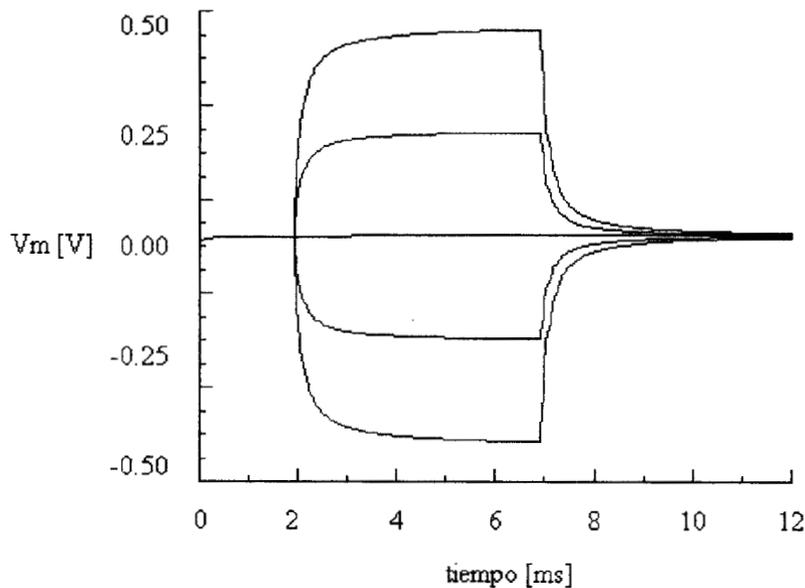


Figura 2.58. Simulación de la respuesta del modelo de membrana cuando se activa el sistema de fijación de corriente. Se aplicaron pulsos de corriente de 5 ms de duración y amplitudes de -125, -25, 0, 25 y 125  $\mu\text{A}$ , respectivamente.

Debido a que el modelo de membrana sólo simula las propiedades pasivas de la membrana, el comportamiento observado al aplicar pulsos de corriente, corresponde al comportamiento de un circuito RC, como puede apreciarse en la figura 2.58.

### 2.5.3. Resultados

De manera similar a la presentación del sistema de fijación de voltaje, en este caso, después de realizar la simulación, se comprobó el funcionamiento del sistema de fijación de corriente de manera real. Los componentes utilizados para la implementación del circuito que realiza la fijación de corriente, son similares a los empleados en el sistema de fijación de voltaje.

La única restricción que existe para el empleo del sistema de fijación de corriente, es que debe disminuirse la ganancia del convertidor de corriente a voltaje, para no saturar el amplificador que registra el comportamiento del potencial de membrana  $V_m$ . De esta forma, cuando se selecciona fijación de corriente, el interruptor SW también modifica la ganancia del convertidor de corriente a voltaje.

Los resultados obtenidos en fijación de voltaje, se ilustran en la figura 2.59. Los resultados concuerdan con los obtenidos en forma teórica.

En este caso, se aplicaron pulsos de corriente de 5 ms de duración y amplitudes entre -125 y 125  $\mu\text{A}$ , con incrementos de 25  $\mu\text{A}$ . La adquisición se realizó con una tarjeta DigiData 1200 y el paquete pClamp, ambos de Axon Instruments.

decapitación y una vez muertos se les desmedula. Posteriormente, se hace una incisión, con tijera gruesa, a la altura del vientre para disecar la piel; a partir de esta abertura, se realiza un corte hasta el púbis y a partir de este punto, se continua el corte a lo largo de toda la pierna y hasta por abajo de la rodilla. Se retira la piel dejando al descubierto los músculos superficiales de la pierna. Durante todo este procedimiento, se baña la región descubierta con la solución A<sup>20</sup> de la tabla A.1.

Se corta el tendón, en el extremo de la rodilla, del músculo gracilis mayor; se retira suavemente este músculo para dejar al descubierto el músculo semitendinoso. Este músculo tiene forma de y, por lo que cuenta con un tendón central del lado de la rodilla que lo divide en dos secciones que se encuentran unidas a la región púbica por medio de tendón. Una vista parcial de la ubicación del músculo semitendinoso puede verse en la figura A.2.

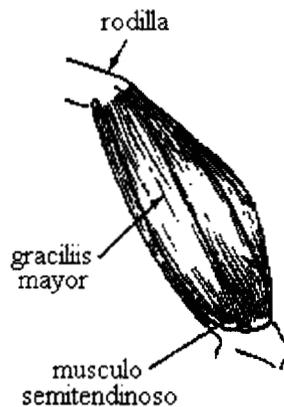


Figura A.2. Vista de los músculos superficiales en la pierna de la rana *Xenopus*. La vista superficial de los músculos difiere entre especies.

Se retira el gracilis mayor de tal forma que queden al descubierto los extremos del músculo semitendinoso; se corta el tendón del extremo inferior (a la

altura de la rodilla) y se retira suavemente para separarlo del gracilis menor. Posteriormente se cortan los tendones de las dos secciones a la altura del púbis y se retira el músculo. Rápidamente se traslada el músculo a una caja de petry que contiene una capa gruesa de silicón (184 Sylgard   brand) y está cubierta por una solución relajante, solución B <sup>39</sup> de la tabla A.1. El uso de esta solución facilita la disección de las fibras musculares, sin el riesgo de que se dañen, puesto que no se presentan contracciones.

Bajo microscopio de disección, el músculo se fija en el fondo de la caja de petry por medio de pequeñas agujas que detienen los tendones y posteriormente se procede a la disección del segmento de fibra a utilizar. Cada una de las secciones en el músculo tiene las siguientes dimensiones (aproximadamente) : longitud 2 cm; ancho 0.5 cm y grosor 0.1 cm.

Cerca de uno de los extremos se hace un pequeño corte transversal. A partir de este corte, con las pinzas se desprende un fascículo de fibras del resto del músculo. De este conjunto de fibras se toman subconjuntos de fibras, cada vez más pequeños, hasta dejar aislada una sola fibra. Una vez que se logró aislar una fibra, se corta del extremo que aun permanecía unido al tendón , procurando cortar desde el tendón. La disección de la fibra se realiza con pinzas y tijeras de microcirugía.

Una vez lograda la disección de la fibra, se transfiere con un trozo de película a la cámara de montaje.

Para verificar el buen estado de las fibras después de realizar la disección, se coloca la fibra en la solución A durante varios minutos y se le aplican pulsos con un estimulador diseñado para este fin. Si las fibras continúan en buen estado,

deben contraerse al recibir el pulso de estimulación. La figura A.3. presenta el circuito del estimulador utilizado para verificar el estado de las fibras musculares.

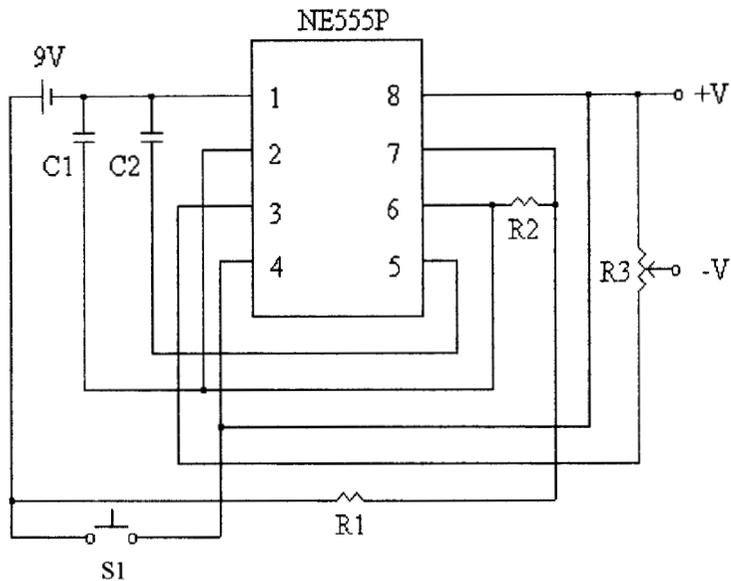


Figura A.3. Circuito estimulador para fibras musculares. El pulso se aplica entre los puntos +V, -V. La amplitud del estímulo puede variar, de acuerdo al valor que presente el potenciómetro R3. El estímulo aparece al oprimir el interruptor S1.

Una vez que se ha verificado el buen estado de las fibras, se puede transferir, confiablemente, el segmento de fibra a utilizar.

## A.2. Montaje experimental

La camarilla experimental está constituida por una pieza de lucita de aproximadamente 4 x 2.5 cm por 0.45 cm de grosor. Esta camarilla cuenta con dos "lanchas" deslizables. Esta camarilla se presenta en la figura A.4.

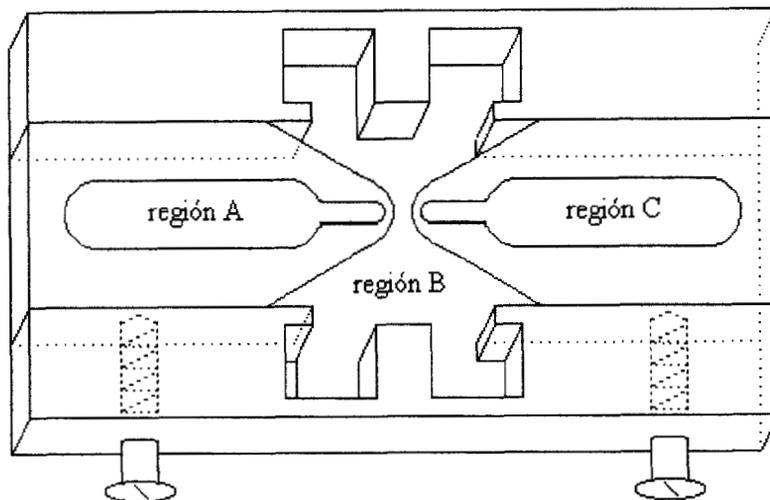


Figura A.4. Camarilla de experimentación utilizada en un sistema de fijación de voltaje con dos sellos de vaselina.

La superficie de la cámara se cubre con una capa fina de vaselina. Se fija una de las "lanchas" mientras la otra se ajusta para lograr un espacio de 100 a 150  $\mu\text{m}$  entre ambas. Una vez logrado este espacio, se fija la otra "lancha" y se coloca una pared fina de vaselina por abajo de las "lanchas"; esto tiene la finalidad de evitar que se pongan en contacto las soluciones de los tres compartimentos formados.

Posteriormente se inunda la cámara con solución interna (solución C <sup>20</sup> de la tabla A.1.) de tal forma que queden llenos todos los comportamientos y la cámara esté lista para recibir el segmento de fibra.

Como ya se mencionó anteriormente, el segmento de fibra es transportado en un trozo de película, y se coloca sobre el eje mayor de la camarilla, abarcando

los tres compartimientos formados; en ese momento, la fibra tiene una longitud mayor a los 2 mm.

A continuación, bajo el microscopio y utilizando una jeringa con aguja fina, se colocan dos sellos de vaselina, transversalmente sobre las superficies angostas de las lanchas. Debe asegurarse que los sellos de vaselina estén en contacto con la superficie de la camarilla, cubriendo totalmente a la fibra en los espacios correspondientes. Esto es muy importante, por que la magnitud de la corriente de fuga, depende directamente de la calidad de los sellos de vaselina.

Una vez con la fibra sumergida en la solución y con los sellos aplicados, se procede a cortar los extremos de la fibra, dejando las siguientes longitudes: 200  $\mu\text{m}$  en los compartimientos laterales y de 100 a 150  $\mu\text{m}$  entre los dos sellos de vaselina, quedando una longitud aproximada de 800  $\mu\text{m}$  de fibra sana.

El montaje de la fibra muscular en la camarilla experimental, se muestra en la figura A.5.

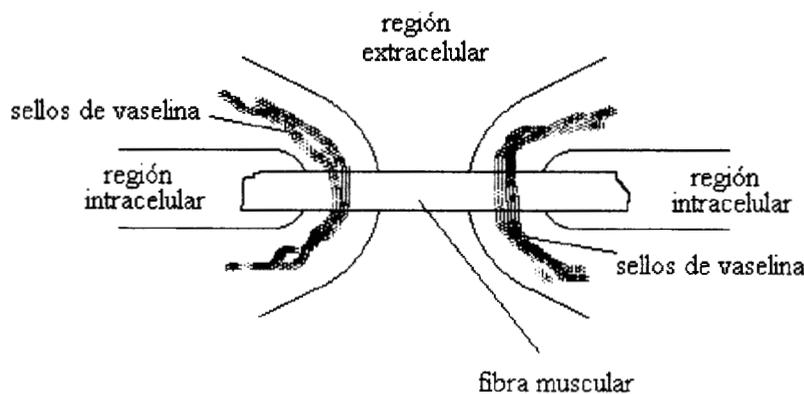


Figura A.5. Montaje de la fibra en la camarilla experimental. Se ilustra la fibra y los dos sellos de vaselina.

	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> EGTA	KAG	Hepes
Solución A	117 mM	2.5 mM	-	1.8 mM	-	-	4 mM
Solución B	-	119.5 mM	1.8 mM	-	-	-	4 Mm
Solución C	-	-	1.5 mM	-	5 mM	110 mM	4 mM

Tabla A.1. Soluciones.

Una vez que la fibra ha sido depositada en la camarilla, se baja la temperatura antes de comenzar los registros. Después de un tiempo de enfriamiento, se colocan los electrodos para realizar los registros. Los electrodos están compuestos por un tubo pequeño, el cual tiene inmersa una placa de plata-cloruro de plata Ag-AgCl, que a su vez está sellada con un alambre que servirá de contacto con el sistema de fijación de voltaje. El resto del tubo se llena con cloruro de potasio KCl 3M. Una vez que se llenan los tubos de los electrodos con esta solución, se conectan con la camarilla experimental a través de puentes de agar. De esta manera, la plata no está en contacto directo con las soluciones intra y extracelular. Realizado esto se coloca un electrodo (a través de puentes de agar) en la región A, otro en la región C y un par en cada lado de la región B, de la camarilla de experimentación. Los puentes de agar son pequeños tubos capilares llenos de agar disuelto en KCl 3M.

Los electrodos con y sin puente de agar, se ilustran en la figura A.6.

Es importante señalar que para la obtención de registros confiables y de buena calidad, es necesario cuidar todos estos detalles, ya que la preparación es sumamente delicada y cualquier error u omisión en este procedimiento, puede deteriorar fácilmente a la célula.

Por último, debe comentarse que tanto la técnica de disección de las fibras musculares, como la aplicación de los sellos de vaselina, son métodos que requieren de mucho cuidado y entrenamiento, por lo que dominar la técnica para lograr una buena preparación biológica suele llevarse varios meses.

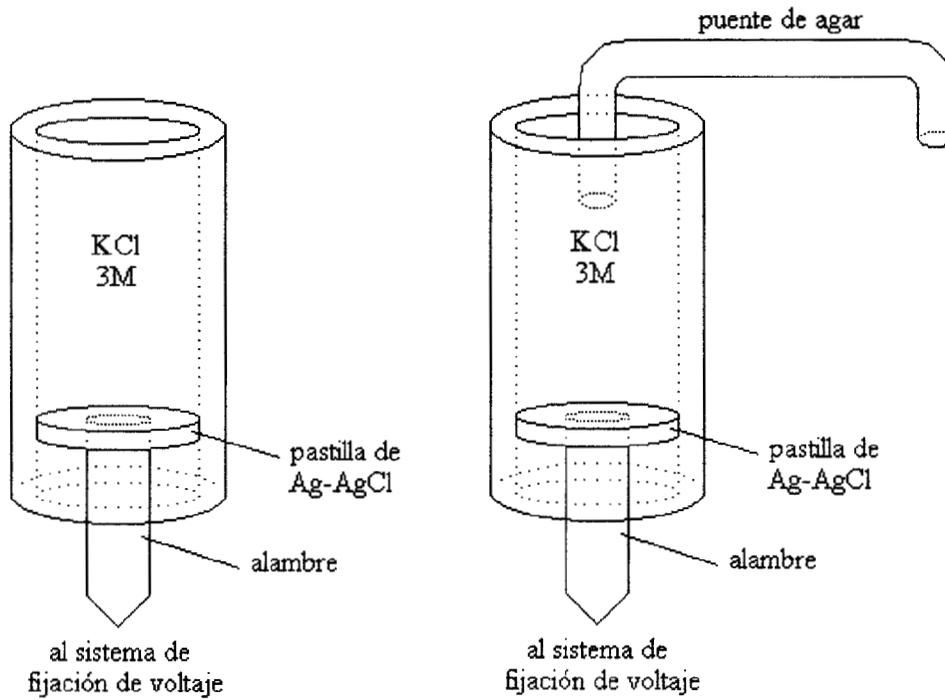


Figura A.6. Electrodo de registro para el sistema de fijación de voltaje con dos sellos de vaselina. Se ilustra la pastilla de plata, el alambre de contacto con la electrónica y el puente de agar

## B. SIMULADOR Micro-Cap II

El simulador Micro-Cap II de Spectrum, es una herramienta muy útil para el diseño y análisis de circuitos eléctricos, además de resultar bastante amigable con el usuario, por lo que resulta ser un instrumento de fácil manejo y de sumo provecho en circuitos eléctricos.

El menú principal que presenta la versión 4.51 del Micro-Cap II, ofrece todas las opciones para diseñar y analizar circuitos eléctricos. La versión profesional, no tiene limitación en cuanto al número de nodos que puede soportar, mientras que la versión para estudiantes está sujeta al uso de un número máximo de 50 nodos.

La pantalla principal del Micro-Cap II presenta las siguientes opciones :

Help Page Enter Zap Short Begin End Draw Nodes Clr File Analyze Util Lib Quit

Para la edición de circuitos eléctricos, se emplean de manera común, los comandos *Enter*, *Zap* y *Short*. El acceso al uso de estos comandos, es tecleando la primera letra de cada comando.

El comando *Enter* sirve para editar cualquier elemento contenido en la librería del programa. De esta manera, si se quiere editar un resistor, se oprime la tecla *E*, para llamar al comando *Enter*, y aparecerá la siguiente leyenda :

Enter type of component...Press ESC to abort

Para editar un resistor, el usuario deberá escribir a continuación *RES*, y oprimir la tecla ←

Enter type of component...Press ESC to abort **RES** ←

A continuación, se presentará la siguiente pregunta :

Direction (R, L, U, D) ?

Y el usuario debe responder de acuerdo a la dirección que desee darle al componente resistor (R derecha, L izquierda, U arriba, D abajo), y oprimir la tecla

←

Direction (R, L, U, D) ? **R** ←

La siguiente pantalla pregunta si desea reflejar el componente.

Reflection (X, Y, none) ?

El usuario debe responde de acuerdo a los requerimientos de su diseño y finalizar oprimiendo la tecla ←.

Reflection (X, Y, none) ? **N** ←

Finalmente, el usuario deberá proporcionar el dato del valor del parámetro (el programa permite el uso de notación científica), cuando aparece el siguiente mensaje

Parameter ?

El usuario puede utilizar también la notación empleada en circuitos eléctricos, esto es,  $K=1000$ ,  $M=1000000$ ,  $p=1*10^{-12}$ ,  $n=1*10^{-9}$ . Después de seleccionar el valor, debe oprimirse la tecla ←.

Parameter ? 1E3 ←

A continuación, aparecerá en la pantalla un resistor dirigido hacia la derecha, sin reflexión, cuyo valor es de  $1\text{ K}\Omega$ .

De manera similar se puede editar un capacitor, un inductor, una batería, una fuente variable, un amplificador operacional, un diodo, etc.

Las palabras con las que se identifican estos componentes en la librería del programa son :

batería	BAT
fuentes variable	V(t)
capacitor	CAP
amplificador operacional	OP AMP

Una vez colocados los elementos del circuito, se unen utilizando el comando *Short*, que se activa al oprimir la tecla S.

En la pantalla aparecerá la pregunta sobre la dirección que desea para el corto; esta dirección está referida al punto en donde el cursor está parpadeando.

Si el usuario quiere eliminar componentes o cambiar el valor de su parámetro, esto se logra fácilmente oprimiendo la tecla Z para activar el comando *Zap*.

El usuario puede hacer uso de todos los componentes contenidos en la librería del programa, y además, tiene la posibilidad de editar nuevos componentes, al describir sus características. Para editar nuevos componentes,

se llama al comando *Lib*, y se elige, de una lista, el componente que desea editarse. Esta pantalla a su vez, lo llevará a un pantalla en la que aparecerán las características del componente elegido; de esta manera, es posible describir las características de elementos no incluidos en la librería, que podrán ser llamados por el programa principal.

Para realizar análisis de circuitos, se hace uso del comando *Analyze*. A continuación aparecerán cuatro opciones para realizar análisis :

Analysis options :    1. Transient    2. A.C.    3. D.C.    4. Fourier

Dependiendo del análisis que se quiera realizar, se elige una de esta cuatro opciones. Cada número llevará al usuario a una nueva pantalla en la que aparecen las características de cada análisis.

Las simulaciones realizadas en el presente trabajo, corresponden al análisis transitorio. El programa puede proporcionar diagramas de Bode (análisis de A.C.), función de transferencia (análisis de D.C.) y espectros de frecuencia (análisis de Fourier).

En este apéndice, se pretende describir de manera breve el funcionamiento de la herramienta computacional elegida para realizar las simulaciones de circuitos eléctricos. Para mayor información sobre el desempeño del Micro-Cap II, consulte :

Micro-Cap II. User's Guide, Spectrum and CSU, Los Angeles CA, 1984.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adrian, R.H., Almers, W. Charge Movement in the Membrane of Striated Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 254, 1976, pp 339-360.
2. Adrian, R.H., Chandler, W.K., Rakowski, R.F. Charge Movement and Mechanical Repriming in Skeletal Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 254, 1976, pp 361-388.
3. Adrian, R.H., Peres, A.R. Charge Movement and Membrane Capacity in Frog Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 289, 1979, pp 83-97.
4. Adrian, R.H., Huang, C.L-H. Charge Movements near the Mechanical Threshold in Skeletal Muscle of *Rana Temporaria*, *Journal of Physiology*, Vol 349, 1984, pp 483-500.
5. Armstrong, C.M., Bezanilla, F. Currents Related to Movement of the Gating Particles on the Sodium Channels, *Nature*, Vol 242, 1973, pp 459-461.
6. Bezanilla, F., Vergara, J. Properties of Excitable Membranes en *Membrane Structure and Function*, Vol 2, John Wiley & Sons, Inc., New York NY, 1980, pp 53-94.
7. Boulton, A.A., Baker, G.B., Vandewolf, C.H. Neurophysiological Techniques: Basic Methods and Concepts en *Neuromethods*, Vol 14, The Humana Press Inc., Clifton NJ, 1990.
8. Brum, G., Rios, E. Membrane Currents and Intramembrane Charge Movement in Non-polarized Skeletal Muscle Fibers. Inactivation without Charge Immobilization, *Biophysical Journal*, Vol 49, 1986, pp 12a.
9. Brum, G., Rios, E. Calcium and the Voltage Sensor of Skeletal Muscle Excitation-Contraction Coupling, *Biophysical Journal*, Vol 49, 1986, pp 459a.
10. Brum, G., Rios, E. Intramembrane Charge Movement in Frog Skeletal Muscle Fibres. Properties of Charge 2, *Journal of Physiology*, Vol 387, 1987, pp 489-517.
11. Chandler, W.K., Hui, C.S. Membrane Capacitance in Frog Cut Twitch Fibers Mounted in a Double Vaseline-Gap Chamber, *Journal of General Physiology*, Vol 96, 1990, pp 225-256.
12. Chen, W., Hui, C.S. Differential Blockage of Charge Movement Components in Frog Cut Twitch Fibres by Nifedipine, *Journal of Physiology*, Vol 444, 1991, pp 579-603.
13. Cole, K.S. Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane, *Arch Sci Physiol*, Vol 3, 1949, pp 253-258.
14. Collins, C.A., Rojas, E., Suárez-Isla, B.A. Fast Charge Movements in Skeletal Muscle, Fibres from *Rana Temporaria*, *Journal of Physiology*, Vol 324, 1982, pp 319-345.
15. Coughlin, R.F., Driscoll, F.F. Circuitos integrados lineales y amplificadores operacionales, segunda edición, Prentice Hall, México, 1987.

16. Deuchar, E. M. *Xenopus : The South African Clawed Frog*, John Wiley and Sons, London GB, 1975.
17. Dietzel, I.D., Bruns, D., Polder, H.R., Lux, H.D. Voltage Clamp Recording en *Practical Electrophysiology Methods*, Wiley-Liss, New York NY, 1993, pp 256-262.
18. Frankenhaeuser, B. A Method for Recording Resting and Action Potential in the Isolated Myelinated Nerve Fibre of the Frog, *Journal of Physiology*, Vol 135, 1957, pp 550-559.
19. García, J., McKinley, K., Appel, H., Stefani, E. Ca Current and Charge Movement in Adult Single Human Skeletal Muscle Fibres, *Journal of Physiology*, Vol 454, 1992, pp 183-196.
20. García, M.C., Díaz, A.F., Godínez, R., Sánchez, J.A. Effect of Sodium Deprivation on Contraction and Charge Movement in Frog Skeletal Muscle Fibres, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, Vol 13, 21. pp 354-365.
22. Gilbert, S.G. *Pictorial Anatomy of the Frog*, University of Washington Press, Seattle WA, 1984.
23. Hammil, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, R.J. Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches, *Pflügers Archiv*, Vol 391, 1981, pp85-100.
24. Hille, B., Campbell, D.T. An Improved Vaseline Gap Voltage-Clamp for Skeletal Muscle Fibers, *Journal of General Physiology*, Vol 67, 1976, pp 265-293.
25. Hodgkin, A.L., Horowicz, P. Potassium Contractures in Single Muscle Fibres, *Journal of Physiology*, Vol 153, 1960, pp 386-403.
26. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B. Measurements of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of *Loligo*, *Journal of Physiology*, Vol 116, 1952, pp 424-448.
27. Horowicz, P., Schneider, M.F. Membrane Charge Movement in Contracting and Non-contracting Skeletal Muscle Fibres, *Journal of Physiology*, Vol 314, 1981, pp 565-593.
28. Horowitz, P., Hill, W. *The Art of Electronics*, Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
29. Huang, C.L-H. Dielectric Components of Charge Movements in Skeletal Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 313, 1981, pp 187-205.
30. Huang, C.L-H. Effects of Local Anaesthetics on the Relationship between Charge Movements and Contractile Threshold in Frog Skeletal Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 320, 1981, pp 381-391.
31. Huang, C.L-H. Pharmacological Separation of Charge Movement Components in Frog Skeletal Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 324, 1982, pp 375-387.
32. Huang, C.L-H. Charge Inactivation in the Membrane of Intact Frog Striated Muscle Fibres, *Journal of Physiology*, Vol 468, 1993, pp 107-124.

33. Huang, C.L-H. Kinetic Separation of Charge Movement Components in Intact Frog Skeletal Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 481.2, 1994, pp 357-369.
34. Huerta, M., Stefani, E. Potassium and Caffeine Contractures in Fast and Slow Muscles of the Chicken, *Journal of Physiology*, Vol 318, 1981, pp 181-189.
35. Hui, C.S., Chen, W. Origin of Delayed Outward Ionic Current in Charge Movement Traces from Frog Skeletal Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 479.1, 1994, pp 109-125.
36. Junge, D. Nerve and Muscle Excitation, Second Edition, Sinauer Associates Inc., Los Angeles CA, 1981.
37. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. Principles of Neural Science, Third Edition, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York NY, 1991.
38. Kovács, L., Schneider, M.F. Increased Optical Transparency Associated with Excitation-Contraction Coupling in Voltage Clamped Cut Muscle Fibres, *Nature*, Vol. 265, 1977, pp 556-560.
39. Kovács, L., Schneider, M.F. Contractile Activation by Voltage Clamp Depolarization of Cut Skeletal Muscle Fibres, *Journal of Physiology*, Vol. 277, 1978, pp 483-506.
40. López, J.R., Alamo, L., Caputo, C., DiPolo, R., Vergara, J. Determination of Ionic Calcium in Frog Skeletal Muscle Fibers, *Biophysical Journal*, Vol 43, 1983, pp1-4.
41. McGuigan, J.A.S., Tsien, R.W. Some Limitations of the Double Sucrose-Gap and its Use in a Study of the Slow Outward Current in Mammalian Ventricular Muscle, *Journal of Physiology*, Vol. 240, 1974, pp 775-806.
42. Melzer, W., Schneider, M.F., Simon, B.J., Szucs, G. Intramembrane Charge Movement and Calcium Release in Frog Skeletal Muscle, *Journal of Physiology*, Vol 373, 1986, pp 481-511.
43. Millman, J. Microelectronics : Digital and Analog Circuits and Systems, McGraw-Hill Book Co., Japan, 1984.
44. Moore, L.E. Voltage Clamp Experiments on a Single Muscle Fibers of *Rana pipiens*, *Journal of General Physiology*, Vol. 60, 1972, pp 1-19.
45. Nakajima, S., Bastian, J. Double Sucrose-Gap Method Applied to Single Muscle Fiber of *Xenopus laevis*, *Journal of General Physiology*, Vol 63, 1976, pp 235-256.
46. Onetti, C.G., García, U., Valdiosera, R.F., Aréchiga, H. Ionic Currents in Crustacean Neurosecretory Cells, *Journal of Neurophysiology*, Vol 64, No. 5, 1990, pp 1514-1526.
47. Rashevsky, N. A Possible Physical Mechanism of Excitation en *Mathematical Biophysics. Physico-Mathematical Foundations of Biology*, Third Edition, Dover Publications, Inc., New York NY, 1960, pp 453-462.
48. Rudy, B. Slow Inactivation of the Sodium Conductance in Squid Giant Axon. Pronase Resistance, *Journal of Physiology*, Vol 283, 1978, pp 1-21.

49. Schilling, D.L., Belove, C. *Electronic Circuits. Discrete and Integrated, Second Edition*, McGraw-Hill Book Co., Singapore, 1985.
50. Schneider, M.F., Chandler, W.K. Voltage Dependent Charge Movement in Skeletal Muscle : a Possible Step in Excitation-Contraction Coupling, *Nature*, Vol 242, 1973, pp 244-246.
51. Tsien, R.W. Calcium Channels in Excitable Cell Membranes, *Annual Review of Physiology*, Vol 45, 1983, pp 341-358.