

Revisión de estado del Arte de medición de potenciales de acción

Santiago Bernardez¹, Joaquín Andrés Hoffer²,
Natalia Garay³ and Franco Simini³

¹Estudiante del XXXII Seminario de Ingeniería Biomédica 2023.

²Conferencista del Seminario del día 28/03/23 de título “Innovaciones en métodos para rescatar, reanimar o reemplazar

músculos: 50 años de investigación y transferencia tecnológica a la industria”, Simon Fraser University, Burnaby, Canada.

³Docentes del XXXII Seminario de Ingeniería Biomédica 2023.

Resumen— El sistema nervioso utiliza potenciales de acción para llevar a cabo sus funciones, estos son generados mediante la apertura y cierre de canales de iones en la membrana celular. Se realizó una búsqueda mediante el motor de búsqueda PUBMED y se encontraron 3 técnicas con las que se mide el potencial de acción, patch-clamp, dispositivos MEA y tintes fluorescentes, se da una aplicación de su funcionamiento, se comparan sus capacidades y las magnitudes a medir, junto con la calidad resolución de sus medidas tanto del potencial de acción en si, como de la resolución temporal y espacial, cuando es aplicable. Como resultado de este análisis se tiene que el método patch-clamp permite medir mayor cantidad de características eléctricas de la célula, sin embargo solo puede medir 1 célula a la vez. Los dispositivos MEA permiten medir múltiples puntos en el espacio, sin embargo las señales a medir son varios ordenes de magnitud mas pequeñas. Y los tintes fluorescentes permiten una mayor resolución espacial, sin embargo estos tintes pueden afectar el funcionamiento de la neurona y hasta ser neurotóxicos al largo plazo.

Palabras clave— Potencial de acción, patch-clamp, MEA, tinte fluorescente.

INTRODUCCIÓN

En las células del cuerpo humano se presentan impulsos eléctricos debido a procesos fisiológicos llamados potenciales de acción, en el caso particular del sistema nervioso estos impulsos son utilizados por las neuronas para comunicarse entre si y llevar a cabo sus funciones, incluyendo el procesamiento de información y transición de información sensorial y motora. Por tanto la medición de estos potenciales de acción resulta impredecible tanto para avanzar en la comprensión del funcionamiento de las neuronas y las estructuras cerebrales, como para las posibles herramientas de diagnóstico y tratamiento en la medicina.

Tal y como Hudkin y Huxley demostraron [1] los potenciales de acción son generados por la apertura de canales iónicos de sodio y potasio en la membrana celular.

En un principio la célula se encuentra polarizada en el estado de reposo siendo la diferencia entre el exterior y el interior -70 mV, en este estado los canales de sodio y potasio están cerrados, si la célula se estimula tal que el voltaje de membrana supera umbral de -55 mV se abren los canales de sodio y potasio, causando que entre sodio a la célula mientras que el potasio escapa el interior de la célula, por lo que la célula se despolariza, la tensión se incrementa hasta hiperpolarizar la célula, llegando a $+15$ mV, en la cual los canales de sodio se cierran y la célula entra en un periodo refractario donde no responde a nuevos impulsos hasta que el flujo de potasio repolariza la célula al potencial de reposo nuevamente.

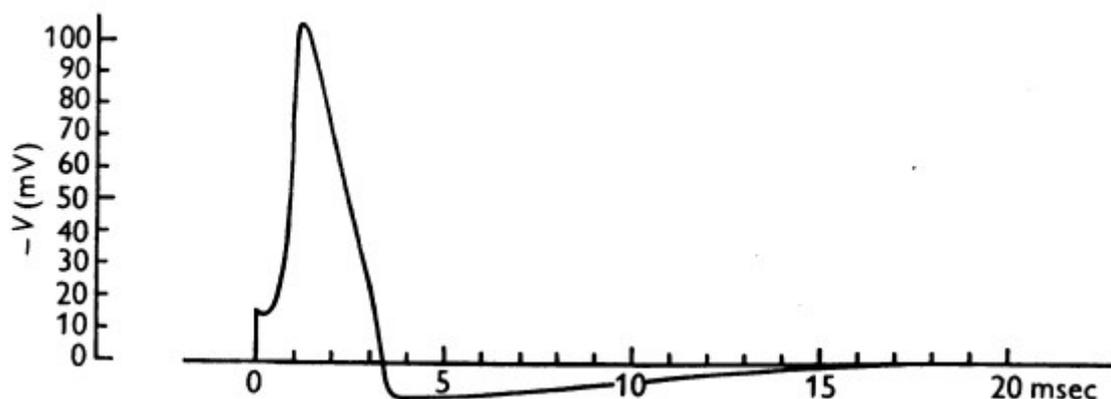


Fig. 1: Simulación del potencial de acción de una célula, presentando las distintas fases de este. La escala vertical tiene un offset de -70 mV. Figura obtenida de [1], página 526

La medición del potencial de acción contiene entonces un gran potencial para tratamientos que mejoren la calidad de vida del paciente, desde restablecer la comunicación entre el cerebro y la médula espinal [2], reemplazar funciones del cerebro dañadas como el habla [3] y establecer interfases entre nervios periféricos y prótesis [4,5].

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de revisar la literatura se utilizó el motor de búsqueda PUBMED, con el cual se tiene acceso a la base de datos MEDLINE la cual cuenta con artículos de distintas revistas científicas. Las palabras clave utilizadas fueron *action potential*, *MEA*, *patch-clamp* y *Voltage Imaging*. Con el objetivo de que esta revisión esté lo más actualizada posible se seleccionaron artículos desde 2010 hasta la presente fecha. A su vez se ahondó más en profundidad en las referencias de los artículos en caso de ser necesario para obtener más información sobre el tema en cuestión.

De los artículos filtrados se seleccionaron aquellos que expliquen características sobre la técnica correspondiente, o demuestren sus aplicaciones en la literatura científica.

II. RESULTADOS

Los métodos a comparar son 3: el método patch-clamp, los dispositivos MEA (array de múltiples electrodos), y los métodos ópticos basados tintes fluorescentes.

A. Patch-Clamp

La técnica patch-clamp consiste en una pipa de vidrio del tamaño del orden de los micrometros, esta micropipa se une a la pared celular mediante succión para formar un sello que alcanza resistencias del orden del gigaohm, una vez formado este es posible inyectar voltaje a la pared y medir la corriente resultante [6].

Esta técnica es altamente versátil, ya que permite interactuar físicamente con la membrana celular para de esta manera tener disponibles distintas configuraciones, las variaciones incluyen, inside-out, donde la se remueve de manera rápida la micropipeta de la célula para separar un fragmento de la membrana celular, esto expone el medio intracelular al extracelular; whole-cell, en el cual mediante succión se rompe un fragmento de la membrana permitiendo que la micropipeta esté en contacto con el medio intracelular; y la configuración outside-out, en la cual una vez se tiene acceso al medio intracelular se remueve de manera lenta la micropipeta para que una parte de la membrana se separe de la célula y se adhiera a la micropipeta, esto sería equivalente a una célula en la cual el medio intracelular es la solución dentro de la micropipeta, con lo cual se puede estudiar el comportamiento de la membrana al variar esta solución

Esta técnica presenta múltiples ventajas, la ya mencionada versatilidad, la posibilidad de poder medir canales iónicos individuales y buena calidad de las mediciones [6].

Sin embargo tiene 2 inconvenientes principales: la incapacidad de medir múltiples puntos al mismo tiempo de manera sencilla y una mayor necesidad de personal capacitado y tiempo para realizar esta técnica.

La aplicación que mas diferencia este método de los otros 2 es la ya mencionada capacidad de medir canales iónicos individuales, con esto es posible estudiar como distintas sustancias afectan a estos canales, por ejemplo medicaciones como antidepresivos, antipsicóticos, antiaritmicos, anestésicos locales, entre otros [7].

B. Dispositivos MEA.

Por otra parte se dispone de los dispositivo MEA, los cuales consisten en múltiples electrodos con los cuales se miden los potenciales de acción, estos dispositivos permiten la fácil medición de potenciales de acción en múltiples puntos del tejido, tanto *in vivo* como *in vitro* [8].

En la figura 2 se muestra un diagrama esquemático del hardware interno de uno de estos dispositivos, consistiendo este principalmente en un circuito digital capaz de digitalizar la señal analógica de los distintos canales de los electrodos y transmitir estos datos.

Estos dispositivos se subdividen en 2 clasificaciones, los MEA clásicos, con menos de 100 electrodos [8] por mm^2 y los HD-MEA que incluyen transistores CMOS con lo cual se logra incrementar la densidad de electrodos [9] hasta más de 3000 por mm^2 , utilizando estos dispositivos se ha logrado medir tanto la actividad de poblaciones de neuronas en el cerebro [8,10,11] como la transmisión de un potencial de acción a través de un axón [13] periférico, hasta la actividad eléctrica subcelular [9], sin embargo, estos dispositivos presentan múltiples desventajas, la primera es que el voltaje medido es extracelular, el cual es alrededor de 3 ordenes de magnitud menos que en la técnica de patch-clamp, además se requiere cirugía invasiva para instalar los electrodos, y estos pueden causar una respuesta inmune deteriorando el funcionamiento de los electrodos [12], otro factor a considerar es la potencia disipada por el dispositivo, esta debe ser lo suficientemente pequeña como para que la temperatura del tejido sea tanto compatible con la vida de la neuronas como su correcto funcionamiento, para esto es recomendable que la potencia disipada sea menor a 100mW, para un dispositivo de dimensiones $3.85 \times 2.10 \text{ mm}^2$ que disipa 75 mW se produce una diferencia de temperatura de $0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ en el tejido circundante [14]. Otra precaución a tener en cuenta es que se debe de evitar que los iones de cobre y aluminio se disuelvan en el medio extracelular para evitar su toxicidad[15].

Un ejemplo de estos dispositivos es analizado en el artículo [9], las características a resaltar incluyen la disponibilidad de 1024 canales de lectura, que pueden seleccionar cualquiera de los 26400 electrodos disponibles y muestrear digitalmente a 20 kHz.

El ruido introducido por el dispositivo es de $2.4 \mu V_{rms}$ entre las frecuencias 300Hz y 10kHz, entre las cuales encuentra la mayoría de la potencia de un potencial de acción, un ejemplo de la distribución de la potencia de este ruido se encuentra en [14], esta distribución corresponde aproximadamente con $1/f$, este tipo de ruido es llamado ruido flicker y es causado por de las impurezas en el silicio de los transistores, y la funcionalidad de la estimulación eléctrica del tejido, lo cual no es necesario para medir la actividad normal del cerebro pero puede ser de utilidad en ciertas aplicaciones científicas y medicas.

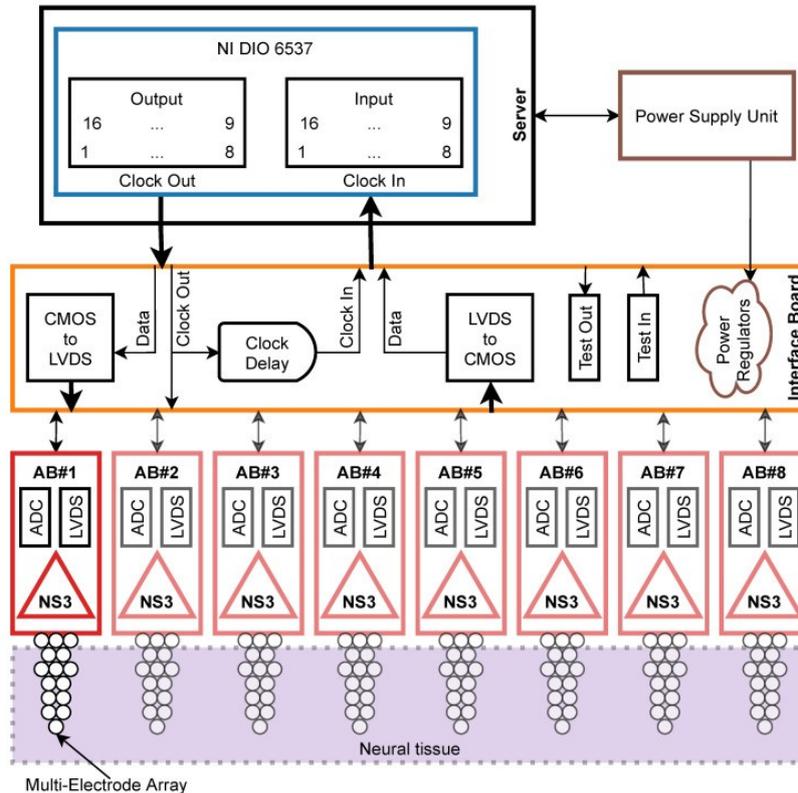


Fig. 2: Descripción del funcionamiento de hardware de un HD-MEA basado en transistores CMOS, imagen obtenida del artículo [16].

C. Tintes fluorescente.

Los métodos ópticos implican la utilización de sustancias que cambian su fluorescencia en respuesta a cambios al voltaje u otros fenómenos causados por el potencial de acción, como el cambio de concentración de iones de calcio [18].

Estas sustancias pueden ser introducidas de manera exogena o es posible modificar genéticamente las neuronas de un embrión para que produzcan proteínas que cumplan esta función [17,18].

El setup de medición utilizando este método consiste en introducir el tinte fluorescente en el espacio entre neuronas, iluminar con un láser de potencia de alrededor de 400 mW [19], la magnitud a medir corresponde al cambio relativo en

la fluorescencia $\frac{\Delta F}{F}$ causado por el potencial de acción. Luego la fluorescencia debe de ser medida y guardada ,

para esto se requiere otro instrumento para realizar la conversión entre la señales óptica a eléctrica, hasta el año 2000 se utilizaban arreglos de fotodiodos para realizar esta conversión [20], pero actualmente se utilizan cámaras, las características más importantes de estas son la resolución de la cámara, la profundidad de memoria de cada pixel, el ruido de lectura y la tasa de muestreo [19].

Esta técnica a logrado medir con alta resolución espacial el potencial de acción de neuronas en el cerebro [18] y de neuronas individuales hasta el nivel de sus dendritas [19].

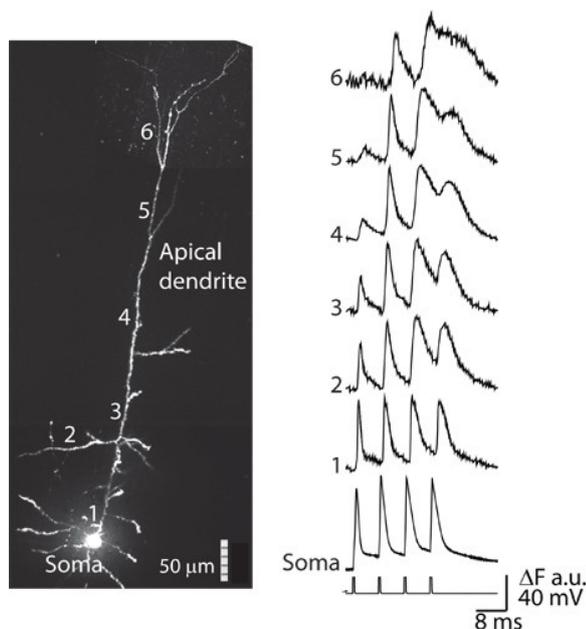


Fig. 3: Imagen de neurona expuesta tintes fluorescentes y extrapolación del potencial de acción a distintos puntos. Obtenido de [19]

Sin embargo el método de tintes presenta ciertos inconvenientes, como la producción de especies de oxígeno reactivas que son tóxicas para las neuronas a largo plazo y degradan químicamente los tintes [17]. La luz del proceso puede dañar a las neuronas de igual manera [17,19]. Los tintes pueden ser difundidos destruyendo la sensibilidad [17]. Los efectos que pueda tener el tinte sobre la conducción y generación de potenciales de acción, por ejemplo ciertos tintes incrementan la capacitancia de la membrana, lo cual reduce la amplitud del potencial de acción [17,19].

Estas desventajas varían dependiendo del método utilizado, por ejemplo las sustancias que dependen de los iones de calcio tienen mayor sensibilidad, menor ruido y menor toxicidad, sin embargo sufren de menor resolución temporal, dificultad para medir voltajes menores al umbral del potencial de acción y saturan si la frecuencia de los potenciales de acción se vuelve lo suficientemente alta [17].

I. DISCUSIÓN

Cada método presentado tiene ventajas y desventajas con respecto a los otros, para empezar el método de patch-clamp permite medir voltajes extracelulares e intracelulares, además de ser el único método capaz de medir corriente y poder medir las características de un canal iónico particular, sin embargo no permite medir múltiples puntos al mismo tiempo.

Los dispositivos MEA sacrifican la flexibilidad de patch-clamp a cambio de la posibilidad de medir múltiples puntos de manera simultánea.

Los métodos fluorescentes permiten una mayor precisión espacial que los HD-MEA, llegando hasta el nivel de dendrita [19], pero con la desventaja de carecer de estimulación eléctrica integrada en los otros métodos, además de los efectos de los tintes sobre la célula y la degradación química de estos tintes que limita la aplicación a largo plazo [17]. La elección de que método utilizar depende de la aplicación y las limitaciones particulares que se presenten, por ejemplo en el caso de una prótesis el método fluorescente puede ser subóptimo debido a la duración limitada de la aplicación de este método y se presenta el problema adicional de que la señal eléctrica del potencial de acción es transformada en una señal lumínica la cual debe de ser convertida nuevamente en una señal eléctrica para accionar los mecanismos de la prótesis. En la literatura presentada en la introducción sobre prótesis se puede observar como la interfaz entre nervio y máquina está basada en electrodos [2,3,4,5]. Igualmente es posible combinar múltiples métodos que compensen las desventajas del otro, por ejemplo en el artículo [19] se utilizan tanto la técnica patch-clamp como los tintes fluorescentes.

II. CONCLUSIONES

A lo largo de esta monografía se analizaron diversos métodos para la medición de potenciales de acción, comparando sus principios de funcionamiento, los cuales resultan en ventajas y desventajas de cada método comparado con los otros, tanto en capacidades de medición como calidad de las mediciones, por lo que cada método es preferible en ciertas aplicaciones más que en otras.

Un siguiente paso como continuación a esta monografía sería realizar una comparación de los métodos aplicados en distintas áreas y para múltiples propósitos, por ejemplo, en prótesis y dispositivos de diagnóstico.

REFERENCIAS

1. A.L HODGKIN, and A F HUXLEY. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. In *The Journal of physiology* vol. 117 , Pages 500-544, 1952.
- 2.H. Lorach, A. Galvez et al . Walking naturally after spinal cord injury using a brain-spine interface. In *Nature* vol. 618,7963,Pages 126-133,2023. URL <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06094-5>
- 3.D.A. Moses, et al. Neuroprosthesis for Decoding Speech in a Paralyzed Person with Anarthria. In *The New England journal of medicine* vol, 385,3 ,Pages 217-227,2021. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8972947/>
- 4.C.C. Rowan,O. Graudejus and T.M. Otchy. A Microclip Peripheral Nerve Interface (μ cPNI) for Bioelectronic Interfacing with Small Nerves. In *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany)* vol. 9,3, e2102945,2020. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8787429/>
- 5.S. Naufel,L.G. Knaack, R. Miranda, T.K. Best, K. Fitzpatrick, A. A. Emondi, E.V. Gieson, T. McClure-Begley, *DARPA investment in peripheral nerve interfaces for prosthetics, prescriptions, and plasticity*. In *Journal of Neuroscience Methods*, vol 332,108539,ISSN 0165-0270,2020. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027019303966>
- 6.X. Yajuan , L. Xin and L. Zhiyuan . A comparison of the performance and application differences between manual and automated patch-clamp techniques. In *Current chemical genomics*, vol 6, Pages 87-92, 2012 URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549544/>
- 7.N. Lenkey,R. Karoly,P. Lukacs, E.S Vizi.M. Sunesen, L. Fodor and A. Mike. Classification of drugs based on properties of sodium channel inhibition: a comparative automated patch-clamp study. In *PLoS one*, vol. 5,12,Pages e15568, 2010. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004914/>
8. M. Schröter, C. Wang, M. Terrigno, P. Hornauer, Z. Huang, R. Jagasia, and A. Hierlemann. Functional imaging of brain organoids using high-density microelectrode arrays. In *MRS bulletin*, vol 47(6), Pages 530–544, 2022. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9474390/>
9. J. Müller, M. Ballini, P. Livi, Y. Chen, M. Radivojevic, A. Shadmani, V. Viswam, I.L Jones, M. Fiscella, R. Diggelmann, A. Stettler, U. Frey, D.J Bakkum, and A. Hierlemann. High-resolution CMOS MEA platform to study neurons at subcellular, cellular, and network levels. In *Lab on a chip*, vol 15(13), Pages 2767–2780, 2015. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5421573/>
10. T. Bullmann, M. Radivojevic, S.T Huber, K. Deligkaris, A. Hierlemann, & U. Frey. Large-Scale Mapping of Axonal Arbors Using High-Density Microelectrode Arrays. In *Frontiers in cellular neuroscience*, vol 13, Pages 404, 2019. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6742744/>
11. K.R Tovar, D.C Bridges, B. Wu, C. Randall, M. Audouard, J. Jang, P.K Hansma, and K.S Kosik . Action potential propagation recorded from single axonal arbors using multielectrode arrays. In *Journal of neurophysiology*, Vol 120(1),Pages 306–320,2018. URL https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/jn.00659.2017?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org
12. J.K Hermann, and J.R Capadona. Understanding the Role of Innate Immunity in the Response to Intracortical Microelectrodes. In *Critical reviews in biomedical engineering* vol. 46,4 ,Pages 341-367, 2018. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6391891/>
13. B. Lee, M.K Koripalli, Y. Jia,J. Acosta,M.S.E Sendi,Y. Choi and M. Ghovanloo. An Implantable Peripheral Nerve Recording and Stimulation System for Experiments on Freely Moving Animal Subjects. *Sci Rep* 8,Page 6115, 2018. URL <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24465-1>
14. M. Ballini, J. Müller et al. A 1024-Channel CMOS Microelectrode Array With 26,400 Electrodes for Recording and Stimulation of Electrogenic Cells In Vitro. In *IEEE journal of solid-state circuits* vol. 49,11,Pages 2705-2719,2014. doi:10.1109/JSSC.2014.2359219
15. J. Dragas,V. Viswam, A. Shadmani, Y. Chen,R. Bounik, A. Stettler, M. Radivojevik,S. Geissler,M. Obien,J. Müller.A Multi-Functional Microelectrode Array Featuring 59760 Electrodes, 2048 Electrophysiology Channels, Stimulation, Impedance Measurement and Neurotransmitter Detection Channels. In *IEEE journal of solid-state circuits* vol. 52,6,Pages 1576-1590,2017. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5447818/>
16. P. Jurgielewicz, T. Fiutowski ,E. Kublik,A. Skoczeń,M. Szypulska,P. Wiącek,P. Hottowy and B. Mindur. Modular Data Acquisition System for Recording Activity and Electrical Stimulation of Brain Tissue Using Dedicated Electronics. In *Sensors (Basel)*.vol 21(13), Page 4423, 2021. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8271791/>
- 17.D.S Peterka, H. Takahashi and R. Yuste. Imaging voltage in neurons. In *Neuron* vol. 69,1,Pages 9-21,2011. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387979/>
18. N. Ghitani,P.O Bayguinov,Y. Ma and M.B Jackson. Single-trial imaging of spikes and synaptic potentials in single neurons in brain slices with genetically encoded hybrid voltage sensor. In *Journal of neurophysiology* vol. 113,4,Pages 1249-1259, 2015. URL https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jn.00691.2014?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
- 19.M. Popovic,X. Gao,,D. Zecevic. Voltage-sensitive dye recording from axons, dendrites and dendritic spines of individual neurons in brain slices. In *Journal of visualized experiments : JoVE* ,vol 69, Page 4261, 2012. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3565854/>
20. T. Tominaga,R. Kajiwara and Y. Tominaga . Stable wide-field voltage imaging for observing neuronal plasticity at the neuronal network level. In *Biophysics and psychobiology*, vol. 20,1 e200015, 2023. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10338050/>