



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA  
CBI DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA  
POSGRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

**MODELADO Y SIMULACIÓN DE LA  
TRANSMISIÓN DE SEÑALES ELÉCTRICAS EN  
LA INTERFASE: NANOTUBOS DE CARBONO -  
NEURONA PARA EL DISEÑO Y LA  
CONSTRUCCIÓN DE ELECTRODOS  
NEURONALES**

Tesis que presenta  
**M.C. Israel Morales Reyes**  
Para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias**

**Asesores:** Dr. Rafael Godínez Fernández

Dr. Nikola Batina

**Jurado calificador:**

Presidente: Dr. Andrés de Luna Bugallo

Secretario: Dr. Rafael Godínez Fernández

Vocal Dra. Iris Natzielly Serratos Álvarez

Vocal Dr. Michel Picquart

Vocal Dr. Javier Vargas Sánchez

Ciudad de México, Febrero 2017



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA



No. 00024

Matricula: 205384029

MODELADO Y SIMULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE SEÑALES ELÉCTRICAS EN LA INTERFASE: NANOTUBOS DE CARBONO - NEURONA PARA EL DISEÑO Y LA CONSTRUCCIÓN DE ELECTRODOS NEURONALES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 24 del mes de febrero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ANDRES DE LUNA BUGALLO
- DR. MICHEL PICQUART
- DR. IRIS NATZIELLY SERRATOS ALVAREZ
- DR. JAVIER VARGAS SANCHEZ
- DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

ISRAEL MORALES REYES  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

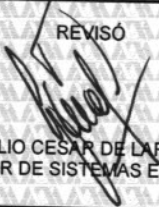
DOCTOR EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: ISRAEL MORALES REYES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES


Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI




DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE



DR. ANDRES DE LUNA BUGALLO

VOCAL




DR. MICHEL PICQUART

VOCAL



DR. IRIS NATZIELLY SERRATOS ALVAREZ

VOCAL



DR. JAVIER VARGAS SANCHEZ

SECRETARIO



DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

*I can't remember when you weren't there  
When I didn't care for anyone but you  
I swear we've been through everything there is  
Can't imagine anything we've missed  
Can't imagine anything the two of us can't do...*

*NM*

## Índice

I.	Introducción .....	1
	Definición, tipos y propiedades de electrodos neuronales .....	2
	Desventajas del registro/estimulación neuronal por medio de los ENs actuales .....	4
	Definición, tipos y propiedades de los nanotubos de carbono .....	4
	Red o película delgada de nanotubos de carbono.....	7
	Características de algunos electrodos construidos con nanotubos de carbono .....	8
	Actividad eléctrica neuronal y su registro/estímulo mediante un electrodo neuronal .....	9
	Registro/estímulo mediante un electrodo neuronal .....	11
	Modelado, simulación y perspectivas en la interfase electrodo-neurona .....	13
	Modelado y simulación por el método de los elementos finitos de la interfase neuronal .....	14
	Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica .....	17
II.	Antecedentes .....	18
	Trabajos preliminares .....	18
	Modelos desarrollados para caracterizar la interfase .....	19
	Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica .....	25
III.	Hipótesis.....	26
IV.	Justificación.....	26
V.	Objetivos .....	27
	Objetivo general.....	28
	Objetivos particulares .....	28
VI.	Diseño, construcción, caracterización y modelado del eNTCPM .....	29
	Metodología.....	29
	Diseño y construcción del eNTCPM .....	30
	Caracterización del eNTCPM.....	32
	Modelado y simulación por el método de los elementos finitos del eNTCPM (I) .....	35
	Resultados.....	37
	Diseño y construcción del eNTCPM .....	37
	Caracterización del eNTCPM.....	37
	Modelado y simulación por el método de los elementos finitos del eNTCPM (I) .....	54
	Discusión .....	58



VII.	Cultivo, caracterización, estimulación y modelado de la línea celular NG108-15.....	63
	Metodología.....	63
	Cultivo de la línea celular NG108-15 en controles y sobre el eNTCPM .....	64
	Caracterización de la línea celular cultivada en controles y sobre el eNTCPM .....	65
	Estímulo extra e intracelular de la línea NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM.....	67
	Modelado y simulación por el método de los elementos finitos de la interfase (II) .....	67
	Resultados.....	72
	Cultivo de la línea celular NG108-15 en controles y sobre el eNTCPM .....	72
	Caracterización de la línea celular cultivada en controles y sobre el eNTCPM .....	72
	Estímulo extra e intracelular de la línea NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM.....	84
	Modelado y simulación por el método de los elementos finitos de la interfase (II) .....	86
	Discusión .....	106
VIII.	Aplicación: registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica de una célula NG108-15 .....	110
	Metodología.....	110
	Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica (“bi-Patch Clamp”) .....	110
	Modelo de punto de contacto: Registro simultáneo.....	111
	Resultados.....	113
	Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica (“bi-Patch Clamp”) .....	113
	Modelo punto de contacto: Registro simultáneo.....	117
	Discusión .....	118
IX.	Conclusiones .....	121
	Perspectivas .....	122

## Lista de figuras

I. Introducción .....	1
Figura I-1. Esquema de la interfase neuronal .....	1
Figura I-2. ENs empleados en electrofisiología para estimular y registrar neuronas .....	3
Figura I-3. Esquema de la estructura molecular de distintos tipos de NTC .....	5
Figura I-4. Esquema de los tipos de NTC .....	6
Figura I-5. Esquema de una neurona que muestra las partes básicas que la componen .....	9
Figura I-6. Esquema de la membrana de una neurona y del potencial de acción .....	10
Figura I-7. Esquema de la doble capa eléctrica .....	11
Figura I-8. Esquema de la interfase electrodo neuronal/medio extracelular con los procesos farádicos y no-farádicos. ....	12
Figura I-9. Esquema de la interfase electrodo/electrólito con los procesos farádicos y no-farádicos. ....	12
Figura I-10. Representación de un dominio 2D por medio de triángulos y cuadriláteros .....	15
Figura I-11. Diferentes tipos de elementos finitos .....	16
II. Antecedentes .....	18
Figura II-1. Modelo de punto y área de contacto de la interfase neuronal .....	19
Figura II-2. Modelo de la interfase neuronal de A. Mazzatenta et al .....	21
Figura II-3. Modelo de la interfase neuronal de G. Massobrio et al .....	22
Figura II-4. Modelo equivalente de la interfase electrodo/electrolito .....	23
Figura II-5. Modelo de punto de contacto de la interfase neurona-nanoalambre .....	23
III. Hipótesis .....	26
IV. Justificación .....	26
V. Objetivos .....	27
VI. Diseño, construcción, caracterización y modelado del eNTCPM .....	29
Figura VI-1. Etapas del diseño, construcción, caracterización y modelado del eNTCPM .....	29
Figura VI-2. Dispersión de los NTCPM .....	31
Figura VI-3. Preparación de la película de NTCPM .....	31
Figura VI-4. Esquema del eNTCPM construido para este trabajo .....	32
Figura VI-5. Esquema de la caracterización morfológica de la superficie del electrodo por AFM. ....	33
Figura VI-6. Medición de resistividad superficial .....	34
Figura VI-7. Esquema de la simulación del experimento de los cuatro puntos .....	37
Figura VI-8. Imagen y esquema del eNTCPM diseñado y construido en el laboratorio de nanotecnología e ingeniería molecular para el desarrollo experimental .....	37
Figura VI-9. Imágenes de microscopía óptica de la distribución de los NTCPM sobre la superficie del cubreobjetos de vidrio .....	38
Figura VI-10. Micrografías SEM de la superficie del electrodo .....	39
<i>Figura VI-11. Imágenes TEM de la superficie del eNTCPM construido .....</i>	<i>40</i>
Figura VI-12. Esquema del eNTCPM caracterizado .....	41
Figura VI-13. Imágenes AFM de la superficie del electrodo .....	42
Figura VI-14. Par de NTCPM individuales entrelazados formando un sitio de contacto importante para la transmisión de señales eléctricas .....	43
Figura VI-15. Espectros Raman del eNTCPM .....	44

Figura VI-16. Mapeo Raman de la película de nanotubos .....	45
Figura VI-17. Curvas corriente-voltaje .....	47
Figura VI-18. Potencial de interfase desarrollado en un periodo de tiempo .....	49
Figura VI-19. Voltamograma de -1500 a 1000 mV de electrodos construidos con diferentes materiales. 50	
Figura VI-20. Voltamograma -600 a 600 mV y de -400 a 50 mV .....	51
Figura VI-21. Efecto del incremento de la velocidad de barrido en el experimento voltametría cíclica....	52
Figura VI-22. Cronocougrama del eNTCPM .....	53
Figura VI-23. Cronoamperograma .....	53
Figura VI-24. Construcción de la geometría del eNTCPM.....	55
Figura VI-25. Resultados de la simulación del experimento de los cuatro puntos.....	57
Figura VI-26. Comportamiento eléctrico del electrodo en el medio extracelular .....	58
VII. Cultivo, caracterización, estimulación y modelado de la línea celular NG108-15.....	63
Figura VII-1. Etapas del cultivo, caracterización, estimulación y modelado de la línea celular NG108-15.63	
Figura VII-2. Esquema e imagen del registro electrofisiológico utilizando las técnicas estándar de fijación de corriente/voltaje .....	67
Figura VII-3. Esquema de registro y estimulación.....	68
Figura VII-4. Esquema del procedimiento para establecer los sitios de contacto.....	69
Figura VII-5. Esquema del modelado y la simulación .....	71
Figura VII-6. Esquema del proceso de simulación del estímulo mediante el eNTCPM. ....	71
Figura VII-7. Imágenes de microscopía óptica de línea celular NG108-15 a dos semanas de cultivo .....	74
Figura VII-8. Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en controles .....	75
Figura VII-9. Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en controles .....	76
Figura VII-10. Micrografías SEM del crecimiento celular sobre la superficie del eNTCPM.....	77
Figura VII-11. Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en el eNTCPM1.....	78
Figura VII-12. Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en el eNTCPM2.....	79
Figura VII-13. Imágenes AFM 3D que muestran detalles de las neutritas inmersas en la película rodeadas de nanopicos de NTCPM en contacto cercano .....	80
Figura VII-14. Espectro Raman de la superficie del eNTCPM previo y posterior al cultivo celular.....	81
Figura VII-15. Caracterización electrofisiológica de las células NG108-15 cultivadas en los controles y sobre el eNTCPM.....	83
Figura VII-16. Curvas de conductancia ( $\pm$ SE) $g_{Na^+}$ y $g_{K^+}$ .....	84
Figura VII-17. Experimentos de estimulación celular .....	85
Figura VII-18. Graficas del experimento de estimulación intracelular con pulsos incrementales de corriente.....	85
Figura VII-19. Imágenes extraídas de AFM .....	87
Figura VII-20. Construcción de la geometría celular.....	88
Figura VII-21. Reparación de defectos en la geometría.....	89
Figura VII-22. Ensamble del sistema de registro.....	90
Figura VII-23. Simulación del modelo de Hodgkin y Huxley, así como su modificación ejecutada para reproducir el comportamiento electrofisiológico de la célula NG108-15 en Comsol .....	92
Figura VII-24. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial sobre la neurona para un estímulo en el electrodo .....	93
Figura VII-25. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo sobre la neurona.....	94

Figura VII-26. Esquema del modelado y la simulación para la estimulación neuronal en la geometría real ..... 94

Figura VII-27. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial sobre la neurona para un estímulo en el electrodo; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley..... 95

Figura VII-28. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo sobre la neurona; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley. . 96

Figura VII-29. Gráficos del Vm y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial en la neurona para un estímulo en el electrodo; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado ..... 97

Figura VII-30. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo en el electrodo; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado 98

Figura VII-31. Gráficos del Vm y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo en la neurona; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado..... 99

Figura VII-32. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo en la neurona; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado 101

Figura VII-33. Gráficos del Vm y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial en la neurona para un estímulo en el electrodo; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado ..... 102

Figura VII-34. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo en el electrodo; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. ... 103

Figura VII-35. Gráficos del Vm y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo sobre la neurona; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado ..... 104

Figura VII-36. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo sobre la neurona; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado . 105

VIII. Aplicación: registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica de una célula NG108-15 ..... 110

Figura VIII-1. Etapas de la aplicación del registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica asociada mediante el eNTCPM..... 110

Figura VIII-2. Esquema del sistema bi-Pclamp construido y las células NG108-15 cultivadas sobre la superficie del eNTCPM..... 111

Figura VIII-3. Esquema del sistema bi-Pclamp ..... 112

Figura VIII-4. Modelo equivalente y simulación del sistema de registro/estimulación mediante el eNTCPM realizado para corroborar los resultados experimentales..... 112

Figura VIII-5. Comparación de los experimentos de registro de corrientes iónicas realizadas con la micropipetta de vidrio y de manera simultánea con los electrodos de Ag/AgCl y el eNTCPM de manera extracelular ..... 114

Figura VIII-6. Comparación de los experimentos de registro simultáneo realizados con el electrodo de Ag/AgCl y el eNTCPM ..... 114

Figura VIII-7. Comparación de los experimentos de registro simultáneo con incremento de magnitud en el pulso ..... 115

Figura VIII-8. Pulsos positivos largos de estimulación de corriente experimental ..... 116

Figura VIII-9. Pulsos de estimulación de corriente de mayor magnitud ..... 116

Figura VIII-10. Caso excepcional de célula NG108-15 disparando potencial de acción de manera espontánea ..... 117

Figura VIII-11. Modelo computacional del sistema de registro implementado en Matlab y Simulink .... 118

IX. Conclusiones ..... 121

## Lista de tablas

I.	Introducción .....	1
	Tabla I-1. Comparación de las propiedades mecánicas de los nanotubos (Ajayan & Ebbesen, 1999).....	6
II.	Antecedentes .....	18
	Tabla II-1. Modelos empleados en el estudio de la interfase electrodo-neurona.....	24
III.	Hipótesis.....	26
IV.	Justificación.....	26
V.	Objetivos .....	27
VI.	Diseño, construcción, caracterización y modelado del eNTCPM .....	29
	Tabla VI-1. Características físicas y composición química de los NTCPM utilizados.....	30
	Tabla VI-2. Promedio de las mediciones de resistividad superficial y volumétrica de la película de NTCPM, el Au(111) y las NFC. ....	46
	Tabla VI-3. Tabla de resistividad/conductividad de distintos materiales. ....	47
	Tabla VI-4. Conductividad de soluciones extracelulares utilizadas. ....	48
	Tabla VI-5. Potencial de interfase desarrollado.....	48
	Tabla VI-6. Comparación entre valores de resistividad experimentales y simulados. ....	56
VII.	Cultivo, caracterización, estimulación y modelado de la línea celular NG108-15.....	63
	Tabla VII-1. Protocolos de estimulación empleados.....	66
	Tabla VII-2. Protocolos de estimulación empleados.....	67
	Tabla VII-3. Conteo celular antes de sembrar en controles y ENTCPM. ....	72
VIII.	Aplicación: registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica de una célula NG108-15 .....	110
IX.	Conclusiones .....	121

## Abreviaciones

AFM	Microscopía de fuerza atómica
eNFC	Electrodo de nanofibras de carbono
EN	Electrodo neuronal
ENs	Electrodos neuronales
eNTCPM	Electrodo de nanotubos de carbono de paredes múltiples
li	Corriente iónica
IN	Interfase neuronal
ME	Medio extracelular
MEF	Método de los elementos finitos
MEMS	Sistemas microelectromecánicos (por sus siglas en inglés)
NFC	Nanofibras de carbono
NTC	Nanotubos de carbono
NTCPM	Nanotubos de carbono de paredes múltiples
NTCPS	Nanotubos de carbono de pared simple
PA	Potencial de acción
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SNR	Relación señal a ruido (por sus siglas en inglés)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
V <sub>m</sub>	Potencial de membrana celular



## Agradecimientos

Al Dr. Rafael Godínez Fernández y al Dr. Nikola Batina, por la dirección de esta tesis.

A los sinodales, Dra. Iris Natzielly Serratos Álvarez, Dr. Rafael Godínez Fernández, Dr. Andrés de Luna Bugallo, Dr. Javier Vargas Sánchez y al Dr. Michel Picquart, por la disposición, revisión y corrección de este documento.

Al Dr. Michel Picquart por su contribución con los espectros Raman.

Al M. en C. Alberto Seseña Rubfiaro por su asistencia en la obtención de los registros electrofisiológicos.

A la M. en C. Cristina Acosta García por su contribución con las micrografías SEM y TEM.

A la Ing. Jessica Gabriela Dávalos Vázquez por su colaboración en la edición de este documento.

A mi familia por todo su apoyo y por haberme otorgado la mejor de las herencias.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad, ayuda y conocimientos aportados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (327247) bajo el programa de posgrado en Ingeniería Biomédica de la UAM-Iztapalapa (001612).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de proyecto CB-2006-1-61242.

A la Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECITI antes ICyTDF) por la beca de proyecto ICYTDF/274/2010-12411497.

## Resumen

Los nanotubos de carbono de paredes múltiples han sido propuestos como un material interesante y novedoso en la construcción de la siguiente generación de los electrodos neuronales. En este trabajo se cultivaron células NG108-15 sobre la superficie de un electrodo de nanotubos de carbono de paredes múltiples y mediante microscopia de fuerza atómica y microscopía electrónica de barrido, se observa que las células crecieron desarrollando una extensa red de neuritas haciendo contacto íntimo con los nanotubos de carbono; lo que tiene como consecuencia que las células tengan una excelente adhesión con la superficie del electrodo. Estas características son importantes para obtener registros electrofisiológicos con una alta relación señal a ruido. Posteriormente, se estimuló y se registró la actividad electrofisiológica a través del electrodo y se observó que éste último no modifica las condiciones funcionales de la célula. Con el electrodo de nanotubos de carbono de paredes múltiples también fue posible registrar la dinámica de las corrientes iónicas de célula completa mientras que con un microelectrodo de vidrio se registró la magnitud y el curso temporal de los potenciales de acción de manera simultánea, utilizando dos sistemas de "Patch Clamp". A continuación, un modelo de punto de contacto fue construido para describir este sistema.

Por otra parte, se realizó el modelado y la simulación por el método de los elementos finitos de la interfase para describir su comportamiento cuando se estimulaba a la célula con un pulso de voltaje mediante el electrodo de nanotubos de carbono de paredes múltiples. En esta etapa se construyeron las geometrías de la célula, el electrodo y se utilizó el modelo de Hodgkin-Huxley así como la ecuación de continuidad para simular el comportamiento en el tiempo de la célula y del electrodo/medio extracelular respectivamente. Cada geometría de la interfase fue construida como un componente independiente y posteriormente integrado en un sistema que representa la geometría realista de esta; de esta manera, el comportamiento de la interfase fue simulado con diferentes condiciones de operación de acuerdo a las características geométricas.

Se plantea que la instrumentación, el desarrollo experimental, el modelado y la simulación desarrollados en este trabajo contribuyen a comprender mejor los mecanismos involucrados en la transmisión de señales eléctricas en la interfase neuronal y son de utilidad en el diseño y el análisis de cualquier tipo de interfase nanoestructurada. Estos conocimientos pueden ser aplicados fundamentalmente en el estudio de la fisiología celular, estudios farmacológicos y en el diagnóstico de enfermedades.

Es importante resaltar que el registro de las corrientes iónicas de célula completa obtenido experimentalmente fue hecho de manera extracelular, lo cual es novedoso y de gran utilidad pues permite monitorear la dinámica de estas corrientes durante la producción de potenciales de acción sin la necesidad de tener sistemas de registro complicados. Asimismo, la incorporación de geometrías reales obtenidas por microscopia de fuerza atómica a los modelos de transmisión de señales eléctricas en la interfase neuronal es también novedoso y, como se puede observar en el trabajo, muestra claramente que existen diferencias en la respuesta celular al estímulo cuando se utiliza una geometría sencilla o una real.

## Abstract

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) have been proposed as a desirable material to fabricate the next generation of neural electrodes. In this work, NG108-15 cells were cultured over a plain MWCNT electrode (MWCNTE) surface. Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) illustrate that cells grew developing a complex network, with neurites getting close contact and strong adhesion to the electrode surface; these two last features are the key factor to obtain good records of the whole-cell ion current ( $I_c$ ) with high signal to noise ratio (SNR). Then, we stimulate and record the electrophysiological activity of the cells through the electrode and observe that the MWCNTE does not alter or modify it.

Based on experimental results, a specific Finite Element Method (FEM) model and simulation (developed during this work) the behavior of the whole system was described stage by stage to understand the processes when a voltage stimulus is applied. Results of theoretical modeling were in good agreement and supported by the experimental findings. Besides, it helps to describe the way in which electrical signals transmit through the interface between the MWCNTE and the NG108-15 cells and, evoke the electrophysiological activity of the last. The interface behavior was simulated at different operation conditions and in function of the cell and the electrode geometry characteristics and modifications. Each geometry of the interface was constructed as an independent component and finally integrated into a large multi-component system in order to describe the real interface geometry. This knowledge could be crucial in the design and in the interpretation of any kind of nanostructured interface in such physiological systems.

With our specially designed electrodes, we observe the dynamics of the ion currents and the magnitude and time course of an action potential ( $A_p$ ) simultaneously using two independent Patch Clamp systems (Bi-Patch Clamp), also especially adapted in the thesis. A point contact model was used to describe the simultaneous recording of an induced  $A_p$  and the  $I_c$  which rises it by means of a simulation. We believe that the newly developed instrumentation, the experimental and the modeling and simulation procedures will contribute to a better understanding of the fundamental mechanisms involved in the cell interface communication, mainly in cell physiology, pharmacology studies and diseases diagnosis.

## I. Introducción

El registro y la estimulación de la actividad electrofisiológica en células neuronales se ha realizado comúnmente con fines terapéuticos o de investigación. Para llevar a cabo este procedimiento, es necesario colocar un electrodo neuronal (EN) en la región donde se encuentra la neurona que se desea estimular y/o registrar, formando así un sistema integrado por estos dos componentes y por el medio extracelular (ME); el cual, está compuesto básicamente de agua y sales, entre otros elementos (Waterhouse & Farmery, 2012). La zona que comprende la superficie del electrodo, el medio extracelular y la membrana celular es la que denominaremos como interfase neuronal (IN).

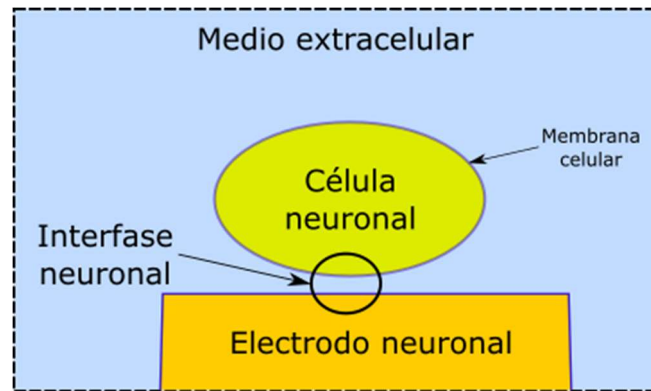


Figura I-1. Esquema de la interfase neuronal.

El conocimiento de lo que sucede en la IN cuando se lleva a cabo la estimulación del tejido es importante ya que permite determinar las características que debe tener la señal de estimulación, así como las características de diseño y las características intrínsecas del electrodo las cuales son necesarias para realizar una adecuada estimulación del tejido. Esta zona es muy importante porque aquí se transmiten las señales que comunican a ambos componentes y donde se presenta la impedancia y otros factores que determinan la forma en que se propaga la señal a través del tiempo y el espacio. Del mismo modo, esto es relevante para cuando el EN es utilizado como elemento de registro de la actividad electrofisiológica de la neurona.

Por lo que el presente trabajo se centra en comprender cómo se propagan las señales de comunicación a través de la IN que se genera entre un EN, cuyo componente principal es una película de nanotubos de carbono (NTC), y una neurona. Para lograr esto, se empleó el conocimiento teórico así como la metodología establecida respecto a los procesos de modelado y simulación en ENs, así como el desarrollo de la experimentación requerida para la obtención de datos de las variables no reportados en la literatura especializada como las características físicas reales de la célula o el sustrato; que son datos importantes para el proceso de modelado.

El modelado y la simulación de la interfase se compone de varias etapas que culminan con la obtención del modelo propuesto, del cual se espera obtener información que permita entender la forma en que las señales eléctricas se transmiten en ésta tanto en el proceso de registro como en el de estimulación y que tenga un determinado poder predictivo, para poder utilizarlo

a futuro como una herramienta computacional para el diseño de electrodos neuronales contruidos a partir de materiales nanoestructurados.

Por otra parte, aprovechando los elementos así como la instrumentación diseñados y contruidos para la obtención de los datos experimentales necesarios para el modelo, se desarrolló una aplicación específica de registro simultáneo del potencial de acción (PA) y de la corriente iónica (Ii) de una neurona cultivada sobre un electrodo de nanotubos de carbono de paredes múltiples (eNTCPM).

A continuación, se presentan los conceptos necesarios para comprender el tema; en esta primer parte se describe qué es un EN, su clasificación, los materiales que los constituyen, así como las desventajas que presentan algunos de los electrodos actuales y la opción que presentan los materiales creados por la nanotecnología para su construcción.

### Definición, tipos y propiedades de electrodos neuronales

Los ENs son dispositivos extracelulares que permiten el estudio del comportamiento electrofisiológico de neuronas individuales o en red, en el tiempo y el espacio mediante la conversión de una señal generada por un flujo de electrones a una señal generada por el flujo o movimiento de iones y viceversa (Fromherz, 2003). Dichos electrodos, se han convertido en una herramienta esencial en investigación básica y aplicada dentro del campo de la electrofisiología (Marom & Shahaf, 2002) (Figura I-2). En ciencia básica una aplicación interesante es el registro simultáneo de potenciales de acción y sus corrientes iónicas asociadas lo cual, es importante para observar como un cambio en la cinética y la magnitud de estas corrientes podría afectar la frecuencia de disparo, la amplitud, la forma u otras importantes características de los potenciales de acción (Szentandrassy et al., 2014), (Grant, 2009), (Faber & Rudy, 2000). Esta información podría ser de utilidad para estudios en ciencia básica, fisiología celular y farmacología así como también para la detección de condiciones patológicas (Sigworth & Klemic, 2005), principalmente en células cardiacas (Chen-Izu, Izu, Nanasi, & Banyasz, 2012). En neurología, por ejemplo, los ENs son empleados:

- Con fines terapéuticos en el tratamiento de enfermedades como el Parkinson, la epilepsia o la depresión (Mogilnera, Benabidb, & Rezai, 2001).
- En la restauración de funciones nerviosas que han sido dañadas por accidentes o enfermedades neurodegenerativas, como: lesiones en la médula espinal o accidentes cerebro vasculares (Andrews, 2007).
- En las llamadas interfases neuronales o dispositivos auxiliares del sistema nervioso, tales como: implantes cocleares, marcapasos, prótesis de miembros superiores e inferiores, prótesis de vejiga, prótesis visuales (Veraart *et al.*, 1998) y en el registro/estimulación de regiones corticales para el control cognitivo de dispositivos de asistencia (Marom & Shahaf, 2002), (Massobrio, Baijon, Maccione, Chiappalone, & Martinoia, 2007).

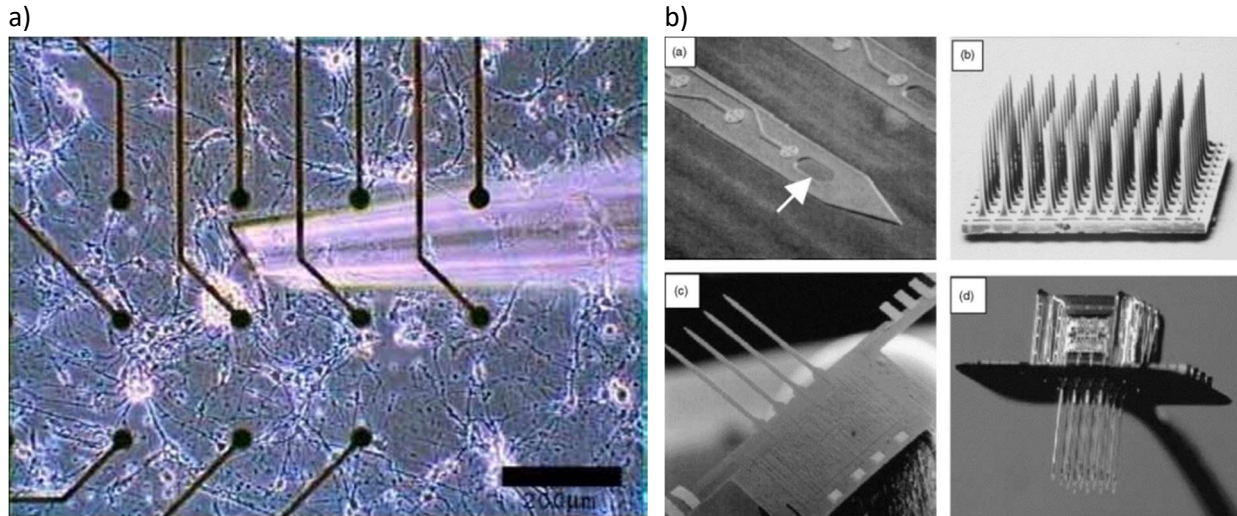


Figura I-2. ENs empleados en electrofisiología para estimular y registrar neuronas. a) Se muestran dos tipos de ENs utilizados en investigación básica: una micropipeta de vidrio, la cual actúa sobre neuronas de manera individual, y una serie de electrodos de oro que a su vez actúan sobre poblaciones neuronales (Imagen tomada de: <http://www.ecuadorciencia.org/noticias.asp?id=1576&fc=20070603>). b) Diversos tipos de microelectrodos de tipo invasivo que actúan sobre poblaciones neuronales empleados con fines terapéuticos, en la restauración de funciones nerviosas y en las interfases neuronales (Imagen tomada de Polikov, Tresco, & Reichert, 2005).

La clasificación de los ENs varía de acuerdo con su propósito, la posición anatómica donde se colocan, su selectividad, etc. (Sinkjær & Popovic, 2006), como algunos ejemplos de los electrodos que se utilizan en aplicaciones clínicas se tienen: electrodos en brazalete (Sinkjær & Popovic, 2006), (Meier, Rutten, & Boom, 1998), electrodos intrafasciculares (Cogan, 2008), electrodos regenerativos (Navarro *et al.*, 2005), (Rutten, 2002), entre otros. El avance de los procesos de fabricación en microelectrónica, ha permitido la creación de electrodos a escalas menores y con mejores propiedades de selectividad (microelectrodos).

Por su construcción, este tipo de microelectrodos se pueden presentar como arreglos lineales, bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D) (Navarro *et al.*, 2005), (Quiroz, Moreno, & Jaramillo, 2007), (Donoghue, 2002) (Figura I-2b). También, se construyen electrodos a base de transistores CMOS-FET (“Complementary metal-oxide-semiconductor – Field-Effect Transistor”) en los cuales la neurona o la red neuronal se exponen directamente sobre este elemento de registro/estimulación. Los materiales más comunes con los que se construyen estos tipos de electrodos son metales como: oro, platino, aleaciones platino-iridio, tungsteno, acero inoxidable; o materiales semiconductores como: el óxido de titanio, nitruro de titanio, óxido de indio, silicio, óxido de silicio (Rutten, 2002).

La mayoría de los ENs de reciente creación se han implementado *in vitro* y pese a que se ha mejorado bastante su diseño y la forma en que se construyen, los materiales entre otras características fisicoquímicas que los componen, no han logrado cubrir en su totalidad los requerimientos necesarios para conseguir que: el registro/estímulo neuronal conserve una alta resolución espacial sin incrementar lo invasivo del electrodo, mejoren su selectividad y hacer que los materiales utilizados para su construcción tengan la capacidad de adaptarse a los cambios físicos del



tejido nervioso con el fin de no provocar lesiones en él (Hierlemann, Frey, Hafizovic, & Heer, 2011).

### Desventajas del registro/estimulación neuronal por medio de los ENs actuales

El éxito de los ENs depende de variables como: la flexibilidad, el tamaño, la superficie de contacto, así como de la biocompatibilidad estructural y superficial; esto es, que las características mecánicas y superficiales del electrodo no provoquen daños ni reacciones tóxicas al entrar en contacto con la región donde van a ser colocados. Otra característica importante es la estabilidad a largo plazo, ya que las propiedades de registro/estímulo de los electrodos actuales tienden a degradarse con el tiempo por el incremento de su impedancia; lo cual, es originado por la formación de capas de proteínas en los sitios de contacto como resultado de la reacción del tejido y del entorno debido a la presencia del electrodo (Oweiss, Wise, Lopez, Wiler, & Anderson, 1999). Algunas de las principales limitaciones de los ENs actuales son:

- La resolución espacial (selectividad). En aplicaciones dentro del campo de la biofísica existen ocasiones donde es preciso registrar/estimular de manera muy selectiva, como en una especie de pixel, la región (o neuronas) en la vecindad inmediata al electrodo y no en regiones cercanas a otros electrodos. Algunos de los electrodos tienen dimensiones de entre 18 y 200  $\mu\text{m}$  las cuales, son mayores a las de las neuronas (10-30  $\mu\text{m}$ ); por lo tanto, al registrar la actividad electrofisiológica de una neurona, se obtiene una señal generada por más de una de ellas (Moulin *et al.*, 2008). Por otro lado, si el electrodo es empleado para estimular y no es lo suficientemente selectivo, se corre el riesgo de excitar una población neuronal amplia y no una o algunas neuronas en particular (Leão *et al.*, 2010).
- La impedancia. Otro aspecto transcendental de los electrodos actuales y en específico de los microelectrodos es que, debido a su área de contacto tan pequeña, la impedancia al igual que los niveles de ruido pueden incrementarse demasiado (Cheung, 2009).

Por las razones descritas, la siguiente generación de electrodos ha buscado emplear los nuevos materiales introducidos por la nanotecnología. Particularmente, se piensa que los NTC pueden ser empleados en el perfeccionamiento de las características de los electrodos de registro/estimulación existentes o, en la construcción de nuevos electrodos desarrollados a partir de este material.

### Definición, tipos y propiedades de los nanotubos de carbono

Los NTC pueden ser considerados como una hoja de grafeno que se enrolla formando un cilindro, cuyos bordes se encuentran unidos sin costura, además de tener los extremos cerrados. Cada nanotubo está compuesto de anillos hexagonales formados por átomos de carbono, mientras que sus extremos están compuestos de anillos pentagonales. Los anillos hexagonales se forman cuando cada átomo de carbono se une a otro mediante enlaces covalentes, que son enlaces



químicos muy fuertes y contribuyen en gran medida al establecimiento de las propiedades mecánicas y electrónicas de los nanotubos. Por otra parte, la estructura molecular de los NTC deriva de la quiralidad o tipo de geometría que adquieren durante su fabricación, que a su vez se define por el vector y el ángulo de quiralidad. El vector de quiralidad por definición, es la línea conectada desde dos sitios cristalográficos O-A en una estructura 2D de grafeno que definen la celda unitaria, mientras que el ángulo de quiralidad es el ángulo que se describe entre el vector de quiralidad y la dirección de la línea de zigzag (Chen *et al.*, 2006) (Figura I-3a). Para ángulos quirales de  $0^\circ$  y  $30^\circ$ , se forman los nanotubos tipo “zigzag” y “armchair” los cuales, desde el punto de vista eléctrico, se comportan como materiales semiconductores y metálicos, respectivamente. Para diferentes ángulos, se forman los nanotubos denominados “quirales”, que se comportan como materiales semiconductores (Figura I-3b).

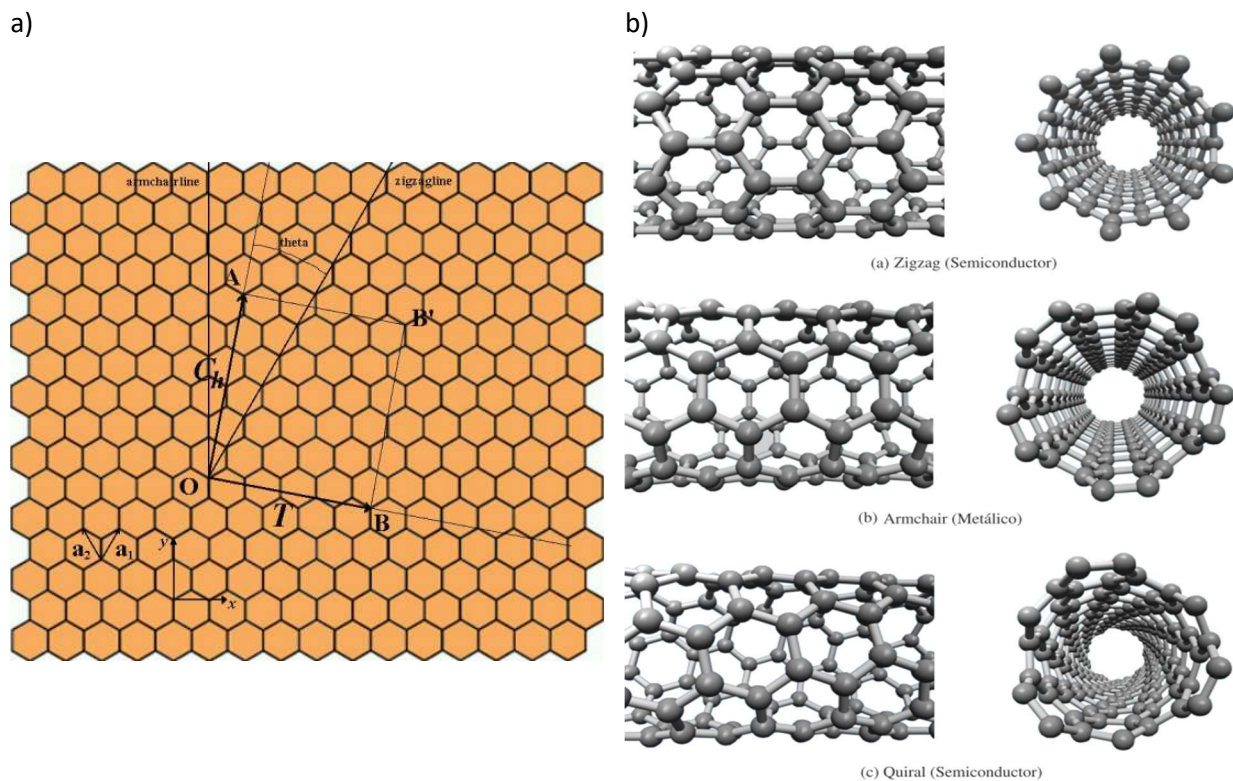


Figura I-3. Esquema de la estructura molecular de distintos tipos de NTC. a) Hoja de grafeno que muestra la disposición de los átomos de carbono en una red de elementos hexagonales además de los vectores y el ángulo de quiralidad (Imagen tomada de Seetharamappa, Yellappa, & D'Souza, 2006). b) Diferentes estructuras moleculares de NTC derivadas de la quiralidad que dan origen a elementos semiconductores o metálicos desde el punto de vista eléctrico (Imagen tomada de Morales-Reyes, 2009).

Por la forma en que se producen, existen fundamentalmente dos tipos de nanotubos: NTC de pared simple (NTCPS) (Figura I-4a) y NTC de paredes múltiples (NTCPM) (Figura I-4b) (Daenen *et al.*, 2003). Los nanotubos tienen diámetros que pueden variar desde 1 hasta aproximadamente 300 nm y longitudes que van desde algunos nm hasta varios  $\mu\text{m}$ . En ese aspecto, cabe destacar que las dimensiones de los NTC se aproximan a las dimensiones que se encuentran a nivel neuronal, por ejemplo, en las dendritas o la laminina, que es un componente extracelular de

anclaje con dimensiones de aproximadamente 50 x 75 nm (Ayad, Boot-Handford, Humphries, Kadler, & Shuttleworth, 1998). Esta similitud en dimensiones supone una adecuada interacción mecánica, donde las neuronas pueden desarrollar una mejor adhesión y contacto con los nanotubos.

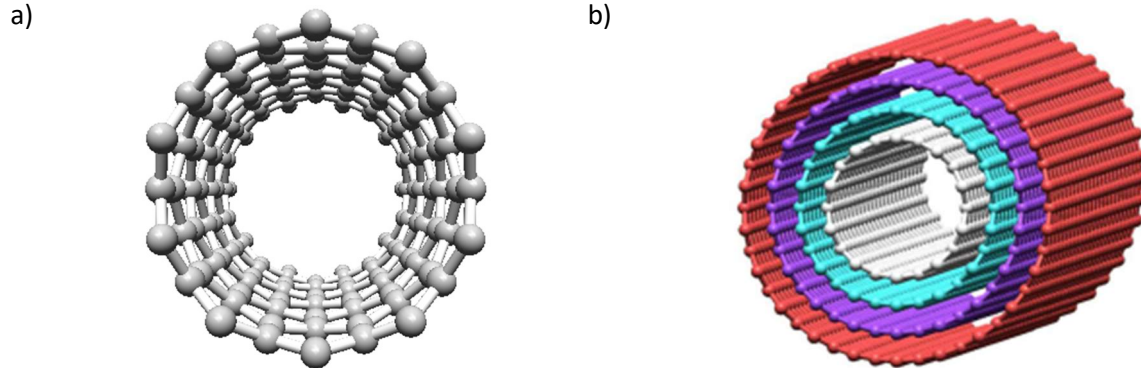


Figura I-4. Esquema de los tipos de NTC. a) NTCPS. b) NTCPM.

Las propiedades mecánicas y eléctricas de los NTC dependen de su estructura atómica que está relacionada directamente con la alta anisotropía del grafeno. Los nanotubos tienen buenas propiedades elastomecánicas, ya que el arreglo 2D de los átomos de carbono en la hoja de grafito permite amplias distorsiones fuera del plano, mientras que la fuerza en los enlaces carbono-carbono mantienen la hoja de grafito excepcionalmente fuerte en contra de cualquier distorsión en el plano. De esta forma, los NTC tienen la habilidad de mantener cargas considerables para amplios ángulos de deflexión además de ser muy ligeros (Ajayan & Ebbesen, 1999). Algunas de las características mecánicas importantes en comparación con otros materiales se muestran en la Tabla I-1.

Tabla I-1. Comparación de las propiedades mecánicas de los nanotubos (Ajayan & Ebbesen, 1999).

Material	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tracción (GPa)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )
NTCPS	1054.000	150.000	---
NTCPM	1200.000	150.000	2.600
Acero	208.000	0.400	7.800
Epoxy	3.500	0.005	1.250
Madera	16.000	0.008	0.600

El comportamiento eléctrico de los NTC como materiales conductores o semiconductores depende del arreglo de los átomos de carbono en su estructura que está relacionado con el vector de quiralidad (Gaddamanugu, 2009) y con su diámetro (Ajayan & Ebbesen, 1999). En los nanotubos, el flujo de corriente eléctrica se considera que es normalmente balístico o sin dispersión, en ambos casos, la resistencia es baja, logrando con ello portar altas corrientes con calentamiento

despreciable (Burke, 2002), (Rosenblatt, 2006). Algunas características eléctricas importantes en comparación con el cobre son las siguientes:

- Presentan un transporte de electrones libre de dispersión. En el cobre o el oro, por ejemplo, existe dispersión de electrones originada por la frontera de grano (arreglo estructural).
- Poseen un camino libre medio de dispersión de electrones de varios  $\mu\text{m}$  en comparación con el cobre que es de aproximadamente 40 nm (“mean free path scattering”).
- Soportan densidades de corriente de hasta  $10^{10}$  A/cm<sup>2</sup>, mientras que el cobre es susceptible a electromigración para densidades de corriente mayores a  $10^6$  A/cm<sup>2</sup>.
- Cuentan con una excelente conductividad térmica de entre 1700 a 3000 W/mK, mientras que en el cobre es de 400 W/mK (Schwartz, 2004).

#### Red o película delgada de nanotubos de carbono

El manipular este material de manera individual y de forma simple presenta un reto complejo, por lo que su manipulación en red o como película delgada presenta una solución factible sin ser por ello menos compleja. Dentro de una red de NTC puede existir una combinación de nanotubos metálicos y semiconductores, donde el contacto que existe entre cada uno de ellos presenta una contribución a la resistencia total del sistema. La transmisión de electrones en estos sitios de contacto ocurre por el denominado efecto túnel (Kaiser *et al.*, 2002) y, la ruta que siguen los electrones en esta red es definida por la o las vías de nanotubos que presenten menor resistencia a su paso (American & New, 2007). Es importante mencionar que la conductividad en una red de NTC puede ser modificada mediante la uniformidad superficial o mediante la cantidad de nanotubos presentes en la película entre otras técnicas de fabricación o tratamientos superficiales (Marinho, Ghislandi, Tkalya, Koning, & de With, 2012), (Jack *et al.*, 2010), (Park *et al.*, 2008), (Bekyarova *et al.*, 2005).

Por otra parte, las características de rugosidad superficial de un sustrato tienen un efecto relevante sobre la adherencia y el crecimiento de las neuronas. En específico, se ha observado que sustratos nanoestructurados a base de redes o películas delgadas de NTC facilitan ambos aspectos (Blau, 2013), (Sorkin *et al.*, 2009), (Price, Ellison, Haberstroh, & Webster, 2004), (Fan *et al.*, 2002).

Debido a las características mecánicas, eléctricas y de adhesión celular que se han reportado sobre los NTC, se piensa que pueden ser utilizados en la construcción de la siguiente generación de EN; en particular las superficies o películas delgadas fabricadas con este material, presentan nuevas posibilidades en la forma de interactuar a nivel celular (Bareket-Keren & Hanein, 2012), (Fabbro, Bosi, Ballerini, & Prato, 2012), (Nunes, Al-Jamal, Nakajima, Hariz, & Kostarelos, 2012).

### Características de algunos electrodos construidos con nanotubos de carbono

Actualmente ya se han construido (Vitale, Summerson, Aazhang, Kemere, & Pasquali, 2015), (Yoon *et al.*, 2013), (Voge & Stegemann, 2011) o modificado (Baranauskas *et al.*, 2011), (Ben-Jacob & Hanein, 2008), (Keefer, Botterman, Romero, Rossi, & Gross, 2008) ENs a base de NTC y se ha encontrado que estos elementos mejoran las capacidades de los electrodos disponibles. Algunos de los resultados que muestran los NTC:

- Aumentan la capacitancia específica; es decir, la capacitancia por unidad de área o volumen, así como también disminuyen la dependencia de la impedancia respecto a la frecuencia. Con esto, se mejora el comportamiento del electrodo haciendo que los procesos no-farádicos sean los que predominen en la estimulación y que los cambios de frecuencias no afecten en demasía los registros obtenidos (Fan *et al.*, 2002).
- Inducen una mínima respuesta inmune en tejido vivo (Hsu, Parker, & Joshi, 2008) además de que proveen una excelente superficie para el crecimiento y la adhesión neuronal (biocompatibilidad).
- En red o como película delgada tienen la capacidad de transmitir señales bioeléctricas sin distorsión (Morales-Reyes, 2009), pues mejoran el contacto entre el electrodo y la neurona mediante la reducción de la distancia entre ellos (Blau, 2013), (Bulai, Molchanov, Denisov, Pitlik, & Cherenkevich, 2012), (Brüggemann *et al.*, 2011) y por consiguiente, la disminución también de la impedancia (Fan *et al.*, 2002), (Ferguson *et al.*, 2012), (Robinson *et al.*, 2012), (Duan *et al.*, 2012), (Cellot *et al.*, 2009).
- Muestran gran sensibilidad a los cambios electrostáticos en el medio que los rodea gracias a la eficiente transferencia de carga entre los nanotubos y las moléculas de adhesión en la superficie (Massobrio, Massobrio, & Martinoia, 2008).
- Se puede obtener una excelente resolución espacial, permitiendo la estimulación/registro bioeléctrico de una neurona en una red neuronal o en lugares específicos de la misma debido a sus dimensiones físicas.

Cabe mencionar que los reportes de estabilidad a largo plazo de los electrodos neuronales construidos en base a NTC o NFC son escasos y los tiempos presentados en la literatura abarcan desde los 7 a los 200 días (Guitchounts, Markowitz, Liberti, & Gardner, 2013; Kolarcik *et al.*, 2015; Kozai *et al.*, 2012; Vitale *et al.*, 2015). Hasta ahora se ha descrito la definición, la finalidad, la clasificación, los materiales así como otras características importantes y deseables de los electrodos neuronales, incluyendo la posibilidad de utilizar a los NTC como elementos constituyentes. A continuación, se discutirá cómo es que la neurona produce pequeñas corrientes eléctricas que los ENs registran o modifican a través de la interfase que se genera entre ellos y el porqué es importante estudiarla.

## Actividad eléctrica neuronal y su registro/estímulo mediante un electrodo neuronal

Las neuronas son células excitables cuya actividad eléctrica natural es generada y regulada por mecanismos dinámicamente complejos y altamente no lineales (Carnevale & Hines, 2006) que se comunican mediante la producción y transmisión de señales eléctricas conocidas como potenciales de acción (Germann & Stanfield, 2004).

Las neuronas se componen de un cuerpo celular o soma (10-30  $\mu\text{m}$  diámetro) que contiene casi en su totalidad a los organelos celulares incluyendo al núcleo y realiza la mayoría de los procesos celulares. Del soma emergen las dendritas cuyas ramas forman el árbol dendrítico; las dendritas reciben conexiones de otras neuronas en una unión llamada sinapsis. También del soma emerge el axón, el cual se encarga de transmitir las señales eléctricas en forma de potenciales de acción hasta su extremo o terminal nerviosa. La comunicación entre las neuronas se realiza a través de la sinapsis; la cual, está formada por la terminal nerviosa de una neurona y la dendrita contigua de otra. La neurona recubre los componentes antes mencionados con la membrana celular o plasmática, la que a su vez contiene proteínas específicas conocidas como canales iónicos que permiten el paso de iones a través de ella (Evans-Martin, 2010) (Figura I-5).

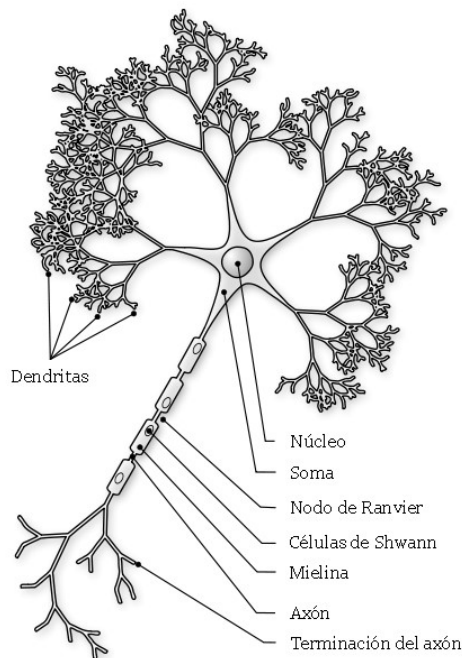


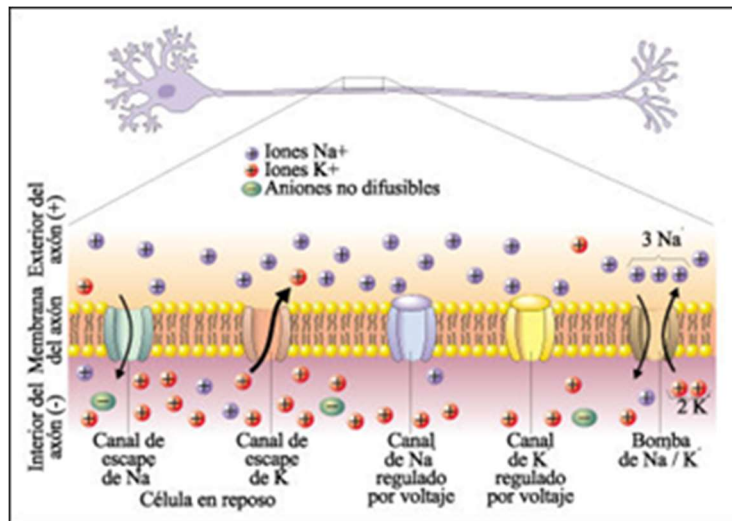
Figura I-5. Esquema de una neurona que muestra las partes básicas que la componen (Imagen tomada de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron-figure.svg>).

En las neuronas el flujo de iones a través de los canales iónicos de la membrana celular (Figura I-6a), principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , originan cambios en el potencial de membrana ( $V_m$ ); estos cambios conocidos como potencial de acción, son las señales que transportan información de una neurona a otra en cuestión de milisegundos. En el potencial de acción la fase ascendente se relaciona con la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$ ; lo que origina un desplazamiento de iones de este tipo al interior celular, mientras que la fase descendente está ligada a la apertura de



los canales de  $K^+$ ; lo que produce el movimiento de este tipo de iones hacia el exterior celular (Figura I-6b) (Acharya, 1997). En una neurona el cuello axónico es el lugar donde más alta densidad de canales de  $Na^+$  se observa y es el sitio donde se originan los potenciales de acción (Hsu *et al.*, 2008). A pesar de la complejidad del sistema nervioso, su función a nivel celular se rige por los siguientes principios generales: en las sinapsis, la neurona produce potenciales postsinápticos que pueden ser inhibidores o excitadores. Si predominan los potenciales excitatorios y se disminuye el Vm hasta un voltaje umbral, en el cuello axónico se dispararán potenciales de acción que viajarán hasta la terminal nerviosa produciendo a su vez, potenciales postsinápticos con la neurona que forma sinapsis.

a)



b)

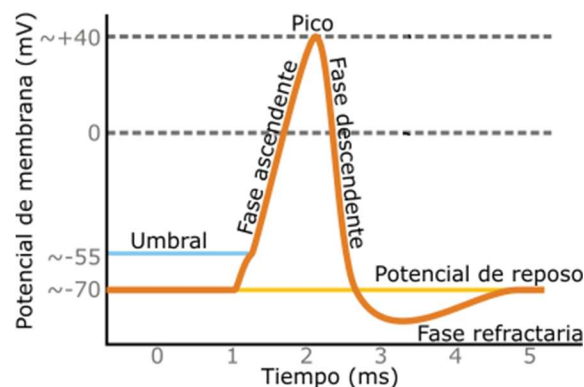


Figura I-6. Esquema de la membrana de una neurona y del potencial de acción. a) Muestra la membrana celular con la bomba de sodio/potasio, así como algunos tipos de canales iónicos e iones al interior y exterior celular. b) Muestra los niveles y las fases, así como la magnitud y la duración de un potencial de acción (Imagen tomada de <http://preujct.cl/biologia/curtis/libro/c47c.htm>)

Para poder observar tanto el potencial de acción como las corrientes iónicas que le dan origen, se hace uso de dos técnicas convencionales de registro electrofisiológico: la técnica de fijación de voltaje y de fijación de corriente.

En la primer técnica, el potencial de la célula se modifica mediante pulsos de voltaje de diferente magnitud a partir de un potencial de fijación establecido, mientras que la corriente iónica asociada es registrada. Por otra parte, en la segunda técnica se aplican pulsos de corriente de diferente magnitud a la célula para estimularla, mientras que los cambios en el  $V_m$  asociados son registrados.

### Registro/estimulo mediante un electrodo neuronal

Para poder estimular y medir los cambios en el  $V_m$  de manera externa (extracelular) se hace uso de ENs. Un electrodo registra/estimula a una neurona o a una red de éstas mediante la detección o la generación de un cambio en el campo eléctrico que polariza al electrodo en el caso de registro, o a la neurona en el caso de la estimulación. Todo el proceso es causado por un conjunto de reacciones electroquímicas que se originan en la frontera o interfase que existe entre la superficie del electrodo, el medio extracelular y la neurona; el medio extracelular es donde se encuentran inmersos el electrodo y la neurona (Figura I-1) (Sariciftci, 2006).

La superficie del electrodo, el medio extracelular y la membrana celular de la neurona o red de neuronas, forman una interfase en la cual la recepción/transmisión de información entre los componentes se rige por la conversión de una señal generada por un flujo de electrones a una señal producida por el flujo o movimiento de iones y viceversa (Fromherz, 2003). Lo que sucede a grandes rasgos es lo siguiente: cuando el electrodo se ve inmerso en el medio extracelular, se forman una especie de regiones o capas cargadas cerca de su superficie, lo que se conoce como doble capa eléctrica, esta doble capa surge de una redistribución de partículas cargadas y polares (p. ej. iones positivos o negativos y moléculas de agua) en la interfase electrodo-medio extracelular (transporte de carga), en ésta, no existe transferencia de carga del electrodo al medio o al revés (Figura I-7). Cuando esto acontece, se tiene un proceso capacitivo o no-farádico (Merrill, Bikson, & Jefferys, 2005). Si la membrana de la neurona es próxima a esta región, se forma la IN. La neurona no entra en contacto directo con el electrodo en toda su extensión sino que en ciertas regiones existe un espacio ("cleft") que va de unos cuantos  $\mu\text{m}$  a varios  $\text{nm}$  (Fromherz, 2003).

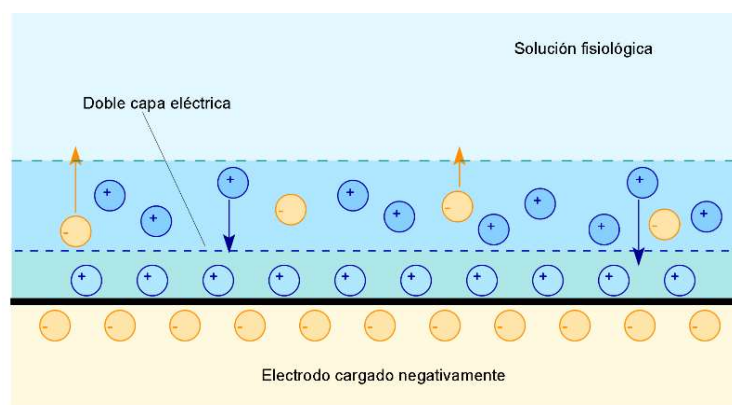


Figura I-7. Esquema de la doble capa eléctrica (Imagen tomada de [http://es.wikipedia.org/wiki/Doble\\_capa\\_el%C3%A9ctrica](http://es.wikipedia.org/wiki/Doble_capa_el%C3%A9ctrica)).



Al estimular a la neurona con el electrodo mediante un pulso positivo/negativo de corriente o voltaje, se genera un cambio en el campo eléctrico de la zona lo que hace que los iones presentes en las inmediaciones comiencen a moverse con un reacomodo de cargas en la región cercana a la membrana celular hiperpolarizando o despolarizando a la membrana celular, generando o no una respuesta en la neurona (Figura I-8) (Cogan, 2008), (Hierlemann *et al.*, 2011.).

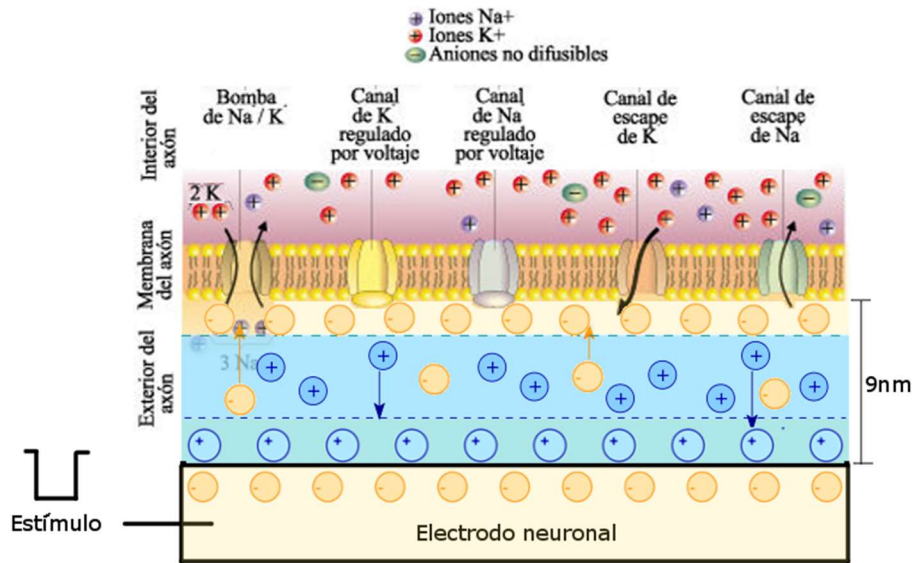


Figura I-8. Esquema de la interfase electrodo neuronal/medio extracelular con los procesos farádicos y no-farádicos.

Si existe transferencia de carga del electrodo al medio y viceversa, es decir, se establecen reacciones de óxido-reducción en la interfase, entonces se tiene lo que se conoce como un proceso farádico (Merrill *et al.*, 2005). Generalmente en la estimulación se tienen presentes tanto procesos farádicos como no-farádicos (Figura I-9).

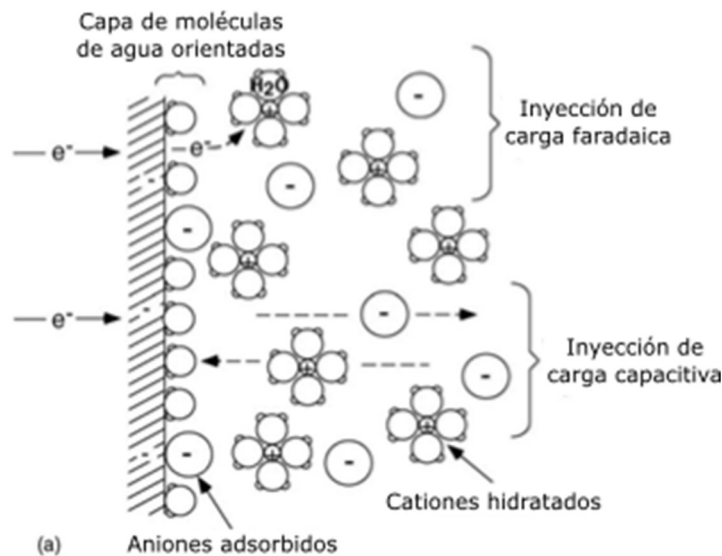


Figura I-9. Esquema de la interfase electrodo/electrolito con los procesos farádicos y no-farádicos. (Imagen tomada de Merrill *et al.*, 2005).

En el registro de la actividad eléctrica de la neurona el proceso es similar. La neurona, por su actividad eléctrica normal e intercambio iónico de la membrana celular con su entorno, crea cambios en el campo eléctrico y por lo tanto movimiento de iones provocando un reacondo de carga en la región del electrodo polarizándolo. El registro de la actividad eléctrica con un electrodo extracelular esta dado principalmente por procesos no-farádicos (Hierlemann *et al.*, 2011).

Sin embargo, la descripción anterior sobre el comportamiento eléctrico del electrodo de registro/estimulación es aún incompleta y lo que ocurre realmente en la interfase continúa siendo tema de investigación, por lo que la explicación dada, satisface de manera parcial lo que acontece en este fenómeno (Massobrio *et al.*, 2007). Es entonces necesario, ampliar el conocimiento que se tiene sobre esta interfase y más aún cuando se utilizan materiales novedosos o de reciente creación como el caso de los NTC para la construcción de ENs. Para lograr este cometido, los investigadores se apoyan en diversas herramientas, siendo el modelado y la simulación de sistemas junto con la experimentación una de las áreas que se emplean cada vez con mayor frecuencia para mejorar el entendimiento de dicho problema.

### Modelado, simulación y perspectivas en la interfase electrodo-neurona

El modelado de un sistema es una representación simplificada de la realidad y se basa en el conocimiento previo del comportamiento de las unidades constituyentes, de principios físicos o químicos establecidos del fenómeno en general, así como de sus leyes de interacción para posteriormente expresarlos matemáticamente, con el fin de resolver o determinar cómo se comportará el sistema en un ambiente nuevo o desconocido. De esta forma se puede tener el control sobre las variables que lo afectan y la posibilidad de incorporar nuevos estados en él.

En este caso no se debe dejar ningún dato importante fuera, pero tampoco incluir datos excesivos que entorpezcan la solución del problema. En ese sentido, los modelos con una fidelidad baja son menos costosos de evaluar en términos computacionales, pero para ello se deben desechar importantes efectos físicos que sí son incluidos en los modelos de mejor calidad que sin embargo, por obvias razones, son más costosos de evaluar (Mejía-Rodríguez & Mozumder, 2006).

La simulación reproduce de manera artificial, en este caso por medios computacionales, el comportamiento en el tiempo de un sistema que ha sido previamente modelado y sobre el cual se pueden modificar los diferentes escenarios o condiciones así como las variables que lo rigen. Aun cuando el modelo del sistema físico requiera de matemáticas que representen el modelo conceptual, en el entorno de simulación se puede, en determinadas situaciones, representar de mejor forma como un algoritmo computacional. Por otro lado, los resultados obtenidos por la simulación pueden contener errores provenientes de la formulación del modelo o de su incorrecta implementación. De tal forma que la validación del modelo en ocasiones resulta complicada y requiere el desarrollo de una hipótesis acertada o de pruebas físicas para más tarde compararlo con la predicción.

Asimismo, es importante mencionar que en el caso de sistemas complejos que tienen un número importante de variables, el modelado y la simulación deben proveer características multifuncionales y multifísicas; es decir, que tomen en cuenta la multitud de fenómenos físicos que interactúan entre sí (Joye, Schmid, & Leblebici, 2009).

En el caso específico que se trata en este escrito, el propósito del modelado y la simulación en la IN es analizar los mecanismos subyacentes que permitan comprender cómo funciona el sistema completo; y que además permita el diseño y la construcción de mejores EN. Para esto, es necesario conocer diferentes aspectos de los componentes del sistema, así como de la forma en que interactúan entre ellos. La tarea no es sencilla pues se deben tomar en cuenta factores como: el tamaño, la forma, los materiales, la rugosidad superficial y la posición del electrodo; además de la composición del medio extracelular, el tipo y la anatomía de la neurona, la presencia de canales iónicos y células circundantes, entre otros. Todos estos factores contribuyen o afectan de alguna manera el proceso de comunicación entre los componentes de la IN y por consecuencia, el comportamiento total del sistema total cuando se registra/estimula a la neurona.

Para desarrollar de manera adecuada el modelado y la simulación de la IN se requiere emplear una estrategia de modelado en la cual se permita introducir las ecuaciones matemáticas que describan el comportamiento de sus componentes, pero que también involucre el modelado empírico, con uso de datos experimentales, que puedan ser introducidos al simulador (sistema computacional). Por otra parte, se observa además que algunos de los factores más importantes que intervienen en la comunicación de señales en el espacio y el tiempo en la IN están directamente relacionados con la morfología (geometría) de los componentes del sistema y de la geometría compleja que se forman en la interfase; es decir, la conformación de la región donde la célula se ancla sobre la superficie del electrodo; la cual, depende de factores como la matriz extracelular, el medio extracelular y las características fisicoquímicas del electrodo entre otros.

Por esta razón se propone desarrollar el modelado y la simulación de la IN mediante el método de los elementos finitos (método numérico) pues es una alternativa que permite tomar en cuenta estas características complejas de funcionamiento y geometrías de los componentes del sistema a fin de obtener resultados más precisos acerca del comportamiento eléctrico en la IN. Así por ejemplo, el modelado de la IN por **métodos numéricos** puede hacer muy buen uso de las ecuaciones de Maxwell para calcular los campos eléctricos y magnéticos generados por la actividad del electrodo o de la neurona en un medio continuo (Joucla & Yvert, 2012). En este caso se empleará la ecuación de continuidad y el modelo de Hodgking-Huxley.

#### Modelado y simulación por el método de los elementos finitos de la interfase neuronal

En las últimas décadas, el método de los elementos finitos (método numérico) se ha convertido en una técnica muy utilizada para el análisis de fenómenos físicos en el campo de estructuras, mecánica de sólidos y fluidos, transferencia de calor, electromagnetismo, así como también en áreas más específicas (p. ej. MEMS, microfluidos, baterías, etc.) (Hutton, 2001). El modelado y

la simulación por este método ofrece una solución numérica para ecuaciones algebraicas, diferenciales e integrales asociadas a una gran variedad de geometrías complejas, así como resultados detallados de la información espacio temporal en los distintos ámbitos en los que esta técnica ha sido empleada. Algunas razones para emplear el método de los elementos finitos son:

- Cualquier tipo de dominio y de condiciones de frontera puede ser manejado con ventaja en 1D, 2D y 3D, además de poder analizar dominios multimateriales.
- Se obtiene una solución global mediante funciones definidas dentro de cada elemento que captura los efectos locales y la convergencia de la solución puede obtenerse mediante el refinamiento de la aproximación.
- Un programa de uso general puede ser utilizado para resolver una gran cantidad de problemas.
- En un esquema multifísica se pueden tomar en cuenta diversos procesos e identificar cual es el predominante.

En este método, un dominio dado (Figura I-10a); que representa en la mayoría de los casos un ente físico, se discretiza o se divide en una colección de subdominios más sencillos llamados elementos finitos (Figura I-10b), los cuales a su vez se pueden ver como dominios independientes que están interconectados en uniones específicas llamadas nodos (Figura I-10c). Al conjunto de estos nodos y sus relaciones constitutivas se le conoce como malla.

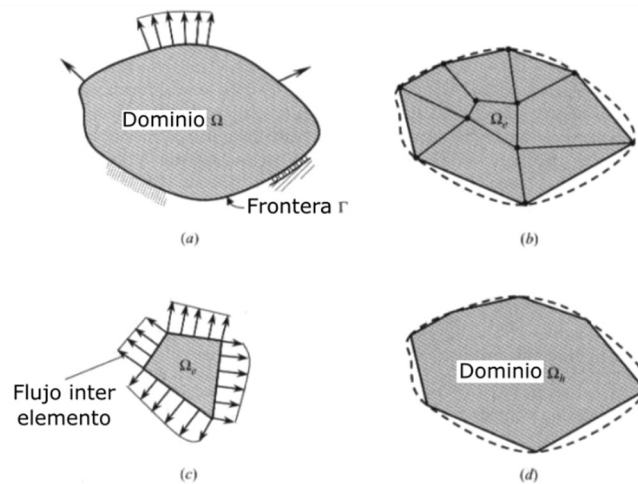


Figura I-10. Representación de un dominio 2D por medio de triángulos y cuadriláteros. (Imagen tomada de Reddy, 2006).

La discretización del dominio en elementos finitos no es realizada al azar, sino que ya existen elementos definidos que permiten modelar el dominio lo más cercano al comportamiento físico real (Figura I-11). El número total de elementos utilizados y su variación en tamaño y tipo dependen de las características del problema que se desea resolver y de que tan precisos o cercanos a al comportamiento real se desean obtener los resultados. En general, los elementos deben

ser lo suficientemente pequeños para que se puedan obtener resultados confiables, pero también deben ser lo suficientemente grandes para reducir el esfuerzo computacional (Logan, 2007).

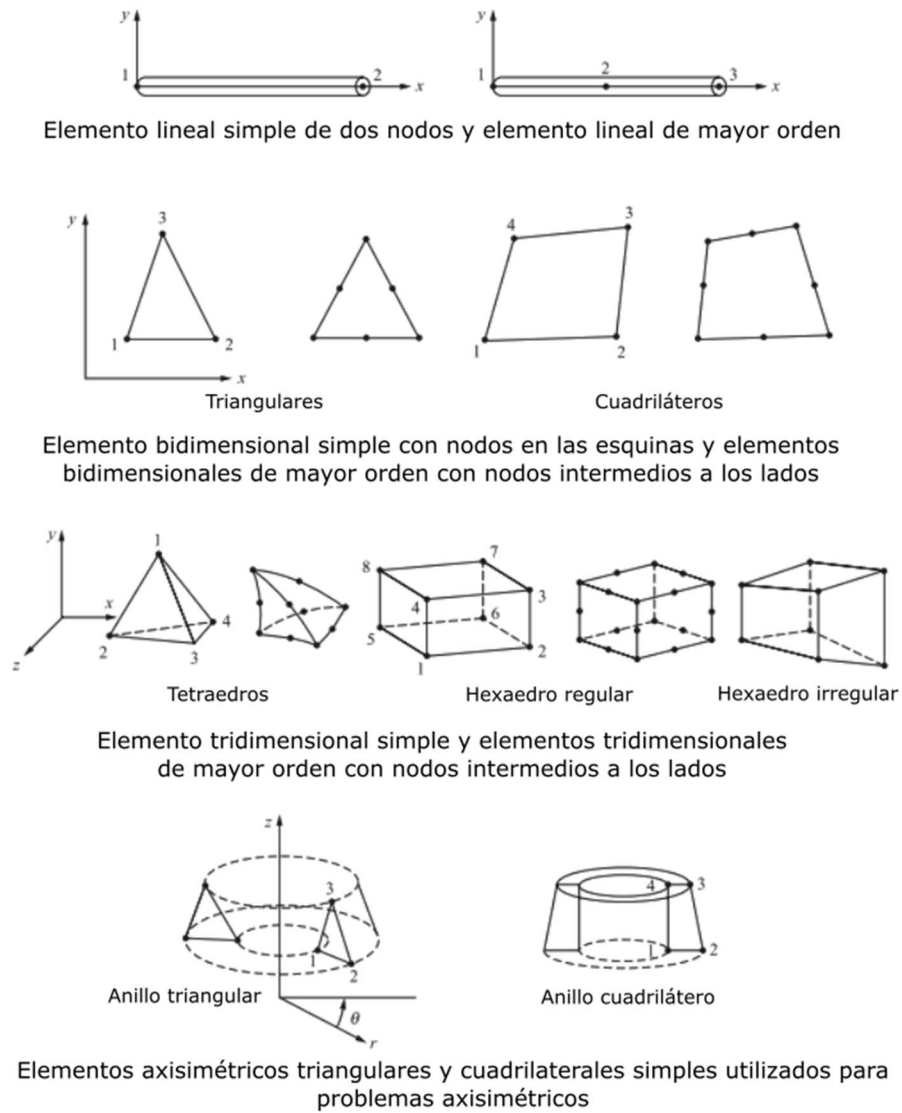


Figura I-11. Diferentes tipos de elementos finitos. Elementos con solo nodos en los bordes y lados rectos son de menor orden (lineal), mientras que aquellos con nodos intermedios y que pueden tener lados curvos representan elementos de mayor orden (cuadrático). (Imagen tomada de Hutton, 2001).

Una forma para escoger los elementos, es utilizar elementos pequeños (y posiblemente de alto orden) cuando los resultados cambian rápidamente, como en aquellos dominios donde la geometría cambia de manera repentina, y elementos largos donde los resultados son relativamente constantes. A continuación, sobre cada uno de estos elementos finitos se generan funciones algebraicas de aproximación definidas en términos de los valores de las variables dependientes en los nodos que están basadas en la ecuación o ecuaciones matemáticas que gobiernan el pro-

blema, así como en las condiciones específicas de frontera. Las funciones más comúnmente utilizadas para realizar esta aproximación, son las funciones lineales o las polinómicas (cuadráticas o cúbicas) ya que son relativamente sencillas de trabajar en la formulación del método.

Posteriormente, todos los elementos son colocados de nuevo en sus posiciones originales dentro del dominio empleando ciertas relaciones inter-elemento (Figura I-10d) y el conjunto total de ecuaciones que describen el comportamiento de cada nodo resulta en un ensamble de ecuaciones algebraicas simultáneas que es expresado en forma de matriz y que define la o las ecuaciones globales. Dichos sistemas de ecuaciones finalmente son resueltos mediante diferentes métodos como por ejemplo los métodos de eliminación o iterativos.

La reconstrucción completa del dominio por medio de los elementos finitos puede no ser exacta y esto introduce un cierto grado de error en el problema que está siendo modelado (Figura I-10d) (Reddy, 2006). Este procedimiento, genera errores de aproximación debido a la naturaleza numérica del mismo que a su vez son también introducidos en la solución del sistema global y que se suman a los generados por la selección de los elementos finitos. Finalmente, se debe realizar el post procesamiento (graficación, integración, derivación, etc.) para poder interpretar y analizar los resultados para su uso posterior.

En el caso de la IN, el potencial eléctrico y el campo eléctrico son calculados mediante la solución de la ecuación de continuidad bajo las condiciones de frontera adecuadas donde si la geometría es simple, es relativamente sencillo resolverla, sin embargo, cuando la geometría es compleja, **es necesario recurrir a los métodos numéricos como el método de los elementos finitos** para poder obtener una solución (Joucla & Yvert, 2009).

### Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica

Como ya se mencionó previamente el registro simultáneo de potenciales de acción y sus corrientes iónicas asociadas permite observar como un cambio en la cinética y la magnitud de éstas podría afectar la frecuencia de disparo, la amplitud, la morfología u otras importantes características de los potenciales de acción. Esta información es de utilidad para diferentes estudios entre los que se encuentra los de las células cardíacas. En este trabajo y como una aplicación práctica en ciencia básica, se diseñó y construyó un sistema de registro simultáneo basado en los elementos así como en la instrumentación utilizada para la obtención de los datos experimentales del modelo. Para esta aplicación se empleó el eNTCPM y dos amplificadores de “Patch Clamp”. A grandes rasgos, el potencial de acción de una neurona cultivada sobre el electrodo se registró con una micropipeta de vidrio convencional y la corriente iónica de célula completa se registró de manera extracelular con el eNTCPM construido.



## II. Antecedentes

### Trabajos preliminares

Hasta ahora se ha definido qué es un EN y se han resaltado las ventajas de incluir a los materiales surgidos de la nanotecnología en su construcción. Además, se presentó un panorama general de la interfase que se forma entre la superficie del electrodo, el medio extracelular y la neurona. En ese sentido y como antecedente, en el grupo de trabajo se ha explorado la posibilidad de utilizar a los NTC en la construcción de un EN básico. En un trabajo previo, se obtuvo de manera exitosa el cultivo de la línea celular PC12 (modelo de neurona) sobre electrodos construidos a base de una película de NTC. Los resultados del crecimiento celular fueron satisfactorios pues se consiguió obtener una proliferación neuronal equiparable a la exhibida en los controles (cajas Petri) por un periodo de aproximadamente 30 días. Durante este tiempo, se observó que las células desarrollaron procesos dendríticos, así como el comportamiento electrofisiológico típico de este tipo de neurona para posteriormente desplegar una red neuronal sobre la superficie del electrodo.

En lo que respecta a los estudios electrofisiológicos, se obtuvieron datos al estimular y registrar intra y extracelularmente células individuales sin que las células vecinas aportaran interferencia o ruido al sistema. Se observó que, al hacer el registro de manera extracelular, los potenciales adquiridos siguieron en forma y magnitud la etapa de decaimiento exponencial de la señal intracelular. La confirmación del seguimiento fue que las constantes de tiempo tanto para el registro intracelular como para el registro extracelular fue igual en ambos casos, lo cual implicó que el electrodo compuesto por NTC reprodujo la respuesta de la célula sin distorsionarla.

En esta nueva etapa se desea comprender qué es lo que sucede con la transmisión de las señales eléctricas en la interfase cuando se presenta un estímulo o registro neuronal además de investigar si es posible predecir su comportamiento cuando exista alguna modificación en las condiciones de operación o de diseño en el electrodo, sin la necesidad de realizarlo de manera experimental; es decir, bajo qué condiciones de diseño, construcción u operación el desempeño en la interfase mejoraría.

**Es necesario recalcar, que este proceso de mejora de los EN de NTC se lleva a cabo actualmente de manera empírica a ensayo error o a través de pruebas de concepto.** Esta inquietud donde se quiere entender de manera formal lo que ocurre en la IN mediante el modelado y la simulación, ha surgido en otros grupos de investigación además del nuestro. A continuación, se muestran los trabajos encontrados en la literatura sobre modelos de EN con diferentes materiales.



## Modelos desarrollados para caracterizar la interfase

En la literatura existen algunos modelos que describen las características eléctricas de la IN, que permiten comprender mejor los mecanismos de acople entre el medio extracelular y su interacción con la superficie del electrodo y con la membrana celular durante la transmisión de señales eléctricas de comunicación entre ellos.

Modelos como el de punto de contacto y el de área de contacto son algunos de los más utilizados o estándar para describir las características eléctricas de la interfase célula-electrodo, sin embargo, dichos modelos presentan algunas desventajas (Figura II-1). Por ejemplo, el modelo de punto de contacto no provee la precisión suficiente para modelar las propiedades eléctricas de la interfase a resoluciones sub-celulares ya que la distribución espacial de las diferentes características eléctricas de la IN no es modelada. El modelo de área de contacto si contempla la distribución espacial apropiadamente pero cuando la geometría del área de contacto es muy compleja, la solución de este modelo es muy complicada (Fromherz, 2003).

Otro tipo de modelo que se ha logrado utilizar con éxito es el modelo de circuitos agrupados (“lumped”), y se construye con base en la regla del volumen conductor y a datos experimentales (incluyendo micrografías de la neurona). En estos circuitos, la membrana celular se divide en una parte superior y una inferior sobre el electrodo la cual definen como membrana libre y de unión respectivamente además, la interfase electrodo-electrolito y la resistencia de sello están representadas por un solo componente. En este caso, el modelo no garantiza una relación geométrica adecuada debido a que se realizan muchas simplificaciones en la representación de las propiedades eléctricas de la IN, además de que es complicado calcular los parámetros del modelo desde la geometría a menos que ésta sea muy simple (Buitenweg, Rutten, & Marani, 2003).

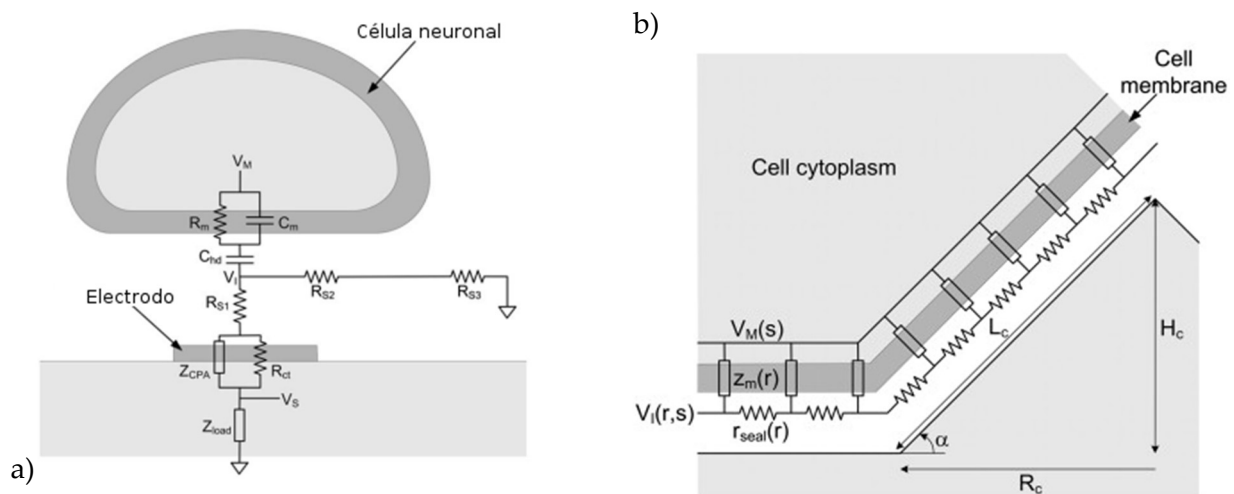


Figura II-1. Modelo de punto y área de contacto de la interfase neuronal. En éstos, a base de una serie de circuitos eléctricos se representan el comportamiento de la membrana celular, el medio extracelular, la resistencia de sello y la impedancia del electrodo. Donde  $V_m$ ,  $R_m$  y  $C_m$  representan el potencial, la resistencia y la capacitancia de membrana.  $C_{nd}$ ,  $V_l$ ,  $R_{s1}$ ,  $R_{s2}$  y  $R_{s3}$  la capacitancia, el potencial, la resistencia del electrodo y la de fuga.  $Z_{cpa}$ ,  $R_{ct}$ ,  $V_s$  y  $Z_{load}$  la impedancia y la resistencia de contacto.  $V_s$  y  $Z_{load}$  el potencial y la impedancia de carga. (Imagen tomada de Quiroz et al., 2007).

La literatura existente sobre el tema de modelado y simulación de la IN es extensa y hasta ahora se han explorado distintos métodos para tratar de entender lo mejor posible su funcionamiento, de manera que este tema, sigue siendo investigado y más ahora que los materiales nanoestructurados se están incorporando en la construcción de los nuevos EN. A continuación, se exponen algunos de los trabajos que se han realizado al respecto.

En 2007, surge uno de los primeros modelos sobre la IN el cual fue desarrollado por A. Mazzatenta *et al.* (Mazzatenta *et al.*, 2007). En este trabajo de manera experimental y por medio de un modelo sencillo de resistencias eléctricas equivalentes, los autores sugieren que el acople eléctrico entre las neuronas y el electrodo de NTC es en parte resistivo y que la corriente de estimulación entregada a través de este pudo hiperpolarizar o despolarizar la membrana, lo que inhibía o iniciaba el disparo sostenido de potenciales de acción en las neuronas adheridas a su superficie.

La Figura II-2 muestra el modelo de estimulación eléctrica a través de una película de NTC desarrollado por este grupo. En este esquema se tiene la micropipeta inmersa en la solución extracelular (Figura II-2A) y sobre la célula en de fijación de voltaje (Figura II-2B). Para la primera configuración, el circuito de la Figura II-2C explica las propiedades de corriente continua tanto de la película de NTC como de la micropipeta y la solución extracelular. Para el experimento con la célula, los autores prueban su hipótesis de acoplamiento entre los NTC y la célula. El circuito representa el experimento de "Patch Clamp" en célula completa ideal sin (Figura II-2D) y con (Figura II-2E) acoplamiento eléctrico resistivo entre el citoplasma y los NTC. Finalmente el circuito de la Figura II-2F captura las dos situaciones anteriores bajo la hipótesis de una configuración en célula completa no-ideal.

En 2008, C. Moulin y A. Glière (Moulin *et al.*, 2008), presentan un modelo del registro extracelular de los potenciales de acción de una neurona con axón y su segmento inicial ("axon-hillock") mediante un microelectrodo de oro desarrollado con el método de los elementos finitos. El modelo de la neurona está basado en las ecuaciones de Hodgkin-Huxley y los cálculos del  $V_m$ , las corrientes iónicas, así como de los potenciales intra y extracelulares son efectuados con el método de los elementos finitos. Los resultados de esta investigación muestran que el potencial de acción de mayor amplitud registrado de manera extracelular se obtiene cuando el electrodo está situado debajo del área que engloba el soma de la neurona y el segmento inicial. Esto es debido a que en su modelo las conductancias de sodio y de potasio son incrementadas 10 veces en la zona del segmento inicial; con el fin de tomar en cuenta la mayor población de canales iónicos voltaje dependientes en esta estructura y su mayor excitabilidad.

En 2008, 2009, G. Massobrio *et al.* (Massobrio *et al.*, 2008), (Massobrio, Massobrio, & Martinoia, 2009), proponen un modelo electrónico para simular y analizar las interacciones y la actividad eléctrica extracelular inducida en la neurona por un arreglo de NTC junto con un transistor de efecto de campo (Figura II-3). La membrana celular de la neurona la modelan con el modelo "silicon neuron" mientras que para los nanotubos emplean un modelo eléctrico o circuito

"RLC" (Resistencia-Inductor-Capacitor) equivalente. El modelo RLC está basado en el modelo de "Luttinger liquid" (Burke, 2002), (Hierlemann *et al.*, 2011).

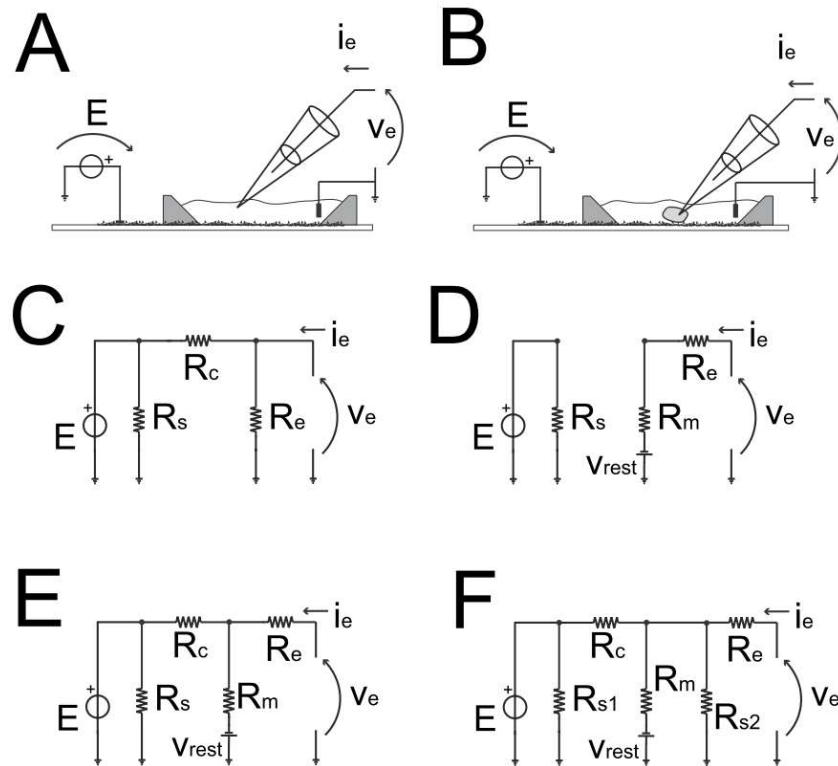


Figura II-2. Modelo de la interfase neuronal de A. Mazzatenta *et al.* A y B presentan los esquemas del protocolo experimental seguido sin y con célula sobre los nanotubos respectivamente. El resto de las imágenes muestran los modelos empleados para describir el comportamiento de cada experimento en base a circuitos eléctricos resistivos. Donde E representa el potencial de estimulación,  $i_e$ ,  $V_e$ , la corriente y el potencial de registro.  $R_s$ ,  $R_c$ ,  $R_e$ ,  $R_m$ , representan las resistencias de superficie, acople, registro y de membrana respectivamente.  $V_{rest}$  es el potencial de membrana en reposo. (Imagen tomada de Mazzatenta *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos muestran a los NTC como una interfaz eléctrica que tiene efectos tanto en la amplitud como en la forma de las señales registradas, además de que incrementan la eficacia de la transmisión de la señal neuronal. Posteriormente, ese mismo grupo agrega variaciones de temperatura (Massobrio & Massobrio, 2009) y pH del medio extracelular (Massobrio, Massobrio, Massobrio, & Massobrio, 2011) al mismo modelo y sus resultados muestran que ésta tiene un papel importante en la forma de las señales extracelulares adquiridas.

En 2009, W. Eberle *et al.* (Eberle *et al.*, 2009), parten de un microelectrodo con 10 contactos para investigar las propiedades de estimulación espacial, para diferentes formas y topologías del electrodo en una rebanada de tejido nervioso utilizando el modelado y la simulación por el método de los elementos finitos. Sus resultados muestran el potencial que tienen las topologías que se encuentran en el orden de los  $\mu\text{m}$  para ser empleados en patrones de estimulación espacial. Ese mismo año N. Joye *et al.* (Joye *et al.*, 2009), utilizan el modelo de punto de contacto y el modelo de área de contacto con el fin de modelar las características de la IN a resolución subcelular. De

manera analítica, determinan que un diámetro óptimo del electrodo para registrar la actividad eléctrica de las neuronas es de  $8\ \mu\text{m}$  con un diámetro de la célula de  $10\ \mu\text{m}$  y una capacitancia típica de  $10\ \text{pF}$ ; además, las puntas de los electrodos son modeladas en 3D usando el modelo de área de contacto, con lo que obtienen mejoras en el acople eléctrico en pequeños electrodos.

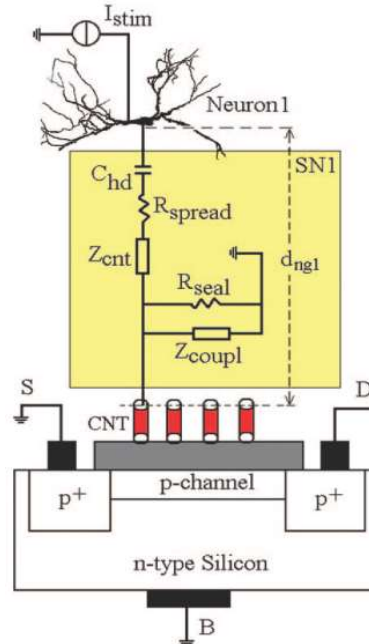


Figura II-3. Modelo de la interfase neuronal de G. Massobrio et al. En base a circuitos eléctricos se describe el comportamiento de la interfase donde se emplean nanotubos de carbono dispuestos de manera vertical sobre un transistor de efecto de campo. El recuadro amarillo representa el medio extracelular (SN1) mientras que la neurona es simulada con circuitos electrónicos no lineales.  $R_{seal}$  es la resistencia de sello entre la neurona y el sitio de registro,  $I_{stim}$  es la corriente de estimulación,  $C_{hd}$  es la capacitancia membrana-medio extracelular,  $R_{spread}$  es la resistencia de propagación,  $Z_{cnt}$  y  $Z_{coupl}$  son impedancias electroquímicas, CNT los nanotubos de carbono, S, D y B son las terminales del transistor FET. (Imagen tomada de Massobrio & Massobrio, 2009).

En 2011, G. Baranauskas et al. (Baranauskas et al., 2011), describen la impedancia de la interfase electrodo de nanotubos-polipirrol-electrolito con un modelo eléctrico (Figura II-4). En este modelo, los autores toman en cuenta: la resistencia de la solución, la impedancia del electrodo sin la solución, la capacitancia del recubrimiento, la resistencia de poro, la capacitancia de la interfase, la resistencia de transferencia de carga y un elemento de difusión. Como resultado, muestran que la impedancia se reduce y se mejora la relación señal a ruido gracias los nanotubos.

En 2012, J. Robinson et al. (Robinson et al., 2012), construyen un nanoalambre que es cubierto por una neurona y realizan el análisis de las corrientes y los potenciales obtenidos utilizando un circuito eléctrico equivalente (Figura II-5). Este modelo permite la determinación de los parámetros que especifican el acople eléctrico entre el nanoalambre y la neurona. El modelo que emplean es el modelo de punto de contacto con unas pequeñas variaciones introducidas por la adición de una micropipeta en paralelo con la neurona de registro. En este análisis determinan:

la resistencia de sello para el nanoalambre y la micropipeta, la resistencia intrínseca del nanoalambre, la resistencia en la unión electroquímica y la capacitancia de la doble capa eléctrica.

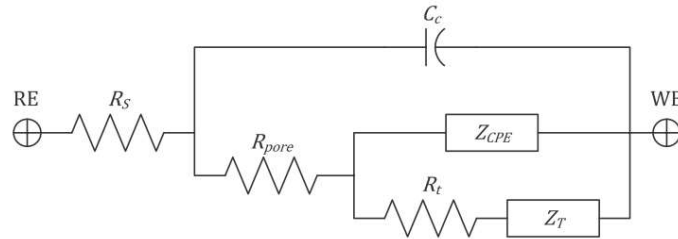


Figura II-4. Modelo equivalente de la interfase electrodo/electrolito. En éste, se simula mediante circuitos eléctricos la impedancia existente entre el electrodo de nanotubos y el electrolito. Donde  $R_s$ ,  $R_{pore}$ ,  $R_t$  son la resistencia en serie, de poro y de interfase respectivamente.  $C_c$ ,  $Z_{cpe}$  y  $Z_t$  es la capacitancia de doble capa y las impedancias de interfase.  $Re$  y  $We$  son el electrodo de referencia y de trabajo respectivamente. (Imagen tomada de Baranauskas et al., 2011).

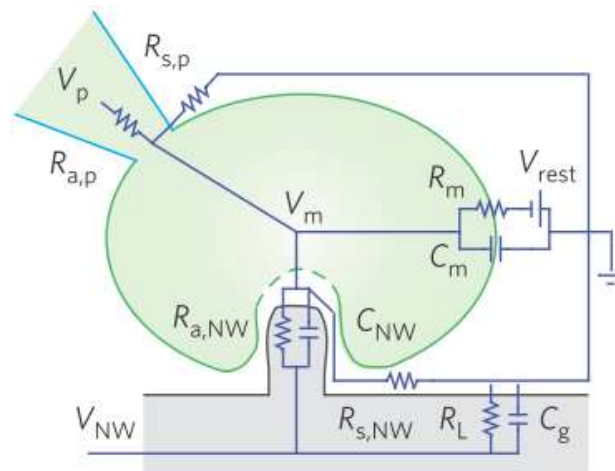
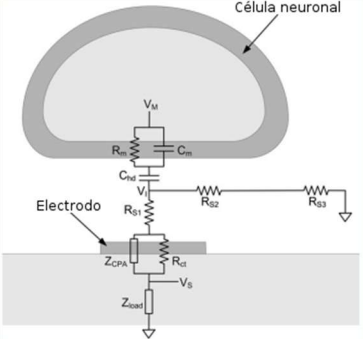
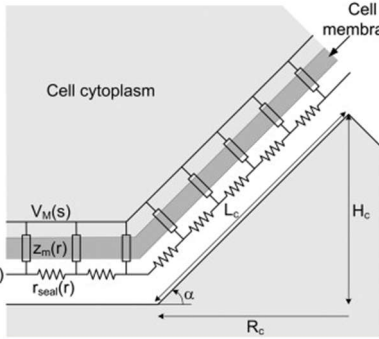
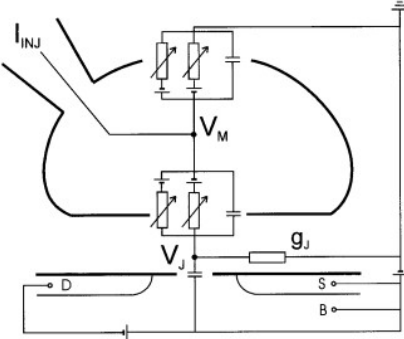
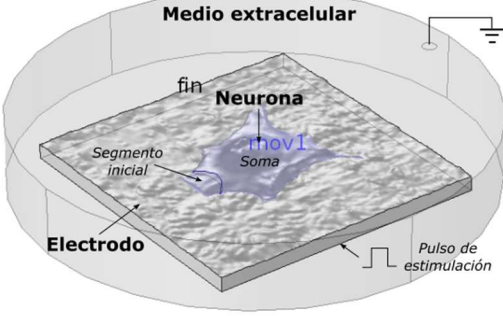


Figura II-5. Modelo de punto de contacto de la interfase neurona-nanoalambre. Haciendo uso de circuitos eléctricos convencionales se representa cada etapa del sistema, pero en este caso se incluye además el sistema de registro/estimulación por medio de la micropipeta de vidrio. Donde  $V_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$ ,  $V_{rest}$  representan el potencial, la resistencia, la capacitancia de membrana y el potencial de reposo.  $V_p$ ,  $R_{s,p}$  y  $R_{a,p}$  el potencial, la resistencia en serie y de fuga del contacto entre la pipeta y la célula.  $R_{a,NW}$ ,  $C_{NW}$ ,  $R_L$ ,  $C_g$  las resistencias y capacitancias de contacto entre el electrodo y la célula y el electrodo.  $R_{s,NW}$  es la resistencia de fuga y  $V_{nw}$  es el voltaje en el nanoalambre. (Imagen tomada de Robinson et al., 2012).

Estos son algunos de los modelos que se han construido para tratar de entender lo que sucede en la IN y cuyos resultados son importantes para poder diseñar y construir electrodos de registro/estimulación neuronal de manera confiable. Las técnicas utilizadas emplean entre otros, modelos eléctricos equivalentes y simulaciones por el método de los elementos finitos a microelectrodos y recientemente a nanoelectrodos. Los trabajos preliminares de modelado y simulación del tipo de interfase con nanotubos o materiales nanoestructurados son muy pocos y hasta la fecha no se ha investigado un modelo que utilice el método de los elementos finitos para describir la interfase eléctrica células neuronales-electrodo nanoestructurado. Para cubrir este hueco importante es que se propone éste proyecto doctoral.

Tabla II-1. Modelos empleados en el estudio de la interfase electrodo-neurona.

Modelo	Ventajas	Desventajas
<p><b>Punto de contacto</b></p> 	<p>Representa los componentes principales de la interfase mediante circuitos eléctricos equivalentes sencillos.</p>	<p>No proporciona suficiente exactitud para modelar las propiedades eléctricas de la interfase a una resolución subcelular, ya que las distribuciones espaciales de las diferentes características eléctricas en ésta no están modeladas.</p>
<p><b>Área de contacto</b></p> 	<p>Contempla la distribución espacial de las características eléctricas apropiadamente mediante circuitos eléctricos equivalentes sencillos.</p>	<p>Se tienen problemas cuando la geometría del área de contacto es muy compleja pues la solución de este modelo se vuelve complicada.</p>
<p><b>Circuitos agrupados</b></p> 	<p>Similar a los anteriores; la membrana celular se divide en una parte superior y una inferior sobre el electrodo, puede incluir micrografías para considerar la geometría.</p>	<p>Se hacen grandes simplificaciones en la representación de las propiedades eléctricas de la interfase y es difícil calcular los parámetros del modelo a partir de la geometría, a menos que sea muy simple (axisimétrica).</p>
<p><b>Método de los elementos finitos</b></p> 	<p>Presenta la geometría realista del electrodo de estimulación y de la neurona. Puede tomar en cuenta diversos procesos para describe las características eléctricas, asignar distintos materiales, condiciones de frontera.</p>	<p>Mientras más compleja sea la geometría, la malla de elementos finitos y el orden de las ecuaciones a resolver, el esfuerzo computacional se incrementa.</p>

## Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica

Una de las primeras técnicas experimentales desarrolladas para realizar este tipo de registros permitió observar el potencial de acción de una célula excitable con actividad eléctrica espontánea junto con la corriente iónica generada por un canal iónico (inespecífico) (Fischmeister, DeFelice, Ayer Jr, Levi, & DeHaan, 1984). Debido a la configuración experimental de ese trabajo, no era posible medir la corriente iónica de célula completa pues está era producida por un solo canal.

Un par de técnicas llamadas “fijación del potencial de acción” (Doerr, Denger, & Trautwein, 1989), (Chen-Izu et al., 2012), y su variante “fijación del potencial de acción dinámica” (Chen-Izu et al., 2012), resolvió la limitación de la técnica anterior permitiendo registrar tanto la corriente iónica de célula completa como el potencial de acción específico. Los principales inconvenientes de estas técnicas es que son indirectas y secuenciales (no simultáneas) además de que es necesario utilizar bloqueadores de canales iónicos específicos para adquirir las corrientes. Por otra parte, estas técnicas dependen del comportamiento óhmico de los canales iónicos; sin embargo, en la realidad también existen otros tipos de corrientes producidas por canales modulados de manera no lineal por metabolitos y  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Hille, 2001).

En una técnica llamada "sistema de fijación de voltaje híbrido" (Dietrich, Clusmann, & Kral, 2002), un amplificador especial capaz de conmutar entre fijación de corriente y fijación de voltaje lo suficientemente rápido es utilizado para medir el potencial de acción y la corriente iónica subyacente de manera cuasi-simultánea. La principal desventaja de esta técnica es que el desarrollo normal del potencial de acción es interrumpido para medir la corriente iónica.

Las técnicas descritas anteriormente son importantes pues fueron diseñadas para registrar la corriente iónica y el potencial de acción de manera simultánea, lo cual sirve para evaluar el efecto que tiene un cambio dichas corrientes iónicas en el desarrollo de un potencial de acción.

En este trabajo y como una aplicación práctica en ciencia básica, se diseñó y construyó un sistema de registro simultáneo que presenta características distintas; entre ellas, el empleo de nanomateriales y el uso de dos amplificadores de “Patch Clamp”. La metodología aquí propuesta resuelve los inconvenientes de las técnicas discutidas anteriormente pues ni la actividad de los canales iónicos ni el proceso de registro, se altera o se interrumpe durante el experimento.



### III. Hipótesis

Con base en datos experimentales y en modelos teóricos, es posible construir un modelo de la interfase neurona-electrodo de nanotubos de carbono y simularlo por el método de elemento finito para describir la transmisión de señales eléctricas en ella además de predecir su conducta cuando se modifiquen las condiciones de operación o de diseño en el electrodo. Asimismo, que gracias a las características eléctricas y mecánicas de los nanotubos de carbono es posible registrar de manera extracelular las corrientes iónicas de célula completa que generan un potencial de acción.

### IV. Justificación

Para que se pueda adquirir un potencial bioeléctrico o aplicar una señal eléctrica a una neurona con éxito, es importante que tanto en el diseño como en la construcción de los electrodos se cuente con un número suficiente de contactos estables y duraderos con el tejido nervioso además de considerar las impedancias y capacitancias que se pudieran producir en la interfase entre el electrodo y la neurona (Schwartz, 2004). En este caso, el conocimiento que se tiene acerca del fenómeno de transporte eléctrico en la interfase es poco claro, por lo que la experimentación ayuda a comprenderlo mejor. Sin embargo, el manejo de materiales nanoestructurados no es sencillo y las metodologías existentes para la construcción de micro-nanoelectrodos en ocasiones son muy elaboradas y costosas, por lo que construir un electrodo de este tipo sin tener un entendimiento, una dirección, un panorama aproximado de lo que sucede en la interfase puede resultar costoso. Para comprender mejor y ofrecer una posible explicación del fenómeno, los modelos y la simulación por computadora son una herramienta óptima que permite, en conjunto con la experimentación, obtener un conocimiento más profundo del sistema que se está estudiando. Por otra parte, reduce el número de experimentos de prueba y error pues el modelo computacional permite hacer que estas pruebas sean más fluidas y que a su vez, se pueda enriquecer con los resultados obtenidos por las pruebas físicas que se vayan desarrollando. El trabajo experimental desarrollado requiere ahora de un enfoque teórico que ayude a comprender mejor cómo es que se llevan a cabo los procesos de comunicación eléctrica en la interfase pues aun cuando los resultados obtenidos fueron bastante alentadores, se desconocen características importantes de los componentes de la interfase así como de su funcionamiento en conjunto; por ejemplo, algunas de las interrogantes que surgen después de haber hecho los registros extracelulares fueron:

¿Cuáles son las capacitancias e impedancias que presentó la película en el momento de hacer el registro extracelular y cómo éstas se modificaron con respecto a su estado natural, es decir, cuando aún no formaban parte de la interfase? ¿Cuáles son las contribuciones de cada componente de la interfase?

¿Por qué el registro a través de la película de nanotubos siguió en tiempo, forma y magnitud la etapa de decaimiento exponencial de la señal intracelular sin modificarla? ¿Qué tanto la

cercanía de los nanotubos con la neurona mejora la comunicación eléctrica o los niveles de ruido en la interfase?

De acuerdo con el diseño propuesto, ¿Qué se puede modificar en la interfase para obtener una mejor calidad de señal? ¿Cómo responde la interfase a las señales de estimulación aplicadas?, esto con el fin de saber cuál es la señal idónea de estimulación para el electrodo construido.

El trabajo de simulación es importante porque determina entre otras cosas, cuáles son las características o parámetros importantes que permiten favorecer el intercambio de información entre los componentes del sistema, pero también acompañado del trabajo experimental estrictamente requerido y de resultados experimentales y teóricos encontrados en la literatura para poderlo sustentar. Es importante destacar que, siguiendo los protocolos de los autores, el trabajo desarrollado se situó a nivel macro.

Por otra parte, aprovechando las características eléctricas y mecánicas de los NTCPM así como los elementos y la instrumentación diseñados y construidos para la obtención de los datos experimentales requeridos para el modelo, se desarrolló una aplicación específica para registrar de manera simultánea el potencial de acción de una neurona y las corrientes iónicas que lo generan. Esto es importante para conocer como un cambio en la cinética y la magnitud de éstas corrientes podrían afectar la frecuencia de disparo, la amplitud, la morfología u otras características relevantes de los potenciales de acción. La información generada por esta aplicación es de utilidad en estudios de ciencia básica, fisiología celular, farmacología y detección de condiciones patológicas (Sigworth & Klemic, 2005) en células cardiacas principalmente (Chen-Izu et al., 2012).

Si bien esto ya se ha intentado anteriormente, los diseños, la instrumentación, las características de los electrodos empleados y otros factores han impedido que se realice de manera satisfactoria. En este caso, el electrodo nanoestructurado y la instrumentación construidos pueden facilitar la obtención de estos registros de manera extracelular solventando las inconvenientes de las técnicas anteriores.

## V. Objetivos

### Objetivo general

Comprender el proceso de la transmisión de señales eléctricas en la IN cuando se presenta un estímulo y, predecir su comportamiento cuando exista alguna modificación en las geometrías o condiciones de operación en la interfase mediante el modelado y la simulación por el método de los elementos finitos, así como registrar las corrientes iónicas que generan un potencial de acción por medio de un eNTCPM de manera extracelular.

### Objetivos particulares

- Diseñar y construir un EN biocompatible a base de nanotubos de carbono de paredes múltiples (NTCPM) para el cultivo de neuronas sobre su superficie así como, estudiar sus propiedades eléctricas y morfológicas superficiales.
- Analizar el comportamiento eléctrico del electrodo construido mediante el uso técnicas de modelado y simulación por el método de los elementos finitos empleando su geometría real. Validar el modelo por medio de datos experimentales.
- Estudiar de manera experimental el comportamiento electrofisiológico de células neuronales cultivadas sobre la superficie del electrodo mediante el registro del potencial de membrana y las corrientes iónicas (funcionalidad). Además, evaluar la estimulación celular con pulsos de voltaje mediante el eNTCPM.
- Obtener el modelado y la simulación del sistema (electrodo acoplado eléctricamente al medio extracelular y a la neurona) por el método de los elementos finitos en el proceso de estimulación empleando geometrías sencillas y realistas. Analizar el comportamiento eléctrico del modelo y validarlo por medio de datos experimentales.
- Evaluar experimentalmente si el electrodo construido es capaz de registrar de manera extracelular las corrientes iónicas que producen el potencial de acción en las neuronas (registro simultáneo), aprovechando las características estructurales, eléctricas y de biocompatibilidad del material nanoestructurado que lo compone.
- Modelar y simular este sistema de registro simultáneo combinando el modelo de punto de contacto con un modelo computacional del comportamiento electrofisiológico específico de la neurona.

## VI. Diseño, construcción, caracterización y modelado del eNTCPM

### Metodología



Figura VI-1. Etapas del diseño, construcción, caracterización y modelado del eNTCPM.

## Diseño y construcción del eNTCPM

El electrodo se construyó para estimular y obtener de manera extracelular registros electrofisiológicos de células NG108-15. En el diseño y la construcción del eNTCPM se tuvo especial cuidado en que los materiales empleados no fueran tóxicos. Además, fue importante tener en cuenta que las características ópticas, mecánicas y eléctricas permitieran una correcta caracterización sin y con las células cultivadas sobre su superficie.

### Dispersión de los NTCPM

Los NTCPM son materiales hidrofóbicos que forman aglomerados de diferentes tamaños debido a las fuerzas de adhesión existentes entre ellos (p. ej. fuerzas de Van der Waals). Dichos aglomerados les dan una apariencia de polvo (Figura VI-2a) y pueden afectar sus propiedades mecánicas y eléctricas (Ma, Siddiqui, Marom, & Kim, 2010). Por lo tanto, para construir un electrodo a base de NTCPM que tenga una superficie uniforme e hidrofílica, fue necesario eliminar los aglomerados mediante la dispersión y la funcionalización de los NTCPM.

Tabla VI-1. Características físicas y composición química de los NTCPM utilizados.

Longitud	Diámetro	Componentes	Contenido
10-30 $\mu\text{m}$	20-40 nm	C	98.39%
		Cl	0.45%
		Fe	0.23%
		Ni	0.93%

Se preparó una suspensión con 5 ml de alcohol etílico absoluto (J.T. Baker, USA), 7 ml de agua desionizada y un miligramo de NTCPM (Cheap Tubes Inc., USA). Para separar mecánicamente los NTCPM, la suspensión fue puesta en ultrasonido por un minuto (Figura VI-2b). Posteriormente se agregaron 10 mg de polivinilpirrolidona (PVP) (MP Biomedicals, USA), que es un reactivo que funciona como agente dispersante y evita que los NTCPM vuelvan a formar agregados (Ntim, Sae-Khow, Witzmann, & Mitra, 2011). La suspensión fue puesta nuevamente en ultrasonido por un minuto y se dejó reposar en un horno de calentamiento por 6 hr a 60 °C. Finalmente, la suspensión se colocó en ultrasonido por otros 10 min. Para remover el exceso de PVP, la suspensión fue colocada en ultracentrífuga a 12000 rpm por 15-20 min y reconstituida con la misma mezcla de alcohol-agua (Figura VI-2c).

### Preparación de la película de NTCPM

Utilizando el método por filtración de vacío (Wang & Moriyama, 2011), 3 ml de la suspensión de NTCPM se depositaron sobre una membrana de celulosa con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA) (Figura VI-3a). La membrana con los NTCPM en su superficie (Figura VI-3b) se adhirió sobre un cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro; previamente lavado con agua desionizada y puesto en ultrasonido con alcohol etílico absoluto (J.T. Baker, USA) por 5 min. Para remover la membrana, el cubre objetos fue sumergido en acetona hasta que esta se diluyera por

completo dejando una película de NTPCM limpia sobre el cubreobjetos. Finalmente, el cubreobjetos con la película de NTPCM sobre éste fue enjuagado copiosamente con agua desionizada para remover los residuos (Figura VI-3c).

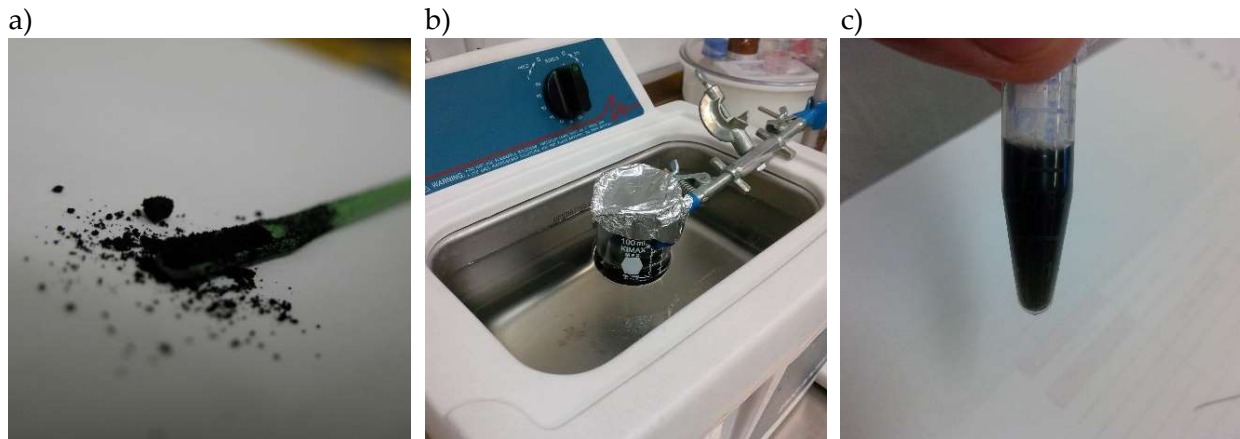


Figura VI-2. Dispersión de los NTPCM. a) NTPCM en polvo. b) Suspensión de NTPCM en ultrasonido. c) Suspensión de NTPCM reconstituida.

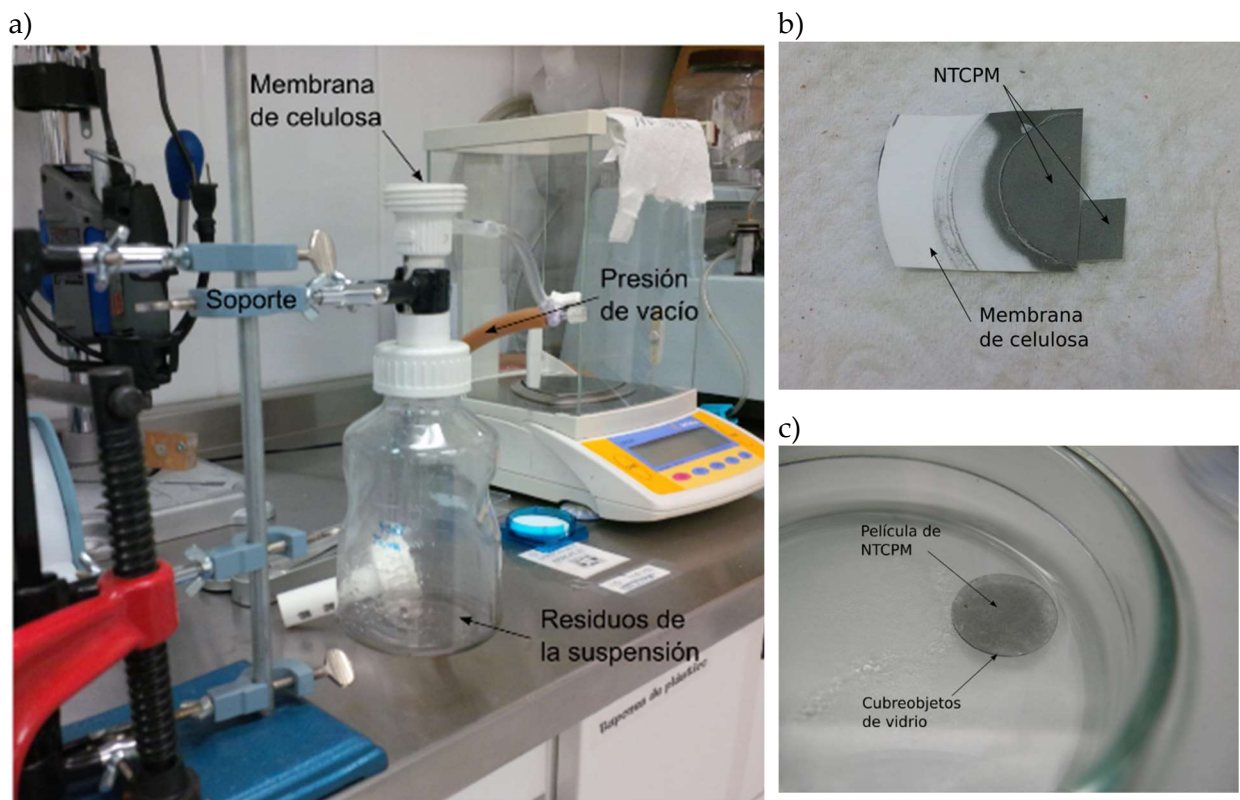


Figura VI-3. Preparación de la película de NTPCM. a) Sistema de filtración construido para este trabajo. b) Membrana de celulosa con NTPCM en su superficie. c) Cubreobjetos de vidrio con la película limpia de NTPCM.

#### Adhesión del alambre de plata

La adhesión del alambre responde al requerimiento de enviar/recibir señales eléctricas desde el electrodo. Un alambre de plata (AGT0510 WPI, USA) de 30 mm de longitud fue adherido



sobre la película de NTCPM con pintura conductiva de carbón (Pelco 16053, Ted Pella Inc, USA); la cual, se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 12 hr. Posteriormente, la unión fue recubierta con Sylgard 184 (Elastómero de silicona Dow Corning, USA) para proveerla de soporte mecánico y aislamiento eléctrico. El Sylgard es un material hidrofóbico que resiste la degradación química y la acción de contaminantes, es empleado principalmente como aislante eléctrico y no tiene efectos neurotóxicos (Klemic, Klemic, Reed, & Sigworth, 2002).

### Esterilización

Con el fin de evitar la contaminación celular, el electrodo (Figura VI-4) fue esterilizado en autoclave a 19-21 psi por 40 min (140 °C aproximadamente) y expuesto por 5 min a luz ultravioleta. La esterilización por vapor mata microorganismos mediante la destrucción de los componentes metabólicos y estructurales esenciales para su reproducción, mientras que la luz UV daña los enlaces químicos de su ADN (Walker *et al.*, 2012), (Rutala & Weber, 2004).

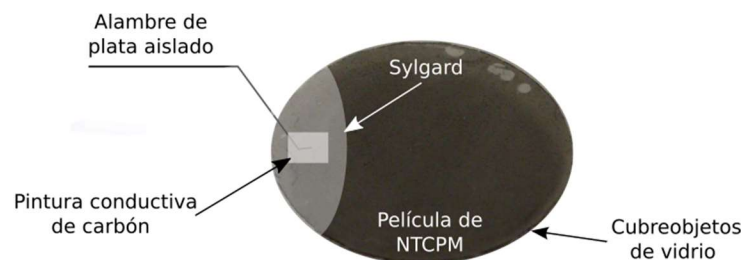


Figura VI-4. Esquema del eNTCPM construido para este trabajo.

### Caracterización del eNTCPM

Una vez concluida la construcción de los electrodos, se realizó la caracterización morfológica y eléctrica para obtener los parámetros morfológicos y eléctricos de la superficie del eNTCPM. Estos parámetros son importantes para comprender los resultados experimentales y también para la construcción del modelo.

#### Caracterización morfológica, química y estructural de la superficie del eNTCPM

La caracterización morfológica y química permitió conocer cómo y cuál era la composición de la superficie donde se cultivaron las células y, por otra parte, reveló información importante acerca de la geometría real de la misma; la cual sería utilizada posteriormente para la construcción del modelo.

*Microscopía óptica:* Las imágenes ópticas de la superficie del electrodo fueron adquiridas con un microscopio Carl Zeiss y digitalizadas con una cámara Cannon.

*Microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés):* La superficie también fue caracterizada mediante SEM. Este tipo de microscopía produce imágenes con alta resolución y profundidad de campo. Las micrografías fueron adquiridas con un microscopio JEOL JSM-5900LV (Jeol Ltd., Japón). Para obtener estas últimas, fue necesario recubrir la superficie del



eNTCPM con una película delgada de oro (10 Å aprox.). Asimismo, imágenes a diferentes ángulos fueron adquiridas para obtener el espesor de la película de NTCPM.

*Microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés):* Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 3.5 % por 48 hr, y postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% por 2hrs, después fueron deshidratadas a través de una serie de concentraciones de etanol (30- absoluto%) para después ser embebidas en resina EPON 812. Se realizaron cortes ultra finos con cuchilla de diamante para después ser observados con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 12000 EII).

*Microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés):* Para obtener información morfológica y geométrica de la superficie real del electrodo, así como una perspectiva 3D de la manera en la que se distribuyeron los NTCPM sobre ésta, se tomaron imágenes por AFM (Figura VI-5). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Nanoscope III Multimode SPM (Digital Instruments, USA) en modo intermitente u oscilante, a una velocidad de barrido de 0.3 Hz empleando puntas TESP (Veeco, USA) repitiendo cada zona por lo menos tres veces; esto último para confirmar que la interacción de la punta con la superficie no la modificaba.



Figura VI-5. Esquema de la caracterización morfológica de la superficie del electrodo por AFM.

*Espectroscopia Raman:* Por otra parte, para realizar la caracterización química y estructural de la superficie del electrodo, se empleó espectroscopia Raman con láseres a una longitud de onda de 633 nm y 510 nm (5-10 mW). Los espectros fueron adquiridos con espectroscopios Alpha 300 RA (Witec, Alemania) (Figura VI-16) y Horiba T64000 láser con longitud de onda de 532.1 nm; no se requirió algún tratamiento adicional de la muestra (Figura VI-15).

#### *Caracterización eléctrica y electroquímica del eNTCPM*

La caracterización eléctrica y electroquímica se realizó con la finalidad de comprobar que el electrodo era capaz de transmitir señales eléctricas desde o hacia la célula y, para observar el comportamiento del mismo inmerso en el medio extracelular; a su vez, también sirvió para obtener los parámetros eléctricos experimentales que posteriormente serían introducidos en el modelo.

*Medición de resistividad superficial (4 puntos):* Se utilizó la técnica de los cuatro puntos (Heaney, 2004) con un cabezal SP4 (Lucas Labs, USA) para asegurar la conductividad y medir la resistividad eléctrica de la superficie del eNTCPM (Figura VI-6). Las mediciones adquiridas se aplicaron posteriormente a las ecuaciones del método para calcular la resistencia superficial y volumétrica en películas delgadas circulares con un factor de corrección  $C_o\left(\frac{d}{s}\right)$  de 0.942.

$$R_{sup} = \frac{\pi \cdot R \cdot C_o\left(\frac{d}{s}\right)}{\ln(2)}$$

$$R_{vol} = R_{sup} \cdot T_s$$

*Ecuación VI-1. Resistividad superficial y volumétrica.* Donde  $R$  es la resistencia eléctrica medida,  $C_o$  es el factor de corrección,  $d$  es el diámetro de muestra,  $s$  es la distancia entre las puntas de prueba,  $T_s$  es el espesor de la película.

Ohm por cuadrado  $\left(\frac{\Omega}{sq}\right)$  es la unidad de medida de la resistividad de una película delgada de un material utilizando la técnica de los cuatro puntos. Es igual a la resistencia entre dos electrodos en lados opuestos de un cuadrado teórico. El tamaño del cuadrado no es importante ("Sheet Resistance and the Calculation of Resistivity or Thickness Relative to Semiconductor Applications," 2017.). También, para observar el comportamiento eléctrico de la película construida (linealidad), se aplicó una corriente eléctrica que se fue incrementando mientras se medía el voltaje desarrollado respecto de estos cambios.

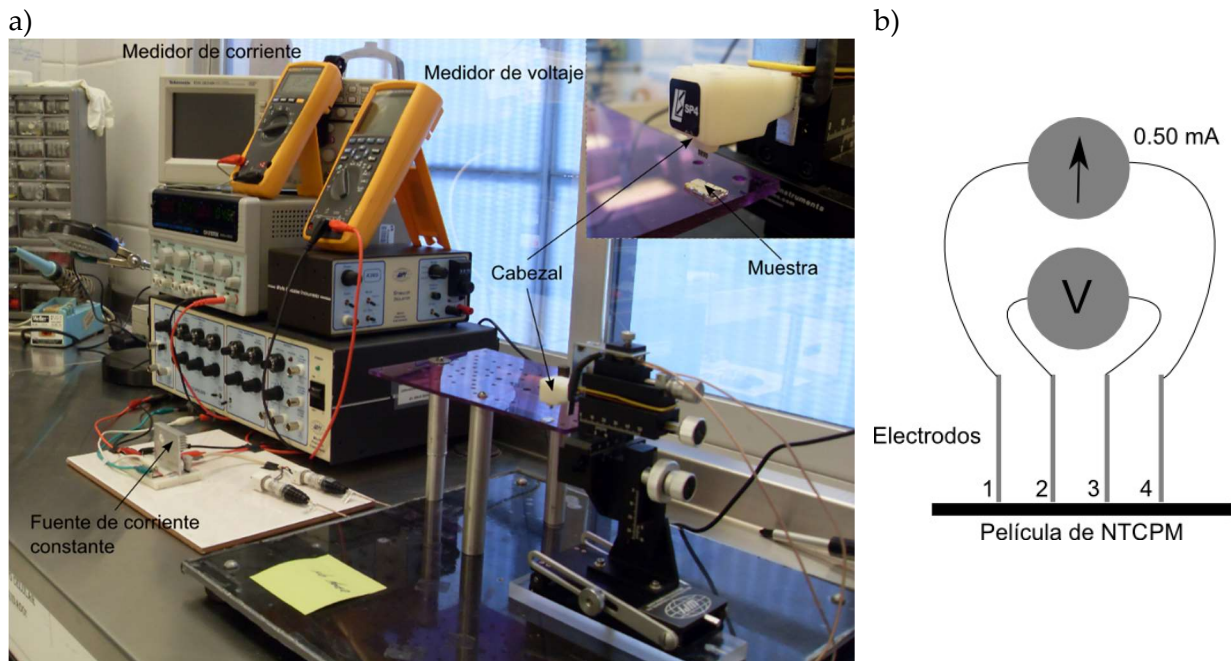


Figura VI-6. Medición de resistividad superficial. a) Sistema de medición de resistividad superficial por el método de los cuatro puntos construido para este trabajo. b) Esquema de medición por el método de los cuatro puntos sobre la superficie del eNTCPM.

*Conductividad eléctrica:* La continuidad eléctrica entre el alambre de plata y la película de NTCPM fue verificada con una prueba de conductividad hecha con un multímetro (Fluke 179, USA).

*Electroquímica:* Utilizando el potenciostato marca BAS 100B/W (Bioanalytical Systems Inc, 2001), se caracterizó por medio de los métodos de voltametría cíclica (Mabbott, 1983) y cronocoulombimetría (Laviron & Roullier, 1985), el comportamiento de la interacción eNTCPM - medio extracelular (electrólito) en un área (geométrica) determinada; el electrólito fue la solución extracelular preparada para los registros electrofisiológicos (definida más adelante en la caracterización electrofisiológica). La voltametría cíclica es una técnica electroquímica en la cual se aplica un potencial de manera continua al electrodo y se registra una corriente mientras que la cronocoulombimetría se aplica un pulso de potencial y se registra la densidad de carga. Con estos estudios, se obtuvieron parámetros como: la capacitancia de doble capa y la resistencia de interfase superficial; que posteriormente se agregarían al modelo. Previo a dichos experimentos, el potencial de reposo o de equilibrio del eNTCPM inmerso en el medio extracelular fue monitoreado.

Como referencia de las propiedades eléctricas, estas mismas pruebas se hicieron sobre dos tipos de electrodos distintos; uno construido con nanofibras de carbono (NFC) y otro de oro con estructura Au(111).

#### Modelado y simulación por el método de los elementos finitos del eNTCPM (I)

Como primer paso en el modelado y la simulación por el método de los elementos finitos (MEF) del sistema, se generó la geometría 3D del eNTCPM a partir de su caracterización morfológica. En la construcción digital de estas geometrías, se siguió un procedimiento de extracción y procesamiento de datos para poder presentarlas en el software de simulación.

De la caracterización por AFM, se obtuvieron las características superficiales, mientras que por SEM se adquirió el espesor promedio del electrodo. Las imágenes proporcionadas por AFM, son matrices de datos que contienen las coordenadas relativas X, Y, Z de la superficie con respecto al microscopio. Al traducir estas matrices a imágenes, se genera la representación geométrica de las superficies 3D reales.

En la simulación del comportamiento eléctrico, se utilizó el módulo AC/DC de Comsol (Comsol AB, USA); el cuál, provee un entorno de simulación electromagnética donde se pueden ejecutar simulaciones en estado estático, semi-estático, transitorio y armónico. Dentro de este módulo, se emplearon las interfases físicas "Electric Currents" y "Electric Currents, Shell"; que, pueden ser aplicadas en todas las dimensiones espaciales y en estudios del tipo estacionario, en el dominio de la frecuencia, estudios dependientes del tiempo y en el análisis de pequeña señal.

Estas interfases resuelven la ecuación de conservación de corriente basada en la ley de Ohm, empleando el potencial eléctrico escalar como variable dependiente, y se emplean básicamente para calcular el campo eléctrico, la corriente y la distribución de potencial en un medio conductor bajo ciertas condiciones (Comsol Documentation).

#### Construcción geométrica del eNTCPM

*Extracción y procesamiento de los datos superficiales 3D de la imagen de AFM.* Para el caso del eNTCPM, los datos superficiales 3D de la imagen de AFM fueron extraídos y procesados con Matlab; en este punto, se interpoló la imagen para agregar o disminuir datos en la misma.

*Acondicionamiento de la geometría del eNTCPM.* A continuación, la matriz de datos superficiales se envió a Comsol; que fue el programa seleccionado para simular el comportamiento eléctrico del electrodo por el MEF. Con las herramientas de dibujo promocionadas por este software, la superficie del eNTCPM fue acondicionada, reparada y embebida en un bloque de tal manera que su espesor simulara el espesor promedio de la película de NTC.

#### Simulación del comportamiento eléctrico del eNTCPM

*Medición de resistividad superficial:* En esta simulación se recreó el experimento de la medición de resistividad superficial por el método de los cuatro puntos (Pág. 33). Para ello, se construyó una geometría de dimensiones reales (Figura VI-7) a la cual, se le asignaron las propiedades de espesor promedio y conductividad eléctrica, obtenidas de manera experimental, y de permitividad relativa, obtenida de la literatura. En la implementación de la simulación se utilizó el módulo "Electric Currents, Shell" (módulo de cáscara o películas delgadas) y, las ecuaciones empleadas por ésta fueron:

$$\begin{aligned}\nabla_{\mathbf{T}} \cdot (\mathbf{T}_{\mathbf{s}} \mathbf{J}) &= -q_{\mathbf{s}} \\ \mathbf{J} &= \sigma \mathbf{E} + \mathbf{J}_{\mathbf{s}} \\ \mathbf{E} &= -\nabla_{\mathbf{T}} V\end{aligned}$$

*Ecuación VI-2. Ecuaciones de conservación de corriente para películas delgadas en Comsol. Donde J es la densidad de corriente en A/m<sup>2</sup>, es la densidad de carga en C/m<sup>3</sup>, la conductividad eléctrica en S/m, E es el campo eléctrico en V/m, la densidad de corriente generada de manera externa en A/m<sup>2</sup>, V el potencial eléctrico en V y Ts es el espesor de la cáscara o película delgada.*

El resultado de la diferencia de potencial (entre los puntos 3 y 6) obtenido de la simulación, se divide entre la corriente de estímulo para obtener la resistencia R, que se sustituye en la Ecuación VI-1 presentada anteriormente. Finalmente, se resuelve la ecuación y se encuentra la resistividad superficial/volumétrica simulada.

*eNTCPM en el medio extracelular.* La segunda simulación realizada, fue la reproducción del experimento de la interfase electrodo/electrólito. En este caso, la geometría del electrodo con sus propiedades eléctricas fue embebida en un cilindro que representa al medio extracelular. A esta

nueva geometría también se le asignaron propiedades de conductividad eléctrica y permitividad relativa, que fueron obtenidas de manera experimental y de la literatura respectivamente. Se emplearon, además, las mismas ecuaciones del estado estacionario que para el caso anterior. En esta simulación, se aplicó un potencial negativo en el eNTCPM, mientras que una región del medio extracelular fue enviado a tierra. Este experimento tiene la finalidad de observar cómo se comporta el sistema para estimular o registrar sin la presencia de la neurona.

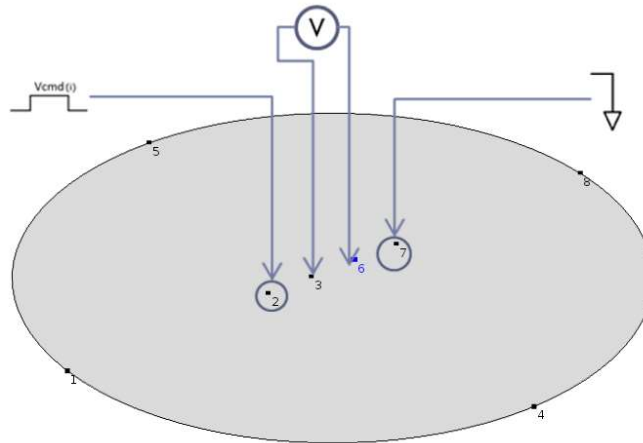


Figura VI-7. Esquema de la simulación del experimento de los cuatro puntos. Entre la terminal 2 y 7 se aplica un pulso de corriente y entre las terminales 3 y 6 se mide el voltaje desarrollado por la película.

## Resultados

### Diseño y construcción del eNTCPM

El electrodo construido para llevar a cabo el desarrollo experimental del sistema de registro/estimulación de la línea celular se muestra en la Figura VI-8.



Figura VI-8. Imagen y esquema del eNTCPM diseñado y construido en el laboratorio de nanotecnología e ingeniería molecular para el desarrollo experimental.

### Caracterización del eNTCPM



### Caracterización morfológica, química y estructural de la superficie del eNTCPM

La caracterización morfológica de la superficie del eNTCPM muestra la densidad, distribución y el arreglo que adoptaron los NTCPM al emplear el método por filtración de vacío para construir la película.

*Microscopía óptica:* En las imágenes por microscopía óptica es posible observar que los NTCPM se distribuyen de manera uniforme; aunque, algunas áreas del cubreobjetos de vidrio no fueron cubiertas con la misma densidad de éstos (Figura VI-9).

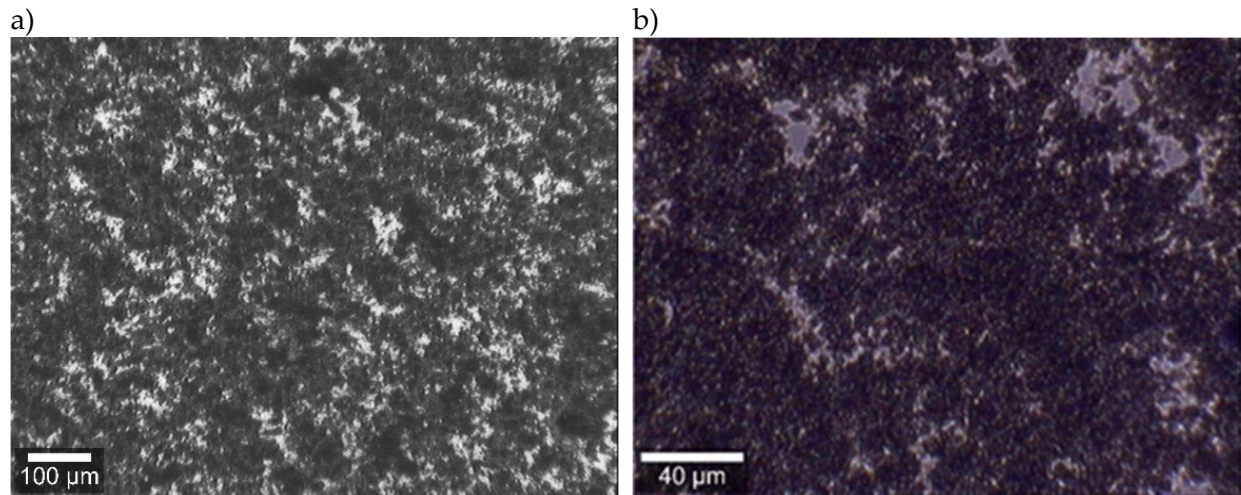


Figura VI-9. Imágenes de microscopía óptica de la distribución de los NTCPM sobre la superficie del cubreobjetos de vidrio. Se observan algunas áreas que no fueron cubiertas con la misma densidad de éstos.

*Microscopía SEM:* Mediante SEM es posible observar que se forma una red compleja de NTCPM desorientados (Figura VI-10a), así como algunos agregados los cuales indican que la dispersión no fue completamente efectiva. En esta imagen se puede ver que los NTCPM no son rígidos, sino que pueden adoptar diferentes conformaciones. Para conocer el espesor de la película, se obtuvieron imágenes con la muestra colocada a diferentes ángulos. Como es posible observar en la Figura VI-10b, el espesor no es completamente uniforme; por lo que se calculó un espesor promedio de  $3.362 \mu\text{m}$  a partir de diferentes zonas en la imagen. Por otra parte, mientras se intentaba determinar dicho espesor, se observaron NTCPM individuales o en pequeños paquetes orientados verticalmente sobre la superficie (Figura VI-10b recuadro). Este fenómeno estructural fue posteriormente confirmado mediante AFM. En este caso, se muestra un NTCPM situado de manera vertical con dimensiones de  $60 \text{ nm}$  de diámetro y  $433 \text{ nm}$  de altura sobre la superficie de la película.

*Microscopía TEM:* En la caracterización por TEM se puede notar la estructura interna de los NTCPM distribuidos en la red de manera individual e interconectados formando uniones. En la Figura VI-11, se observan nuevamente los NTCPM desorientados, así como algunos lugares donde éstos no cubrieron la superficie del cubreobjetos con la misma densidad. A mayor acercamiento (Figura VI-11b), es posible distinguir la conformación, así como las paredes internas en

cada tubo. En esta imagen se tienen NTCPM con diámetros externos de 10-40 nm aproximadamente. El nanotubo medido en la figura tiene un diámetro externo de 40 nm mientras que su diámetro interno es de 6 nm. Cabe mencionar que la muestra no presentó alteraciones debidas al haz de electrones en SEM ni en TEM.

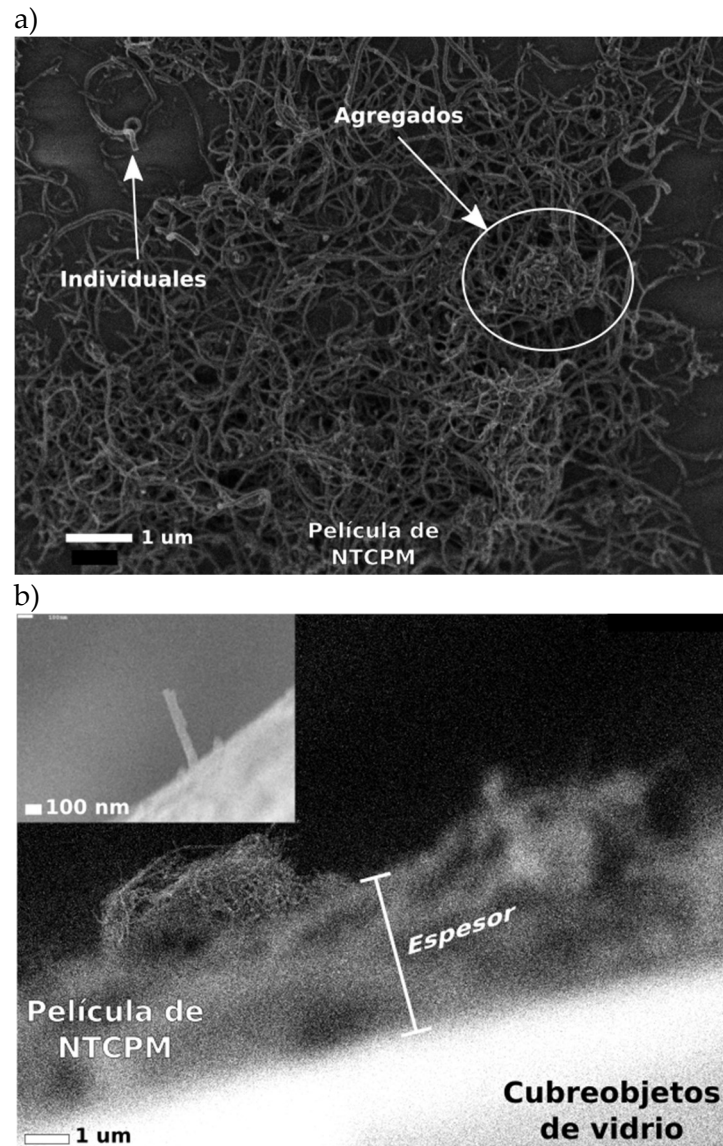


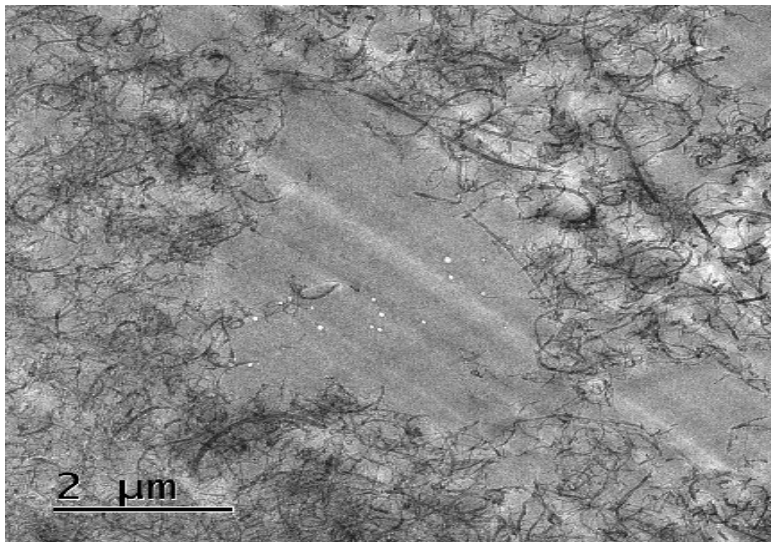
Figura VI-10. Micrografías SEM de la superficie del electrodo. a) Red compleja de NTCPM desorientados con agregados ocasionales sobre la superficie ( $X 11000$ , 1 kV). b) Espesor de la película de NTCPM (promedio calculado de  $3.362 \mu\text{m}$ ;  $X 7500$ , 15 kV). En el recuadro se observa una imagen no común de un NTCPM situado de manera vertical (60 nm de diámetro y 433 nm de altura;  $X 65000$ , 15 kV).

**Microscopía AFM:** Las imágenes AFM muestran la superficie del eNTCPM de manera tridimensional (3D). Dicha superficie se muestra completamente irregular, algo que ya se había observado en las micrografías SEM donde se trató de determinar el espesor de la película. La Figura



VI-13a, muestra una superficie 3D rugosa que, como veremos más adelante, es un parámetro físico importante para la adhesión celular (esta técnica permite cuantificar la rugosidad Rms (Rq) de la zona que se está analizando). En este caso, para un área aproximada de  $9 \mu\text{m}^2$  la Rms (Rq) fue de aproximadamente  $158.75 \pm 2.51 \text{ nm}$ .

a)



b)

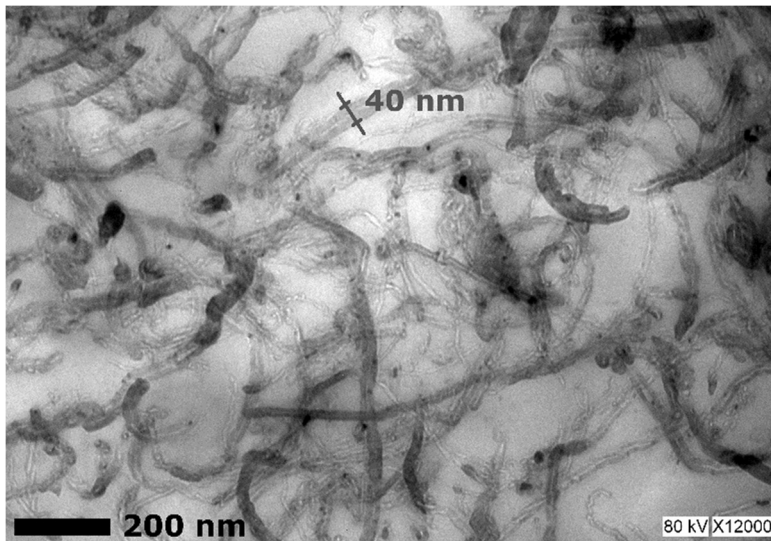


Figura VI-11. Imágenes TEM de la superficie del eNTCPM construido. a) NTCPM distribuidos en red de manera aleatoria, así como lugares donde no se distribuyen con la misma densidad. b) Acercamiento que muestra la conformación y estructura de las paredes internas de NTCPM individuales e interconectados formando uniones. El NTCPM caracterizado tiene un diámetro externo de 40 nm e interno de 6 nm.

Un acercamiento mayor (Figura VI-13b), permite apreciar con detalle la existencia regular de pequeños picos sobre la superficie. Por sus dimensiones, 200 nm de diámetro y 400 nm de altura aprox. en algunos casos, se considera que estos picos están formados por paquetes de

NTCPM que se internalizan en la película ya que, las hojas de especificaciones y las mediciones realizadas muestran que los NTCPM utilizados tienen diámetros menores a 60 nm.

Las Figura VI-13 c y d muestran el análisis de sección o perfil que pasa por algunos de los picos presentes en esta zona de la superficie. Con este análisis, se puede confirmar la irregularidad de la superficie, cuantificar las alturas (p. ej. marcadores verdes 618 nm) y los diámetros de los picos (p. ej. 116 nm marcadores rojos) situados de manera horizontal sobre la superficie.

Es importante mencionar que la adquisición de estas imágenes se hizo de manera suave; es decir, se buscó que la interacción entre la punta y la superficie del electrodo fuera la suficiente para poder adquirir imágenes de ésta sin modificarla y generar artefactos.

De los resultados anteriores se puede entonces construir un esquema general de la conformación de la película de NTCPM. Así pues, en la Figura VI-12 se esquematiza una superficie irregular (rugosa), sobre un sustrato de vidrio que presenta tubos individuales o nanopicos situados de manera regular sobre ella.

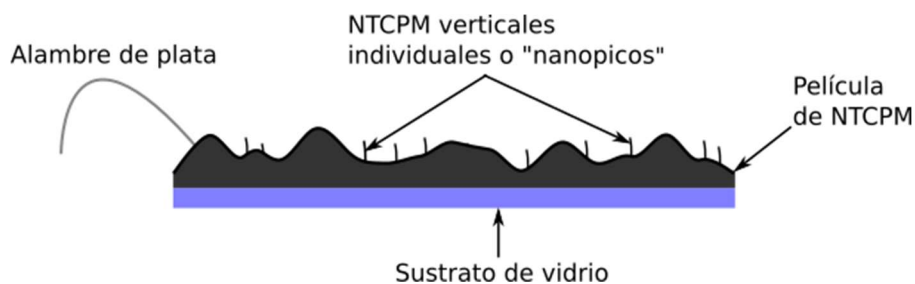


Figura VI-12. Esquema del eNTCPM caracterizado.

Haciendo un acercamiento en una zona con menor cantidad de NTCPM fue posible encontrar un par de tubos entrelazados o cruzados donde, se puede distinguir de manera clara la forma en que hacen contacto entre ellos (Figura VI-14a). Esta imagen es importante pues la transmisión eléctrica a lo largo de la compleja red de NTCPM formada sobre la superficie del electrodo se lleva a cabo principalmente en estos sitios de contacto.

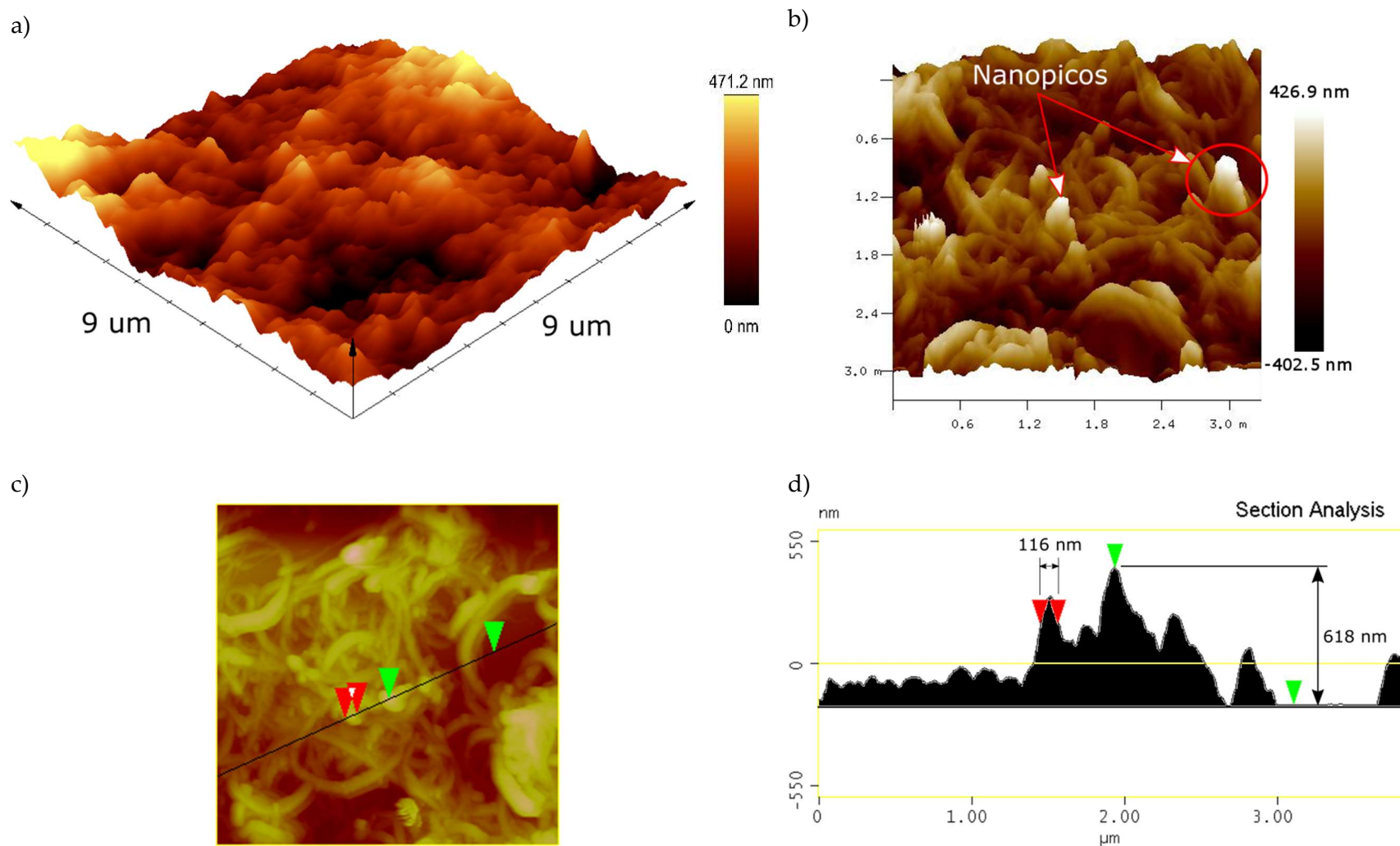


Figura VI-13. Imágenes AFM de la superficie del electrodo. a) Imagen 3D que muestra una superficie rugosa de  $9 \mu\text{m}^2$  con una  $R_{ms}$  ( $R_q$ ) de aproximadamente  $158.75 \text{ nm}$ . b) Detalles de la presencia regular de “nanopicos” sobre la superficie ( $200 \text{ nm}$  de diámetro y  $400 \text{ nm}$  de altura aprox.). c) y d) muestran una sección de la superficie donde se encuentran los nanopicos. Diámetro de un nanopico: marcadores rojos  $116 \text{ nm}$ . Altura del cubreobjetos al pico más alto en esta zona: marcadores verdes  $618 \text{ nm}$ . Diámetros de algunos nanotubos presentes en la zona  $40\text{-}60 \text{ nm}$ .

El diámetro medido de uno de los NTCPM fue de 58 nm, mientras que su altura fue de 33 nm lo que confirma las mediciones realizadas con las técnicas anteriores (Figura VI-14b). Esta imagen muestra una diferencia entre el diámetro y la altura medida lo que, al parecer, surge de un ligero aplastamiento del NTCPM. Con esto se muestra que dichos elementos no son un material completamente rígido y que pueden adaptarse mecánicamente a la zona donde se alojan.

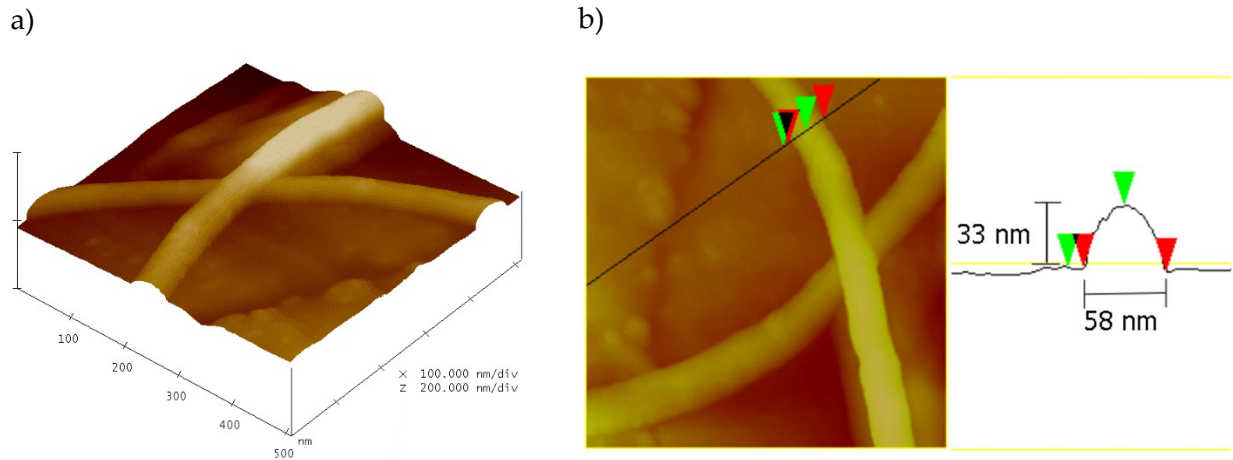


Figura VI-14. Par de NTCPM individuales entrelazados formando un sitio de contacto importante para la transmisión de señales eléctricas. a) Imagen 3D de dos NTCPM. b) Perfil topográfico de un NTCPM. Los marcadores verdes indican una altura de 33 nm mientras que los marcadores rojos indican un diámetro de 58 nm.

Como se ha podido observar morfológicamente, la existencia de NTCPM en la superficie del electrodo es clara; sin embargo, para comprobar que se tienen NTCPM sin la presencia de algún contaminante, el agente dispersante o de la membrana de celulosa utilizada para construir la película, y que su estructura no fue modificada durante este proceso, se realizó la caracterización por espectroscopia confocal Raman. Cabe mencionar que concentraciones muy pequeñas o trazas de estos no son observables mediante este procedimiento. La técnica de espectroscopia Raman se utiliza para estudiar la composición química y estructural de los materiales (Sala, 1996). El espectro obtenido muestra, la huella digital que caracteriza a determinado material.

*Espectroscopia Raman:* La Figura VI-15 muestra el espectro Raman del sustrato de vidrio sobre el cual se construyó la película de NTCPM (trazo azul). A continuación, se muestra el espectro de los NTCPM puros donde se obtienen 2 bandas principales (trazo naranja). La banda localizada por  $1360\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la banda D, que está relacionada con la presencia de defectos o desorden en el arreglo estructural de los sistemas del carbono mientras que la banda localizada por  $1590\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la banda G, la cual está asignada a la vibración del enlace C-C en el plano (vibración fundamental de primer orden) (Bokobza & Zhang, 2012), (Mariotti *et al.*, 2013); esta componente está asociada a la vibración de los átomos de carbono a lo largo del eje y su posición es sensible a fenómenos de transferencia de carga de posibles dopantes (Domingo & Santoro, 2007). La relación de las dos bandas  $I_{(G/D)}$  es utilizada para caracterizar el grado de desorden estructural de los NTCPM analizados y en este caso para ver si su superficie ha sido



modificada o no. Los siguientes espectros fueron tomados sobre la superficie del electrodo construido en dos zonas distintas: el espectro eNTCPM\_a se adquirió donde había mayor cantidad de material (trazo verde) mientras que el espectro eNTCPM\_b se obtuvo donde había una menor concentración (trazo morado); en estos lugares, se observan prácticamente las mismas bandas por  $1350\text{ cm}^{-1}$  y  $1580\text{ cm}^{-1}$ . La relación  $I_{(G/D)}$  para los NTCPM puros fue de 1.2 que aproximadamente es igual en todos los caso. Esto indica que el proceso desarrollado para construir la película no modifico la superficie de los NTCPM.

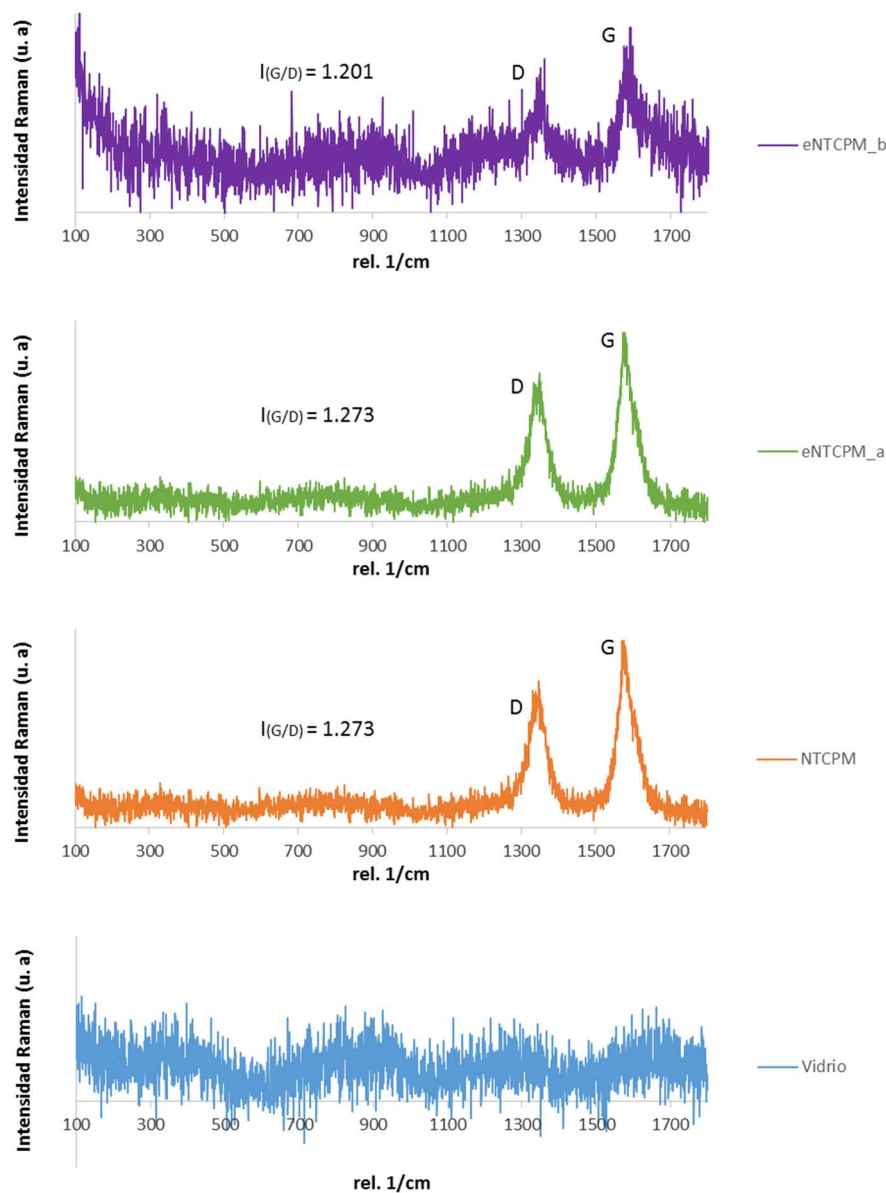


Figura VI-15. Espectros Raman del eNTCPM. Espectro del sustrato de vidrio (trazo azul), los NTCPM puros (trazo naranja), y la superficie del eNTCPM en dos zonas distintas: mayor concentración de material (trazo verde) y menor concentración (trazo morado). Las bandas G y D se encuentran aproximadamente en la misma posición en todos los espectros. Además, el valor de la relación  $I_{(G/D)}=1.2$  permanece aproximadamente igual en todos los casos, esto indica que no hubo modificaciones en su superficie.

En la imagen Figura VI-16 se muestra un barrido o mapeo realizado con el espectrómetro sobre una región de la superficie del eNTCPM. Las zonas amarillas son las partes de la película que están cercanas al plano focal y con más NTCPM mientras que las oscuras representan las más alejadas y con menos NTCPM. En este caso, las zonas amarillas presentan un espectro bien definido con las bandas principales de manera similar al obtenido anteriormente. En las zonas oscuras el espectro pierde definición y comienzan a aparecer las bandas correspondientes al sustrato de vidrio, esto indica no solo que son las zonas más alejadas del plano focal, sino que también es donde menor cantidad de NTCPM existe. En este caso se tiene una banda por  $2680\text{ cm}^{-1}$  la cual se atribuye a un armónico de la banda G. Cabe mencionar que la imagen de espectroscopia Raman confocal que se presenta, no es una imagen 3D como en AFM, sino un plano 2D. Por lo que los colores artificiales no se refieren a las alturas si no a la región donde predomina el material con el espectro Raman correspondiente.

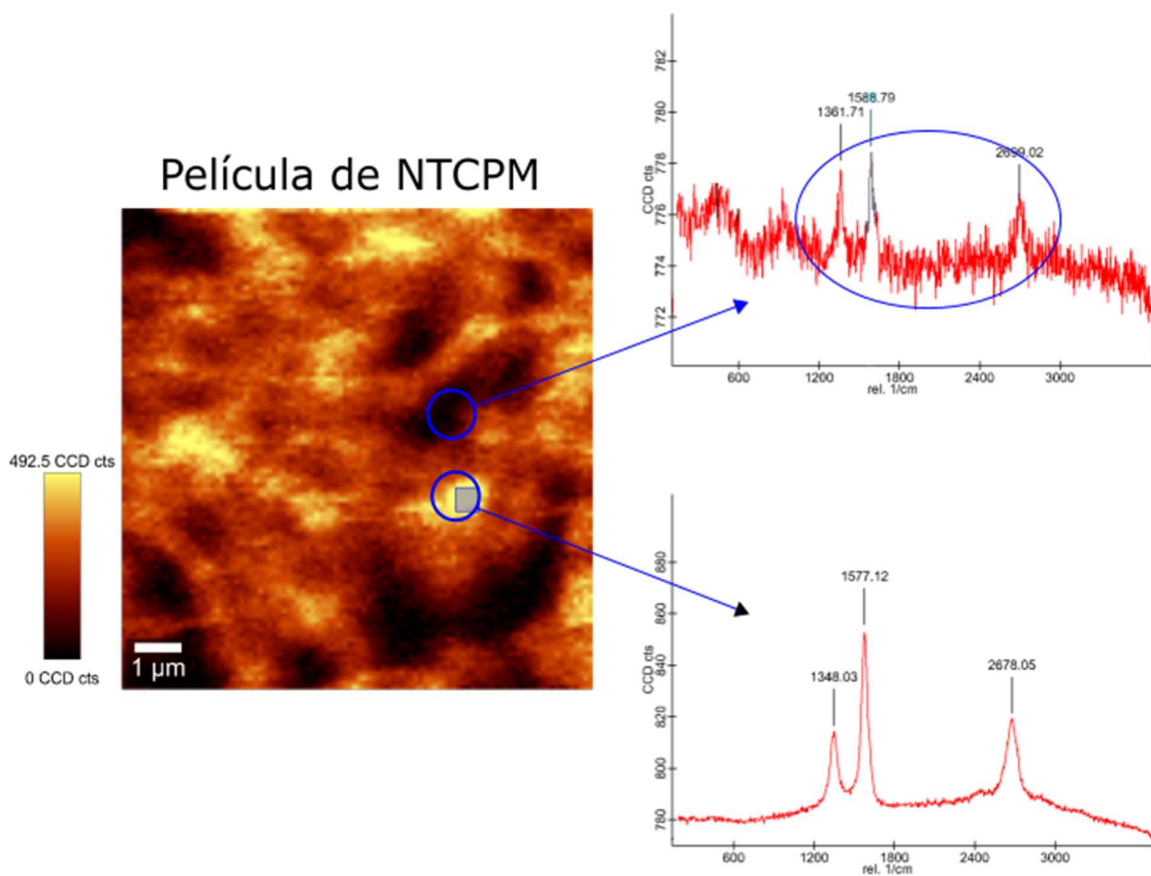


Figura VI-16. Mapeo Raman de la película de nanotubos. Las zonas amarillas representan las zonas con más NTCPM y cercanas al plano focal del espectrómetro mientras que las negras las más alejadas y con menos NTCPM. El espectro se muestra definido en las zonas amarillas con las bandas principales mostrados anteriormente. En las regiones oscuras se pierde definición y comienzan a aparecer las bandas del sustrato de vidrio. En el óvalo azul se encierran las bandas principales de los NTCPM.

Este mapeo confirma que se construyó una superficie donde la densidad de NTCPM sobre ésta varía, sin dejar de estar presentes, tal y como ya se había observado con SEM y AFM. En esta caracterización se obtuvieron espectros con las bandas característicos de los materiales utilizados

similares a los encontrados en la literatura (Bokobza & Zhang, 2012; Dresselhaus, Dresselhaus, Saito, & Jorio, 2008; Ngo *et al.*, 2013). Al no encontrar bandas nuevas o desconocidas, se pudo comprobar que se obtuvo una superficie de NTCPM sin la presencia de algún contaminante y que su estructura no fue modificada durante el proceso de construcción.

#### Caracterización eléctrica y electroquímica del eNTCPM

La caracterización eléctrica del eNTCPM se realizó con el fin de comprobar que era capaz de transmitir señales eléctricas a través de él, así como el de medir su resistividad superficial. Para comparar las propiedades eléctricas de la película de NTCPM construida, el mismo procedimiento de caracterización también se llevó a cabo para un material comúnmente utilizado en la construcción de EN como lo es el Au(111) y, para NFC, otro nanomaterial de distintas características que pudiera también ser utilizado para este fin; ambos en películas de espesor delgado.

*Medición de resistividad superficial (4 puntos):* El método de los cuatro puntos reveló que la película de NTCPM tiene una resistividad relativamente alta de aproximadamente 9 kΩ/sq. Para obtener la resistividad volumétrica, esta última medición se multiplicó por el espesor promedio calculado de las imágenes SEM. Un resumen de las mediciones realizadas para éste y los demás materiales es presentado en la Tabla VI-2. Por otro lado, la continuidad eléctrica entre el alambre de plata y la película de NTCPM fue exitosamente verificada mediante pruebas de conductividad.

Tabla VI-2. Promedio de las mediciones de resistividad superficial y volumétrica de la película de NTCPM, el Au(111) y las NFC.

Material	Resistividad superficial (Ω/sq)	Resistividad volumétrica $\rho$ (Ωm)
Placa de Au(111)	0.076	$19 \times 10^{-9}$ *
Película de NTCPM	8728.246	0.029**
Película de NFC	4364.161	0.102***

\*Espesor promedio de 250 nm, n=9  
 \*\*Espesor promedio de 3.362 nm, n = 3  
 \*\*\*Espesor promedio de 10.514 μm, n = 3b

El parámetro que se utiliza en la simulación es la conductividad, por lo tanto, recordando que:

$$\sigma = \frac{1}{\rho}$$

Ecuación VI-3. Conductividad. Donde  $\sigma$  es la conductividad eléctrica y  $\rho$  es la resistividad volumétrica.

Por lo tanto, se tiene que:

$$\sigma = \frac{1}{0.029 \Omega \cdot m} = 34.482 \frac{S}{m}$$


En ocasiones, los materiales presentan comportamientos no lineales dependiendo de la magnitud de las señales eléctrica aplicadas. Para corroborar o no dicho comportamiento en la





<b>Resistividad</b>	$< 1 \times 10^2 \Omega\text{m}$	$19 \times 10^{-9} \Omega\text{m}$	$0.029 \Omega\text{m}$	$0.102 \Omega\text{m}$	$1 \times 10^{12} \Omega\text{m}$
<b>Conductividad</b>	$> 1 \times 10^{-2} \text{S/m}$	$52.631 \times 10^6 \text{S/m}$	$34.482 \text{S/m}$	$9.803 \text{S/m}$	$1 \times 10^{-12} \text{S/m}$

\*(Semiconductor, 2002)


  
 +                      Conductividad                      -

*Electroquímica.* La caracterización electroquímica tiene la finalidad de estudiar cómo se comporta el electrodo al introducirlo en un medio acuoso (electrolito). En este caso, el electrodo fue sumergido en la solución extracelular preparada para los registros electrofisiológicos; en la Tabla VI-4, se muestra su conductividad medida experimentalmente a temperatura ambiente. Es importante mencionar que la conductividad de las soluciones es menor que la de la película de NTCPM; que fue de 34.482 S/m.

Tabla VI-4. Conductividad de soluciones extracelulares utilizadas.

Solución extracelular	Conductividad (S/m)
Sin glucosa	1.545
Con glucosa	1.193

Nuevamente, para comparar las propiedades, ahora electroquímicas del eNTCPM, la caracterización se llevó a cabo también para electrodos de Au(111) y de nanofibras de carbono (NFC).

Al entrar en contacto el electrodo con la solución extracelular, se desarrolla una diferencia de potencial que va cambiando con el tiempo debido al reacomodo de iones o partículas cargadas en la interfase. Para conocer cómo se llevó a cabo este proceso en los electrodos, se registró la diferencia de potencial desde que se sumergieron hasta que se alcanzó el potencial en estado estable.

En la Figura VI-18a se muestra este proceso para un electrodo de oro (área  $0.361 \text{cm}^2$ ); al inicio, se desarrolla un potencial negativo que va evolucionando hasta alcanzar el potencial de equilibrio o estado estable en aproximadamente 85 mV. Para el caso del eNTCPM (área  $0.329 \text{cm}^2$ ), el potencial desarrolla su máxima amplitud al inicio (siendo está positiva), para posteriormente, alcanzar el potencial de equilibrio en 2.5 mV después de 2 hr aproximadamente. En ambos casos, parece que este proceso sigue un comportamiento exponencial. En la Tabla VI-5 se muestra el valor máximo, mínimo y el promedio del potencial desarrollado en un periodo de tiempo.

Tabla VI-5. Potencial de interfase desarrollado.

Electrodo	Tiempo transcurrido (s)	Potencial máximo (mV)	Potencial mínimo (mV)	Potencial promedio (mV)
Au(111)	7500	86.421	-320.000	48.040
eNTCPM	7500	23.836	1.934	2.204

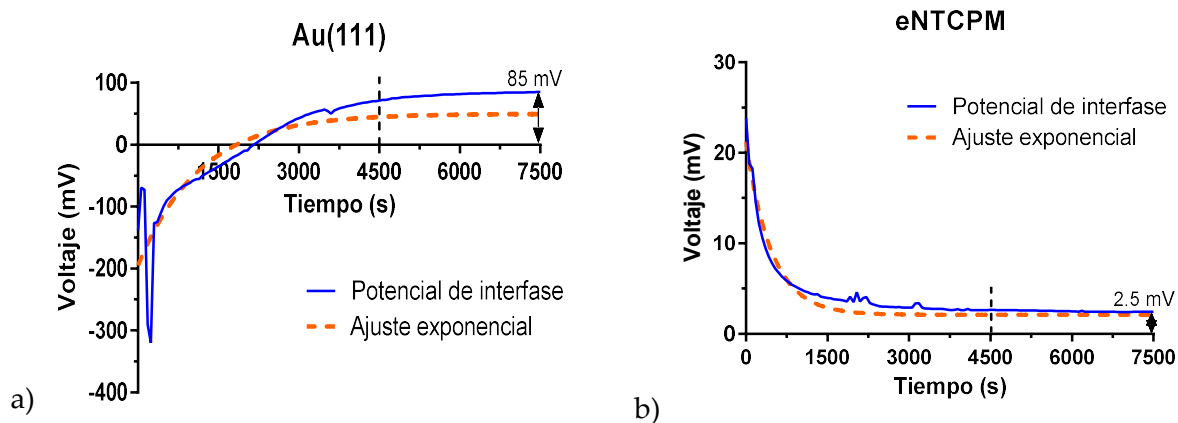


Figura VI-18. Potencial de interfase desarrollado en un periodo de tiempo. a) electrodo de Au(111) (área  $0.361 \text{ cm}^2$ ) y para b) eNTCPM (área  $0.329 \text{ cm}^2$ ) inmersos en solución extracelular hasta alcanzar el potencial de equilibrio en aproximadamente 4500 s. En ambos casos parece seguir un comportamiento exponencial.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los experimentos de voltametría cíclica para el electrodo de estudio y los construidos con otros materiales. Este experimento permitió observar cómo se comporta el electrodo inmerso en la solución extracelular cuando se aplica una diferencia de potencial al sistema.

En la Figura VI-19 se muestra el voltamograma para los electrodos estudiados en un intervalo de voltaje de -1500 a 1000 mV. Al inicio del voltamograma se encuentra la zona de evolución de hidrógeno, que es donde todos los trazos tienden hacia valores negativos de corriente, mientras que en el extremo opuesto se encuentra la zona de evolución de oxígeno que es donde los trazos tienden hacia valores positivos de corriente. La zona que se encuentra en medio de estas dos es conocida como la ventana de agua. Estas zonas cambian dependiendo del electrodo en cuestión. En la gráfica se marcan estas zonas para el electrodo de Au(111); sin embargo, para los otros electrodos estas zonas se pueden modificar.

En el trazo del electrodo de Au(111), aparecen distintos picos que indican reacciones de óxido/reducción farádicas o de transferencia de carga entre el electrodo y el electrolito. Esto significa que el electrodo transfiere electrones al electrolito y viceversa; lo cual, puede generar o no especies tóxicas para las células en la interfase. Tanto en el trazo del eNTCPM como en el del eNFC (electrodo de nanofibras de carbono) no se presentan picos, lo que indica que predomina el proceso no farádico o de reacondicionamiento de cargas en la interfase; las reacciones de óxido/reducción farádicas o de transferencia de carga existen pero son menores. El trazo del eNFC es mucho más estrecho que el del eNTCPM lo que indica que el proceso de reacondicionamiento de cargas en la interfase es menor porque la región polarizable es más estrecha, el reacondicionamiento de cargas es mucho más sencillo y rápido. No hay corriente de transferencia, no hay picos redox.

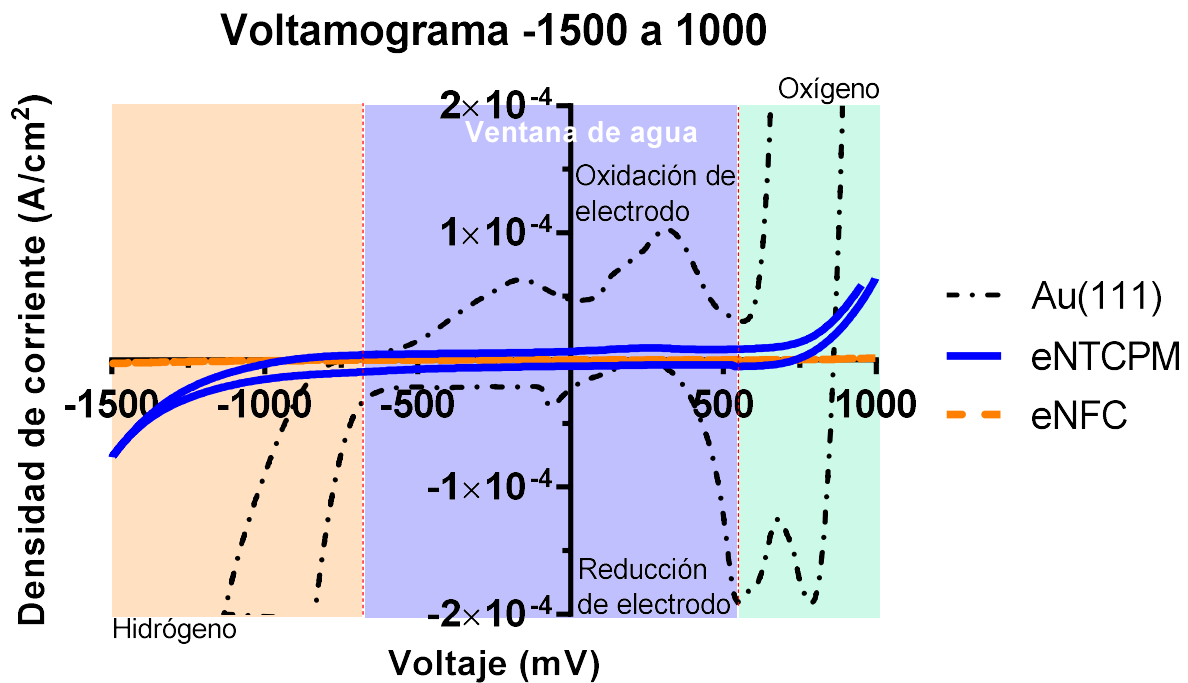


Figura VI-19. Voltamograma de -1500 a 1000 mV de electrodos construidos con diferentes materiales. En esta figura se observa que el electrodo de Au(111) presenta reacciones farádicas o de transferencia de carga con el electrolito (picos de óxido/reducción) mientras que en el eNTCPM y el eNFC solo presenta el reacomodo de carga (no farádica); siendo este trazo de menor amplitud para este último. Esta es la zona de la doble capa o estabilidad donde no existe interacción con el electrodo. La zona inicial representa la evolución de hidrógeno mientras que el otro extremo presenta la evolución de oxígeno. La zona intermedia es la ventana de agua.

A continuación, se seleccionó una zona dentro de la ventana de agua para hacer voltametría cíclica en el eNTCPM únicamente (Figura VI-20). En un intervalo de menor voltaje (-600 a 600 mV) se observan pequeños picos que indican una pequeña reacción farádica por lo que se redujo nuevamente el intervalo de voltaje para evitar estos picos. En este nuevo intervalo (-400 a 50 mV), se tiene solo una reacción no farádica o de reacomodo de cargas en la interfase. Este comportamiento es similar a lo que sucede en un capacitor electrolítico por lo que la magnitud de corriente que se obtiene en el estado estable se le conoce como corriente capacitiva ( $i_c$ ).

Una vez que se obtuvo la magnitud de  $i_c$ , se utilizó la fórmula para calcular esta corriente en un capacitor y, de ella, despejar la capacitancia.

$$i_c = C \cdot \frac{dV}{dt}$$

$$C = i_c / \frac{dV}{dt}$$

Ecuación VI-4. Corriente capacitiva. Donde  $i_c$  es la corriente capacitiva,  $C$  la capacitancia y  $dv/dt$  es la tasa o velocidad de barrido.

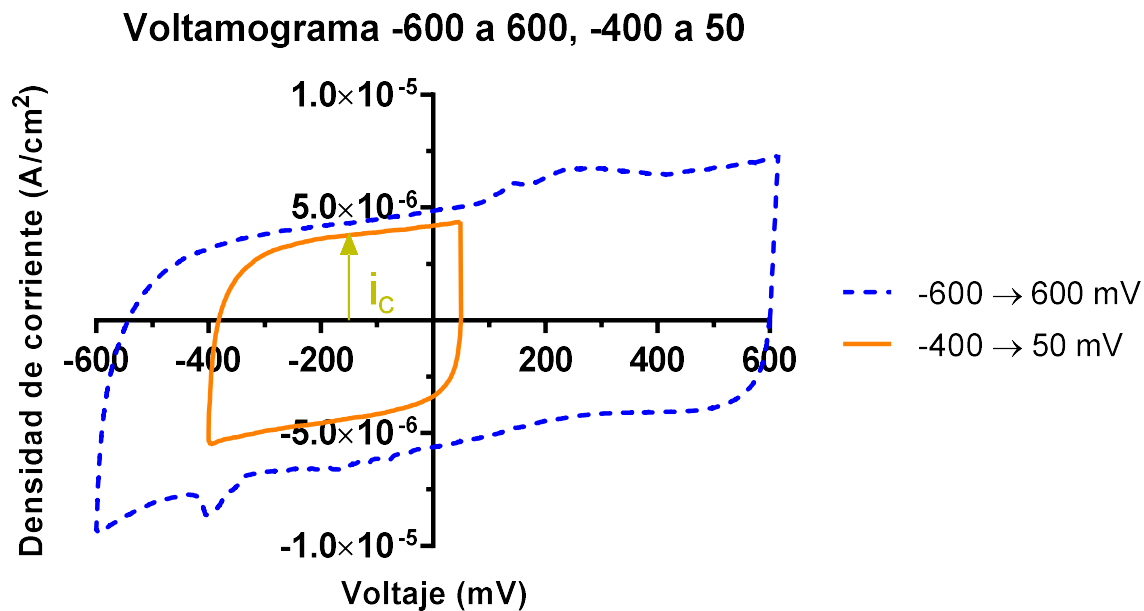


Figura VI-20. Voltamograma -600 a 600 mV y de -400 a 50 mV. El primer trazo muestra picos que indican una reacción farádica. El segundo trazo presenta solamente reacomodo de cargas en la interfase. La magnitud de corriente que se obtiene en el estado estable se le conoce como  $i_c$ .

Recordando que en el experimento de voltametría cíclica se aplica un voltaje en el tiempo de acuerdo con:

$$\frac{dV}{dt} = \text{Scan Rate}$$

Ecuación VI-5. Tasa o velocidad de barrido.

de los parámetros que se ajustan en el experimento de voltametría cíclica se tiene que:

$$\text{Scan Rate} = 100 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$$

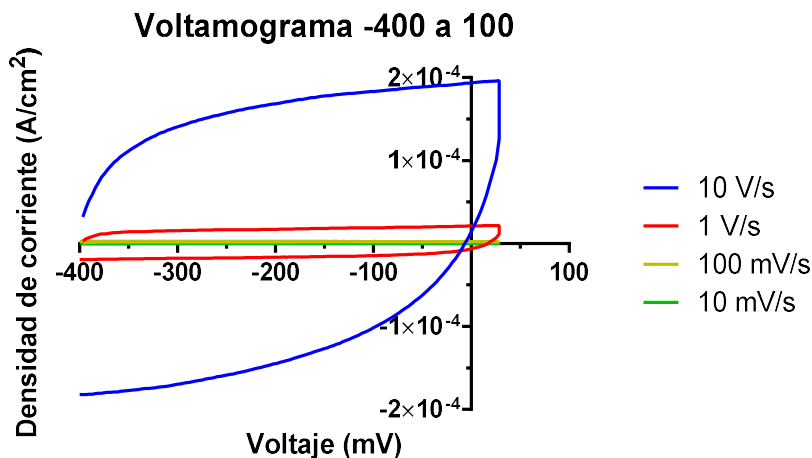
Por lo que sustituyendo los valores experimentales en la fórmula se obtiene directamente el valor de la capacitancia:

$$i_c = 4.93 \times 10^{-6} \frac{\text{A}}{\text{cm}^2}$$

$$C = 49.3 \times 10^{-6} \frac{\text{f}}{\text{cm}^2}$$

Del anterior procedimiento se observa que la tasa o velocidad de barrido tiene un efecto importante sobre la capacitancia de la interfase; por lo que, para evaluar tal efecto, éste se fue cambiando en el experimento de voltametría cíclica para ese último intervalo de voltaje. Lo que sucedió fue que conforme se aumentó la velocidad de barrido, la corriente capacitiva también se incrementó (Figura VI-21).

a)



b)

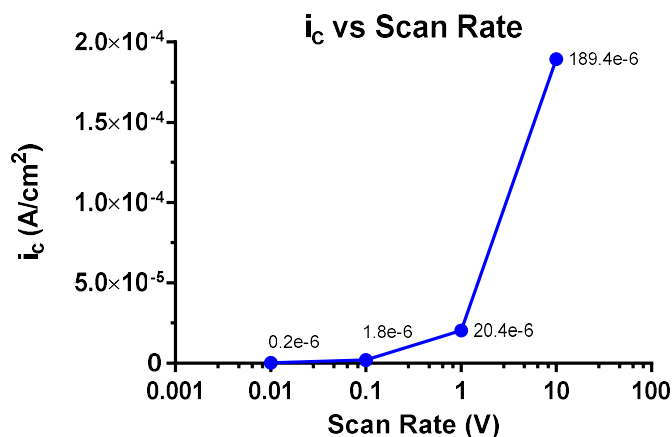


Figura VI-21. Efecto del incremento de la velocidad de barrido en el experimento de voltametría cíclica. a) Voltamograma a diferentes velocidades de barrido. b) Gráfica del incremento de  $i_c$  respecto de la velocidad de barrido.

Haciendo de nuevo el cálculo de la capacitancia para una velocidad de barrido mayor, se puede observar que la capacitancia disminuye; de manera que ésta es inversamente proporcional a la  $i_c$ .

$$SR = 10 \frac{V}{s}$$

$$i_c = 189.4 \times 10^{-6} \frac{A}{cm^2}$$

$$C = 18.94 \times 10^{-6} \frac{f}{cm^2}$$

En el experimento de cronocoulombimetría se aplicó un pulso de voltaje de 450 mV por 1 s al sistema y se registró la cantidad de carga en la interfase. La Figura VI-22a muestra que el comportamiento de la interfase es similar al de un capacitor; mientras el pulso se mantiene, la

interfase se carga hasta alcanzar el estado estable o de carga máxima y una vez que este termina, el capacitor comienza a descargarse. Si el pulso de voltaje es corto, la interfase no se cargará en su totalidad.

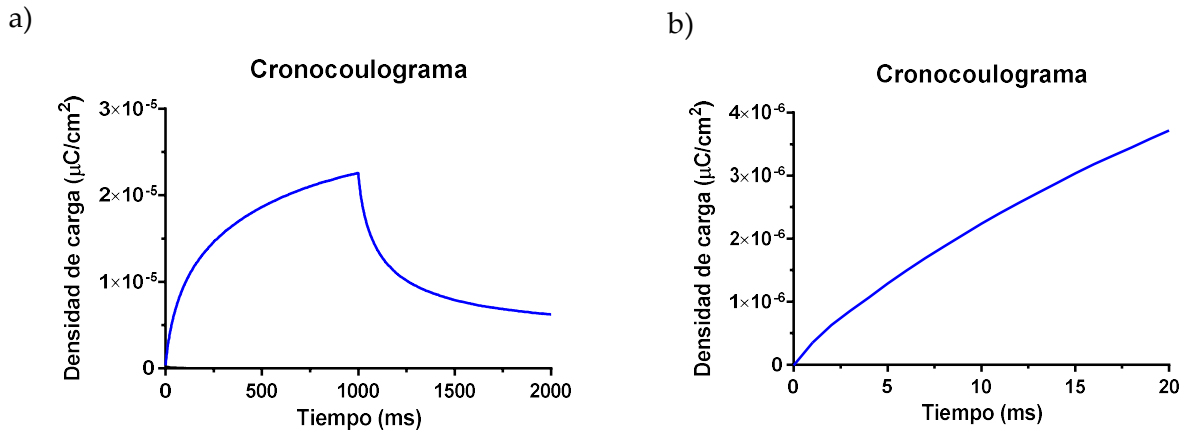


Figura VI-22. Cronocoulograma del eNTCPM con un pulso de duración de a) 1000ms y de b) 20 ms. Amplitud del pulso 450 mV (de -400 a 50 mV).

Para conocer la corriente en la interfase a partir de la carga, ésta última únicamente se debe derivar. De igual manera, se tiene que el comportamiento es similar al de un capacitor donde se observan los transitorios de corriente al inicio y final del pulso de estimulación (Figura VI-23).

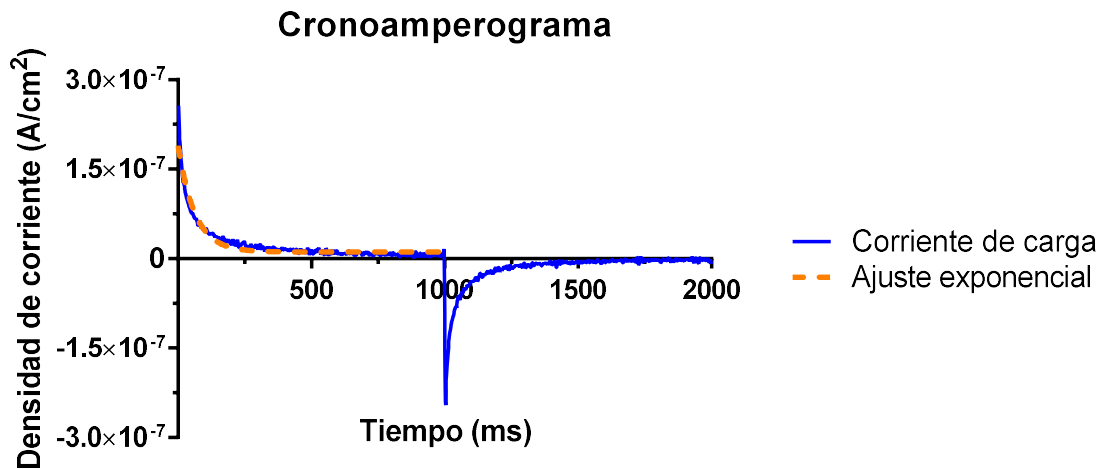


Figura VI-23. Cronoamperograma (derivada de la Cronocoulombimetría) para obtener de la corriente en la interfase.

De la gráfica anterior, se puede observar que la corriente sigue un comportamiento exponencial en el tiempo; recordando que:

$$\tau = R \cdot C$$

Ecuación VI-6. Constante de tiempo. Donde  $\tau$  es la constante temporal,  $R$  es la resistencia y  $C$  es la capacitancia.



Despejando y utilizando la capacitancia de la interfase calculada anteriormente se puede obtener la resistencia en la interfase:

$$R = \frac{\tau}{C}$$

del ajuste de una exponencial al Cronoamperograma (Figura VI-23) se tiene:

$$\tau = 62.46 \times 10^{-3} \text{ s}$$

Finalmente, se obtiene la resistencia en la interfase para el pulso de voltaje aplicado utilizando la capacitancia adquirida para un "Scan Rate" de 10 mV/s.

$$R = \frac{62.46 \times 10^{-3} \text{ s}}{49.3 \times 10^{-6} \frac{f}{\text{cm}^2}} = 1266 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$$

con la capacitancia para un "Scan Rate" de 10 V/s.

$$R = \frac{62.46 \times 10^{-3} \text{ s}}{18.94 \times 10^{-6} \frac{f}{\text{cm}^2}} = 3297 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$$

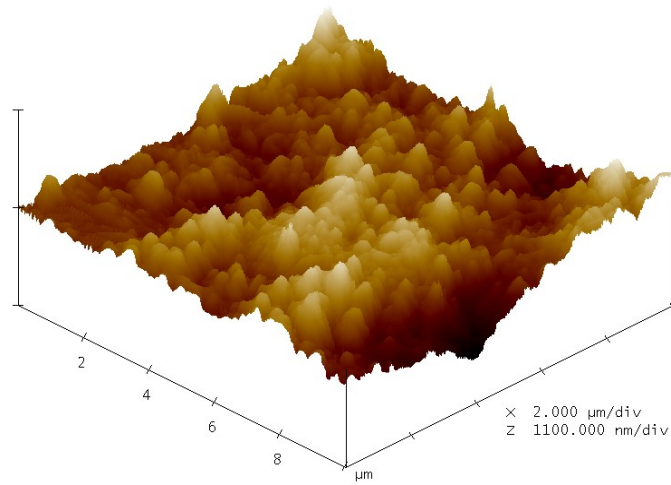
Como se observa en los experimentos anteriores, el valor la capacitancia disminuye mientras que el de la resistencia aumenta conforme se incrementa también la magnitud del potencial ("Scan Rate") aplicado; esto indica que los procesos farádicos o de transferencia de carga predominan conforme éste último se aumenta.

Modelado y simulación por el método de los elementos finitos del eNTCPM (I)

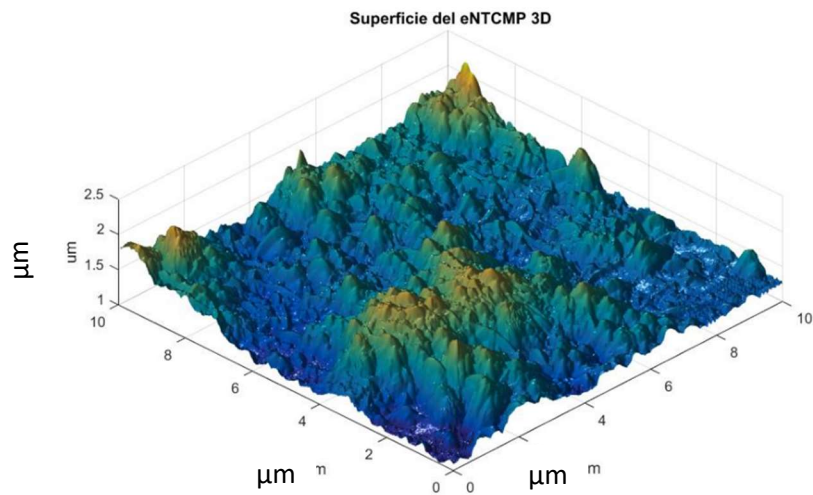
#### *Construcción geométrica del eNTCPM*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la construcción de la geometría del eNTCPM. En la Figura VI-24a y b, se muestran diferentes perspectivas de la imagen AFM extraída y procesada con Matlab. En la Figura VI-24c se muestra la geometría construida del electrodo en Comsol. En esta imagen se observa que la superficie es embebida en un bloque sólido con el que se recrea el espesor de la película de NTCPM. Con esto, se obtiene la geometría que representa una parte del electrodo con sus características físicas reales para posteriormente utilizarla en la simulación por el MEF. Cabe mencionar que la superficie puede ser tratada tanto en Matlab como en Comsol para adecuarla a las condiciones de estudio que se requieran.

a)



b)



c)

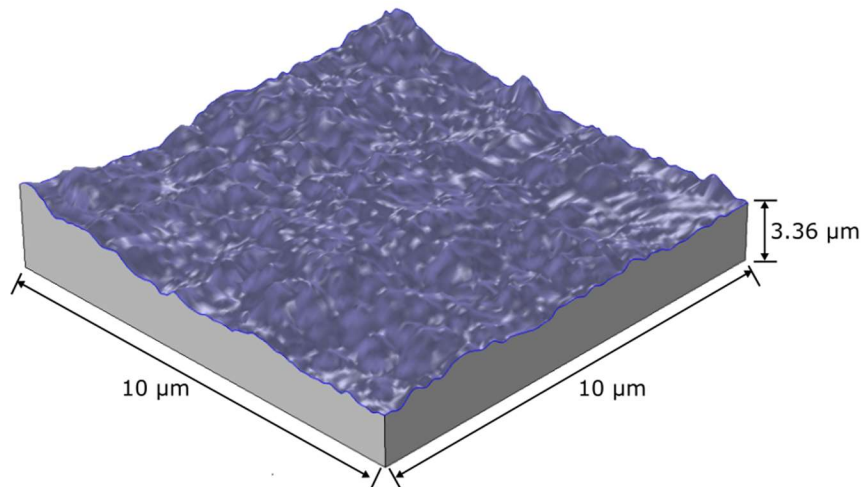


Figura VI-24. Construcción de la geometría del eNTCPM. a) Imagen experimental de AFM de la superficie del eNTCPM. b) Imagen extraída y procesada con Matlab a partir de a). c) Construcción 3D del eNTCPM en Comsol.

### Simulación del comportamiento eléctrico del eNTCPM

*Medición de resistividad superficial:* La simulación del método de los cuatro puntos se realizó para corroborar que el comportamiento eléctrico del eNTCPM modelado, era capaz de reproducir correctamente los resultados experimentales de resistividad superficial/volumétrica. Cabe mencionar que el espesor fue obtenido de la caracterización por SEM de perfil a 90° (Figura VII3), mientras que la conductividad eléctrica fue obtenida de la misma caracterización eléctrica experimental (Tabla VI-2).

En la Figura VI-25 se muestra el resultado de la aplicación de una corriente de estimulación de 0.16 mA entre las terminales 2 y 7 de la geometría 2D modelada del electrodo con los cuatro puntos. En la Figura VI-25a, es posible observar que la distribución del potencial eléctrico sobre la superficie del electrodo tiene mayor magnitud alrededor del punto de aplicación de la corriente mientras que su menor intensidad se encuentra cercana al punto de salida. La distribución de la magnitud del potencial en cada zona esta representada por un color asociado a la barra a la izquierda del mismo. La Figura VI-25b muestra la distribución de la densidad de corriente sobre el electrodo; en este caso, las flechas rojas indican que la corriente se distribuye sobre todo el electrodo partiendo del punto de aplicación hasta el punto de salida, donde la magnitud de corriente presente en cada zona es proporcional al tamaño de la flecha. Es claro que la mayor parte de la corriente fluye sobre el camino más corto entre los puntos de aplicación, pero también que una fracción de esta se distribuye sobre el resto del electrodo.

La diferencia de potencial simulada entre los puntos 3 y 6 fue de 0.327 V. Esta diferencia, se divide entre la corriente aplicada para obtener la resistencia R que se sustituirá en la Ecuación VI-1 junto con el resto de los parámetros experimentales y teóricos. Para la resistividad superficial se tiene que:

$$R_{sup} = \frac{\pi \cdot \left( \frac{0.327 \text{ V}}{0.00016 \text{ A}} \right) \cdot (0.942)}{\ln(2)}$$

$$R_{sup} = 8742.834 \frac{\Omega}{sq}$$

Donde sq es cuadrado; por lo que la resistividad volumétrica es:

$$R_{vol} = (8742.834 \Omega) \cdot (3.362 \times 10^{-6} \text{ m})$$

$$R_{vol} = 0.029 \Omega \cdot m$$

Como se muestra en la Tabla VI-6, estos valores son similares o los obtenidos de manera experimental.

Tabla VI-6. Comparación entre valores de resistividad experimentales y simulados.

Resistividad	Experimental	Simulada
Superficial $\left( \frac{\Omega}{sq} \right)$	8720.000	8742.834
Volumétrica $(\Omega \cdot m)$	0.029	0.029

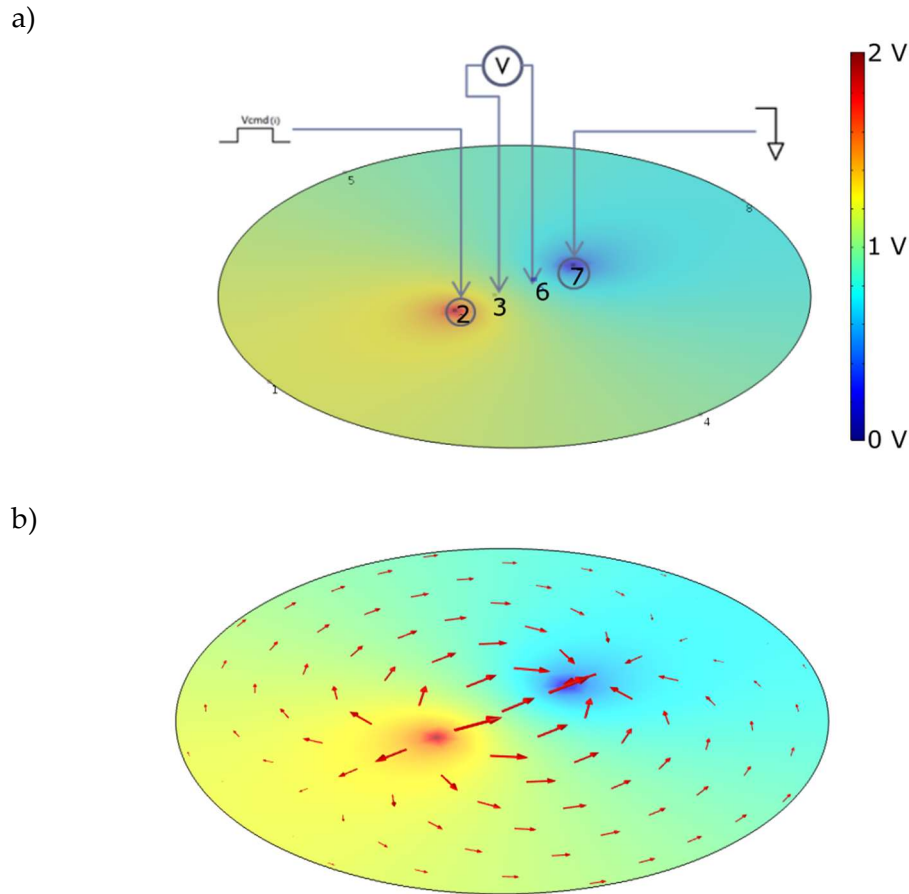


Figura VI-25. Resultados de la simulación del experimento de los cuatro puntos. a) Distribución del potencial eléctrico sobre el eNTCPM donde se indican los puntos de aplicación de corriente y registro de voltaje. Cada color sobre el electrodo está asociado a la barra de magnitud de potencial eléctrico a la izquierda del mismo. b) Líneas de flujo de la densidad de corriente sobre el electrodo. Las flechas más grandes indican una mayor magnitud de corriente presente en la zona.

Finalmente, es importante mencionar que debido a la diferencia entre las dimensiones físicas diámetro/espesor (mm/ $\mu\text{m}$ ) del electrodo, se hace uso de la física o módulo “Electric Current, Shell”. Dicho módulo permite modelar y simular geometrías como películas delgadas sin la necesidad de representar físicamente el espesor, el cual, en este caso es tres órdenes de magnitud menor. Para lograr esto, la dimensión con menor orden de magnitud se introduce directamente en las ecuaciones del sistema.

*eNTCPM en el medio extracelular.* En esta simulación, se aplicó un potencial negativo en la base del eNTCPM 3D, mientras que una región del medio extracelular fue aterrizada para observar cómo se comporta el sistema para estimular sin la presencia de la neurona (Figura VI-26a). Los colores muestran la distribución que tiene el potencial en el medio extracelular y sobre el eNTCPM, el valor correspondiente a cada tonalidad está asociado a un valor numérico en la barra de colores. Además, se grafican las líneas de sentido y distribución de corriente (Figura VI-26b).

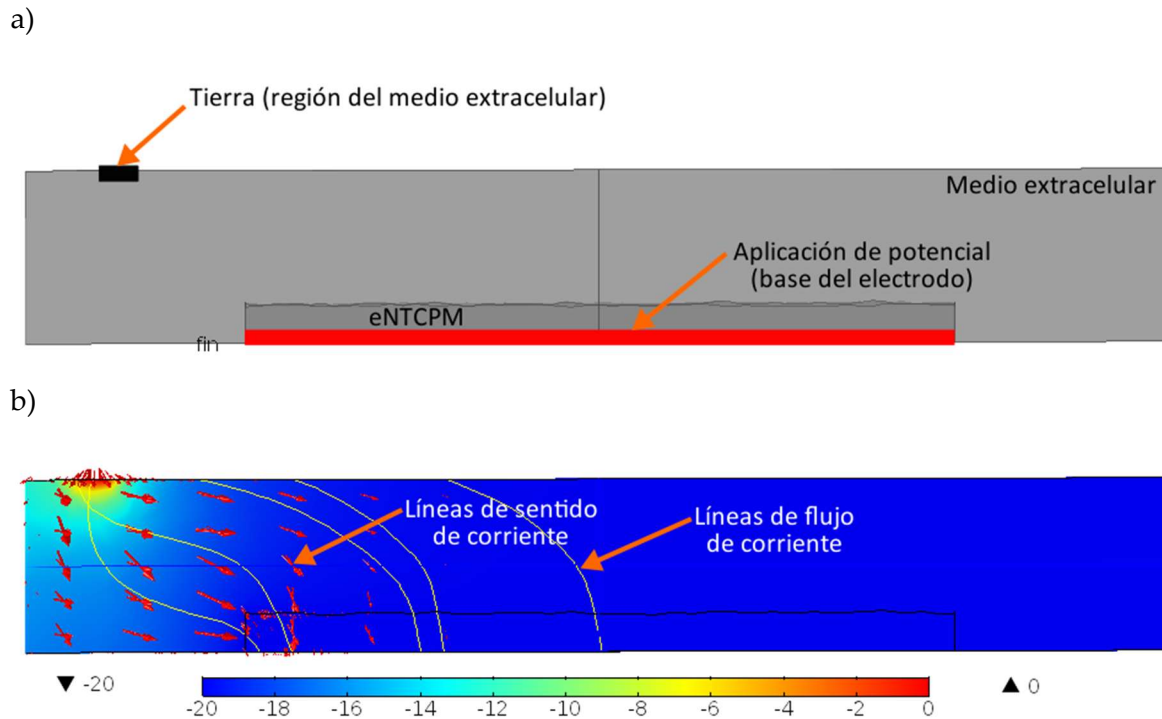


Figura VI-26. Comportamiento eléctrico del electrodo en el medio extracelular. a) Esquema de protocolo de simulación. b) Resultados de la simulación por el MEF.

Esta simulación mostró que hay un flujo de corriente del punto aterrizado hacia la región más cercana del eNTCPM debido a que la corriente circula principalmente por donde hay menor resistencia; además, es importante contemplar que el medio extracelular tiene menor resistividad que el eNTCPM en este trabajo y que las dimensiones del sistema simulado solo presentan una pequeña fracción del sistema total.

## Discusión

### *Diseño y construcción del eNTCPM*

Inicialmente se presentan los resultados alcanzados en el diseño y la construcción del eNTCPM exclusivo para esta investigación (Figura VI-8) donde el método por filtración de vacío utilizado para construir su superficie (película de NTCPM), hace que los NTCPM se distribuyan de manera irregular y desorientada formando una red compleja sobre el cubreobjetos de vidrio. También, es posible notar que algunas zonas de éste parecen no tenerlos; sin embargo, mediante las técnicas de caracterización empleadas (Figura VI-9), se observa que aun cuando la película construida no tiene la misma densidad de NTCPM en toda su extensión, en realidad solo hay pequeñas fracciones del cubreobjetos que no los contienen.

### Caracterización del eNTCPM

Durante la caracterización morfológica de la superficie del eNTCPM se encontraron algunas características las cuales se piensa facilitan la adhesión así como la obtención de los registros electrofisiológicos de las células cultivadas sobre él. Dichas características son pequeños picos o mejor dicho nanopicos (por sus dimensiones) que se encuentran presentes de manera regular sobre la toda superficie y que son originados por NTCPM individuales, o aglomerados de éstos, orientados de manera vertical. Es importante mencionar que estos nanopicos incrementan la rugosidad de la película y que ésta es un parámetro superficial que como se ha reportado (Blau, 2013), (Sorkin *et al.*, 2009), (Price *et al.*, 2004) influye de manera directa en la adhesión celular.

Otro detalle importante observado es que los NTCPM en la red tienen numerosos sitios de contacto entre ellos. Esto es importante ya que tanto las fracciones de NTCPM como estos sitios son las principales vías en la circulación de corriente eléctrica a través de la película y, por lo tanto, la resistencia que presenten ambos elementos es determinante en el comportamiento eléctrico total del electrodo. A falta de caracterizar la resistencia eléctrica en los sitios de contacto y las fracciones de los NTCPM, se especula que estos sitios de contacto se comportan como una serie de resistencias en paralelo que tienen el efecto de disminuir la resistencia total del sistema; lo cual, puede relacionarse directamente con los resultados reportados sobre la disminución de la resistividad en las películas de NTC conforme el incremento de su espesor (Park *et al.*, 2008).

Gracias a la caracterización realizada mediante AFM y SEM, fue posible hacer la construcción de la geometría del electrodo que se utiliza en el modelado y la simulación por el MEF; es importante resaltar que no se trata simplemente de una geometría más sino que incluye detalles reales de la morfología y el espesor del sustrato construido específicamente para esta investigación. Esta representación geométrica sin embargo, está limitada en dimensiones por la misma técnica de caracterización debido a que el microscopio AFM tiene limitaciones mecánicas que permiten adquirir imágenes de hasta 100  $\mu\text{m}$  en la dirección X, Y y de 3.543  $\mu\text{m}$  en Z, y en detalles morfológicos por el método utilizado para modelar y simular su comportamiento ya que la complejidad de la geometría y el exceso de detalles incrementa considerablemente el coste computacional. Para contrarrestar esta última limitación, es posible manipular la superficie original mediante métodos de interpolación o algún otro tipo de procedimiento que permita adecuarla y obtener finalmente una geometría que pueda ser utilizada por el software de simulación.

Al realizar el mapeo de la superficie del electrodo, la caracterización química y estructural por espectroscopia Raman indicó claramente la diferencia entre la superficie de vidrio y la de la película de NTCPM. Con esta técnica fue posible observar el espectro Raman característico de los NTCPM sobre la mayor parte de la superficie del electrodo, pero también es notorio que existen zonas donde la intensidad del espectro disminuye y se observa con mayor intensidad el espectro del vidrio. Este resultado es acorde con la caracterización morfológica donde se observó que hay lugares con menor densidad de NTCPM pero no están desprovistas de ellos. Por otra parte y quizá más importante aún, fue que el espectro Raman de los NTCPM puros fue igual al espectro de los que conformaron la película. Este resultado es importante porque indica que ni el proceso



de dispersión ni el de la construcción de la película modificaron su estructura ni su superficie; se concluye esto gracias a la relación  $I_{(G/D)}$  que como ya se expuso anteriormente, es un indicador del grado de desorden y de modificación de la superficie. No obstante, este resultado se debe manejar con cautela y probablemente es necesario realizar otro tipo de estudios complementarios a la espectroscopia Raman.

Por otra parte, en la caracterización eléctrica se mostró que el electrodo tiene conductividad eléctrica y que es capaz de transmitir señales eléctricas de manera satisfactoria; sin embargo, debido al método de fabricación de la película y a las características eléctricas de los NTCPM, la resistividad es relativamente alta en comparación con otro material comúnmente utilizado para la construcción de EN como lo es el oro. Como se puede ver en la Tabla VI-3, la conductividad eléctrica de la película de NTCPM se encuentra aún dentro de los valores en los que se considera a un material como conductor y por otro lado, su conductividad es mayor que la película construida con NFC y que la del  $\text{SiO}_2$  el cual es otro material también empleado en los EN. Finalmente este parámetro eléctrico de conductividad de la película de NTCPM fue asociado a la geometría del electrodo construida anteriormente. Cabe mencionar que se puede tener un mejor control en la resistividad superficial del electrodo, en este caso para disminuirla, mediante el incremento en la uniformidad superficial, agregando una mayor cantidad de NTCPM a ésta o aplicando algún tipo de tratamiento superficial como recubrimientos con polímeros conductivos, solventes entre otros (Marinho *et al.*, 2012), (Jack *et al.*, 2010), (Park *et al.*, 2008), (Zhang *et al.*, 2006), (Lu *et al.*, 2010), (Ludwig, Uram, Yang, Martin, & Kipke, 2006).

A continuación, se reprodujo el experimento de medición de resistividad superficial por el método de los 4 puntos de la película de NTCPM. En este experimento, es importante resaltar que la propiedad del software para simular películas delgadas fue de gran utilidad ya que el MEF requiere la construcción de una malla para poder obtener la solución de las ecuaciones de interés sobre la geometría en cuestión y, si la diferencia en los órdenes de magnitud dimensionales es muy alta, esto puede traer como consecuencia que el mallado sea muy complejo o inclusive que no se pueda realizar. Como era de esperarse, la simulación reprodujo de manera fiel los resultados experimentales y por otra parte muestra cómo se distribuye el potencial sobre el electrodo además de la ruta e intensidad que tiene la corriente desde el punto de aplicación hasta el de salida.

La caracterización electroquímica es uno de los pasos experimentales más importantes pues determina la forma en que se comporta un electrodo inmerso en un medio acuoso. Al ser este un proyecto en el que se estudia el registro/estimulación neuronal, se reprodujeron las condiciones experimentales bajo las cuales se realiza; es por ello que en el estudio se utilizó la solución fisiológica como electrolito. Los resultados experimentales mostraron primeramente que la conductividad del eNTCPM es mayor que la del electrolito, lo cual indica que cualquier señal eléctrica en las inmediaciones de éste fluirá a través de él antes que en el electrolito. Por otro lado, el potencial en la interfase electrodo-electrolito o potencial normal de electrodo, generado por el acomodo de moléculas de agua, iones o algún otro tipo de molécula es bajo y por lo tanto, el error

proporcionado por éste a los registros adquiridos también es mínimo. Probablemente el electrodo este solvatado y presente un poco de resistencia por los iones.

Cuando se aplica una diferencia de potencial a un sistema electrodo-electrolito, se perturban las condiciones en la interfase por tanto, el potencial normal de electrodo también lo hace. Generalmente cuando esto sucede, siempre existe un reajuste de especies en la interfase, lo que genera reacciones no farádicas pero también en alguna medida transferencia de carga (Merrill *et al.*, 2005) lo que da origen a reacciones farádicas. Al respecto la voltametría cíclica, de manera interesante, muestra que la superficie del electrodo no es tan reactiva, es decir, que en estas condiciones experimentales se tiene una zona de estabilidad o de doble capa eléctrica donde el eNTCPM interactúa muy poco con el electrolito sino que predominan las reacciones del tipo no farádicas y por tanto no presupone la generación de especies tóxicas para la célula como si lo hace el de Au(111); ya que este último, presenta algunos picos en el voltamograma que indican algún tipo de reacción farádica. El experimento de cronocoulombimetría por otra parte, muestra como el sistema electrodo-electrolito, también se comporta como un circuito eléctrico RC cuando se aplica un pulso de estimulación.

De estos experimentos se obtiene la capacitancia y la resistencia por unidad de superficie, los cuales son otros parámetros experimentales importantes para caracterizar el electrodo en contacto con el electrolito. El valor de estos dos parámetros se ve seriamente afectado por la velocidad de barrido o la magnitud de potencial por unidad de tiempo que se aplica, en este caso, mientras más abrupto sea el cambio, la capacitancia disminuye mientras que la resistencia aumenta. Este resultado indica que si el potencial varía de manera abrupta, la transferencia de carga comienza a ser dominada por los procesos farádicos mientras que los no farádicos disminuyen debido a que no se le da suficiente tiempo a los iones, proteínas, moléculas de agua, etc. de acomodarse en la interfase. Finalmente, estos parámetros se agregaron al modelo.

#### *Modelado y simulación por el método de los elementos finitos (I)*

La construcción geométrica del electrodo tiene las características y dimensiones superficiales reales de la película construida aunque esto es solamente en un área de  $\mu\text{m}$  debido a las limitaciones mecánicas del AFM, mientras que el espesor fue un promedio obtenido de la caracterización por SEM. Con estos datos sin embargo, puede construirse una geometría bastante aproximada de la situación experimental real lo que permite obtener información más precisa de lo que sucede en la interfase una vez que se simula el sistema.

La construcción de geometrías realistas en trabajos similares no es muy frecuente y esto es debido principalmente a que incrementan la complejidad así como el tiempo de simulación en el MEF, cuando en ocasiones geometrías simples con las condiciones adecuadas de simulación pueden resolver la situación. Sin embargo, y como se verá más adelante en este trabajo, las geometrías juegan un papel importante en la obtención de resultados adecuados que puedan aportar

más detalles e inclusive nueva información o perspectivas sobre el funcionamiento del sistema completo.

Inicialmente se reprodujo el experimento de medición de resistividad superficial para comenzar a trabajar con el software de simulación y evaluar los resultados obtenidos a partir de ésta. En este caso los resultados de la simulación fueron prácticamente iguales a los obtenidos de manera experimental, algo que era de esperarse pues los parámetros experimentales alimentaban la simulación. Este resultado además permite observar la distribución del potencial, el sentido y flujo de la corriente en el electrodo así como sus valores en puntos específicos de la geometría; algo que en un sistema real complejo puede resultar difícil o imposible.

Por otra parte, en la simulación con la geometría realista del eNTCPM se utilizan estas mismas propiedades y es posible distinguir que la corriente circula por la vía más corta entre la zona aterrizada del medio extracelular y el electrodo, mientras que el potencial es casi el mismo para todo el sistema. Estos resultados al igual que los anteriores eran esperados pero además, confirman el buen funcionamiento del software ya que al reproducir los resultados experimentales de sistemas sencillos, concede la seguridad de que al modelar y simular sistemas más complejos los resultados que se obtendrán serán confiables. De esta forma, estos primeros resultados muestran ya el poder de la simulación para observar el comportamiento, en este caso eléctrico, de un sistema.

## VII. Cultivo, caracterización, estimulación y modelado de la línea celular NG108-15

### Metodología

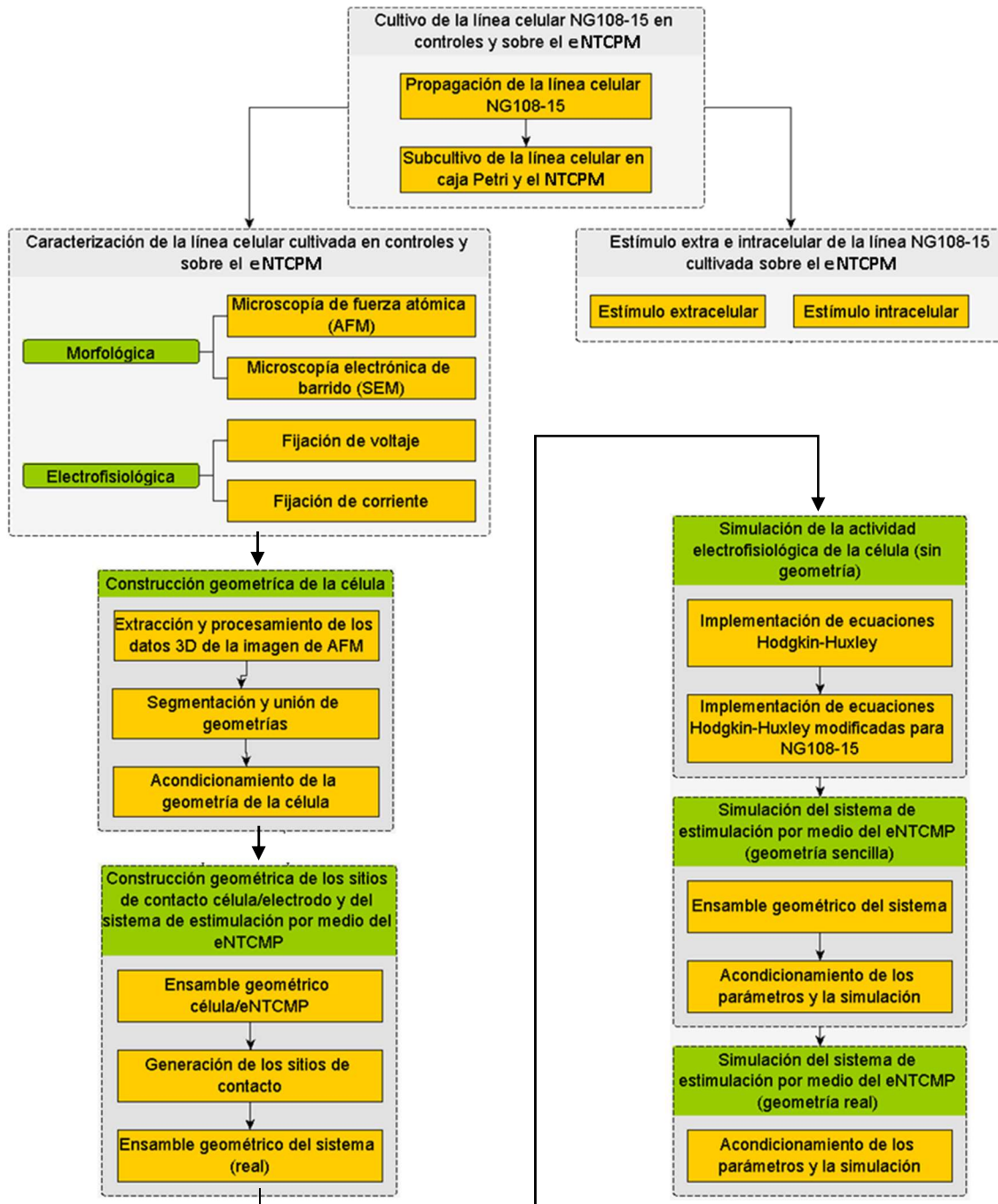


Figura VII-1. Etapas del cultivo, caracterización, estimulación y modelado de la línea celular NG108-15.

A continuación, se describe el desarrollo experimental que se siguió para construir el sistema de estudio. La intención de llevar a cabo estos experimentos fue la de observar el comportamiento electrofisiológico de las células NG108-15, que son un modelo biológico de neurona, cultivadas sobre el eNTCPM así como el de obtener algunos de los parámetros experimentales necesarios para la construcción y la validación del modelo computacional. El diagrama de la Figura VII-1 muestra las etapas generales que se cubrieron en este desarrollo.

#### Cultivo de la línea celular NG108-15 en controles y sobre el eNTCPM

Las células de una línea celular neuronal requieren de un ambiente propicio para crecer, pero fundamentalmente, deben contar con los nutrientes necesarios, con un sustrato óptimo donde adherirse y, mantenerse libres de cualquier tipo de contaminación para poder desarrollarse morfológica y funcionalmente. Se trabajó con células NG108-15, que son un modelo biológico de células neuronales, ya que el principal interés era la interacción tanto física como eléctrica de neuronas en contacto con NTC.

#### *Propagación de la línea celular NG108-15*

La línea celular NG108-15 adquirida de ATCC (Lot No. 58078652), se dejó descongelar a temperatura ambiente. Después, para remover los reactivos con los que fueron congeladas, las células se centrifugaron con 5 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, cat.21063029) a 300 g por 3 min. A continuación, se removió el sobrenadante y se agregaron 5 ml de medio de cultivo fresco para resuspenderlas. Posteriormente, la línea celular fue cultivada en cajas Petri de plástico con medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS Gibco, cat. No 16000), 1  $\mu$ M hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine (50X HAT) (Sigma Aldrich, USA), y 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO, cat. No. 15140). Las cajas fueron colocadas en una incubadora humidificada con una mezcla de gases del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Las células fueron sub-cultivadas de 15-20 veces antes de sembrarlas sobre los controles y el eNTCPM.

#### *Subcultivo de la línea celular en caja Petri y el eNTCPM*

Para comparar si existe un efecto del eNTCPM sobre las células en cuanto a adhesión, proliferación, desarrollo de procesos dendríticos y registros electrofisiológicos, el cultivo se realizó tanto en los electrodos como en sus respectivos controles. Previo al cultivo de las células sobre el eNTCPM, éste fue colocado en una caja Petri de plástico (Corning 35 mm, USA) con el medio de cultivo suplementado cubriéndolo completamente y manteniéndolo con las mismas condiciones ambientales en la incubadora por un día. Esto se hizo con el fin de ajustar la temperatura del electrodo y conseguir que algunas moléculas del medio se depositaran sobre su superficie y hacerla más hidrofílica; lo que ayudó a que las células

tuvieran mayores posibilidades de anclarse sobre la superficie (Wang, Fishman, Dai, & Harris, 2006).

A continuación, las células fueron sembradas sobre el eNTCPM y su respectivo control a una densidad de aprox.  $2.120 \times 10^5$  células/ml (Scepter 2.0 Cell Counter, Millipore USA). Una semana después, se llevó a cabo el proceso de diferenciación mediante la reducción del FBS a una concentración del 5% y la adición de 1mM de N6,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (dbcAMP) (Sigma Aldrich, USA) (Liu, Tu, Zhang, Zheng, & Li, 2012). El medio suplementado modificado para la diferenciación fue cambiado cada 48 hr durante tres o cuatro semanas, previo a los registros electrofisiológicos.

#### Caracterización de la línea celular cultivada en controles y sobre el eNTCPM

En esta etapa se observó mediante AFM y SEM la forma en la que las células diferenciadas crecieron y se adhirieron sobre la superficie del eNTCPM y, a su vez, se realizaron los registros electrofisiológicos pertinentes para observar el posible efecto del electrodo sobre el comportamiento electrofisiológico de las células.

#### *Caracterización morfológica*

Para la caracterización por medio de AFM y SEM, las muestras fueron fijadas en 5% de glutaraldeído por 2 hr y deshidratadas en 30-100% de etanol. Con la fijación, se detienen los procesos vitales de las células y se conservan en un estado lo más parecido posible en morfología y composición química al estado vivo. Los estudios morfológicos por AFM se realizaron de la misma manera que en la caracterización superficial del eNTCPM. En la adquisición de las micrografías SEM, las células fueron tratadas con el método de secado de punto crítico (Bray, 2000) y recubiertas con una película delgada de oro.

*Espectroscopia Raman:* Para realizar la caracterización química y estructural de la superficie del electrodo una vez cultivadas las células, se empleó espectroscopia Raman con un láser de longitud de onda 532.1 nm. Los espectros fueron adquiridos con un espectroscopio Horiba T64000; no se requirió algún tratamiento adicional de la muestra (Figura VI-15).

#### *Caracterización electrofisiológica*

En la caracterización o registro electrofisiológico de las células NG108-15 cultivadas en los electrodos y en los controles (células cultivadas en cajas Petri de plástico, se emplearon técnicas de registro intracelular las cuales muestran la actividad electrofisiológica celular a través de la membrana; es decir, en el interior de la célula. Además del  $V_m$  en reposo se adquirieron las corrientes iónicas y los potenciales de acción.



La solución amortiguadora (intracelular) fue preparada con: 8 mM NaCl, 132.5 mM KCl, 0.02 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.04 mM EGTA, y 10 mM HEPES; a pH 7.2. La solución reguladora (extracelular) fue preparada con: 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM HEPES; a pH 7.4 (todos los reactivos fueron de Sigma Aldrich, USA). Las soluciones fueron filtradas con membranas de un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore, USA) y las micropipetas de vidrio fueron de 2-5 MΩ (WPI Inc., USA). Los experimentos con las técnicas estándar de fijación de voltaje/corriente fueron realizados con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, USA) en el modo de célula completa. El software pClamp (Axon Instruments, USA) fue utilizado para generar los protocolos de estimulación y de adquisición de datos. Los registros fueron obtenidos con una tarjeta Digidata 1200 (Axon Instruments, USA) y procesados y analizados con el software Clampfit 10.2 (Axon Instruments, USA) y Prisma 6.0 (GraphPad, USA).

La Figura VII-2 muestra un esquema simplificado de la configuración empleada para registrar la actividad electrofisiológica de una célula cultivada sobre la superficie del eNTCPM empleando las técnicas de fijación mencionadas, mientras que la Tabla VII-1 muestra los protocolos de estimulación empleados; la misma configuración, pero sin el electrodo, se realizó en los controles.

Tabla VII-1. Protocolos de estimulación empleados.

Fijación de voltaje	Fijación de corriente
Voltaje de fijación: -60 mV	Voltaje de fijación: -70 mV
Inyección de 7 pulsos de voltaje con una duración de 10 y 100 ms, con incrementos de 10 mV de magnitud.	Inyección de 6 pulsos de corriente con una duración de 200 μs, y una amplitud de 7 nA.

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico comparativo de la corriente iónica ( $I_{Na^+}$ ,  $I_{K^+}$ ) entre estos cultivos. Los resultados son reportados como valores promedio con error estándar. Además, se hizo una prueba t de Student para detectar diferencias significativas entre ellos; esta es una prueba estadística que se utiliza para determinar la existencia de diferencias significativas entre la media de dos grupos cuando el tamaño de la muestra es pequeño. Es importante mencionar que en ambos casos, las células no presentaron una población con actividad electrofisiológica homogénea (Liu *et al.*, 2012).

Los registros de fijación de voltaje muestran al menos tres distintos escenarios: conductancia al Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> muy baja ( $\leq 9$  pA pF<sup>-1</sup>), muy alta ( $\geq 400$  pA pF<sup>-1</sup>) y, la conductancia más frecuente o intermedia que se consideró como normal o estándar. El análisis comparativo se realizó solo para el escenario de conductancia normal.

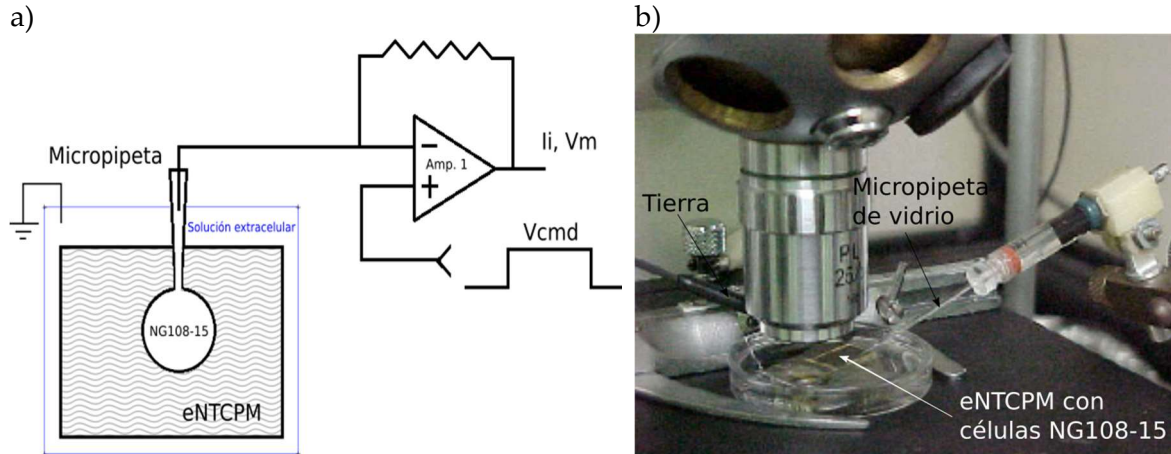


Figura VII-2. Esquema e imagen del registro electrofisiológico utilizando las técnicas estándar de fijación de corriente/voltaje. En el esquema a), cuando el amplificador 1 es utilizado en la configuración de fijación de voltaje (célula completa),  $V_{cmd}$  indica los pulsos de fijación de voltaje aplicados a la célula mientras que la corriente iónica es la salida del amplificador. Por otra parte, cuando el amplificador 1 es utilizado en la configuración de fijación de corriente (célula completa),  $V_{cmd}$  indica ahora los pulsos de fijación de corriente aplicados a la célula mientras que  $V_m$  es la salida del amplificador.

### Estímulo extra e intracelular de la línea NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM

En el estímulo de la línea celular NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM, se emplearon técnicas de registro/estímulo intra y extracelular las cuales muestran la actividad electrofisiológica celular al interior/exterior de la membrana.

Empleando un protocolo de experimentación similar al de la caracterización electrofisiológica, se estimula a la célula por medio de la micropipeta (Figura VII-3a) y del eNTCPM (Figura VII-3b), con lo que se obtuvo la respuesta de la célula o el cambio en el  $V_m$  por medio de la micropipeta de manera intracelular en ambos casos.

Tabla VII-2. Protocolos de estimulación empleados.

Fijación de corriente (pipeta)	Estímulo de voltaje (eNTCPM)
Voltaje de fijación: -70 mV	Voltaje de fijación: -60 mV
Inyección de 1 pulso de corriente con una duración de 200 $\mu$ s, y una amplitud de 7 nA.	Inyección de 1 pulsos de voltaje con una duración de 200 $\mu$ s, y una amplitud de 7 mV.

### Modelado y simulación por el método de los elementos finitos de la interfase (II)

Como segundo paso en el modelado y la simulación por el método de los elementos finitos (MEF) del sistema, se generó la geometría 3D de la célula NG108-15 a partir de su caracterización morfológica.

#### Construcción geométrica de la célula

En la construcción de la célula se siguió el mismo procedimiento de *extracción y procesamiento de los datos 3D de la imagen de AFM* que para el eNTCPM.

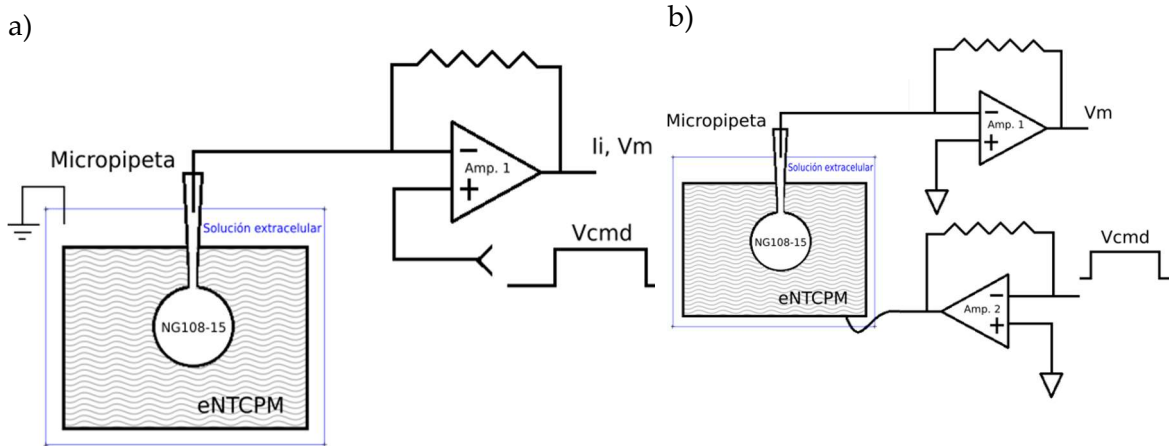


Figura VII-3. Esquema de registro y estimulación. a) Registro del potencial y de b) la estimulación extracelular celular por medio del eNTCPM.

*Segmentación y unión de geometrías.* Sin embargo, en este caso fue necesario segmentar la superficie de la célula ya que estaba combinada con la del sustrato donde fue cultivada. La superficie inferior de la célula fue construida segmentando la proyección del perfil celular sobre la superficie del electrodo. Ambas superficies fueron convertidas a caras y vértices para ser unidas posteriormente en una sola malla cerrada.

*Acondicionamiento de la geometría de la célula.* Después de un procesamiento de limpieza y acondicionamiento (reparación, combinación de elementos, eliminación de caras y vértices duplicados o aislados, etc.) con el toolbox iso2mesh (Fang & Boas, 2009) en Matlab, la malla fue exportada a Meshlab (Visual Computing Lab - ISTI - CNR) donde se realizó una última etapa de procesamiento (limpieza, orientación de normales y suavizado), antes de enviarla finalmente a Comsol. En este último programa, la malla fue convertida a una geometría 3D, reparada para corregir algún defecto de importación en la misma y tratada con la herramienta de geometría virtual para reducir la complejidad en la generación de los elementos finitos sobre la geometría (enmallado).

#### *Construcción geométrica de los sitios de contacto célula/electrodo y del sistema de estimulación por medio del eNTCPM*

*Ensamble geométrico célula/eNTCPM.* En este paso se toma la construcción de la célula y se coloca a una determinada distancia sobre la del electrodo.

*Generación de los sitios de contacto.* Recordando que tanto la superficie del electrodo como la superficie inferior de la célula tienen cierta rugosidad, la distancia entre ambas es distinta en cada punto del área de contacto. Estas distancias fueron calculadas y las que se encontraban dentro de un umbral determinado, se utilizaron para establecer los sitios de contacto entre ambas superficies (Figura VII-4).

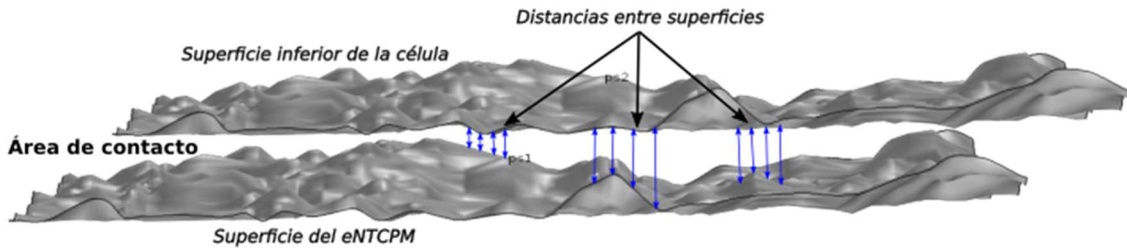


Figura VII-4. Esquema del procedimiento para establecer los sitios de contacto.

Los sitios de contacto fueron entonces agregados a la geometría ya sea del electrodo o de la célula y extruidos hasta llegar a tocar o no la otra geometría. A continuación, esta geometría fue nuevamente reparada y tratada con la herramienta de geometría virtual en las regiones que así lo requirieran.

*Ensamble geométrico del sistema real.* Finalmente, las geometrías de la célula, el electrodo y los sitios de contacto fueron embebidos en un cilindro que representa el medio extracelular. En la realización de este procedimiento se utilizó la interfaz de enlace Matlab-Comsol.

#### Simulación de la actividad electrofisiológica de la célula

La simulación del comportamiento electrofisiológico de la neurona en este caso no involucró la asignación de una geometría.

*Implementación de ecuaciones Hodgkin-Huxley.* Lo que se hizo, fue implementar las ecuaciones de Hodgkin-Huxley (Hodgkin & Huxley, 1952), (Siciliano, 2012) en Comsol. Estas ecuaciones son un modelo que describe la dinámica tanto el  $V_m$  como las corrientes iónicas que lo producen en un punto de la membrana.

$$I = C_m \frac{dV_m}{dt} + \bar{g}_K n^4 (V_m - V_K) + \bar{g}_{Na} m^3 h (V_m - V_{Na}) + \bar{g}_l (V_m - V_l),$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V_m)(1 - n) - \beta_n(V_m)n$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V_m)(1 - m) - \beta_m(V_m)m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V_m)(1 - h) - \beta_h(V_m)h$$

*Ecuación VII-1. Ecuaciones de Hodgkin-Huxley.* Donde  $n$ ,  $m$  y  $h$  son cantidades adimensionales que describen la activación de los canales iónicos.  $V_m$  es el potencial de membrana.  $I$  y  $C_m$  son la corriente y la capacitancia transmembranal.  $\bar{g}_K$ ,  $\bar{g}_{Na}$ , y  $\bar{g}_l$  son las conductancias de potasio, sodio y de fuga respectivamente.  $V_K$ ,  $V_{Na}$  y  $V_l$  son los potenciales de equilibrio de los iones de potasio, sodio y de fuga. Alfa y beta son constantes de tasa de cambio.

La primera ecuación describe la corriente a través de la membrana celular y los elementos que la constituyen son las corrientes iónicas transmembranales que dependen del tiempo así como del cambio en el potencial de membrana. Esta dependencia está dada por  $n$ ,  $m$  y  $h$ , variables que representan la probabilidad de apertura en los canales iónicos de la membrana. Esta probabilidad a su vez, obedece a las constantes voltaje dependientes alfa y beta que determinan la tasa de cambio en la transición, entre el estado de apertura-cierre de los canales iónicos.

Para la implementación de las ecuaciones se utilizó la física o módulo "Mathematics", donde es posible introducir distintos tipos de ecuaciones personalizadas; las ecuaciones a resolver para esta etapa son ahora dependientes del tiempo.

*Implementación de ecuaciones Hodgkin-Huxley modificadas para NG108-15.* Estas ecuaciones fueron modificadas para reproducir la actividad electrofisiológica de las células NG108-15. Dichas modificaciones se realizan para agregar corrientes de calcio y de potasio al modelo de Hodgkin-Huxley (Wu, Yeh, Huang, So, & Lo, 2012).

$$C_m \frac{dV}{dt} = -(I_{Na} + I_{CaT} + I_{CaL} + I_{KDR} + I_M + I_{K(E)} + I_{K(erg)} + I_{K(Na)} + I_{leak}) + I_{app}$$

*Ecuación 2. Ecuaciones Hodgkin-Huxley modificadas para la célula NG108-15.  $C_m$  capacitancia de membrana,  $I_{Na}$  corrientes rápidas de  $Na^+$ ,  $I_{CaT}$  e  $I_{CaL}$  corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo T y L respectivamente,  $I_{KDR}$ ,  $I_M$ ,  $I_{K(E)}$ ,  $I_{K(erg)}$  e  $I_{K(Na)}$  son las corrientes de  $K^+$  del rectificador con retardo, tipo M, voltaje dependientes, erg mediado y activadas por  $Na^+$  respectivamente,  $I_{leak}$  corriente de fuga,  $I_{app}$  corriente de estímulo (Wu et al., 2012).*

#### *Simulación del sistema de estimulación por medio del eNTCPM (geometrías sencilla y real)*

*Acondicionamiento de los parámetros y la simulación (sencillo y real).* En la simulación del sistema se hace uso nuevamente de la interfase física "Electric currents" y de "Mathematics" así como de una característica importante del software de simulación que se conoce como multifísica. Este concepto establece que se pueden utilizar distintas interfases físicas acopladas por medio de algún parámetro o variable para resolver un determinado problema. Por otra parte, las ecuaciones a resolver para este caso son dependientes del tiempo:

$$\begin{aligned}\nabla \cdot J &= -\frac{\partial q_v}{\partial t} \\ J &= \sigma E + \frac{\partial D}{\partial t} + J_e \\ E &= -\nabla V\end{aligned}$$

*Ecuación VII-3. Ecuaciones de conservación de corriente. Donde  $J$  es la densidad de corriente en  $A/m^2$ ,  $q_v$  es la densidad de carga en  $C/m^3$ ,  $\sigma$  la conductividad eléctrica en  $S/m$ ,  $E$  el campo eléctrico en  $V/m$ ,  $D$  es el desplazamiento eléctrico en  $C/m^2$ ,  $J_e$  es la densidad de corriente generada de manera externa en  $A/m^2$  y  $V$  el potencial eléctrico en  $V$ .*

En la solución del sistema, se utiliza el paradigma presentado por (Elia, Lamberti, & Tucci, 2009), (Joucla, Yvert, Glière, & Yvert, 2014) para simular el comportamiento electrofisiológico de la neurona. El procedimiento consiste en acoplar los cambios del medio extracelular con los correspondientes al medio intracelular utilizando dos físicas o módulos, así como un tercero que contiene las ecuaciones de Hodgkin-Huxley asociadas a regiones específicas de la membrana celular. Una vez construido el esquema de simulación, la neurona fue estimulada mediante la aplicación de un pulso de corriente/voltaje a través del eNTCPM (Figura VII-5a) y posteriormente registrada por el mismo mediante la aplicación de un pulso de corriente a la neurona (Figura VII-5b). En la simulación de la estimulación se utilizó el siguiente esquema (Figura VII-6):

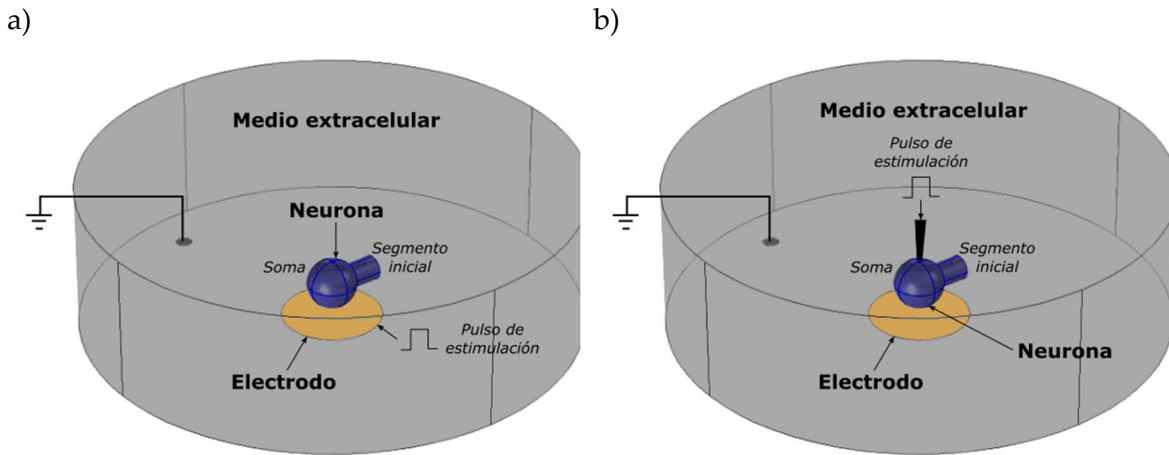


Figura VII-5. Esquema del modelado y la simulación. Esquema de la geometría sencilla del modelado y la simulación para la estimulación neuronal por medio de a) un pulso de voltaje en el electrodo y b) un pulso de corriente en el soma.

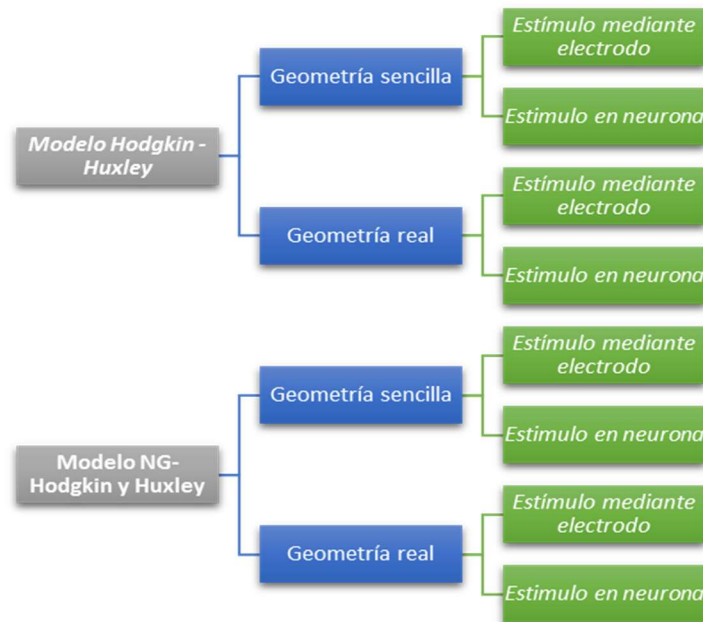


Figura VII-6. Esquema del proceso de simulación del estímulo mediante el eNTCPM.



## Resultados

### Cultivo de la línea celular NG108-15 en controles y sobre el eNTCPM

Previo al cultivo y la caracterización, se realizó el conteo celular durante el proceso de siembra de las células NG108-15 para controlar y corroborar que se sembraba aproximadamente la misma cantidad de células en los controles y sobre el eNTCPM. En la Tabla VII-3 se muestran los resultados del conteo celular realizado en cada caso.

*Tabla VII-3. Conteo celular antes de sembrar en controles y ENTCPM.*

<b>Diámetro celular promedio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Concentración (células/ml)</b>
3.770 $\pm$ 0.470	2.120E+05

### Propagación y subcultivo de la línea celular en caja Petri y el eNTCPM

En la caracterización morfológica se observó el crecimiento celular en los controles y en el eNTCPM durante el proceso de cultivo, evaluando cualitativamente la forma las células se comportaba al contacto con la superficie del electrodo.

Una vez sembradas las células, el crecimiento de la línea celular NG108-15 en los controles (Figura VII-7a) y sobre la superficie del eNTCPM (Figura VII-7b y c) fue monitoreado mediante microscopía óptica en sus etapas de proliferación y diferenciación. Durante esta evaluación, las células mostraron crecimiento satisfactorio y buena adhesión para posteriormente, desarrollar una compleja y extensa red de neuritas en los controles y sobre la superficie del electrodo (Figura VII-7c). El diámetro celular medido fluctuó entre 15-30  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

### Caracterización de la línea celular cultivada en controles y sobre el eNTCPM

#### Caracterización morfológica

*Microscopía óptica y AFM (control).* A continuación, se muestra un par de figuras donde se caracteriza el crecimiento de las células NG108-15 diferenciadas en los controles mediante microscopía óptica (Figura VII-8a, Figura VII-9a), así como su correspondiente análisis por AFM. Las imágenes AFM muestran detalles tridimensionales en la estructura del cuerpo celular o soma, así como de las neuritas desarrolladas (Figura VII-8b, Figura VII-9b). La Figura VII-8c y Figura VII-9c muestran un análisis de perfil de la célula donde los somas presentan un diámetro de 20-30  $\mu\text{m}$  y una altura de 3-5  $\mu\text{m}$  mientras que neuritas cercanas tienen diámetros de 1.5-2.5  $\mu\text{m}$  y alturas de 0.25-0.4  $\mu\text{m}$  aproximadamente. El análisis de perfil es un corte seccional de la superficie sobre la cual se ha realizado el barrido. En este caso el sustrato es plano por lo que no se observan detalles estructurales extra, únicamente los celulares.

*Microscopía SEM (eNTCPM).* En las micrografías SEM es posible observar en un campo más amplio los detalles del crecimiento celular sobre la superficie del eNTCPM así como sus detalles y nanoestructura. En la Figura VII-10a se observa el crecimiento de un grupo de células conectadas mediante sus neuritas. La Figura VII-10b muestra una célula bien adherida con su cuerpo celular o soma en buen estado, el desarrollo de una neurita y filopodios. A mayor detalle (Figura VII-10c) se observa que para anclarse a la superficie de la célula, en este caso el soma, desarrolla filopodios hacia la película de NTCPM mientras que, la Figura VII-10c muestra detalles del soma y del crecimiento de una neurita también anclada a la superficie mediante los filopodios.

*Microscopía óptica y AFM (eNTCPM).* A continuación, se muestra un par de figuras donde se caracteriza el crecimiento de las células NG108-15 diferenciadas sobre el eNTCPM mediante microscopía óptica (Figura VII-11a, Figura VII-12a), así como su correspondiente análisis por AFM. Las imágenes AFM muestran detalles tridimensionales del cuerpo celular o soma, así como de las neuritas desarrolladas (Figura VII-11b, Figura VII-12b). La Figura VII-11c, Figura VII-12c muestran un análisis de perfil de la célula donde los somas presentan un diámetro de 20-60  $\mu\text{m}$  y una altura de 5-8  $\mu\text{m}$  mientras que neuritas cercanas tienen diámetros de 3  $\mu\text{m}$  de y alturas de 0.8  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

La Figura VII-13 muestra detalles de las neuritas en contacto cercano con la película de NTCPM; esta estructura celular, está rodeada por los nanopicos previamente descritos en la caracterización superficial de la película (Figura VI-13). Esta interacción “célula-electrodo” donde los NTCPM están en contacto cercano, pudiendo inclusive penetrar al interior celular, se piensa es uno de los factores clave para la obtención de excelentes registros electrofisiológicos. El análisis de perfil de una neurita muestra que tiene dimensiones de diámetro 1  $\mu\text{m}$  y altura 0.2  $\mu\text{m}$ .

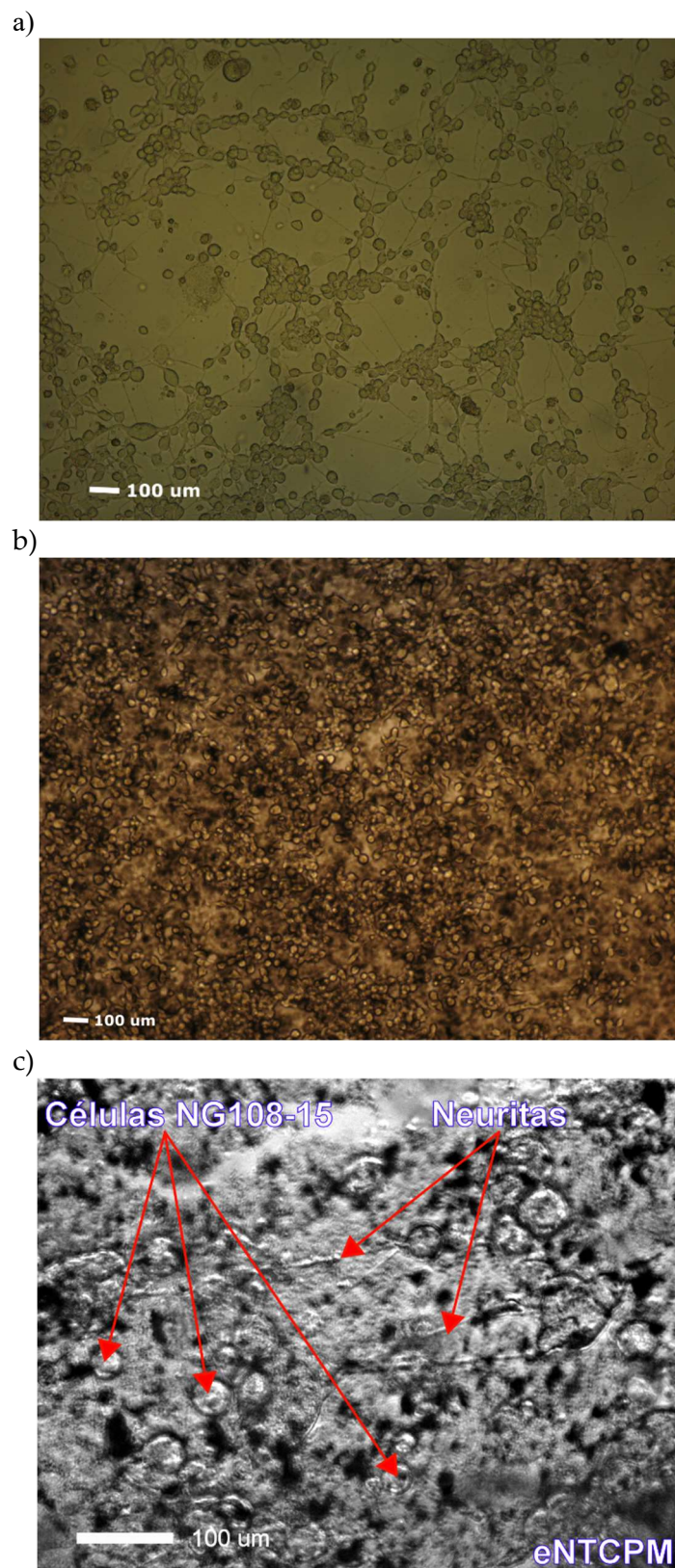
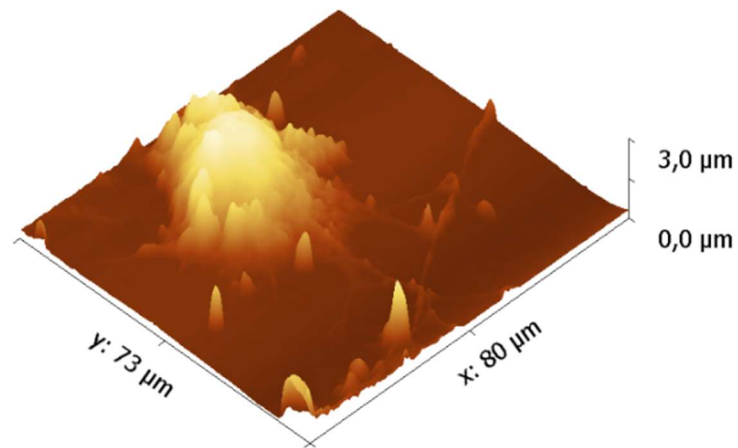


Figura VII-7. Imágenes de microscopía óptica de línea celular NG108-15 a dos semanas de cultivo. a) Controles. b) sobre la superficie del electrodo. c) Magnificación donde se puede identificar a las células desarrollando sus procesos dendríticos sobre la superficie del eNTCPM.

a)



b)



c)

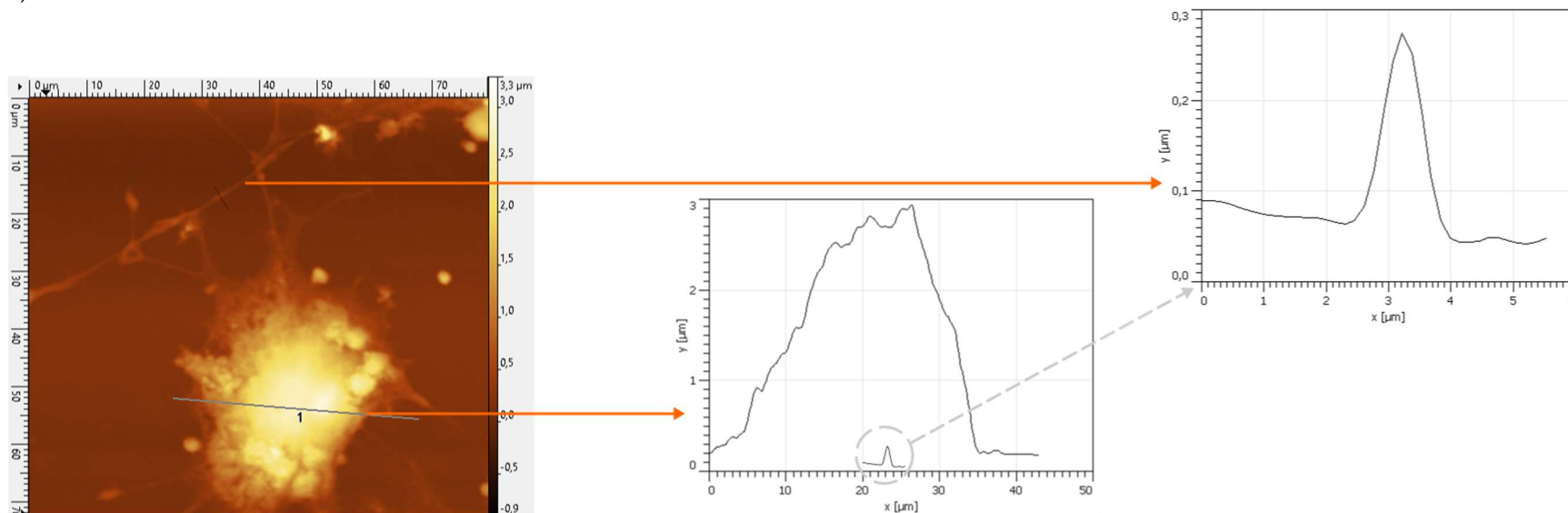


Figura VII-8. a) Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en controles. b) Imagen 3D AFM que muestra el soma y las neuritas desarrolladas. c) Análisis del perfil topográfico del soma (30 μm de diámetro y altura de 3 μm) y de una neurita cercana (diámetro de 1,5 μm y altura de 0,25 μm).



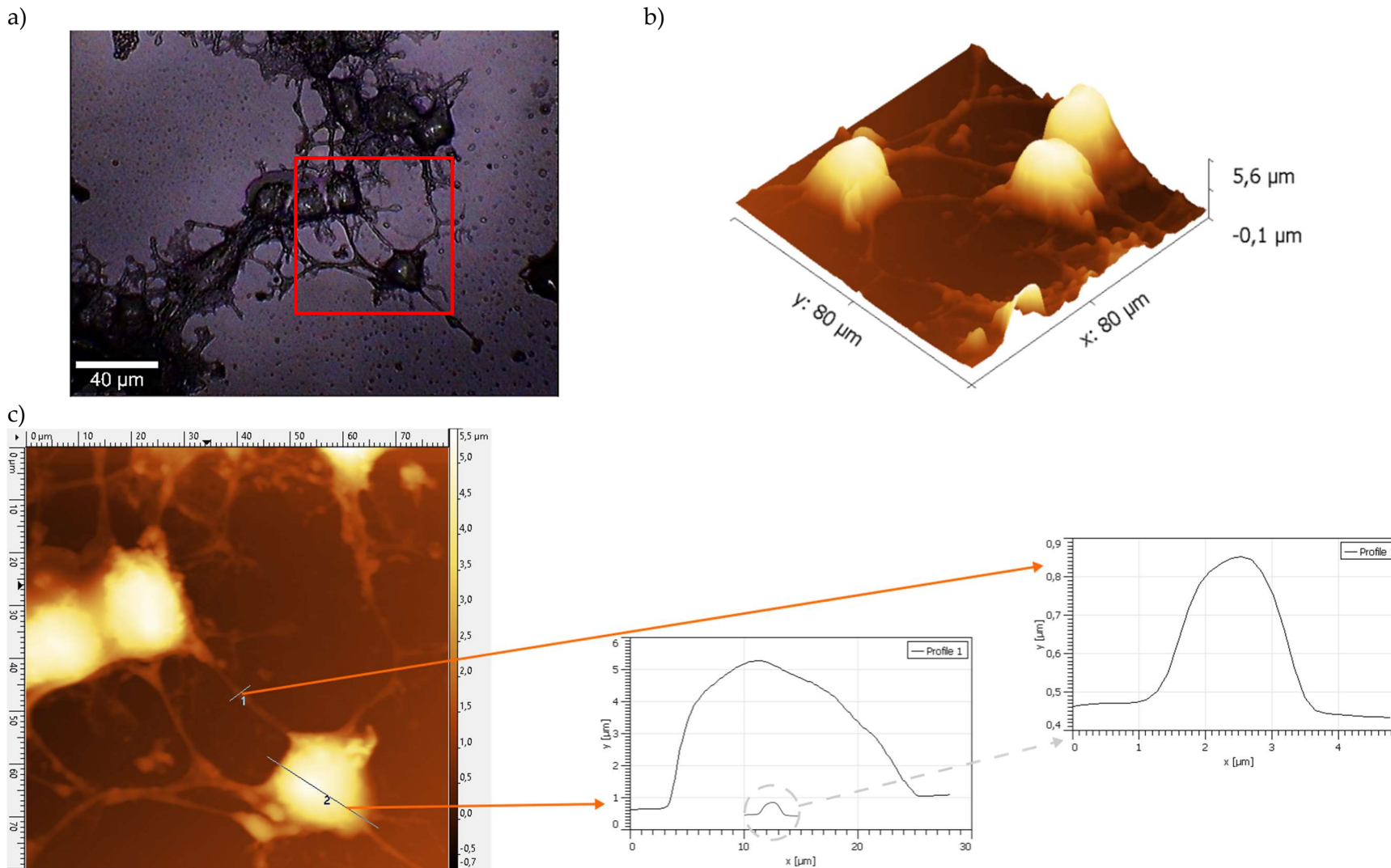


Figura VII-9. a) Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en controles. b) Imagen 3D AFM que muestra el soma y las neuritas desarrolladas. c) Análisis del perfil topográfico del soma (20  $\mu\text{m}$  de diámetro y altura de 5  $\mu\text{m}$ ) y de una neurita cercana (diámetro de 2.5  $\mu\text{m}$  y altura de 0.4  $\mu\text{m}$ ).

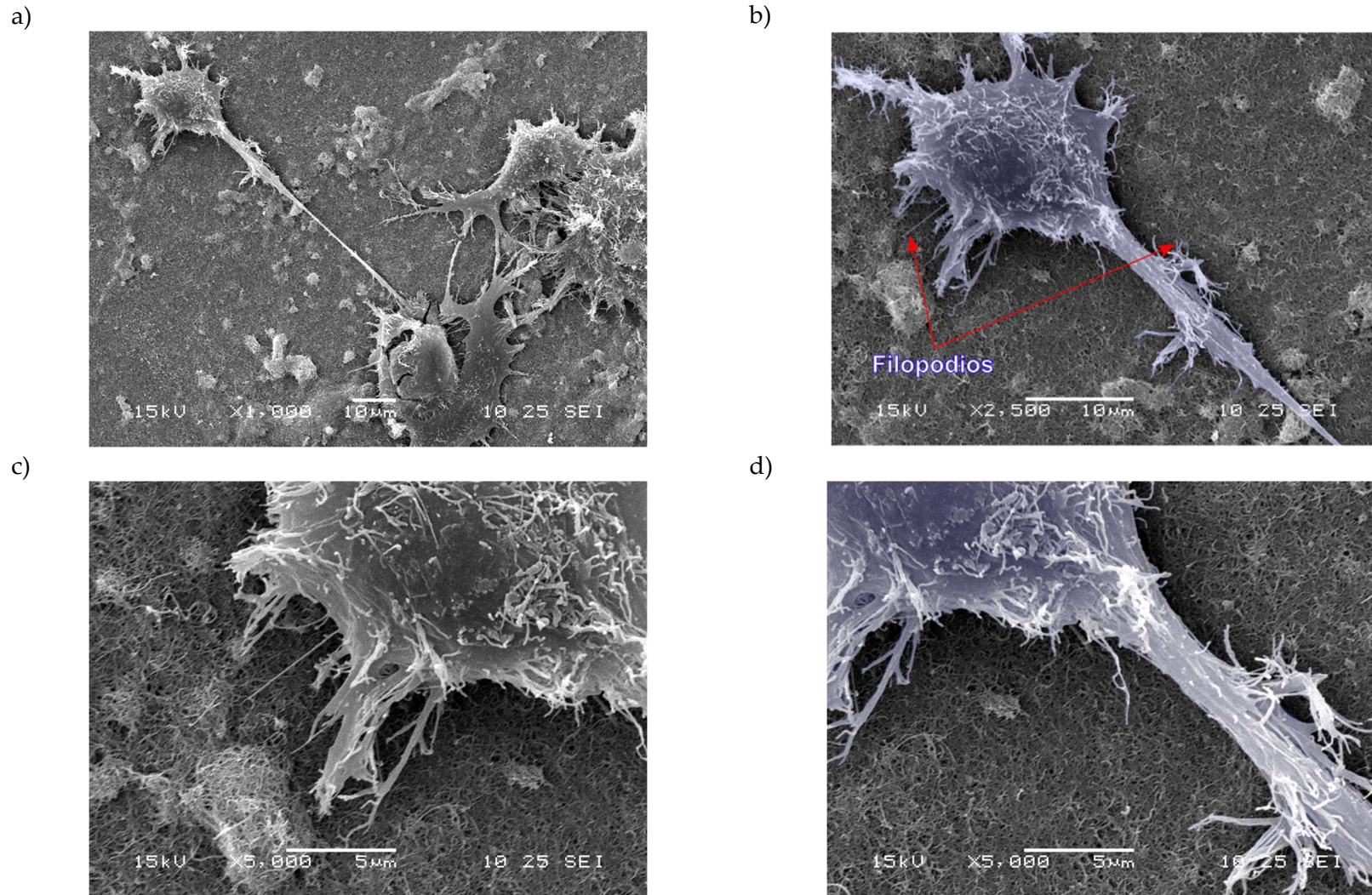
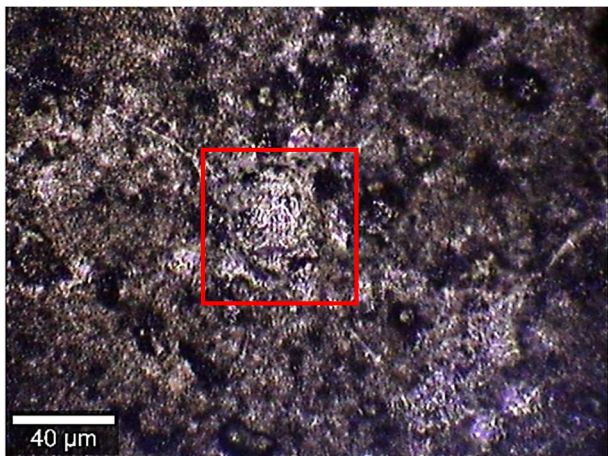


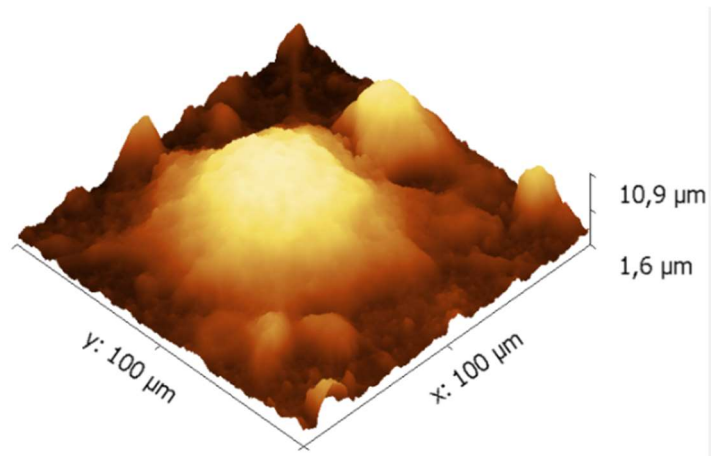
Figura VII-10. Micrografías SEM del crecimiento celular sobre la superficie del eNTCPM. a) Muestra un grupo de células conectadas a través de sus neuritas. b) Adhesión de una célula con su soma o cuerpo celular normal y una neurita donde se observa el desarrollo de filopodios hacia los NTCPM. c) Detalle de la adhesión del soma a la superficie mediante filopodios. d) Detalle del soma con el crecimiento de una neurita y sus filopodios de adhesión sobre la película de NTCPM.



a)



b)



c)

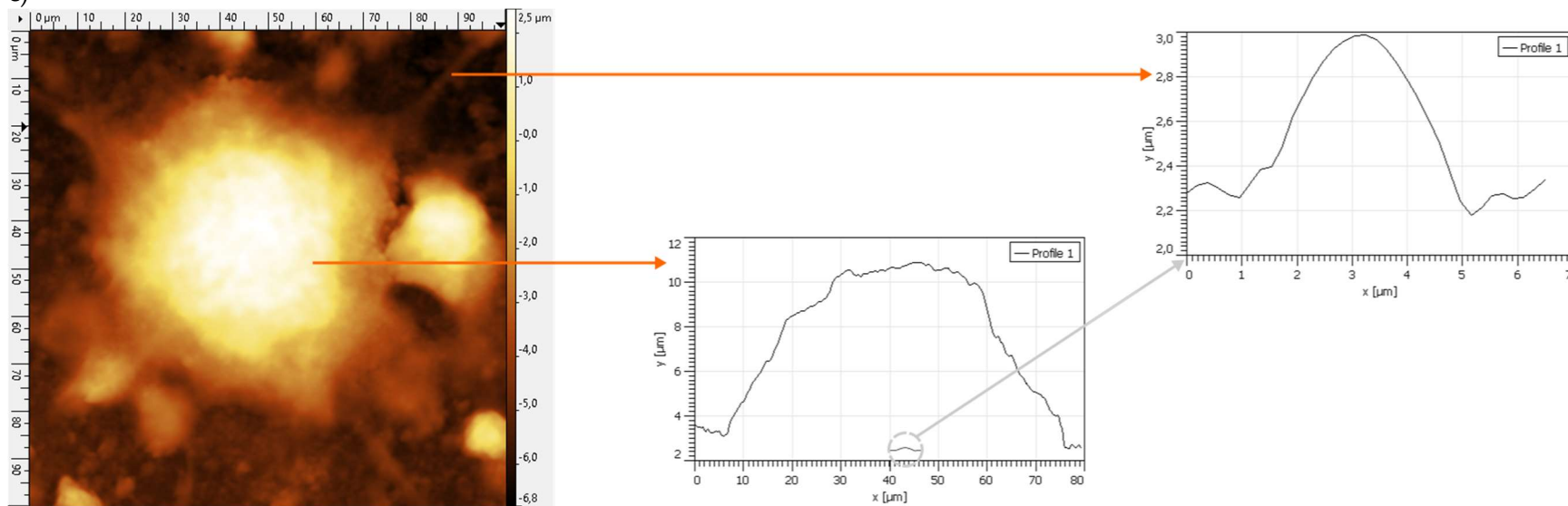


Figura VII-11. a) Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en el eNTCPM. b) Imagen 3D AFM que muestra el soma y las neuritas desarrolladas. c) Análisis del perfil topográfico del soma (60 μm de diámetro y altura de 8 μm) y de una neurita cercana (diámetro de 3 μm y altura de 0.8 μm).

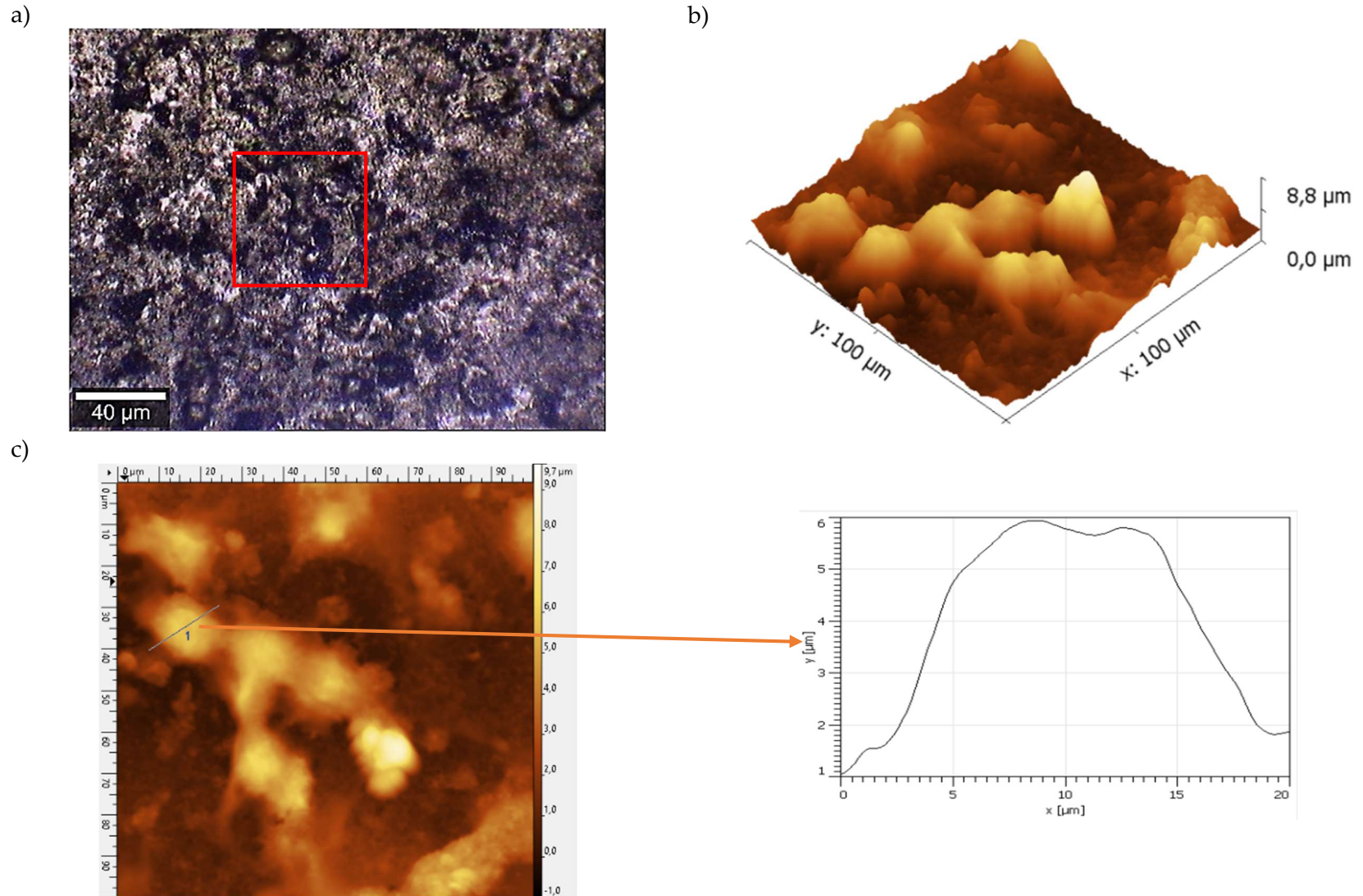


Figura VII-12. a) Imagen de microscopía óptica de una célula NG108-15 cultivada en el eNTPCM. b) Imagen 3D AFM que muestra el soma y las neuritas desarrolladas. c) Análisis del perfil topográfico del soma (20  $\mu\text{m}$  de diámetro y altura de 5  $\mu\text{m}$ ).

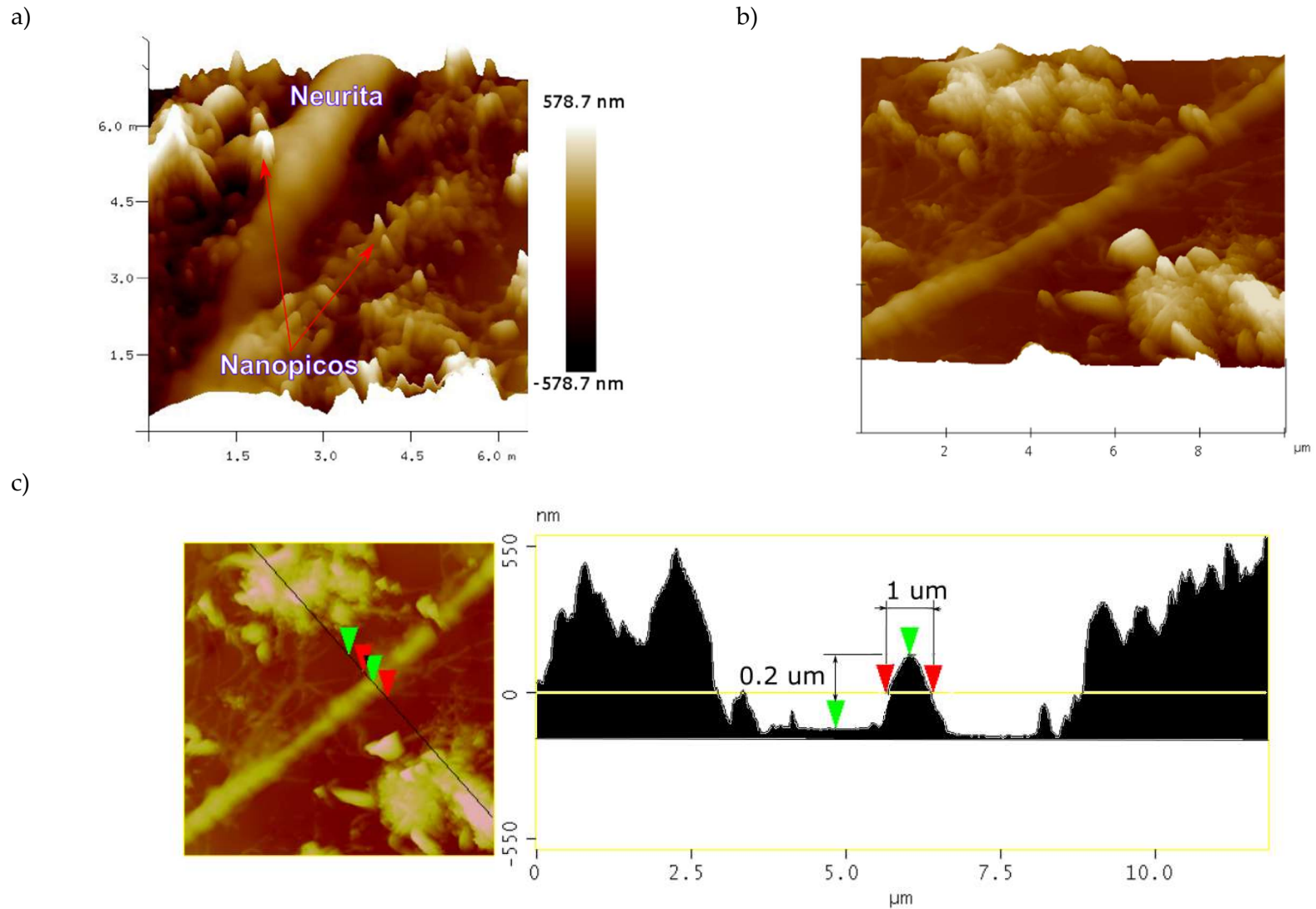


Figura VII-13. a), b) Imágenes AFM 3D que muestran detalles de las neuritas inmersas en la película rodeadas de nanopicos de NTCPM en contacto cercano. c) Análisis de perfil de una neurita (diámetro 1  $\mu\text{m}$  y altura 0.2  $\mu\text{m}$ ).



De manera adicional se realizó un análisis por espectroscopia Raman para observar si el proceso de cultivo o la célula habían modificado de alguna forma a los NTC de la película. En la Figura VII-14 se observa el espectro del eNTCPM, antes de cultivar las células sobre este, con sus dos bandas características localizadas por  $1350\text{ cm}^{-1}$  y  $1580\text{ cm}^{-1}$ , así como una relación  $I(G/D)$  de 1.27 (trazo azul). El siguiente espectro eNTCPM-Célula se adquirió en la superficie de la película bajo una célula. Este último espectro muestra un ligero desplazamiento de las bandas D y G mientras que su relación  $I(G/D) = 0.9$  disminuye en comparación con los valores anteriores, dichas variaciones sugieren la ocurrencia de algún tipo de interacción de los NTCPM con la célula. Por otra parte, aparecen nuevas bandas que son originadas por la célula (cultivo celular) e indican la presencia de proteínas celulares.

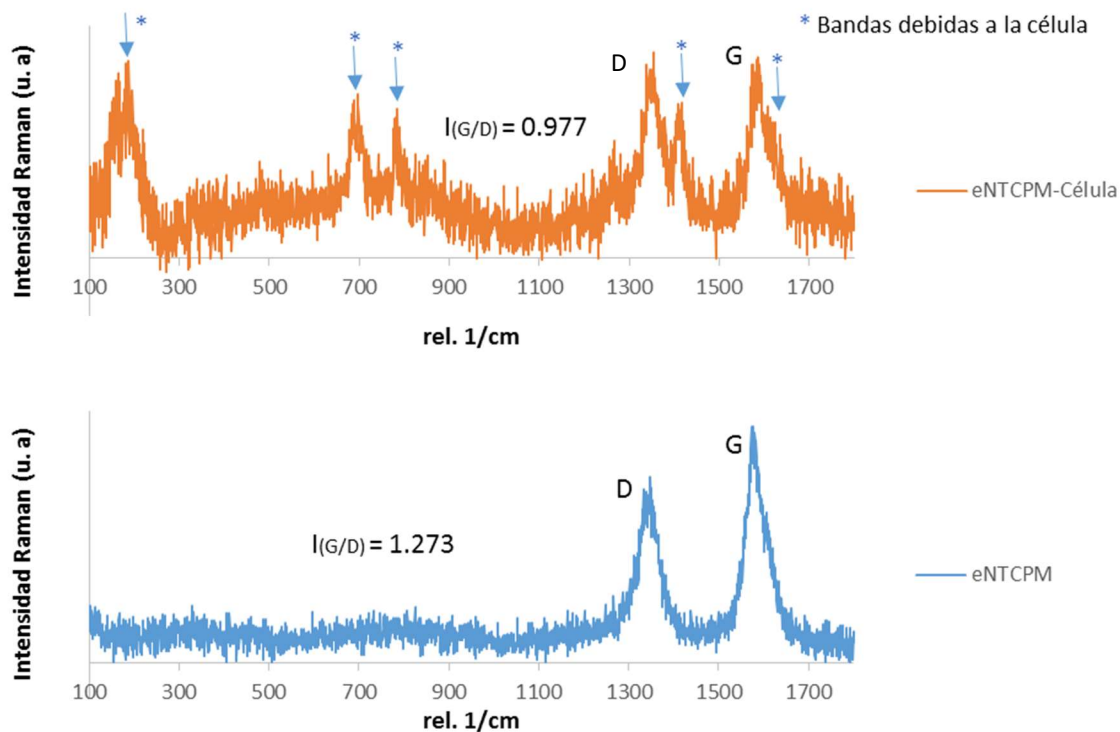


Figura VII-14. Espectro Raman de la superficie del eNTCPM previo y posterior al cultivo celular. Espectro del eNTCPM, antes de cultivar las células sobre este, con sus bandas D y G características (trazo azul). El espectro eNTCPM-Célula fue adquiridos bajo la ubicación de una célula. Este espectro muestra ligeras variaciones en la posición de las bandas D y G así como en su relación  $I(G/D)$  ocasionadas posiblemente por la interacción de la superficie de los NTC con la célula, además se observan nuevas bandas que corresponden a la célula.

#### Caracterización electrofisiológica

La caracterización electrofisiológica tanto en controles como sobre el eNTCPM de la línea celular NG108-15 fue realizada con una micropipeta de vidrio como electrodo empleando las técnicas estándar de fijación de voltaje/corriente. Los resultados muestran registros típicos de corrientes iónicas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Hille, 2001) así como de potenciales de acción (Figura VII-15); de manera que, el comportamiento electrofisiológico obtenido experimentalmente para esta línea

celular es similar al reportado en la literatura (Huang, Huang, Lin, Tsai, & Wu, 2008), (Liu *et al.*, 2012), (Wu *et al.*, 2012).

Los registros de las corrientes de  $\text{Na}^+$  en los controles presentan una rápida activación/inactivación (Figura VII-15a), mientras que las corrientes de  $\text{K}^+$  presentan una lenta activación y nula inactivación (Figura VII-15c); además, también son capaces de generar potenciales de acción (Figura VII-15e). Por otra parte, se distingue que los registros de las corrientes iónicas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y de los potenciales de acción adquiridos en las células cultivadas sobre el eNTCPM, fueron similares a los encontrados en los controles (Figura VII-15b, d y f). Los registros mostrados son representativos para cada uno de los casos.

De estos registros se elaboraron las curvas de conductancia; estas curvas son importantes para observar el comportamiento en los canales iónicos de la membrana celular respecto al cambio en el  $V_m$  y, son características de cada población de canales iónicos (Hille, 2001). Las curvas de conductancia  $g_{\text{Na}^+}$  ( $I_{\text{Na}^+}$  vs  $V_m$ ) fueron construidas con el valor máximo del pico negativo de la corriente de  $\text{Na}^+$  (Figura VII-16a). Por otra parte, para construir las curvas de conductancia  $g_{\text{K}^+}$ , se utilizó el pico positivo de la corriente de  $\text{K}^+$  en estado estable (casi al final del registro).

En este caso, la densidad de la corriente iónica fue comparada como la magnitud de los cambios en las corrientes respecto al tamaño celular. Para esto, se dividió la magnitud entre la capacitancia eléctrica de la célula ya que esta última es directamente proporcional al área celular. Este mismo análisis fue realizado en las células cultivadas sobre el eNTCPM (Figura VII-16b). Las curvas de conductancia  $g_{\text{Na}^+}$ - $V_m$  y  $g_{\text{K}^+}$ - $V_m$  para ambos sustratos también fueron similares.

La diferencia entre ambos potenciales de acción bien podría deberse al comportamiento electrofisiológico no homogéneo obtenido de manera experimental y reportado para este tipo celular.

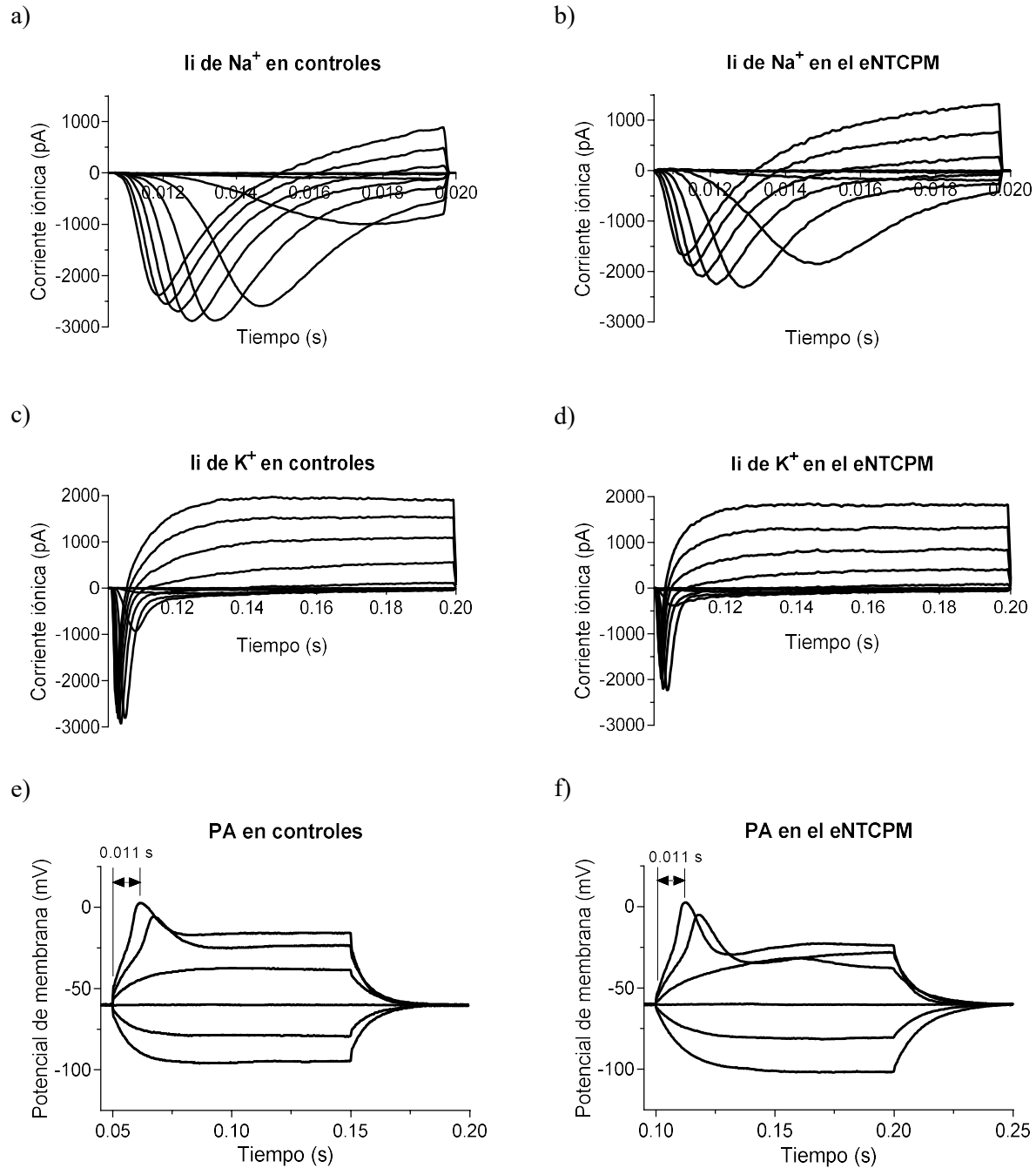
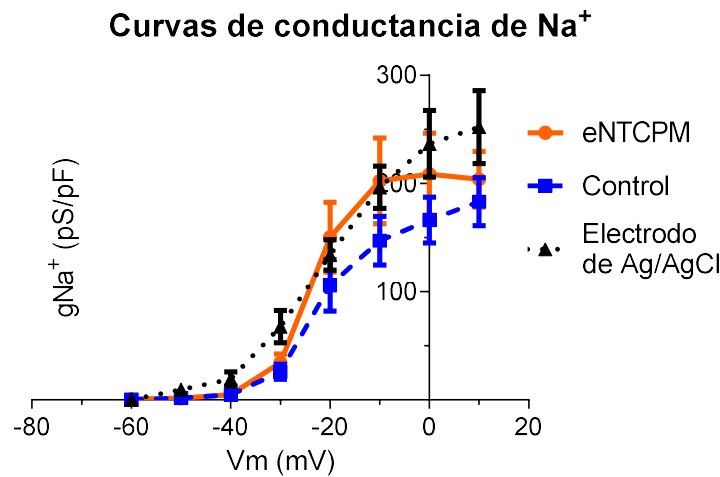


Figura VII-15. Caracterización electrofisiológica de las células NG108-15 cultivadas en los controles y sobre el eNTCPM. Se presentan registros típicos de los experimentos estándar de fijación de voltaje y corriente. a), b) corrientes de Na<sup>+</sup> y c), d) corrientes de K<sup>+</sup> generadas por pulsos despolarizantes de voltaje. e) y f) potenciales de acción característicos generados por pulsos despolarizantes de corriente. Los registros son representativos para cada uno de los casos.



a)



b)

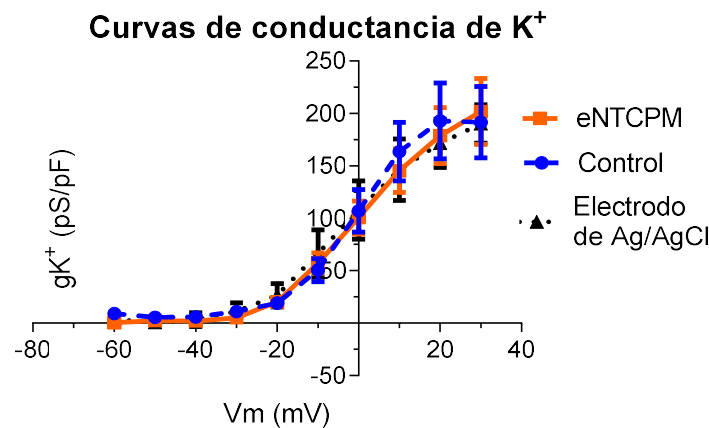


Figura VII-16. a), b) Curvas de conductancia ( $\pm$  SE)  $g_{\text{Na}^+}$  y  $g_{\text{K}^+}$ , respectivamente, adquiridas a partir de los registros de corrientes iónicas en controles y sobre el eNTCPM.

#### Estímulo extra e intracelular de la línea NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM

Los experimentos de estimulación extracelular se llevaron a cabo con el fin de observar la capacidad del electrodo para estimular a las células cultivadas sobre su superficie, mientras que la estimulación intracelular permite observar si éstas emiten potenciales de acción de manera regular. En este experimento, la estimulación extracelular se realizó primero con un electrodo de alambre de plata clorurado (Ag/AgCl), colocado cerca de la célula (experimento control), y también mediante el eNTCPM. Los resultados muestran que con ambos electrodos se genera una respuesta por parte de la célula (potenciales de acción en la Figura VII-17b y d); sin embargo, para lograr el resultado deseado, el electrodo del alambre de plata requiere una magnitud de voltaje aproximadamente tres veces mayor en el pulso de estimulación (Figura VII-17a) que el aplicado con el eNTCPM (Figura VII-17c).

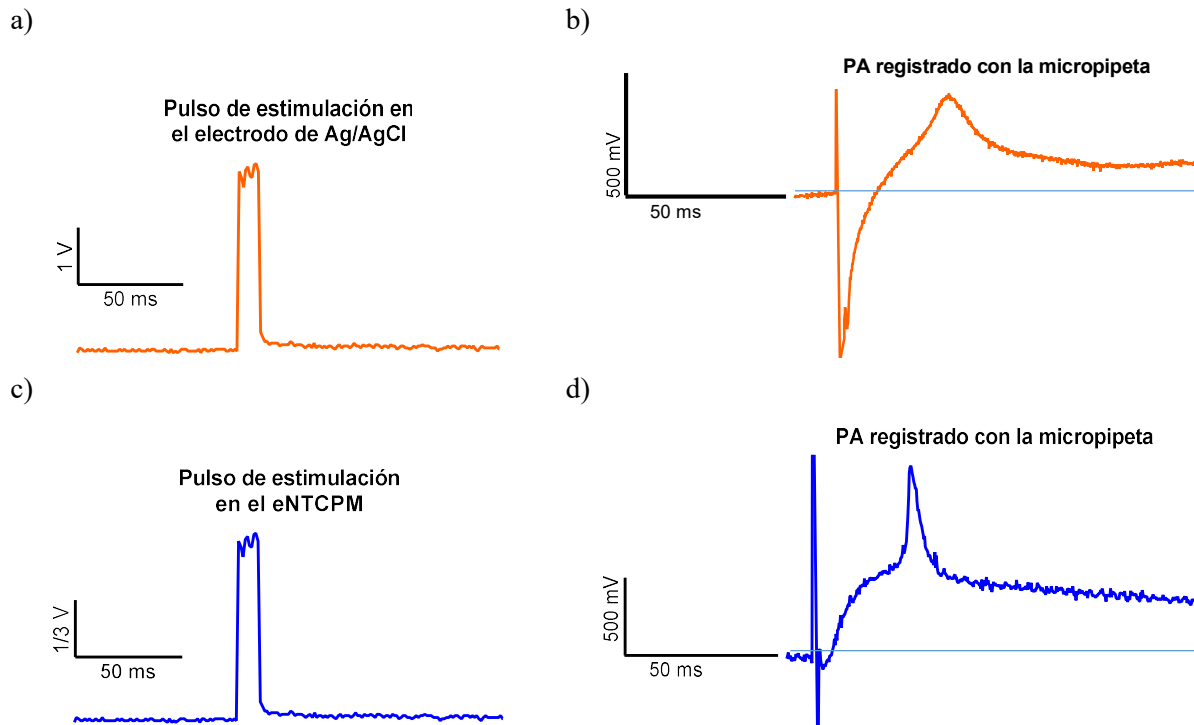


Figura VII-17. Experimentos de estimulación celular. a) Pulso de voltaje aplicado mediante el electrodo de Ag/AgCl. b) potencial de acción registrado como respuesta celular al pulso (Ag/AgCl). c) Pulso de voltaje aplicado mediante el eNTCPM. d) potencial de acción registrado como respuesta celular al pulso (eNTCPM).

En cuanto al experimento de estimulación intracelular, se aplicaron pulsos de corriente que fueron incrementándose en magnitud por medio de la micropipeta directamente sobre el soma de la célula NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM. Esta estimulación produjo cambios en el  $V_m$  que posteriormente generaron potenciales de acción; conforme se incrementaba la amplitud del pulso, el potencial se disparaba casi de manera inmediata (Figura VII-18b).

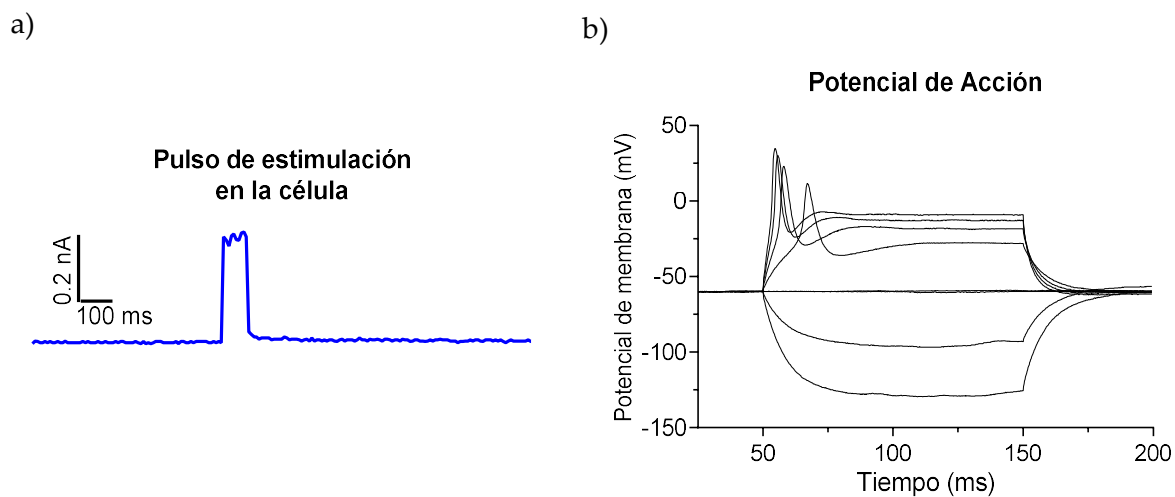


Figura VII-18. Graficas del experimento de estimulación intracelular con pulsos incrementales de corriente. a) pulso de estimulación de corriente. b) cambios en el  $V_m$  de una célula NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM que generaba potenciales de acción.

## Modelado y simulación por el método de los elementos finitos de la interfase (II)

### *Construcción geométrica de la célula*

En la Figura VII-19, se muestran las imágenes AFM extraídas y procesadas con Matlab de las superficies de una célula NG108-15 (Figura VII-19a) y del eNTCPM (Figura VII-19). Para poder unirlos, ambas deben tener el mismo tamaño; por lo que para esta reconstrucción, se obtuvieron imágenes de  $10 \times 10 \mu\text{m}$ . En la Figura VII-19c, se muestra la segmentación de la célula donde se separó el soma con algunas neuritas de su sustrato de cultivo. La Figura VII-19d muestra la proyección y segmentación del perfil celular sobre la superficie del eNTCPM; la superficie resultante se desplazó hacia abajo lo suficiente para que al unirla con la de la célula éstas no se traslaparán. Las Figura VII-20a y Figura VII-20b muestran la unión de ambas superficies.

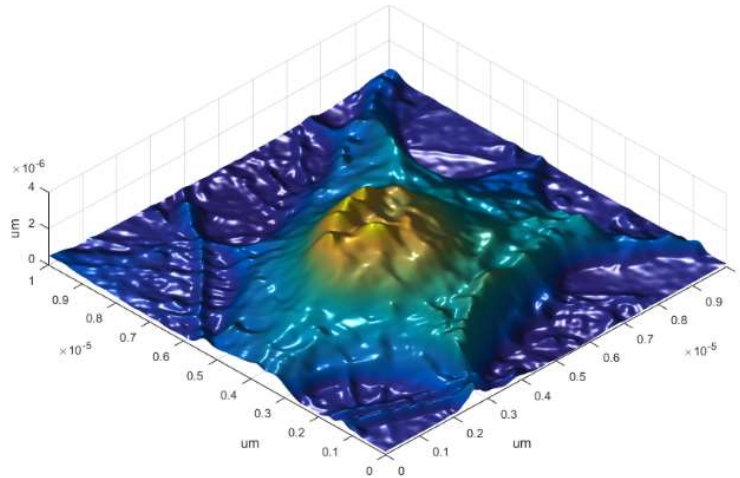
En la Figura VII-20c se muestra la malla importada en Meshlab mientras que la Figura VII-20d, es el resultado del procesamiento de limpieza, orientación y suavizado hecho para eliminar defectos especialmente en los bordes de unión. Sin embargo, como se puede observar, este procesamiento también hace que se pierdan algunas características o detalles superficiales.

En la Figura VII-21 se muestra la geometría importada en Comsol. En algunas ocasiones, la importación no es del todo satisfactoria y puede haber ciertos defectos en la geometría que deben ser corregidos antes de utilizarla para la simulación. En este caso, se observan algunos bordes (Figura VII-21a y c) que pueden hacer que el enmallado sea complejo o imposible de realizar y, por ende, que la solución de la simulación tarde mucho tiempo o no se pueda alcanzar. Para resolver esta situación, el software tiene herramientas que permiten, entre otras cosas, eliminar bordes, vértices o caras extra; además, también existen operaciones virtuales que ocultan este tipo de defectos al enmallado final. Las Figura VII-21b y Figura VII-21d son muestras de geometrías reparadas con estas herramientas.

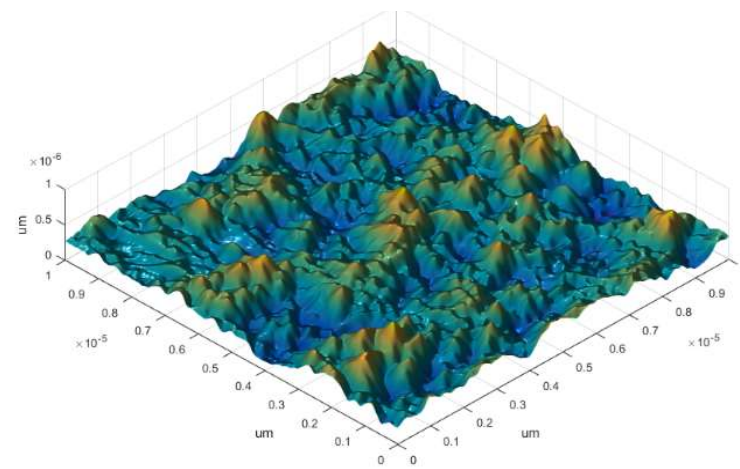
### *Construcción geométrica de los sitios de contacto célula/electrodo y del sistema de estimulación por medio del eNTCPM*

Se muestra en la Figura VII-22a la superposición de las dos geometrías construidas en Comsol; a partir de esta colocación, se genera una geometría que representa los sitios de contacto entre ambas (Figura VII-22b), como se puede ver, estos sitios son áreas irregulares donde la célula se encuentra más cerca de la superficie del eNTCPM. Esta nueva geometría se asocia a la del eNTCPM y se repara con las operaciones de geometría virtual para reducir su complejidad (Figura VII-22c). Finalmente, la Figura VII-22d muestra el ensamble de todas las geometrías embebidas en un cilindro que represente el medio extracelular. Este ensamble contiene las mismas características morfológicas reales. Con esto, se concluye el armado de las geometrías necesarias para proceder con la simulación.

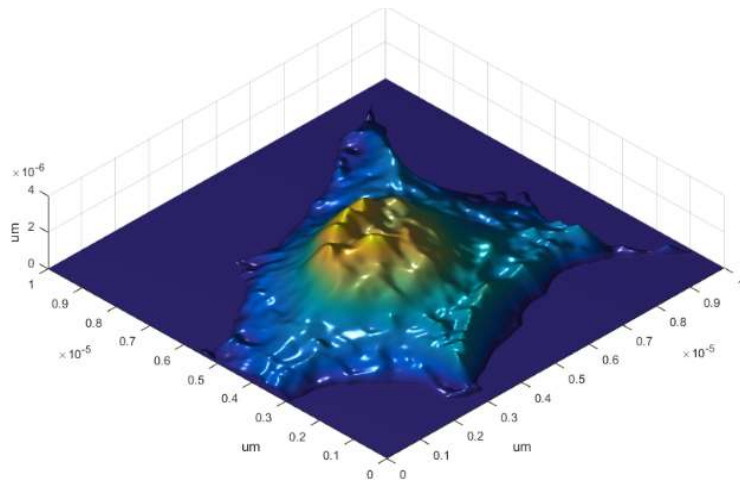
a) Imagen superficial de una célula y el sustrato de cultivo extraída de AFM



b) Imagen superficial del eNTPCM extraída de AFM



c) Imagen superficial de la célula segmentada



d) Proyección del perfil celular sobre la superficie del eNTPCM

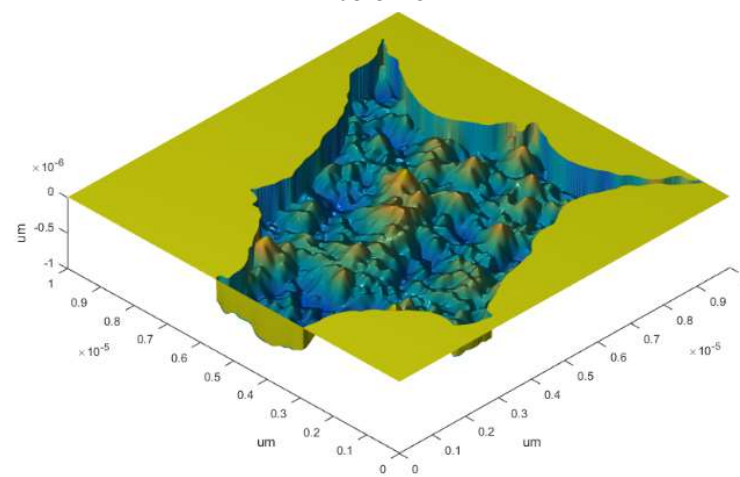


Figura VII-19. Imágenes extraídas de AFM. a) La célula NG108-15 sobre el sustrato y b) la superficie del eNTPCM. Imágenes segmentadas de a) la célula NG108-15 y b) la proyección de la célula sobre superficie del eNTPCM.

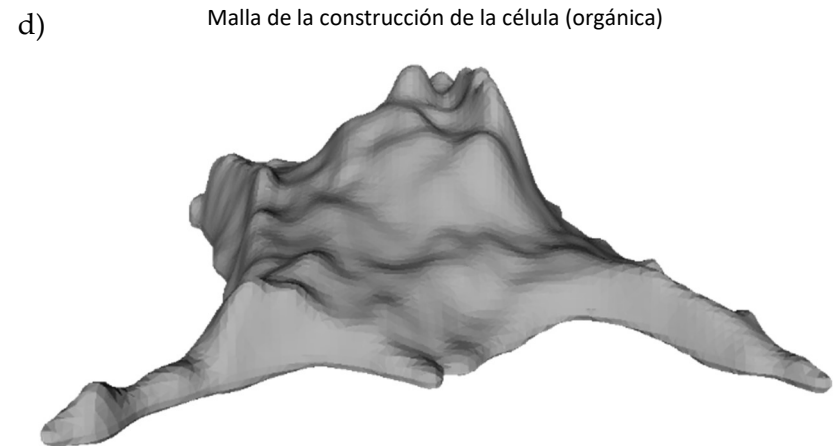
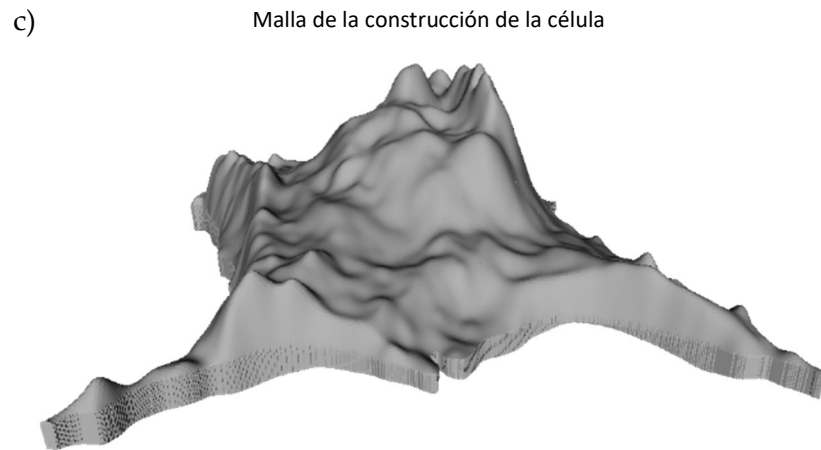
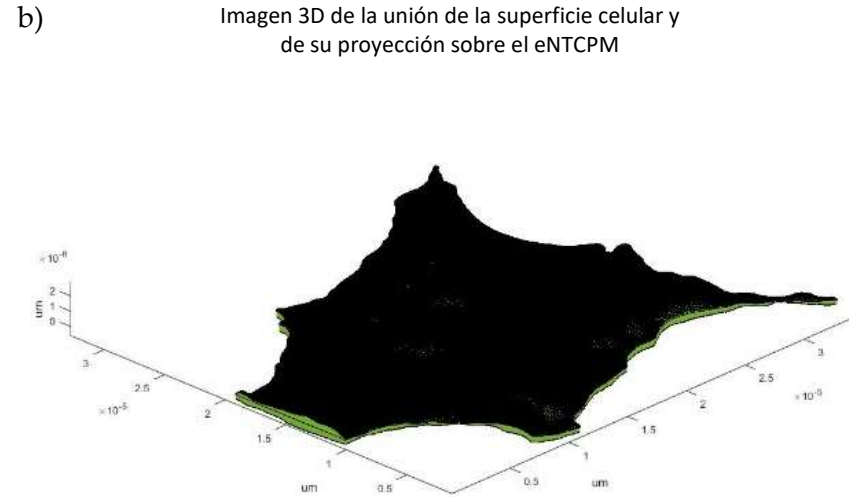
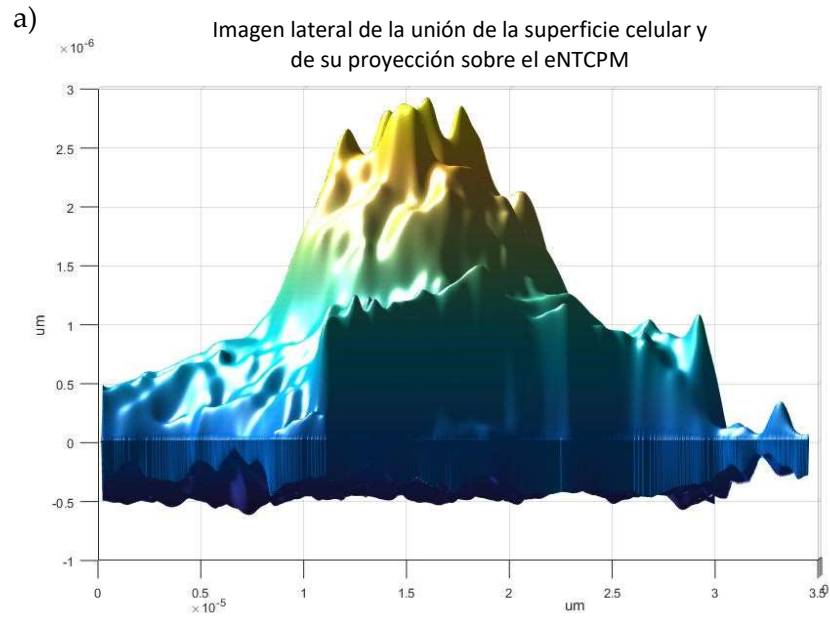


Figura VII-20. Construcción de la geometría celular. Vista lateral a) y tridimensional b) de la unión de las dos superficies. c) Malla de la geometría de la célula importada a Meshlab, d) malla procesada para tener una geometría sin defectos, más orgánica y con los requisitos necesarios para ser exportada a Comsol.

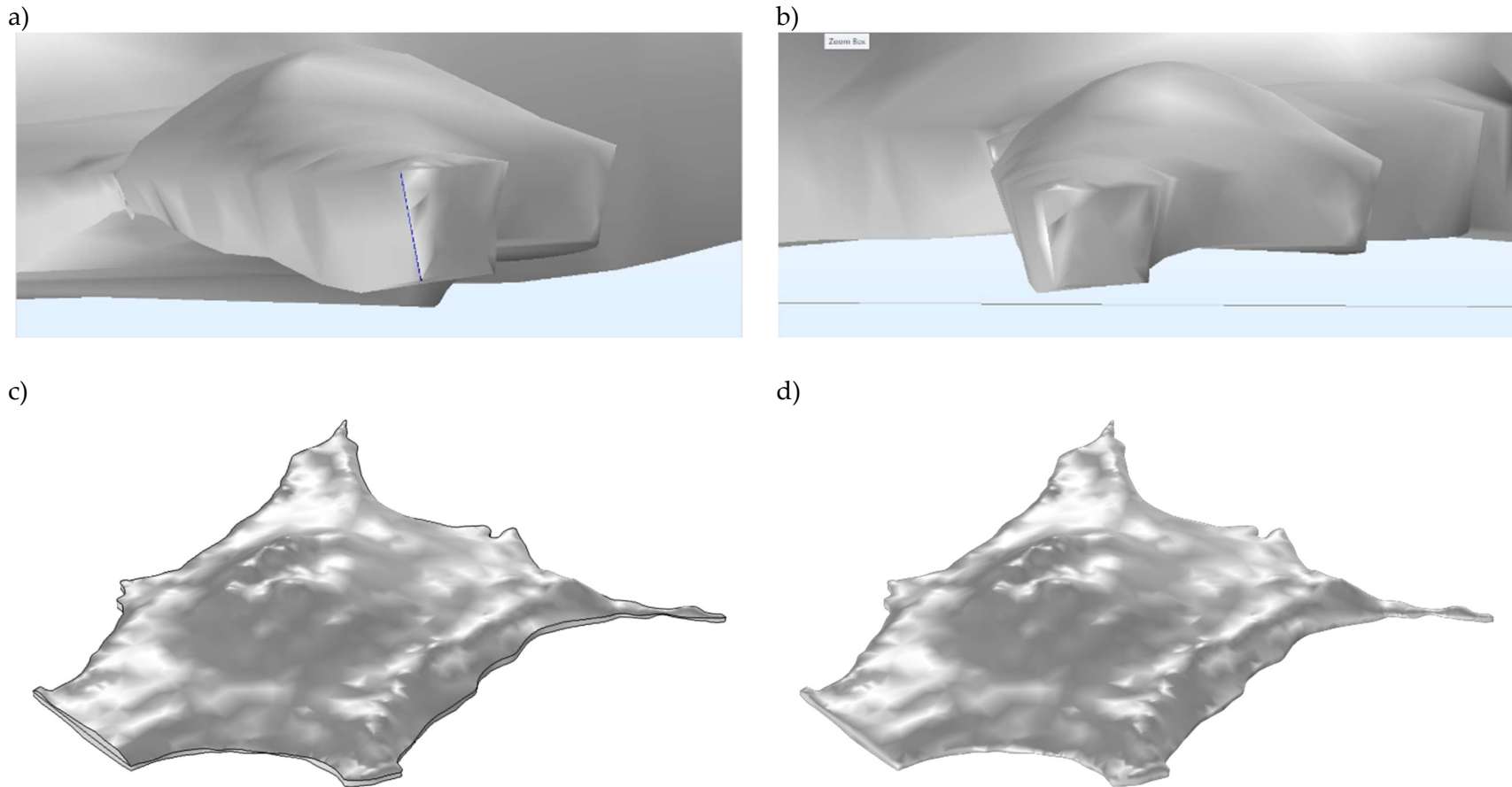
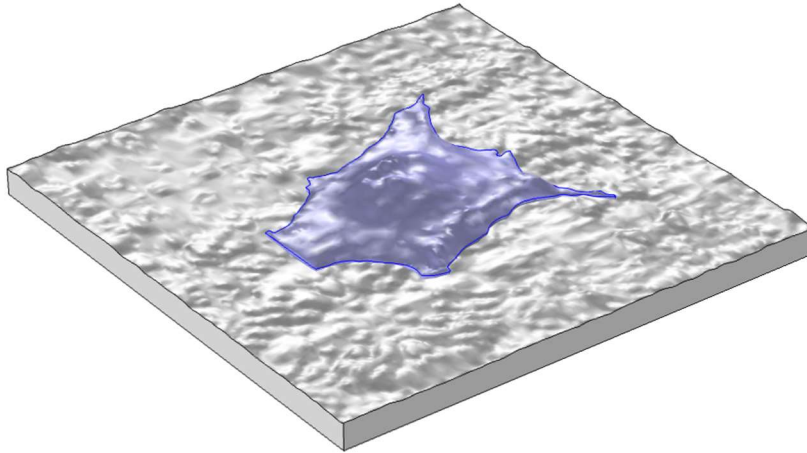


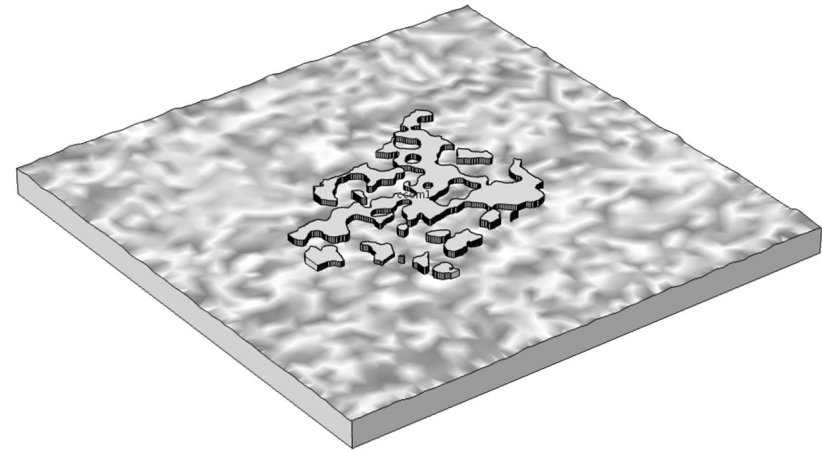
Figura VII-21. Reparación de defectos en la geometría. a) y c) Detalles de algunos defectos como bordes desconectados en la geometría de la célula importada a Comsol. b) y d) geometría reparada mediante la eliminación de vértices y operaciones virtuales.



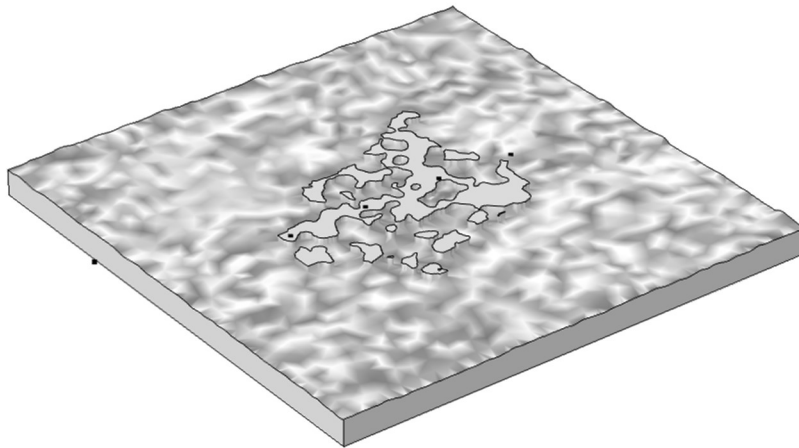
a) Superposición de las geometrías construidas



b) Geometría de los sitios de contacto sobre el eNTCPM



c) Geometría de los sitios de contacto sobre el eNTCPM (orgánico)



d) Ensamble de la geometría del sistema registro/estimulación

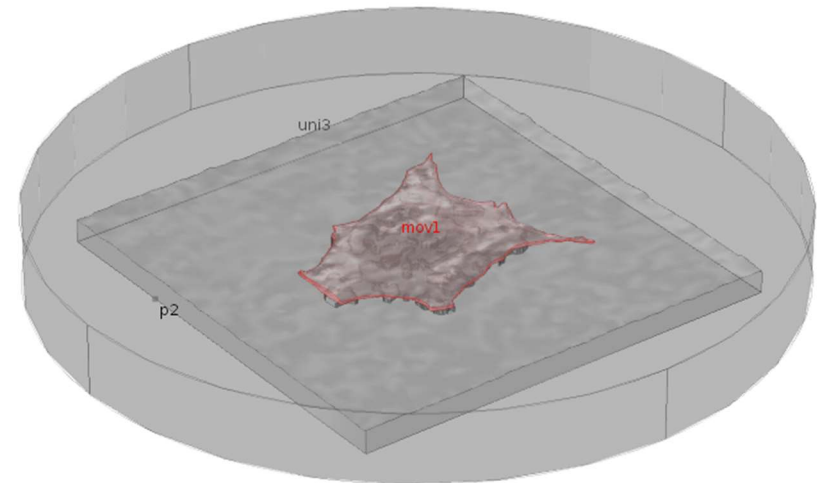


Figura VII-22. Ensamble del sistema de registro. a) Superposición de las geometrías reconstruidas, b) geometría generada para los sitios (áreas) de contacto entre ambas y c) su procesamiento con operaciones virtuales para reducir la complejidad de la malla. d) Ensamble de la geometría completa del sistema de registro; se muestran todas las geometrías embebidas en un cilindro que representa el medio extracelular.

### *Simulación de la actividad electrofisiológica de la célula*

En esta etapa las ecuaciones de Hodgkin y Huxley estándar, así como las modificadas para reproducir el comportamiento electrofisiológico de la célula NG108-15 fueron implementadas en el software de simulación sin asignarlas a una geometría. El resultado de la solución de las ecuaciones muestra claramente el disparo de un potencial de acción (Figura VII-23a, c) junto con su corriente iónica de célula completa asociada (Figura VII-23b, d); esta corriente presenta una deflexión negativa, asociada con la entrada de  $\text{Na}^+$  a la célula durante la fase de despolarización de la membrana, seguido por una deflexión positiva, asociada con la entrada de  $\text{K}^+$  a la célula durante la fase de repolarización de la misma. Como se observa en las figuras, existen diferencias en la morfología de las señales debido a los canales iónicos y parámetros que son considerados para reproducir el comportamiento electrofisiológico celular en cada modelo.

En la Figura VII-23e, f se muestra la simulación para el caso en que se tiene una célula NG108-15 marcapaso; es decir, que produce potenciales de acción espontáneos. En esta simulación se muestra el disparo de un tren de potenciales junto con sus corrientes iónicas de célula completa asociadas en un intervalo de 100 ms, la cual presenta el mismo comportamiento anteriormente descrito.

### *Simulación del sistema de estimulación por medio del eNTCPM*

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la simulación del sistema de estimulación por medio del electrodo y de la micropipeta. En una primera aproximación se implementaron las ecuaciones de Hodgkin-Huxley estándar (Ecuación VII-1) a una geometría sencilla (Figura VII-5) donde a la región del segmento inicial se asociaron las ecuaciones que reproducen el comportamiento no lineal, mientras que en el soma se asignaron únicamente las propiedades pasivas de la membrana. Posteriormente, estas mismas ecuaciones se asignaron a la geometría real construida. En el siguiente paso, las ecuaciones de Hodgkin-Huxley modificadas para reproducir el comportamiento electrofisiológico de las células NG108-15 fueron asignadas nuevamente tanto a la geometría sencilla como a la real repitiendo los mismos pasos.

Este procedimiento de modelar primero el sistema de estimulación con las ecuaciones de Hodgkin-Huxley estándar en ambas geometrías, permite evaluar el modelo ya que se obtiene una base para interpretar los resultados del modelo real, así como una idea cualitativa de que el software está comportándose de manera adecuada.

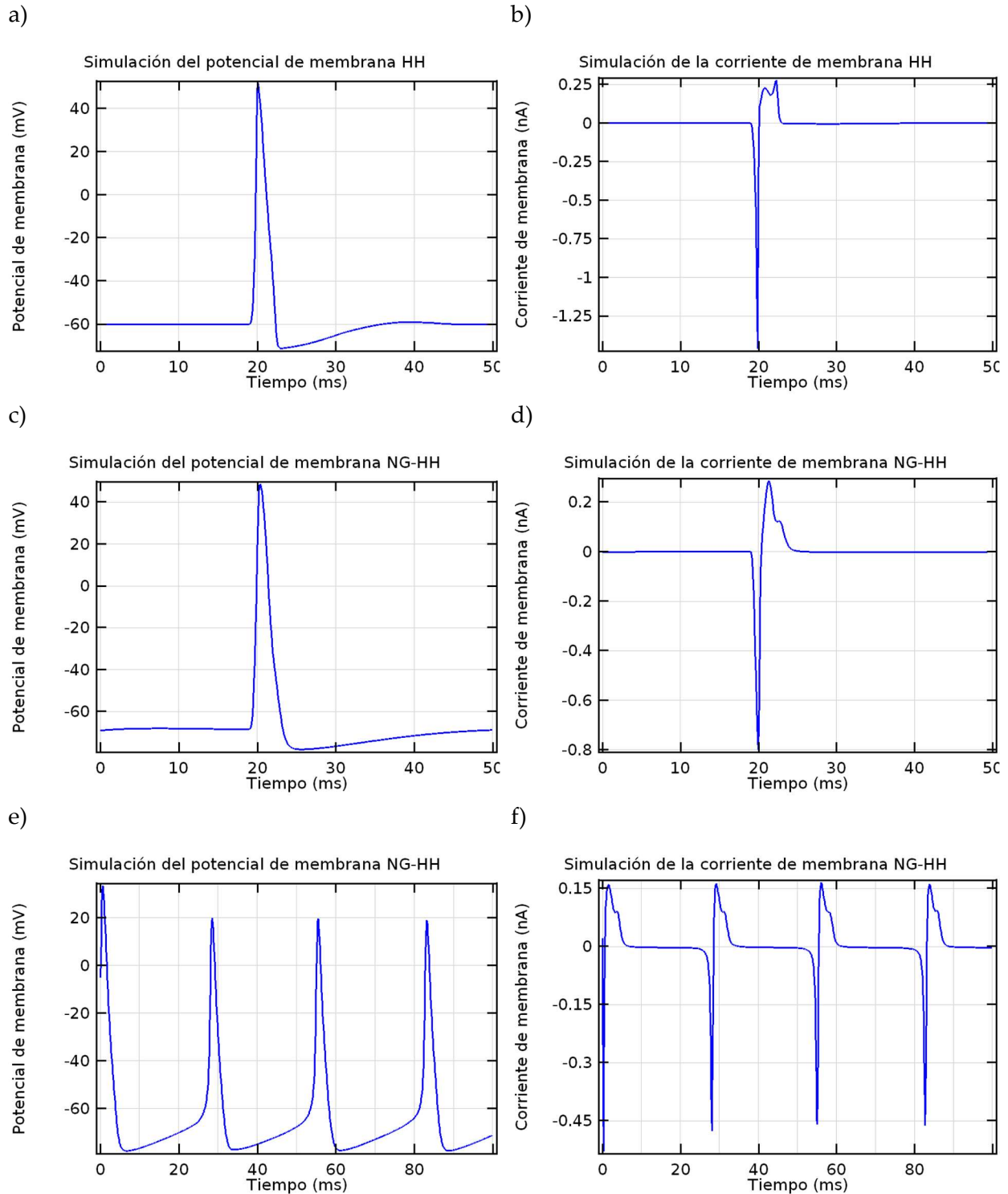


Figura VII-23. Simulación del modelo de Hodgkin y Huxley, así como su modificación ejecutada para reproducir el comportamiento electrofisiológico de la célula NG108-15 en Comsol. a), c) muestran un potencial de acción junto con su corriente iónica asociada b), d) para el modelo estándar y su modificación respectivamente, debida a un pulso de estimulación de corriente. e), f) muestran la simulación de la actividad electrofisiológica espontánea de una célula NG108-15 (caso excepcional).

## Modelo Hodgkin – Huxley estándar

## Geometría sencilla

*Estímulo mediante electrodo.* En este caso se simuló el potencial de acción y su corriente iónica asociada originado por un estímulo de voltaje aplicado mediante el electrodo. En la Figura VII-24a se muestra el potencial obtenido en dos puntos distintos sobre la membrana celular cercana al electrodo: el soma (trazo azul) y el segmento inicial (trazo rojo punteado). En el soma se presentan inicialmente los potenciales transitorios debidos a la respuesta de las propiedades pasivas de membrana al pulso de estimulación para inmediatamente después, observar como el potencial de acción originado en el segmento inicial hace que el potencial de membrana en el soma se modifique y adquiera la misma magnitud y curso temporal. En el segmento inicial por otro lado, se tiene un pequeño transitorio como respuesta al pulso de estimulación que alcanza el potencial umbral y dispara el potencial. Al respecto de las corrientes iónicas (Figura VII-24b) se tienen aquellas que corresponden a la respuesta de la región del soma (trazo azul) y del segmento inicial (trazo rojo punteado) al pulso de estimulación, para posteriormente presentar las corrientes asociadas al potencial de acción. Es evidente que las corrientes iónicas del soma tienen menor magnitud y presentan polaridad opuesta a las del segmento inicial. De manera singular se observa también que los trazos presentan diferencias morfológicas y temporales de los obtenidos en la simulación anterior; los cuales seguramente son producidos por la geometría.

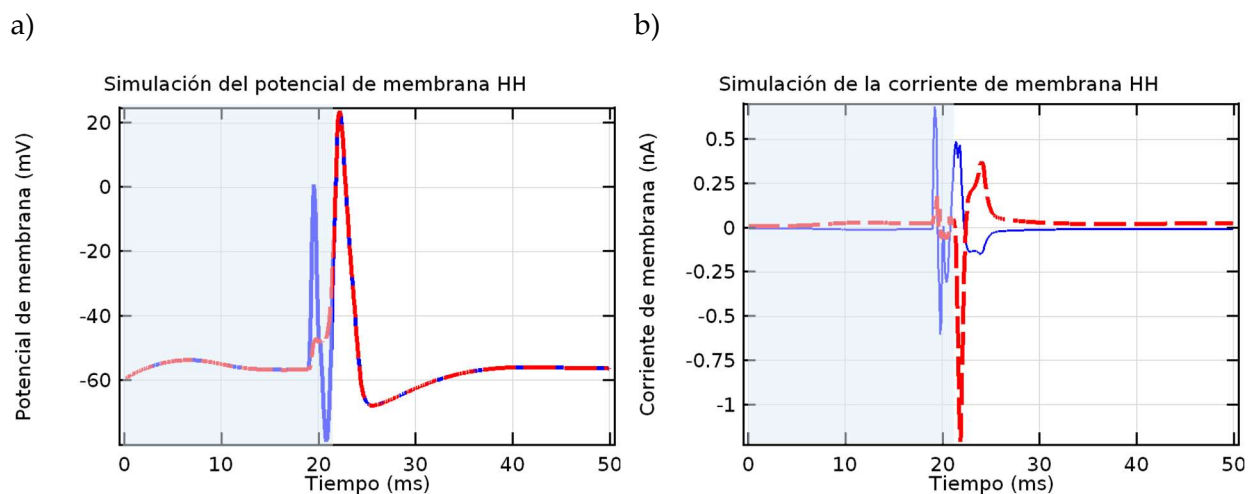


Figura VII-24. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial sobre la neurona para un estímulo en el electrodo; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de voltaje en el electrodo que genera un potencial de acción. En ambos, el trazo azul es la señal adquirida en el soma mientras que el trazo rojo punteado es la señal adquirida en el segmento inicial.

*Estímulo en neurona.* Por otra parte se muestra el potencial de acción y la corriente iónica de la célula asociada originado por un estímulo de corriente aplicado directamente en el soma. En este caso es posible observar en la Figura VII-25a que el cambio en el  $V_m$  tanto del soma (trazo azul) como del segmento inicial (trazo rojo punteado) se encuentran sincronizados; la pequeña

banda que se forma antes del disparo del potencial es debida al pulso de estimulación. La Figura VII-25b muestra nuevamente que las corrientes del soma tienen menor magnitud y presentan polaridad opuesta a las del segmento inicial pero no se tienen las irregularidades de las señales anteriores previo al disparo del potencial de acción. Esto indica, que dichas irregularidades son generadas por el tipo y el lugar donde se aplica el pulso de estimulación.

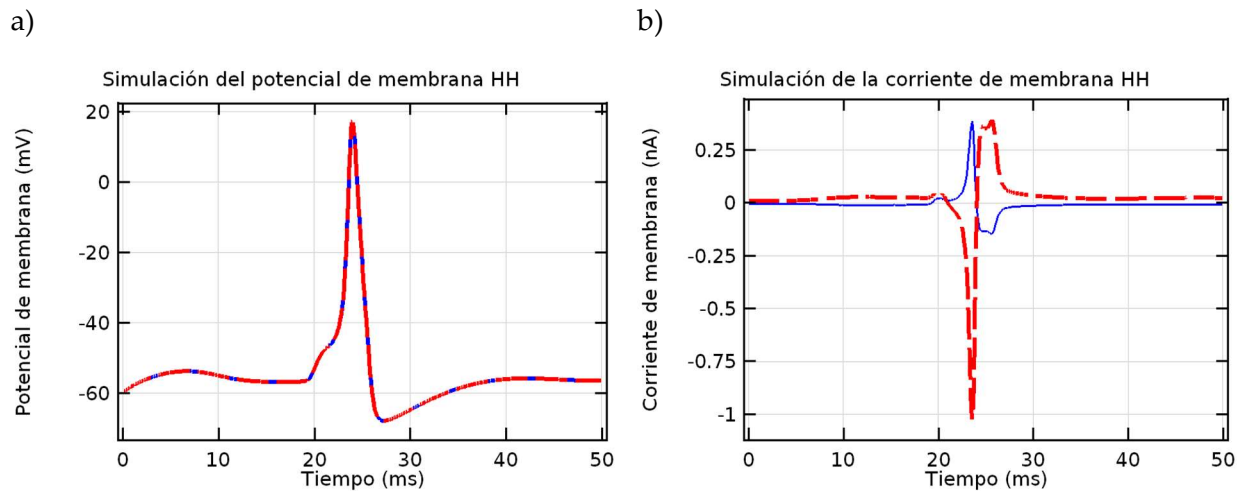


Figura VII-25. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo sobre la neurona; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de corriente sobre el soma de la neurona que genera un potencial de acción. En ambos, el trazo azul es la señal adquirida en el soma mientras que el trazo rojo punteado es la señal adquirida en el segmento inicial.

A continuación, se aplicó el mismo esquema de simulación para el modelado hecho con la geometría sencilla pero ahora sobre los resultados obtenidos de la construcción de la geometría realista. La Figura VII-26a muestra el esquema de estimulación mediante un pulso de voltaje a través del eNTCPM, mientras que la Figura VII-26b muestra la estimulación del sistema mediante un pulso de corriente aplicado directamente sobre el soma de la neurona.

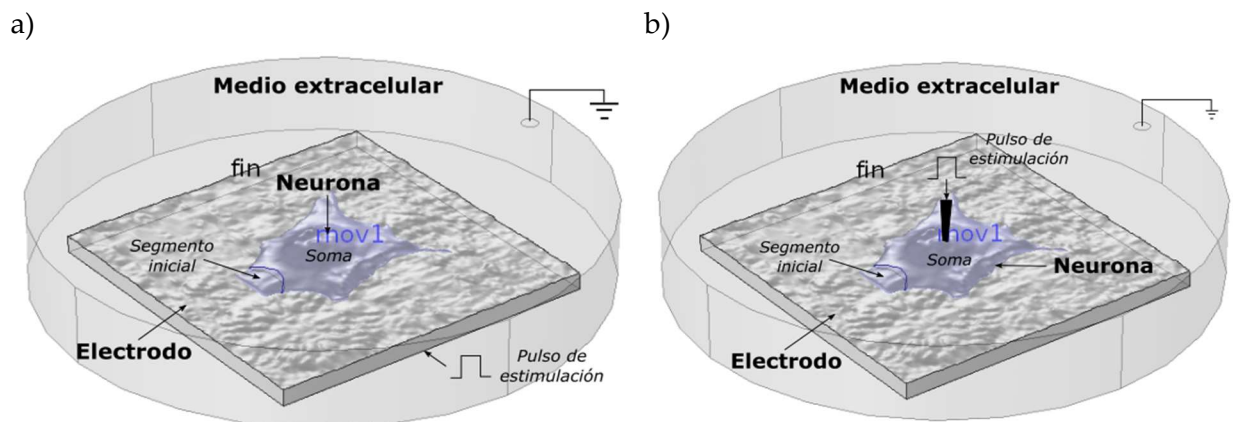


Figura VII-26. Esquema del modelado y la simulación para la estimulación neuronal en la geometría real. Por medio de a) un pulso de voltaje en el electrodo y b) un pulso de corriente en el soma empleando los resultados obtenidos en la construcción de la geometría realista.

Recordando que se muestran los resultados de la asignación de las ecuaciones de Hodgkin-Huxley estándar a esta nueva geometría.

#### Geometría real

*Estímulo mediante el eNTCPM.* La respuesta de la neurona al pulso de voltaje aplicado mediante el electrodo dispara de manera casi inmediata el potencial de acción, es apenas visible al inicio de éste el artefacto de estimulación generado (Figura VII-27a). A diferencia de la señal de la Figura VII-24 el Vm en ambas regiones se encuentra sincronizado en todo momento; sin embargo, la señal de la corriente iónica presenta notables diferencias. Al inicio de ambas corrientes se tienen las etapas ligadas al pulso de estimulación, pero como éste es muy cercano al disparo del potencial es difícil separarlas. Aun así, en la región del segmento inicial (trazo rojo punteado) es posible distinguir las corrientes asociadas a las dos fases predominantes del potencial de acción, pero en el soma no se tiene el comportamiento presentado anteriormente y apenas es notaria la corriente iónica en esta estructura (trazo azul).

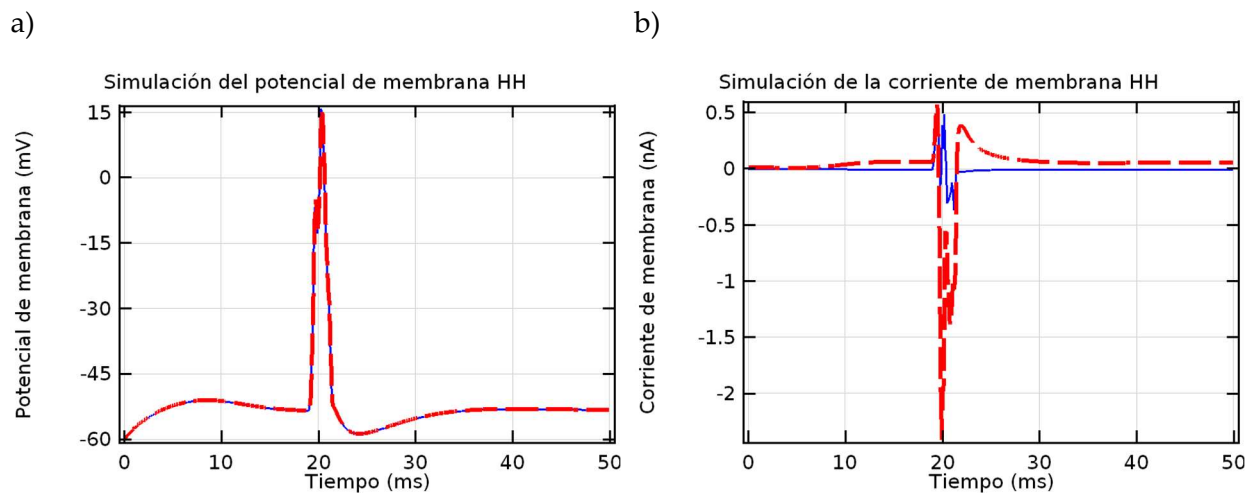


Figura VII-27. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial sobre la neurona para un estímulo en el electrodo; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de voltaje en el electrodo que genera un potencial de acción en la neurona. Trazo azul soma, trazo rojo punteado segmento inicial.

*Estímulo en neurona.* En cuanto a la estimulación aplicada directamente sobre la neurona se puede ver nuevamente la sincronización de ambos Vm (Figura VII-28a), mientras que la corriente iónica retoma el comportamiento observado de polaridad inversa soma-segmento inicial (Figura VII-28b); en esta simulación sin embargo, las corrientes del segmento inicial presentan una deflexión positiva diferente a comparación de las observadas en los casos anteriores.

#### Modelo NG-Hodgkin-Huxley modificado

Ahora con las mismas geometrías se implementaron los cambios en las ecuaciones de Hodgkin-Huxley para reproducir la actividad electrofisiológica específica para las células NG108-15 con las mismas condiciones de simulación anteriores.



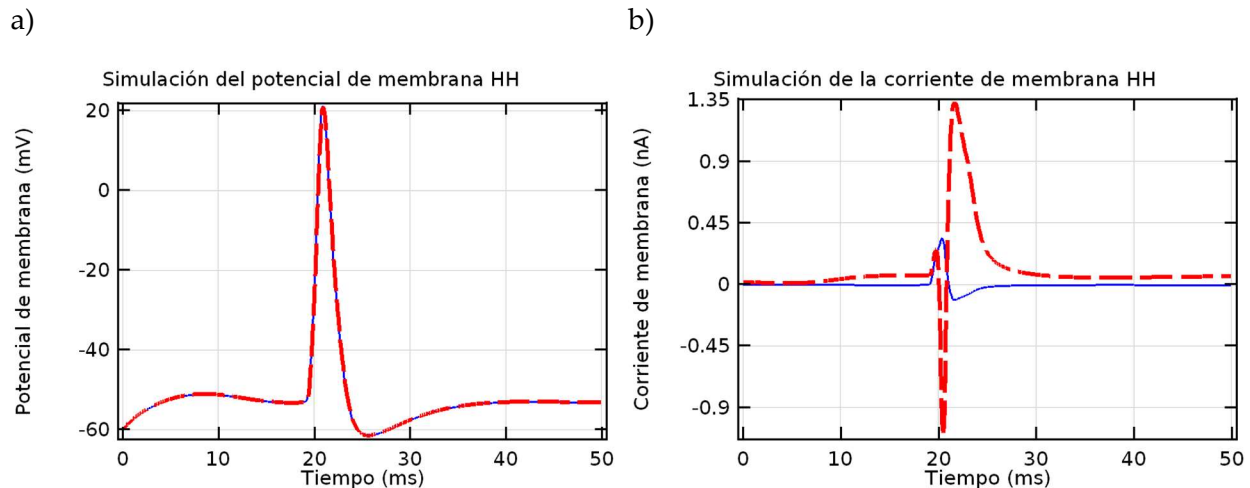


Figura VII-28. Gráficos del potencial de membrana y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo sobre la neurona; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de corriente sobre la neurona que genera un potencial de acción en la neurona. Trazo azul soma, trazo rojo punteado segmento inicial.

#### Geometría sencilla

*Estímulo mediante el electrodo.* En la estimulación realizada mediante el electrodo (Figura VII-29a), el soma presenta potenciales transitorios debidos a la respuesta de las propiedades pasivas de membrana (trazo azul), mientras que en el segmento inicial se tiene un pequeño transitorio que sigue al del soma como respuesta al pulso de estimulación; posteriormente y más separado de la estimulación, se alcanza el potencial umbral y se dispara el potencial de acción (trazo rojo punteado). De nuevo es posible observar como el potencial originado en el segmento inicial hace que el potencial de membrana en el soma se modifique y adquiera la misma magnitud y curso temporal.

Al igual que en la simulación anterior se tienen corrientes como respuesta al pulso de estimulación para posteriormente presentar las corrientes iónicas asociadas al potencial de acción del soma (trazo azul) y el segmento inicial (trazo rojo punteado Figura VII-29b). En este caso fue necesario aplicar un pulso de estimulación de mayor magnitud y duración para poder provocar la respuesta celular; además, es claro que el potencial tiene menor amplitud y mayor duración que los obtenidos anteriormente. De igual manera, las corrientes presentan el mismo comportamiento, pero sus características de amplitud y duración también se ven modificadas. Este cambio se puede asociar tanto a la geometría como a la diferencia en las ecuaciones del modelo.

El modelado y la simulación por el MEF permiten asociar ecuaciones a una gran variedad de geometrías con la posibilidad de obtener la solución de estas en el tiempo y el espacio.

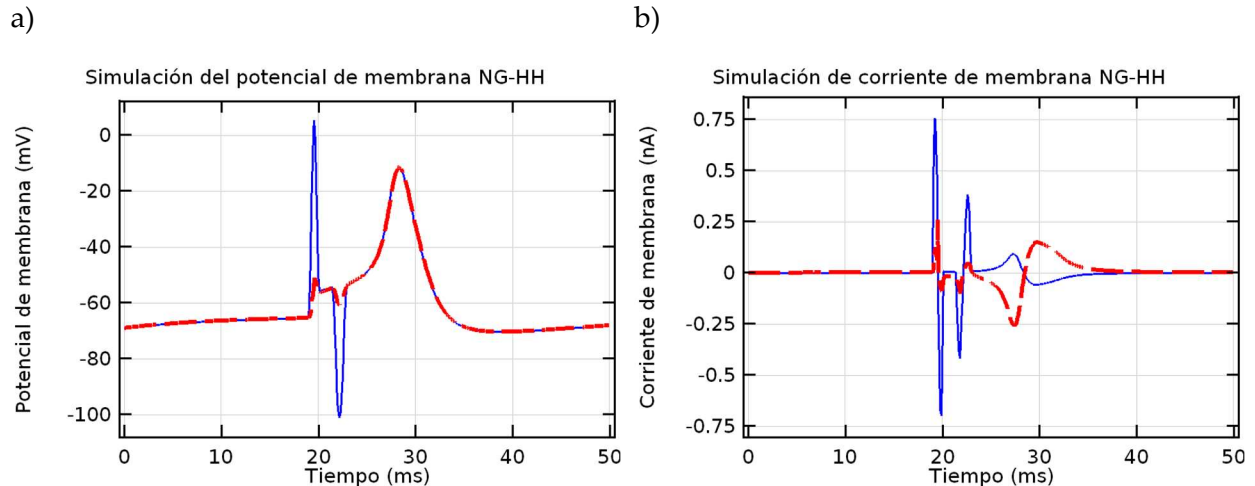


Figura VII-29. Gráficos del  $V_m$  y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial en la neurona para un estímulo en el electrodo; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de voltaje en el electrodo que genera un potencial de acción. En ambos el trazo azul es la señal adquirida en el soma mientras que el trazo rojo punteado es la señal adquirida en el segmento inicial.

En las siguientes figuras se muestra el poder de este método al graficar el comportamiento de la corriente y el voltaje en el sistema. En la Figura VII-30a se muestra la distribución del potencial, el sentido y la ruta de las corrientes en el sistema antes del pulso de estimulación mediante el electrodo.  $V_{ME}$  es el valor del potencial en el medio extracelular y como se observa en la escala de colores, la magnitud puede variar dependiendo la posición y las condiciones de frontera en la que se encuentre.

A pesar de tener distintos valores en diferentes zonas, el potencial del medio extracelular aquí se encuentra cercano a cero. En cuanto al  $V_m$  en el soma ( $V_m_{\text{soma}}$ ) y en el segmento inicial ( $V_m_{\text{segmento inicial}}$ ), este se encuentra en  $-65.5$  mV el cual es el potencial de membrana en reposo. Las flechas indican un pequeño flujo de corriente hacia afuera en el caso del segmento inicial y hacia adentro en el soma, mientras que las líneas amarillas muestran la ruta que sigue la corriente en ese instante de tiempo en el sistema.

En la Figura VII-30b se tiene el instante en el cual el pulso de estimulación llega a su máxima amplitud en este caso es posible observar que las corrientes del soma y el segmento inicial son salientes (tangenciales) y que junto con el punto del medio extracelular aterrizado fluyen hacia el electrodo. El potencial en el medio extracelular ya no es cero y los  $V_m$  también se modifican alejándose del potencial de reposo.

Finalmente, en la Figura VII-30c se muestran estos cambios cuando la neurona dispara un potencial de acción. Se observa que el potencial en el medio extracelular es casi cero mientras que los  $V_m$  en el soma y el segmento inicial se encuentran en el máximo valor (pico del potencial). Aquí las corrientes en el segmento inicial son entrantes mientras que en el soma son salientes.

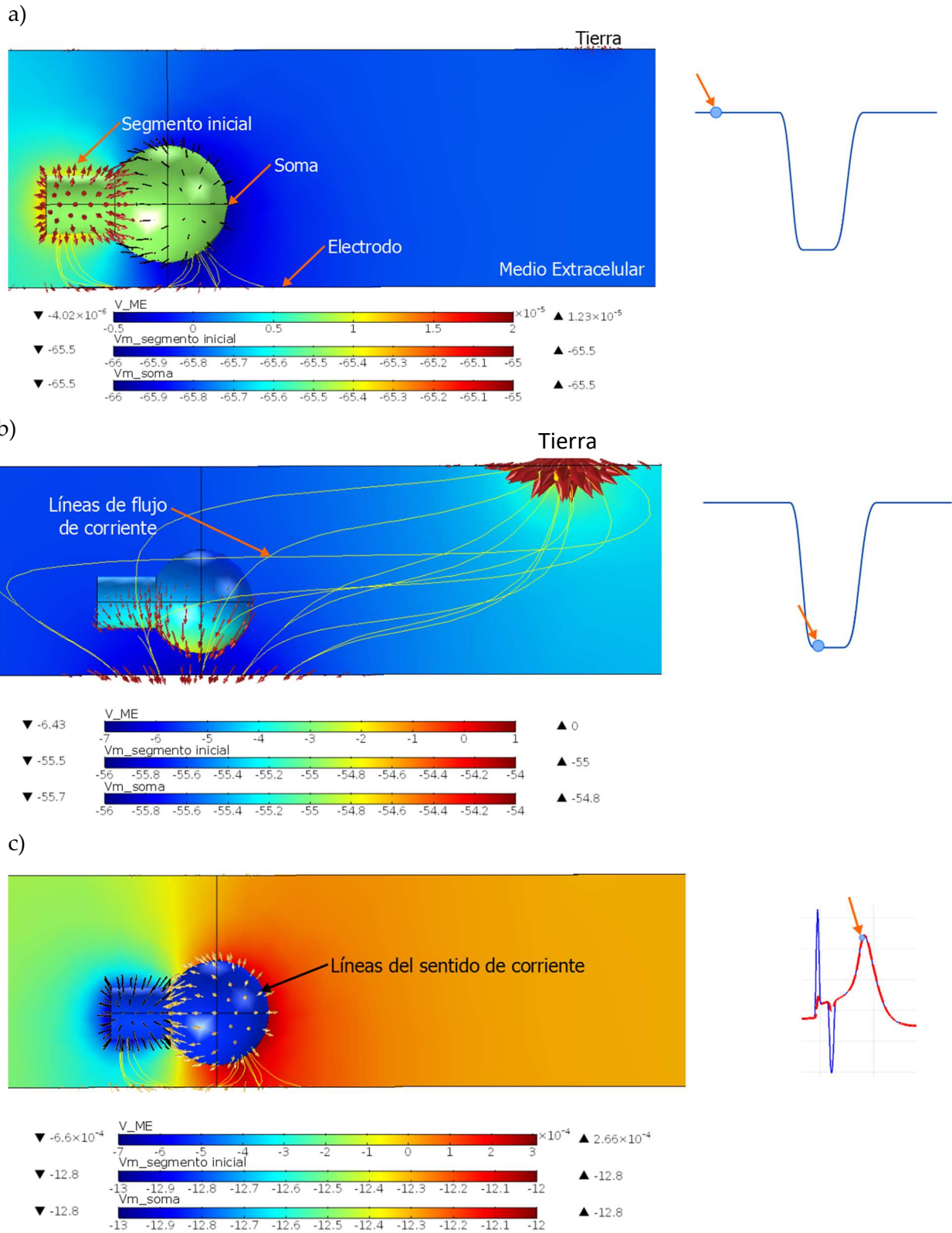


Figura VII-30. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo en el electrodo; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) Sistema antes de

aplicar el pulso de estimulación, b) sistema cuando el pulso de estimulación alcanza la máxima amplitud y c) sistema cuando la neurona dispara el potencial de acción.

*Estímulo en neurona.* Para el caso de la simulación donde se estimula con un pulso de corriente directamente en la neurona (Figura VII-31a) se observa también que el Vm del soma y del segmento inicial mantienen las características morfológicas y la sincronización previamente observada (Figura VII-25a); sin embargo, para lograr este comportamiento, donde además se tiene menor amplitud en el potencial de acción, fue necesario aplicar mayor magnitud al pulso de estimulación que para el caso anterior (ecuaciones de Hodgkin-Huxley estándar). El comportamiento de las corrientes iónicas es acorde con los cambios del potencial, pero se mantiene la misma tendencia de polaridad inversa entre las corrientes del soma y del segmento inicial (Figura VII-31b).

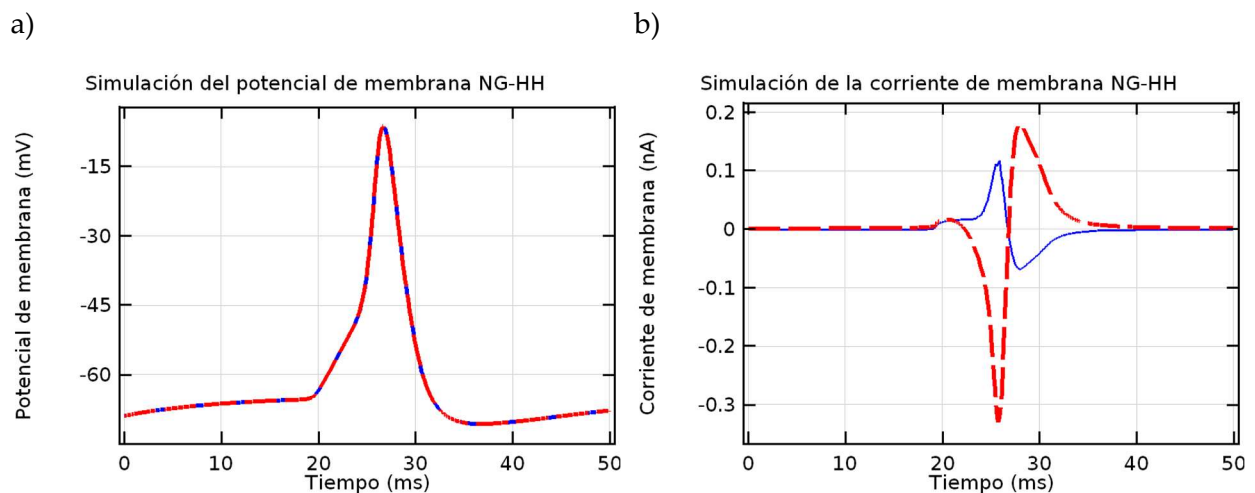


Figura VII-31. Gráficos del Vm y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo en la neurona; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de corriente sobre la neurona que genera un potencial de acción. En ambos el trazo azul es la señal adquirida en el soma mientras que el trazo rojo punteado es la señal adquirida en el segmento inicial.

De igual manera que en la simulación anterior, se muestra el comportamiento de las corrientes y los potenciales del sistema de estimulación por corriente. En la Figura VII-32a se tiene el sistema antes de aplicar el pulso de estimulación.

En esta imagen se muestra que el potencial del medio extracelular es cercano a cero y que el Vm del soma y el segmento inicial se encuentran cercanos al valor de reposo. También se observa que las corrientes en el soma y el segmento inicial son salientes (tangenciales) y fluyen hasta el punto donde se envía el medio extracelular a tierra. Una vez que el pulso de corriente es aplicado (Figura VII-32b), el potencial del medio extracelular, así como los Vm incrementan ligeramente y las corrientes en ambas partes de la neurona son salientes y fluyen hacia tierra. Finalmente, cuando el Vm se encuentra en el valor máximo del potencial de acción el potencial en el medio extracelular es de nuevo cercano a cero mientras que los Vm se encuentran en su máximo

valor. En esta ocasión, las corrientes del segmento inicial son entrantes mientras que las del soma son salientes (Figura VII-32c).

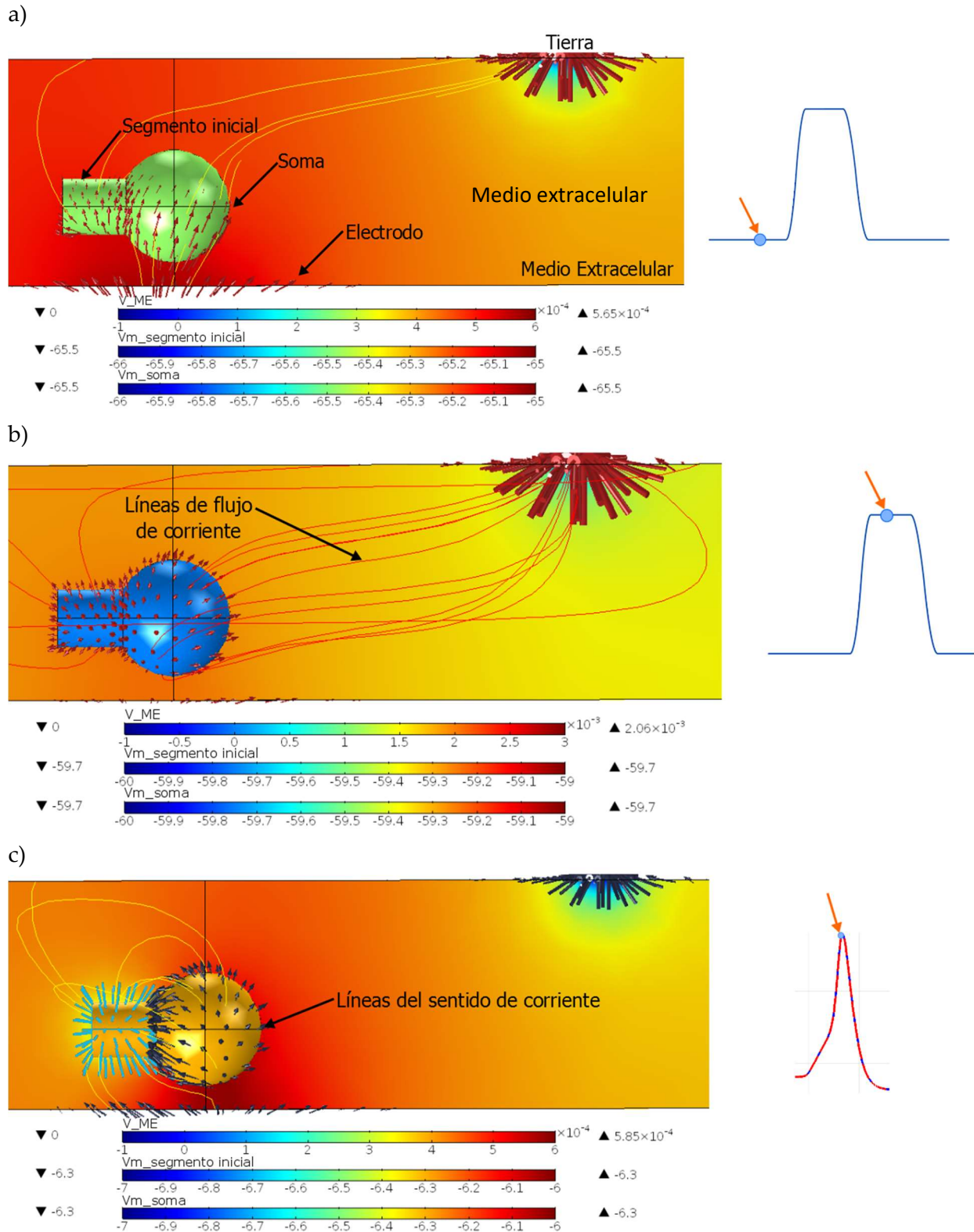


Figura VII-32. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo en la neurona; geometría sencilla y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) Sistema antes de aplicar el pulso de estimulación, b) sistema cuando el pulso de estimulación alcanza la máxima amplitud y c) sistema cuando la neurona dispara el potencial de acción.



### Geometría real

*Estímulo mediante el eNTCPM.* En este sistema, la estimulación con el pulso de voltaje mediante el eNTCPM fue relativamente complicada, y se tuvo que aplicar un pulso de mayor duración y amplitud por lo que en la Figura VII-33a es difícil observar el potencial de acción ya que está mezclado con el pulso de estimulación. De igual manera en este caso es muy difícil observar las corrientes iónicas correspondientes a las etapas principales del potencial (Figura VII-33b).

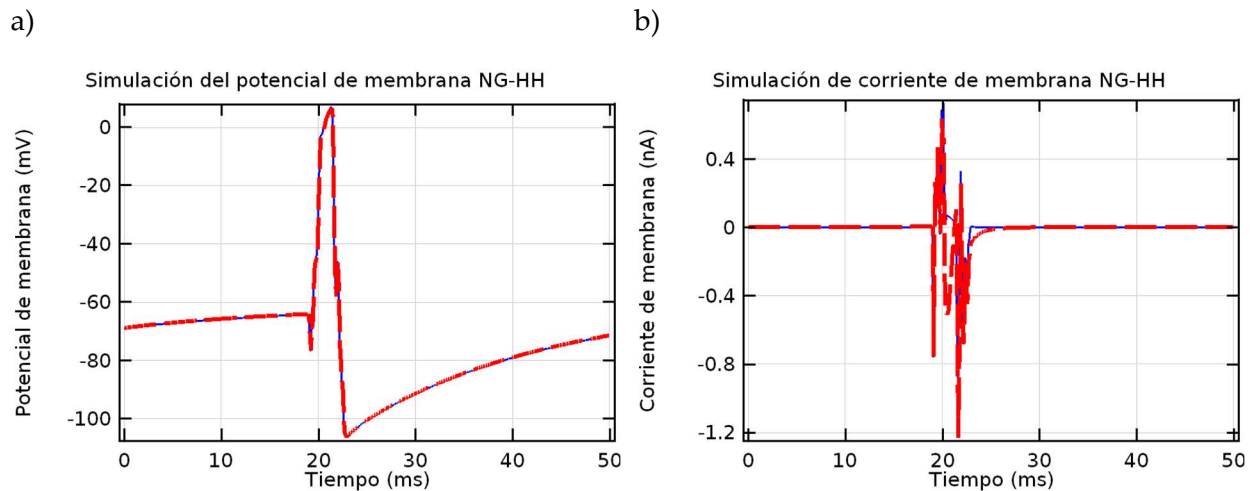


Figura VII-33. Gráficos del  $V_m$  y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial en la neurona para un estímulo en el electrodo; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de voltaje en el electrodo que genera un potencial de acción en la neurona. Trazo azul soma, trazo rojo punteado segmento inicial.

Ahora con la geometría real el sistema se comporta diferente, antes del pulso de estimulación el potencial de medio extracelular es cercano a cero, así como los  $V_m$  se encuentran cerca del potencial de reposo. En este caso, aunque apenas perceptible, las corrientes en el soma son entrantes mientras que en el segmento inicial son salientes. El electrodo al tener un volumen, presenta un comportamiento distinto, mostrando que las corrientes fluyen hacia el punto de aplicación del voltaje (Figura VII-34a).

En la Figura VII-34b se tienen encimados los puntos de la máxima amplitud del pulso de estimulación y el máximo valor del potencial de acción, en este caso, la geometría cambia las condiciones del sistema y es por ello que se puede observar como ciertas regiones del soma o del segmento inicial adquieren el valor máximo del potencial mientras otras regiones tienen un potencial menor; esto sin embargo, también se ve afectado por la duración del pulso por lo que no es posible establecer una conclusión clara. También se observa que aun cuando la corriente fluye desde tierra hacia el electrodo, la mayor cantidad de ésta fluye desde tierra a la zona más cercana del electrodo.

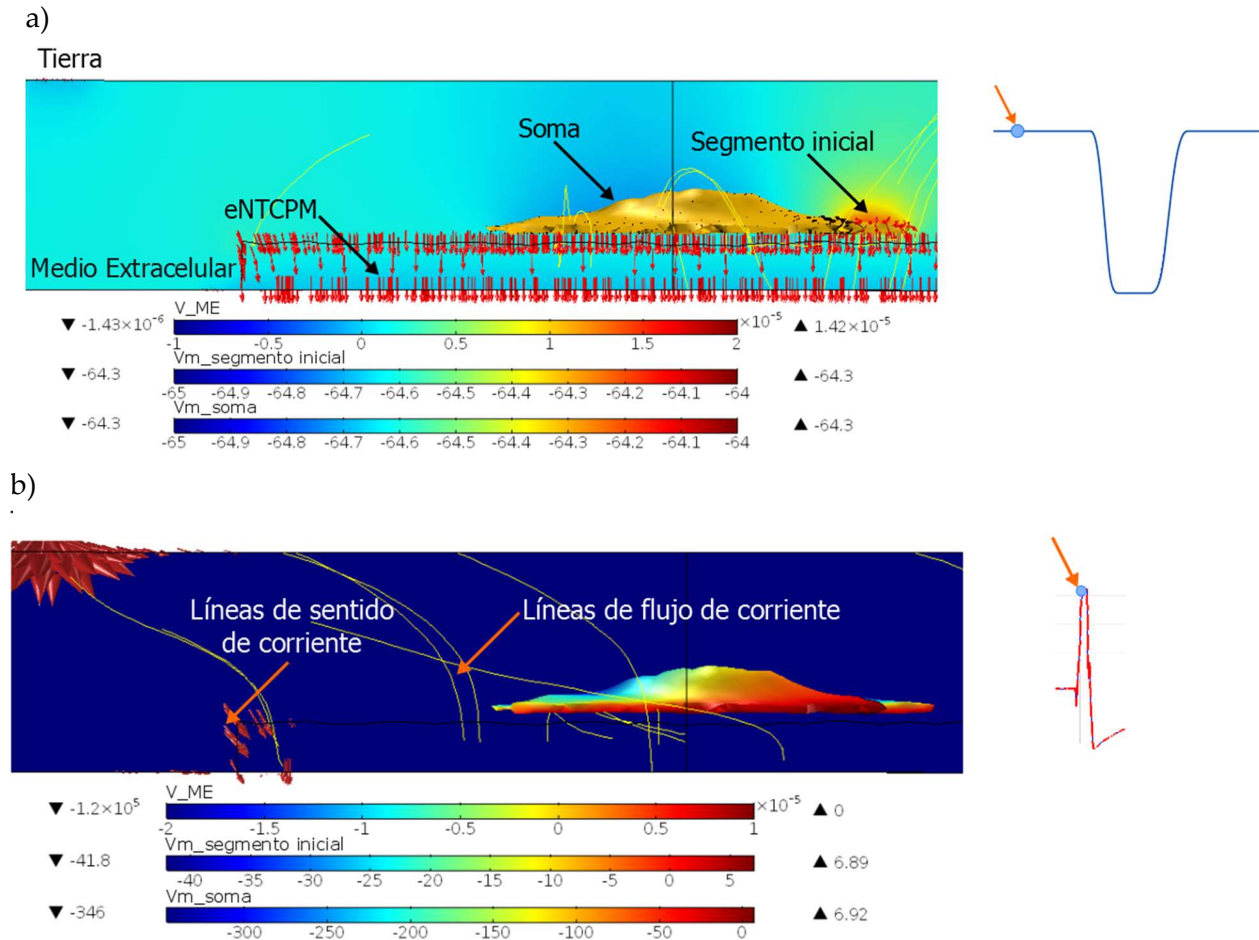


Figura VII-34. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo en el electrodo; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) Sistema antes de aplicar el pulso de estimulación, b) sistema cuando el pulso de estimulación la máxima amplitud y la neurona dispara el potencial de acción.

*Estímulo en neurona.* La estimulación con el pulso de corriente directamente sobre la neurona generó un potencial de acción (Figura VII-35a) muy similar a los obtenidos de manera experimental (Figura VIII-6b) donde nuevamente el Vm del soma (trazo azul) y el segmento inicial (trazo rojo punteado) se encuentran sincronizados. Por otro lado, las corrientes iónicas si presentan diferencia al respecto de las experimentales; para esta simulación se observa una despolarización rápida lo que genera una corriente entrante, pero la repolarización es lenta y con amplitud elevada.

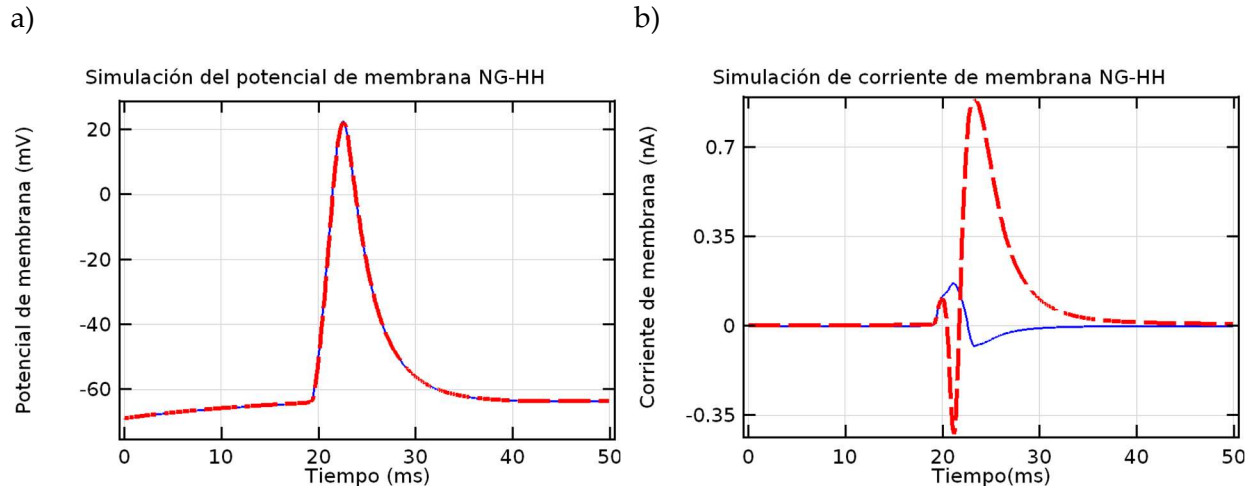


Figura VII-35. Gráficos del  $V_m$  y la corriente de membrana en un punto del soma y del segmento inicial para un estímulo sobre la neurona; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) y b) muestran el potencial y la corriente de membrana, en su respectiva localización, al aplicar un estímulo de corriente sobre la neurona que genera un potencial de acción. En ambos el trazo azul es la señal adquirida en el soma mientras que el trazo rojo punteado es la señal adquirida en el segmento inicial.

En la Figura VII-36a se tiene nuevamente el sistema antes de aplicar el pulso de estimulación donde el potencial en el medio extracelular es próximo a cero mientras que los  $V_m$  son cercanos al potencial de reposo. Existe un flujo de corriente tangencial sobre la superficie del electrodo hacia el punto del medio extracelular a tierra y no es posible distinguir la dirección de las corrientes de membrana en el soma o el segmento inicial. Cuando se aplica el pulso (Figura VII-36b) los  $V_m$  así como el potencial del medio extracelular comienzan a cambiar lo que origina que exista un flujo de corriente de la célula al punto a tierra y que las corrientes del segmento inicial sean entrantes, mientras las del soma son salientes (con mayor presencia en la región cercana al electrodo), también se observa que estas corrientes se dirigen hacia el electrodo y circulan por la superficie de manera tangencial hasta que salen del electrodo con dirección al punto del medio extracelular a tierra. Finalmente, cuando se alcanza la amplitud máxima del potencial de acción, el  $V_m$  alcanza su máximo valor, las corrientes del segmento inicial son salientes mientras las del soma no se alcanzan a distinguir y nuevamente se observan corrientes tangenciales sobre la superficie del electrodo que salen en la región cercana del punto a tierra en el medio extracelular (Figura VII-36c).

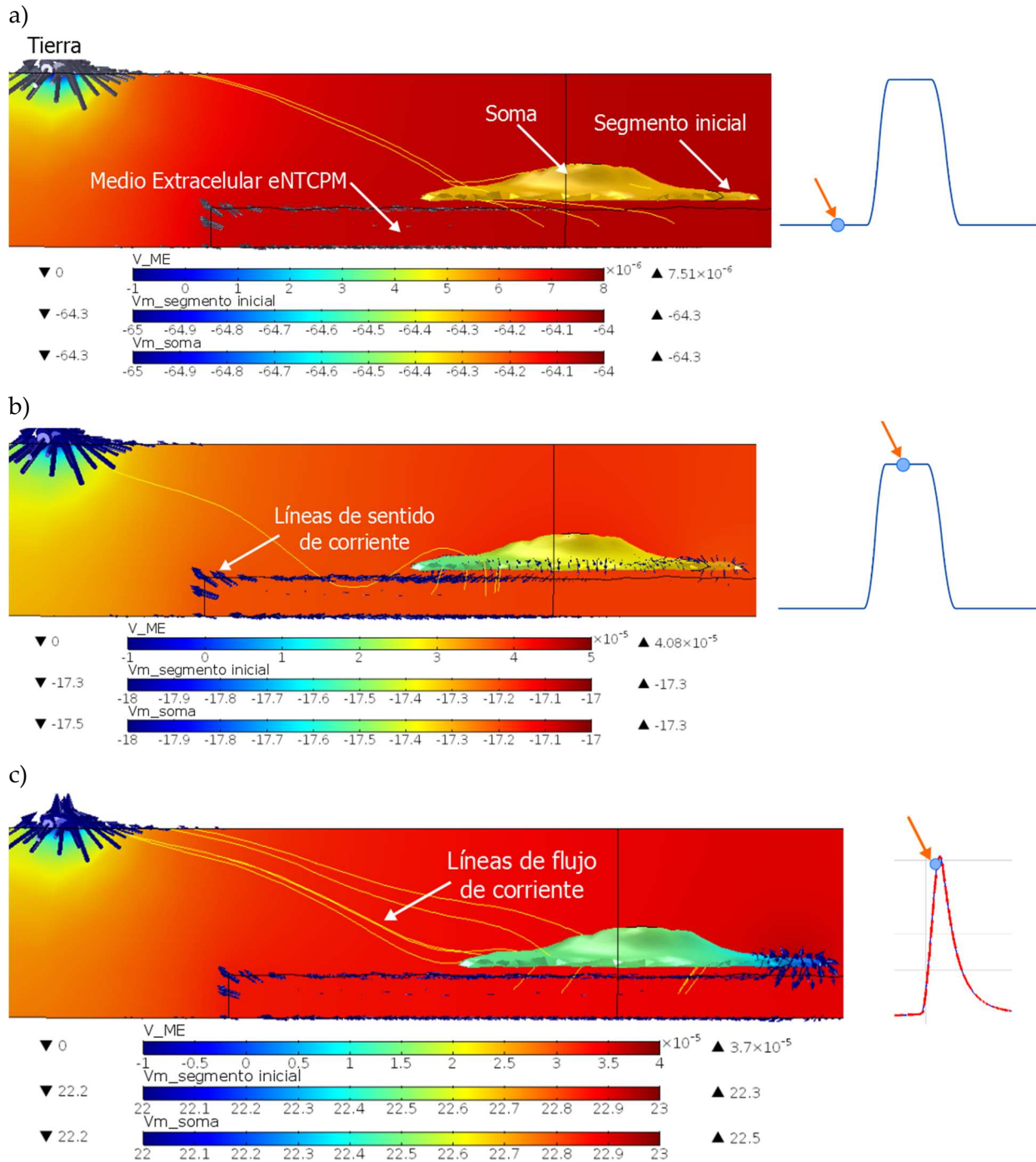


Figura VII-36. Comportamiento del voltaje en el medio extracelular, sentido y flujo de las corrientes en el sistema para un estímulo sobre la neurona; geometría real y modelo de Hodgkin-Huxley modificado. a) Sistema antes de aplicar el pulso de estimulación, b) sistema cuando el pulso de estimulación la máxima amplitud y la neurona dispara el potencial de acción.

## Discusión

### *Cultivo de la línea celular NG108-15 en controles y sobre el eNTCPM*

Para el cultivo celular se procuró sembrar aproximadamente la misma cantidad de células tanto en la caja Petri (control) como en el eNTCPM con el fin de evaluar, aunque de manera cualitativa, las características de crecimiento de la población celular (número y forma) durante sus etapas de proliferación y diferenciación. El cultivo celular obtenido sobre el eNTCPM fue similar al adquirido en la caja Petri (control) respecto a la adhesión y la proliferación celular tal que, fue posible cubrir la superficie del electrodo con células NG108-15 dentro de pocos días de cultivo; lo cual, es un buen indicador de su biocompatibilidad (Figura VII-7).

### *Caracterización de la línea celular cultivada en controles y sobre el eNTCPM (morfológica)*

La caracterización de las células control (caja Petri) mediante AFM, permite adquirir los detalles estructurales y dimensiones reales de las células cultivadas sobre un sustrato plano. En complemento con las imágenes de microscopía óptica se puede apreciar que las células adoptaron distintas morfologías y por lo tanto los diámetros y las alturas variaron también, pero en todos los casos se observa que éstas desarrollaron una extensa y compleja red de neuritas que las conectaban entre sí y con otros grupos celulares más alejados.

Por otra parte, las imágenes SEM y AFM de las células cultivadas sobre el eNTCPM muestran que éstas tienen buena adherencia con la superficie fibro-rugosa nano estructurada de la película de NTCPM, y que para esto desarrollan filopodios a lo largo del cuerpo celular y de las neuritas similares a los observados en otros tipos de sustratos (Timko, Cohen-Karni, Qing, Tian, & Lieber, 2010), (Kotov *et al.*, 2009), (Xie, Chen, Varadan, Yancey, & Srivatsan, 2008). Además, es muy probable que el cuerpo celular o soma así como las neuritas crecieran y se extendieran sobre los NTCPM individuales y/o los nanopicos orientados de manera vertical.

Finalmente se repite la caracterización por espectroscopia Raman para identificar si el proceso de cultivo o la célula misma modificó la superficie del eNTCPM. La relación  $I(G/D)$  muestra que su valor antes y después del cultivo varía debido a la interacción de los NTCPM con la célula. Por otra parte, las bandas D y G se desplazan ligeramente además de que aparecen otras bandas correspondientes a la célula (proteínas). En general se puede concluir que las variaciones son pequeñas y que no representan alteraciones importantes pues sus rasgos característicos se mantienen, lo que indica que los NTCPM no sufrieron modificación alguna durante este proceso.

Gracias a estos resultados se especula que con dichos elementos se consigue un contacto inmediato con la membrana celular; disminuyendo así, la distancia o el espacio entre la célula y el electrodo. Este acercamiento reduce la resistencia eléctrica/iónica mejorando así la conductividad eléctrica y permitiendo la obtención de registros electrofisiológicos con alta calidad (Blau, 2013), (Bulai *et al.*, 2012), (Brüggemann *et al.*, 2011).

### *Construcción geométrica de la célula*

La información sobre la morfología y los detalles estructurales y dimensionales adquiridos con AFM fue aprovechada para construir una geometría realista de la célula NG108-15, que posteriormente sería utilizada para simular su comportamiento electrofisiológico. Como las imágenes AFM dan información superficial en general, fue necesario segmentarla para poder aislar una célula además de suponer que la parte inferior de ésta adoptó la morfología del sustrato de cultivo; es por esto que la construcción geométrica involucró el procesamiento de la unión de los detalles superficiales celulares con los del sustrato de cultivo (previamente adquiridos). Al ser una geometría digital es importante mencionar que ésta puede ser tratada con la finalidad de reducir, resaltar o agregar los detalles necesarios para adecuarla a los requerimientos de la simulación.

### *Construcción geométrica de los sitios de contacto célula/electrodo y del sistema de estimulación por medio del eNTCPM*

Finalmente, para modelar el sistema de registro/estimulación mediante el eNTCPM se realiza el ensamble de las geometrías del electrodo, la célula y el medio extracelular (representado por un cilindro). Previo a esto los sitios o zonas de contacto entre el electrodo y la célula se determinaron en base a la cercanía de ambas geometrías y se resaltaron sobre la superficie del electrodo. Estos sitios representan las zonas donde hay mayor presencia de nanopicos o NTCPM orientados de manera vertical. El ensamble representa una simplificación del sistema real limitado a una sola célula y una extensión pequeña del eNTCPM ya que la idea inicial del proyecto es entender lo que sucede en la interfase originada entre estas dos entidades, pero puede ser ampliado mediante la adición o acople de más células, modificaciones en el área del electrodo, en su geometría, etc., todo esto claro con un coste computacional extra.

### *Caracterización de la línea celular cultivada en controles y sobre el eNTCPM (electrofisiológica)*

Con las técnicas estándar de "Patch Clamp" se analizaron y compararon los registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas entre las células cultivadas sobre el eNTCPM y las cajas de Petri (controles); el resultado fue que no se encontraron diferencias significativas entre éstas. Posteriormente, se realizó la comparación del análisis cuantitativo del desempeño de los canales iónicos voltaje dependientes mediante la construcción de las curvas de conductancia del  $V_m$ . De nuevo, no se encontraron diferencias significativas en la conductancia de potasio ( $gK^+$ ) o en la de sodio ( $gNa^+$ ). Esto indica que ni la conductancia dependiente del voltaje para el sodio ( $gNa^+$ ), la cual es vital para la fase de despolarización, ni la de potasio ( $gK^+$ ) la cual es importante para la fase de repolarización del potencial de acción fueron afectadas por los NTCPM. Con estos resultados podemos decir que el electrodo tiene buena biocompatibilidad estructural y funcional con las células NG108-15.

Cabe mencionar que en la generación de potenciales de acción, las células NG108-15 no muestran una población eléctricamente homogénea (Liu *et al.*, 2012), algunas veces las células



cultivada en las cajas Petri (control) presentaban un potencial de acción lento y otras uno rápido. También, cuando las corrientes iónicas fueron analizadas se encontraron tres escenarios de conductancia diferentes: muy baja, normal y muy alta. El comportamiento electrofisiológico de las células cultivadas sobre el electrodo presentó las mismas características.

#### *Estímulo extra e intracelular de la línea NG108-15 cultivada sobre el eNTCPM*

Los experimentos de estimulación celular mediante dos tipos de electrodos: el electrodo de alambre de plata (Ag/AgCl) y el eNTCPM, mostraron que ambos son capaces de provocar una respuesta celular (potenciales de acción); sin embargo, es debido a las características específicas de este último que la magnitud del pulso de estimulación requerida para lograrla es mucho menor que la necesaria para el electrodo de alambre de plata. Esto ciertamente se relaciona con la cercanía de los electrodos a la célula pero se le atribuye primordialmente a las características de adhesión e interacción celular con la superficie del eNTCPM específicamente.

Es importante mencionar que la diferencia en la magnitud del potencial de acción entre ambos registros bien puede deberse al comportamiento electrofisiológico específico de cada célula en lugar de a la magnitud del estímulo requerido para provocarlo.

#### *Simulación de la actividad electrofisiológica de la célula*

Inicialmente se introdujeron las ecuaciones de Hodgkin y Huxley así como las modificadas para reproducir el comportamiento electrofisiológico de la célula NG108-15 en el software de simulación sin asignarlas a una geometría. Esta simulación reproduce tanto el potencial de acción como la corriente iónica de la célula. Es importante notar que existe una ligera diferencia morfológica en las señales del potencial y las corrientes entre el modelo de Hodgkin y Huxley y el modificado para reproducir la célula NG108-15. Esta diferencia se origina debido a los potenciales de equilibrio, las conductancias y los canales iónicos presentes en los modelos.

Además, se simuló el caso especial de una célula autoexcitable donde se producen potenciales de acción, con sus corrientes iónicas, de manera espontánea. Este resultado como se verá más adelante, es similar al caso excepcional observado en una célula NG108-15 que disparaba potenciales de manera espontánea.

#### *Simulación del sistema de estimulación por medio del eNTCPM*

Para esta simulación se realizaron dos esquemas que utilizaban las ecuaciones de Hodgkin-Huxley sin modificar o estándar y las modificadas para reproducir el comportamiento de las células NG108-15. Este esquema a su vez, se dividió en una geometría sencilla y otra real donde el estímulo provenía primero del electrodo y después directamente de la célula. La intención de esto fue comprobar con las ecuaciones estándar y una geometría sencilla, que los resultados eran acorde con lo esperado o reportado en literatura para un estímulo de voltaje aplicado mediante el electrodo y un estímulo de corriente aplicado directamente en la célula (la primer

simulación tiene la intención de reproducir el experimento de estimulación por voltaje mediante el electrodo y la segunda de reproducir el experimento de fijación de corriente). Posteriormente se utilizó el ensamble de la geometría construida para este trabajo.

La importancia del MEF en la simulación de este tipo de sistemas radica en la facilidad de representar geometrías reales y observar cómo estas modifican o no la transmisión de las señales en la interfase, así como la posibilidad de asignar mediante un modelo matemático el comportamiento eléctrico, físico, químico, etc., de cada etapa o componente del sistema. Esto fue muy claro cuando en el sistema se construyó la geometría sencilla o la real con las diferentes ecuaciones que modelan el comportamiento electrofisiológico y eran estimuladas por medio del electrodo o directamente sobre la célula. En este caso, cada configuración requería que el pulso de estimulación tuviera diferentes condiciones en cuanto a magnitud, tiempo y forma para lograr una respuesta adecuada de la célula.

Por otra parte, con el MEF es posible presentar los resultados obtenidos en diferentes formas que permiten observar y comprender como se transmiten y distribuyen las corrientes y los potenciales en cada región de la interfase, así como su posterior procesamiento para obtener los resultados de interés.

## VIII. Aplicación: registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica de una célula NG108-15

### Metodología

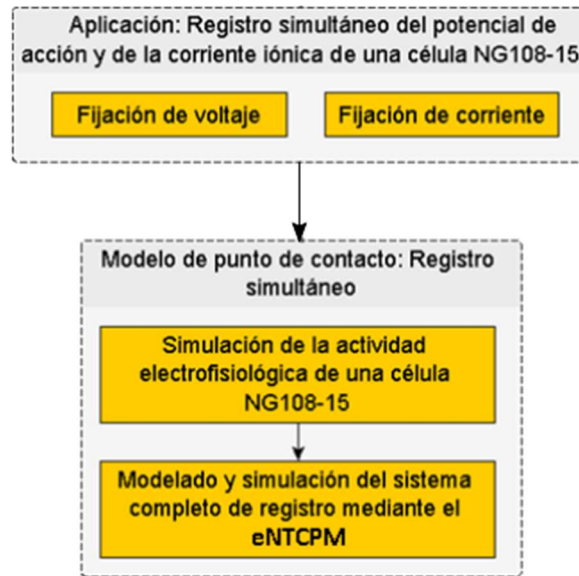


Figura VIII-1. Etapas de la aplicación del registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica asociada mediante el eNTCPM.

### Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica (“bi-Patch Clamp”)

Como un experimento extra y novedoso, se planteó la posibilidad de que además de registrar y estimular la actividad electrofisiológica con el eNTCPM, de manera extracelular, también se pudiera registrar simultáneamente el potencial de acción con su corriente iónica asociada. Lo cual, es precisamente una de las limitantes en las técnicas de registro convencionales.

Por lo tanto, el arreglo experimental de registro descrito anteriormente fue modificado con el fin de poder registrar la corriente iónica en todo momento, sin importar si los experimentos eran de fijación de voltaje o de corriente. Para lograr este propósito, un segundo sistema de registro fue utilizado para mantener el eNTCPM en tierra virtual (Figura VIII-2). El sistema fue construido atendiendo las especificaciones de Hamill (Hamill, Marty, Neher, Sakmann, & Sigworth, 1981). En electrónica y en específico en el área de los amplificadores operacionales (OpAmp), la “tierra virtual” es un concepto donde el nodo de un circuito se mantiene a un potencial cero, sin estar conectado directamente a ese potencial. Por lo tanto en un OpAmp, se considera que tanto la entrada inversora como la no inversora se encuentran conectadas a un potencial cero o tierra, sin estar conectadas físicamente a esta.

Para registrar el potencial de acción y la corriente iónica resultante al mismo tiempo, se agregó un segundo amplificador y se conectó el eNTCPM a través de un alambre de plata aislado

eléctricamente. La medición simultánea de la corriente fue posible debido a que el amplificador 2 inyecta una corriente de igual magnitud y curso temporal que la corriente iónica pero de signo contrario, con el fin de mantener el eNTCPM en tierra virtual. En este caso, el amplificador 1 se conecta a una micropipeta de vidrio que funciona como electrodo para estimular y registrar la respuesta de la célula ya sea en configuración de fijación de corriente o voltaje, mientras que el amplificador 2 mide la corriente resultante en todo momento de manera simultánea.

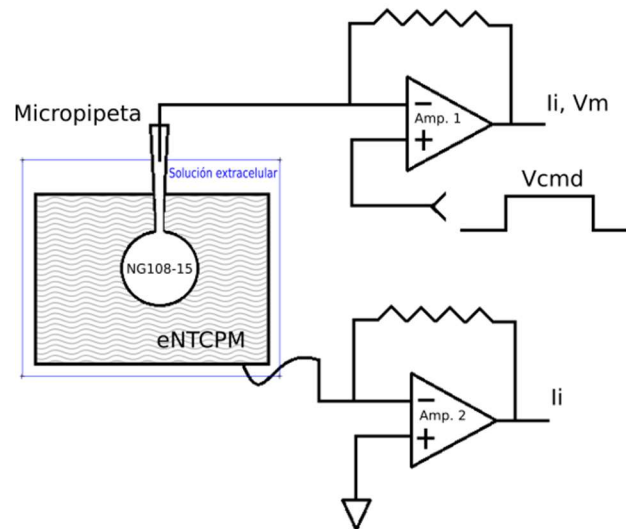


Figura VIII-2. Esquema del sistema bi-Pclamp construido y las células NG108-15 cultivadas sobre la superficie del eNTCPM. Con el amplificador 1, la técnica estándar de fijación de voltaje/corriente, utilizando una micropipeta de vidrio como electrodo, es empleada mientras el amplificador 2 mantiene el eNTCPM a tierra virtual registrando la corriente iónica en todo momento.

Es importante mencionar que para tener un punto de comparación o referencia acerca de las ventajas de usar un eNTCPM, se realizó un experimento control utilizando un alambre de plata clorurado (Ag/AgCl) conectado a tierra virtual en lugar de eNTCPM (Figura VIII-3).

#### Modelo de punto de contacto: Registro simultáneo

Para comprobar los resultados experimentales, un modelo de punto de contacto del sistema de registro extracelular fue construido y simulado (Figura VIII-4).

*Simulación de la actividad electrofisiológica de una célula NG108-15.* Empleando un modelo computacional basado en resultados experimentales, con algunas variaciones, se simuló en Matlab (Mathworks, USA) el potencial de acción de la célula así como la corriente iónica que lo origina (Wu *et al.*, 2012).

*Modelado y simulación del sistema completo de registro mediante el eNTCPM.* Se emplearon también los parámetros experimentales obtenidos de la caracterización eléctrica del eNTCPM, así como algunos otros obtenidos de la literatura para modelar y simular esta etapa en Simulink (Mathworks, USA) y enlazarla posteriormente con la simulación desarrollada en Matlab (Chen *et al.*, 2011), (Martin-Fernandez *et al.*, 2013).

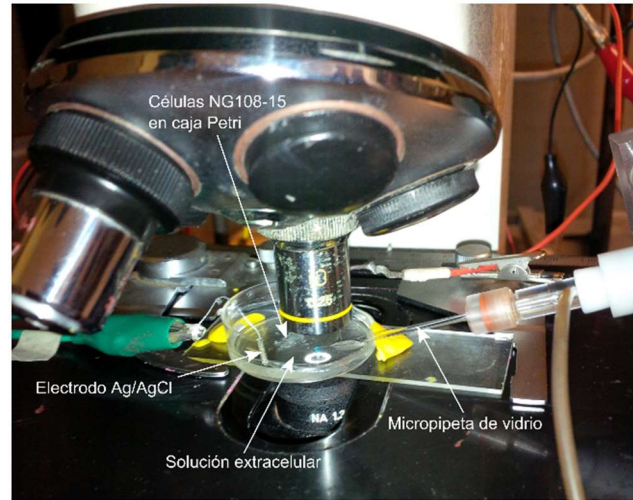
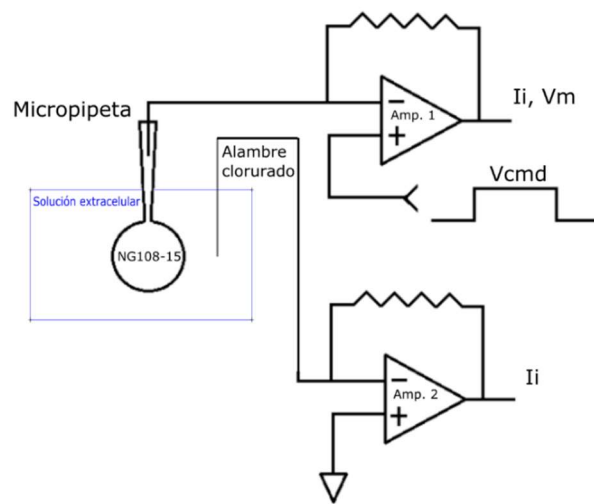


Figura VIII-3. Esquema del sistema bi-Pclamp. a) Esquema del sistema bi-Pclamp construido y las células NG108-15 cultivadas en una caja Petri. Con el amplificador 1, la técnica estándar de fijación de voltaje/corriente, utilizando una micropipeta de vidrio como electrodo, es empleada mientras el amplificador 2 mantiene el alambre de plata clorurado a tierra virtual registrando la corriente iónica en todo momento. b) Esquema experimental.

Además, el sistema de fijación de voltaje utilizado para mantener el electrodo a tierra virtual y registrar las corrientes iónicas fue también simulado. Los parámetros eléctricos utilizados para este sistema fueron adquiridos del diseño electrónico del sistema (Hamill *et al.*, 1981) y, de las hojas de especificaciones del amplificador operacional LF353, el cual es el circuito electrónico principal del sistema de registro. A la entrada del amplificador fue colocado un transistor FET (Transistor de efecto de campo de sus siglas en inglés) para incrementar la impedancia a  $10^{13} \Omega$  y para obtener una corriente "bias" de entrada de 0.3 pA.

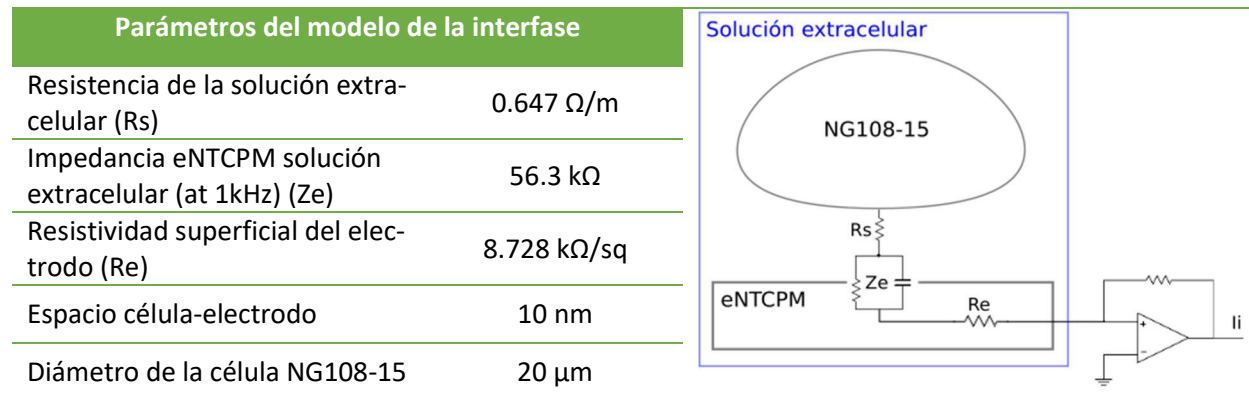


Figura VIII-4. Modelo equivalente y simulación del sistema de registro/estimulación mediante el eNTCPM realizado para corroborar los resultados experimentales.

## Resultados

### Registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica (“bi-Patch Clamp”)

Con la modificación realizada al sistema de “Patch Clamp” para obtener registros simultáneos, fue posible aplicar pulsos de estimulación de voltaje a una célula NG108-15 y registrar los cambios en la corrientes iónicas (célula completa) de manera extracelular al mismo tiempo. En la Figura VIII-5, se presentan los registros de la corriente adquiridos con el electrodo del alambre de plata clorurado y el eNTCPM, así como sus correspondientes registros obtenidos con la micropipeta de vidrio. En ambos casos, se aplicó el mismo protocolo de estimulación que para la caracterización electrofisiológica en su modalidad de fijación de voltaje (Figura VIII-2) de manera que, los canales iónicos de la membrana celular fueran abiertos artificialmente.

En estos experimentos es posible observar que la corriente iónica registrada con la micropipeta de vidrio tiene la misma amplitud y curso temporal que la corriente registrada mediante el alambre de plata clorurado y el eNTCPM. Los resultados revelan que el alambre de plata clorurado tiene una relación señal a ruido (SNR de sus siglas en inglés) aproximadamente dos veces menor que la del eNTCPM, y pobre estabilidad. Las figuras presentan registros representativos para cada uno de los casos. Las corrientes mostradas para el eNTCPM en este caso fueron muy grandes.

Con dicha modificación, también fue posible aplicar pulsos de estimulación de corriente a la célula y registrar los cambios en el  $V_m$  (fijación de corriente) mientras que la corriente iónica de célula completa fue registrada simultáneamente. En la Figura VIII-6 y Figura VIII-7, los resultados de los experimentos control (electrodo de Ag/AgCl) y con el eNTCPM son presentados; el electrodo de Ag/AgCl se utilizó para tener un punto de comparación o referencia acerca de las ventajas de usar un eNTCPM. En ambos casos, la membrana celular fue despolarizada mediante la micropipeta de vidrio hasta que un potencial de acción fuera disparado y, al mismo tiempo, su corriente bifásica asociada fue registrada. Al inicio de los registros del potencial y la corriente aparece un artefacto de estimulación, que no tiene ningún efecto en la visualización de los registros.

En ambos casos, los registros de corriente muestran una deflexión negativa, asociada con la entrada de corrientes de  $\text{Na}^+$  a la célula durante la fase de despolarización de la membrana durante el potencial de acción, seguido por una deflexión positiva, asociada con la salida de corrientes de  $\text{K}^+$  a la célula durante la fase de repolarización de la membrana en el potencial. El registro de la corriente en el experimento control tiene baja amplitud y se encuentra inmerso en ruido (Figura VIII-6a) mientras que el registro adquirido con el eNTCPM tiene buena amplitud y la SNR es alta (Figura VIII-6b).



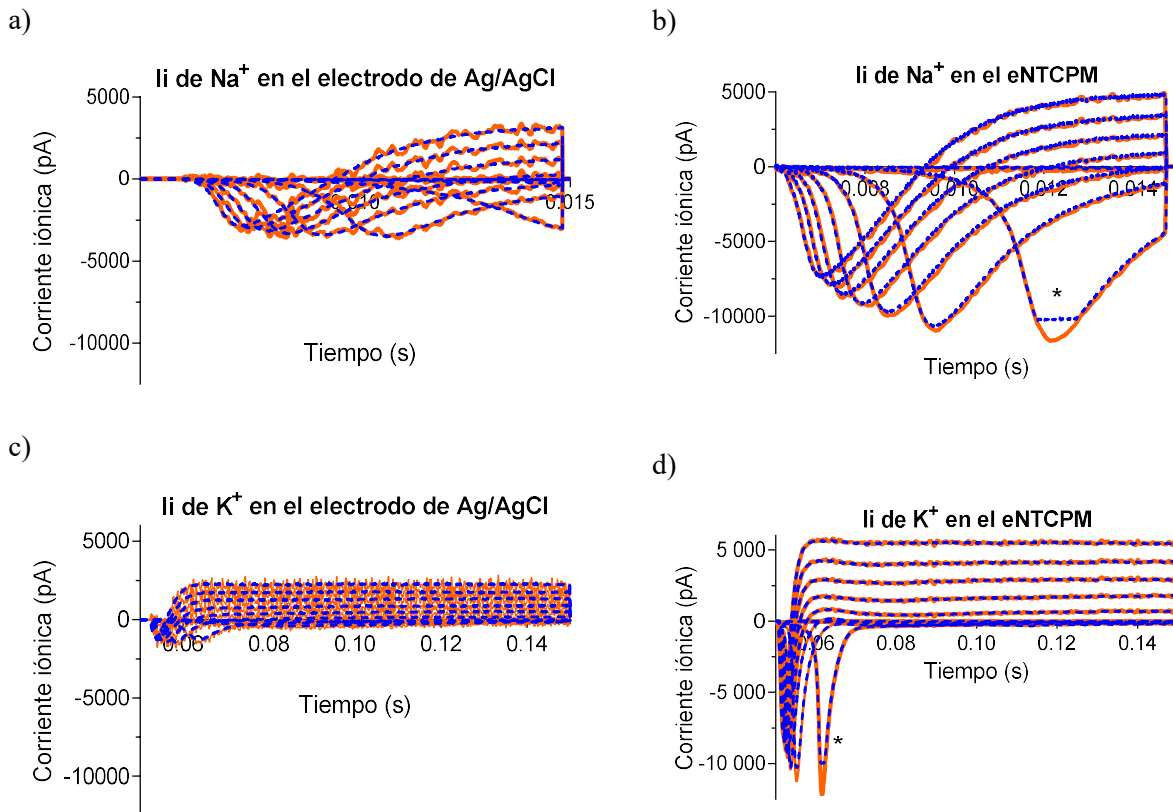


Figura VIII-5. Comparación de los experimentos de registro de corrientes iónicas realizadas con la micropipetta de vidrio y de manera simultánea con los electrodos de Ag/AgCl y el eNTCPM de manera extracelular. a), c) corrientes registradas mediante la micropipeta de vidrio (trazo azul punteado) y al mismo tiempo, pero de manera extracelular, con el electrodo de Ag/AgCl (trazo continuo naranja). b), d) Mismos experimentos para el eNTCPM.

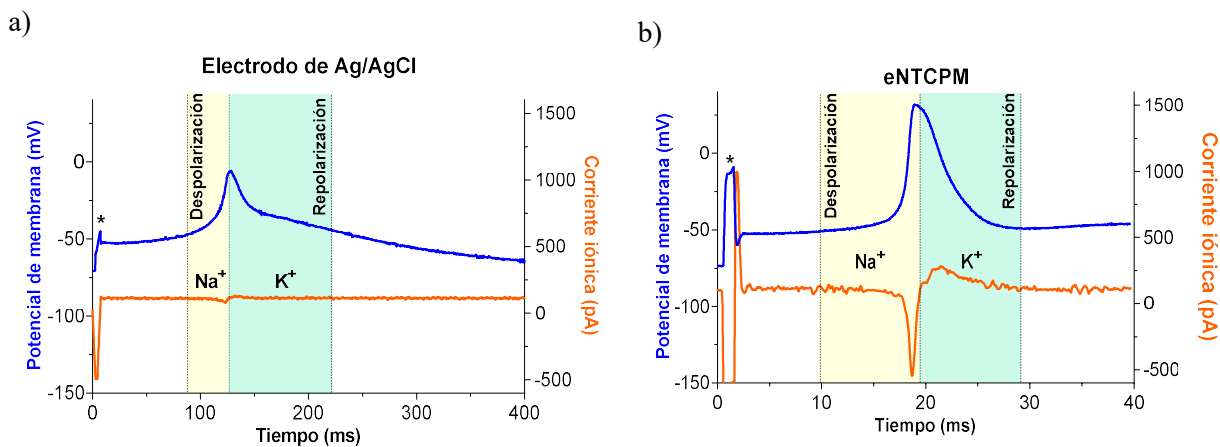


Figura VIII-6. Comparación de los experimentos de registro simultáneo realizados con el electrodo de Ag/AgCl y el eNTCPM. En ambos casos pulsos positivos cortos de corriente fueron aplicados hasta que un potencial de acción fue disparado (trazo azul en a y b), al mismo tiempo, la corriente iónica bifásica asociada fue registrada (trazos naranjas en a y b). Al inicio de los registros del Vm y de la corriente se observan los artefactos de estimulación (\*). El registro de corriente mediante el electrodo Ag/AgCl tiene baja amplitud y está inmerso en ruido, mientras que el registro adquirido con el eNTCPM tiene buena amplitud y la relación señal a ruido es alta.

En la segunda parte del experimento se presenta una gráfica donde los pulsos de estimulación van incrementando su amplitud (Figura VIII-7). En este caso, el primer pulso de estimulación no despolariza la membrana celular y por lo tanto  $V_m$  no alcanza el potencial umbral necesario para disparar un potencial de acción, por consecuencia, no se registra ninguna corriente iónica. Un segundo pulso de estimulación de mayor magnitud es entonces aplicado a la célula y esta vez sí fue posible alcanzar el potencial de umbral y disparar un potencial. Por lo tanto, se obtiene una corriente asociada que muestra las mismas características del experimento anterior. Finalmente, un tercer pulso de estimulación de mayor magnitud es aplicado; la célula dispara nuevamente un potencial de acción, pero en esta ocasión, debido a la magnitud del pulso de estimulación, la membrana celular se despolariza más rápido y el potencial, así como la corriente iónica asociada aparecen antes (más cercana del pulso despolarizante).

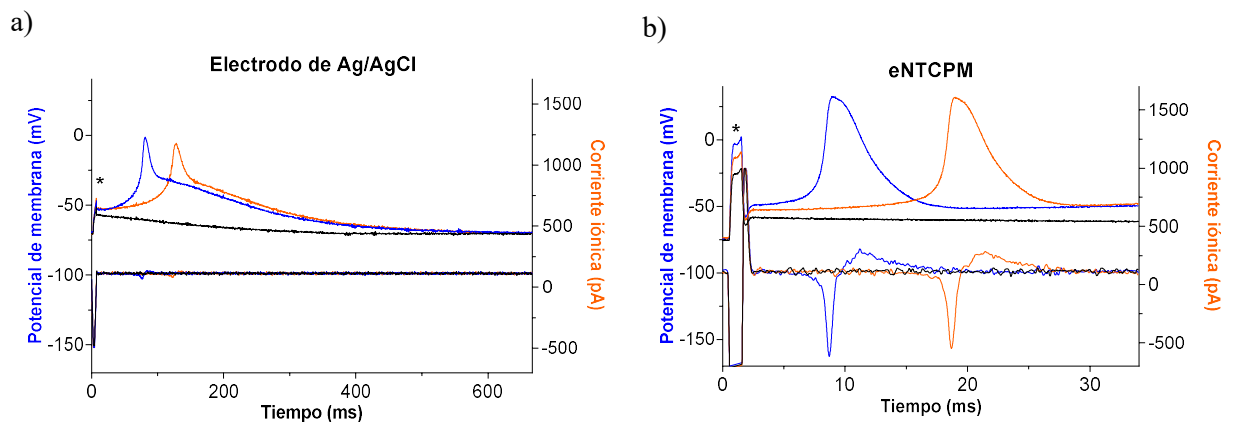


Figura VIII-7. Comparación de los experimentos de registro simultáneo con incremento de magnitud en el pulso. a) y b) muestran la respuesta a un pulso que incrementa su magnitud. El primer pulso no despolariza la membrana celular (trazo negro en c y d) y por consecuencia, no se registra ninguna corriente. Un segundo pulso de mayor magnitud dispara un primer potencial de acción (trazo naranja en c y d) en ese momento se registra la corriente iónica asociada a él. Finalmente, un tercer pulso de estimulación de mayor magnitud dispara otro potencial de acción, pero esta vez más rápido. Artefactos de estimulación (\*).

El siguiente conjunto de imágenes muestran una comparación de los registros obtenidos con el electrodo del alambre de plata clorurado y el eNTCPM cuando un pulso largo de estimulación es aplicado a la célula. El objetivo de estos experimentos, es mostrar que aun cuando se realiza un cambio en las condiciones experimentales, el comportamiento de la neurona así como la obtención de los registros de las corrientes iónicas de manera extracelular persiste.

En este caso, se produce el mismo efecto que en el experimento anterior donde es disparado un potencial de acción y su corriente iónica bifásica asociada es registrada, pero esta ocasión, ambos se observan montados sobre el pulso largo de estimulación (Figura VIII-8).

Nuevamente, cuando pulsos de estimulación que incrementan su magnitud son aplicados, el potencial de acción y las corrientes iónicas ocurren antes que aquellos del primer pulso (Figura VIII-9). En el eNTCPM se observa que un pulso largo de mayor magnitud dispara dos

potenciales (siendo el primero de mayor amplitud) mientras que la corriente registrada sigue la misma conducta.

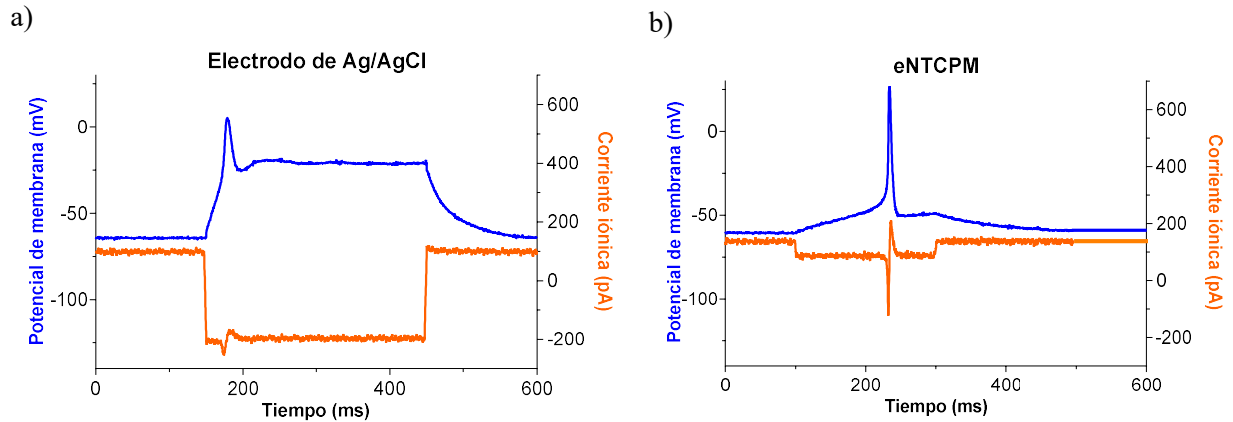


Figura VIII-8. Pulsos positivos largos de estimulación de corriente experimental. Estos pulsos dispararon potencial de acción (trazos azules en a y b) y sus corrientes iónicas bifásicas asociadas fueron registradas (trazos naranjas en a y b) pero esta vez ambos se encontraban montados sobre el pulso de estimulación.

Los registros control no siguen esta tendencia, pero muy posiblemente sea debido a la respuesta inherente de la célula a los pulsos de estimulación; sin embargo, en este último caso, las señales de corriente tienen baja amplitud y se encuentra inmersas en ruido.

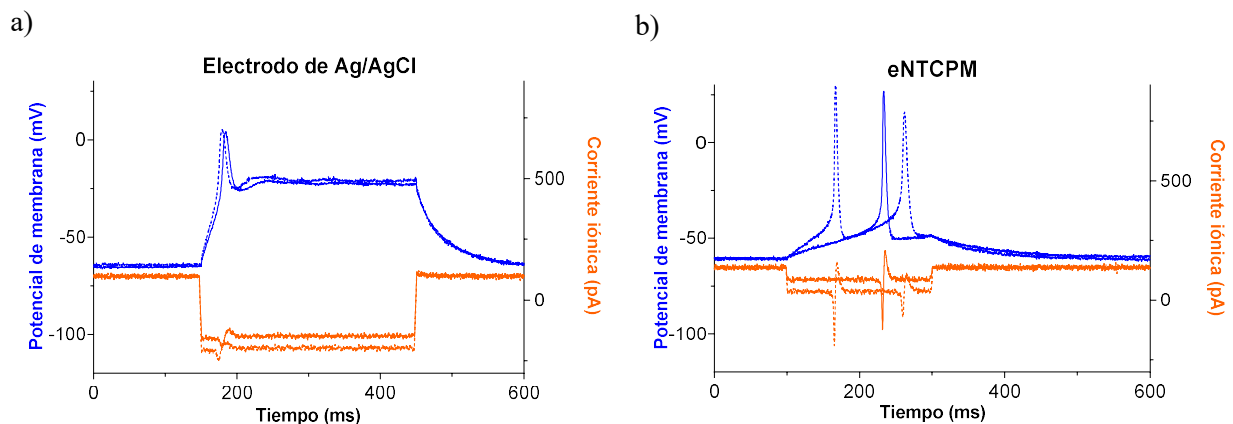


Figura VIII-9. Pulsos de estimulación de corriente de mayor magnitud. En este caso se despolarizó la membrana más rápido y por consecuencia los potenciales de acción, así como sus corrientes iónicas aparecieron antes (trazos azules y naranjas en a y b). Los registros del eNTCPM enseñaron que estos últimos pulsos generaron dos potenciales de acción. Los registros realizados en el electrodo Ag/AgCl no reflejan la misma tendencia y la señal de corriente tiene muy baja amplitud y se encuentra inmersa en ruido.

En esta sección, se presenta un caso excepcional de una célula NG108-15 con disparos de potenciales de acción espontáneos sobre el eNTCPM. En un primer experimento, un pulso negativo de estimulación de corriente se aplicó para hiperpolarizar la membrana celular. Una vez que concluye el pulso, la etapa de repolarización comienza, pero cuando está casi completada, se dispara un potencial pues esta continúa hasta alcanzar el potencial umbral. Este potencial de acción es seguido inmediatamente por otro de menor amplitud y después de un breve periodo de

tiempo, se dispara otro con una amplitud poco mayor al anterior. En esta misma figura se registran simultáneamente, mediante el eNTCPM, las corrientes iónicas de célula completa que generan los potenciales; es claro que la magnitud de dichas corrientes corresponde al cambio también de magnitud en los potenciales (Figura VIII-10a). La ocurrencia de los potenciales de acción para este experimento es regular.

A continuación, esta célula fue monitoreada en el tiempo y se observó en los registros del  $V_m$ , sin aplicar ningún pulso de estimulación, que la célula comenzó a disparar potenciales de acción de manera espontánea y de ocurrencia regular. Los potenciales parecen tener la misma amplitud; sin embargo, las corrientes iónicas registradas de manera extracelular con el sistema construido presentan algunas ligeras diferencias en cuanto su amplitud que se consideran normales dentro de la actividad electrofisiológica espontánea (Figura VIII-10b). No obstante se hace hincapié en que esta actividad no es común para este tipo de células.

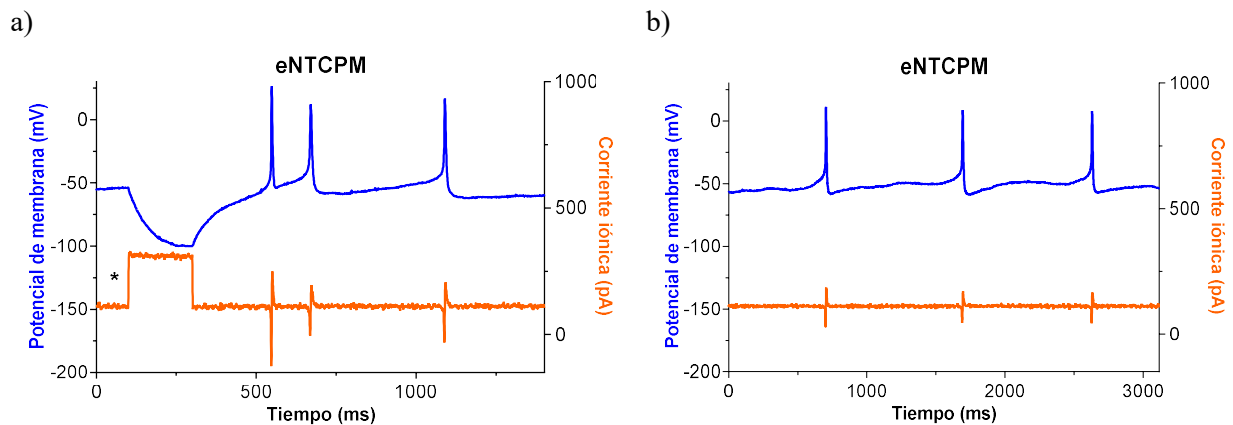


Figura VIII-10. Caso excepcional de célula NG108-15 disparando potencial de acción de manera espontánea. a) El pulso de estimulación de corriente negativa (\*) induce una serie de potencial de acción de diferentes amplitudes casi inmediatamente después de que finaliza (trazo azul). La corriente iónica asociada es registrada de manera simultánea a través del eNTCPM de manera extracelular (trazo naranja). b) Registro del  $V_m$  sin ningún pulso de estimulación que presenta potenciales de acción disparados de manera espontánea (trazo azul) y al mismo tiempo, con el eNTCPM es posible registrar la corriente asociada (trazo naranja).

#### Modelo punto de contacto: Registro simultáneo

En este caso, el potencial de acción y la corriente iónica de célula fueron reproducidos utilizando el modelo de (Wu *et al.*, 2012) (Figura VIII-11a, trazo azul). Posteriormente, la corriente fue puesta como entrada en el sistema de fijación de voltaje simulado que mantiene el electrodo conectado a tierra virtual en todo momento. La salida de este sistema es la corriente iónica de célula completa mostrada en la Figura VIII-11a (trazo naranja). Es notorio que esta simulación reproduce los registros experimentales (Figura VIII-11b) de manera muy similar.

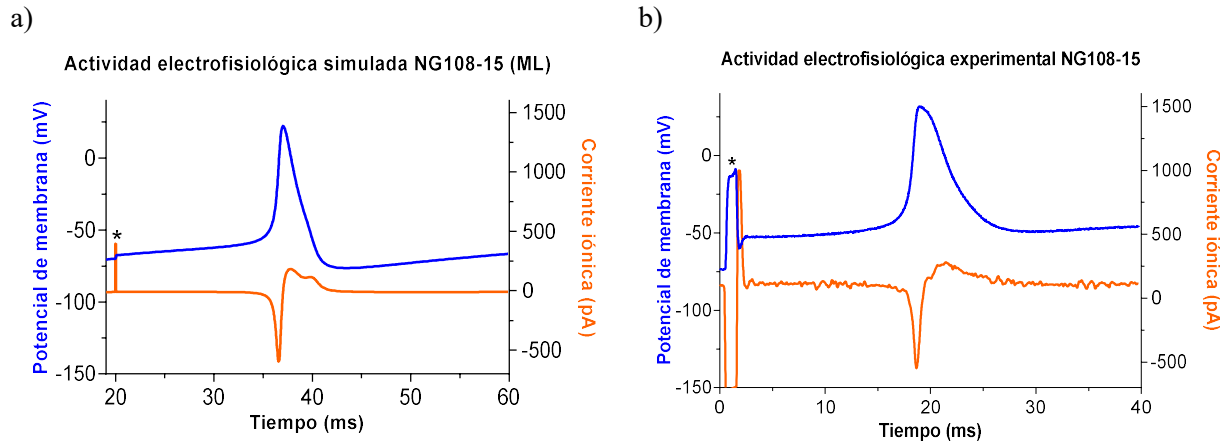


Figura VIII-11. Modelo computacional del sistema de registro implementado en Matlab y Simulink. a) Actividad electrofisiológica simulada de una célula NG108-15. Potencial de acción (trazo azul) y su corriente iónica asociada (trazo naranja), obtenida a través del sistema de fijación de voltaje simulado. b) potencial de acción experimental obtenido con la micropipeta de vidrio y su corriente asociada obtenida mediante el eNTCPM. Artefactos de estimulación (\*).

## Discusión

### Registro simultáneo (“bi-Patch Clamp”)

El uso del eNTCPM y de dos sistemas de “Patch Clamp” uno en la configuración convencional de fijación de corriente/voltaje y el otro ligeramente modificado para mantener el electrodo en tierra virtual tiene varias ventajas (Figura VIII-2). Primero, este arreglo permite medir la corriente a través de un amplificador (él conectado al eNTCPM) sin importar si los experimentos se realizan en la configuración de fijación de corriente o voltaje. Segundo, genera la posibilidad de medir de manera simultánea el potencial de acción y la corriente iónica que le da origen.

Una ventaja evidente de usar el electrodo nanoestructurado como sustrato de cultivo en este sistema, se produce cuando se comparan los registros de la actividad electrofisiológica extracelular con los de otros tipos de electrodos extracelulares que no presentan la localización, morfología y características eléctricas que tiene la película de NTCPM; como es el caso de un electrodo de alambre de plata (Ag/AgCl) (Figura VIII-5, 52, 53, 54 y 55). Esta comparación exhibe que la corriente bifásica registrada con el electrodo de plata tiene baja amplitud y una pobre relación señal a ruido (SNR) como se ha observado anteriormente (Baranauskas *et al.*, 2011). Con esto se concluye que no es suficiente tener otro sistema de “Patch Clamp” si no que también es necesario tener una buena superficie de cultivo con características específicas.

En comparación con las técnicas existentes para medir la corriente iónica y el potencial de acción de células excitables, el uso de un segundo amplificador que mantiene el electrodo a tierra virtual permite registrar la actividad electrofisiológica de manera directa y simultánea sin la necesidad de interrumpir el desarrollo normal del potencial o de un amplificador especial (Dietrich *et al.*, 2002). También, para conseguir esta información con otras técnicas, como la desarrollada

por Chen *et al.* (Chen-Izu *et al.*, 2012), se debe hacer el experimento de manera secuencial en lugar de simultánea. Cabe resaltar que en este caso, para obtener la corriente iónica de célula completa es necesario integrar todas las corrientes individuales, lo cual, puede ser un inconveniente en el caso de que la interacción entre ellas no sea lineal y de que existan canales iónicos desconocidos que contribuyan con la generación de la corriente; adicionalmente, esta técnica depende en específico de bloqueadores y la no existencia de efectos colaterales en otras corrientes cuando se bloquea un canal en específico (Doerr *et al.*, 1989). Por otra parte, en esta técnica, los canales iónicos voltaje dependientes son los únicos que están siendo reclutados para mantener el  $V_m$ , pero en la membrana celular no solo están presentes este tipo de canales sino que hay varios canales de distinta índole que son activados bajo otras circunstancias (Adelman, Maylie, & Sah, 2012), (Sah & Davies, 2000).

#### *Modelo de punto de contacto: Registro simultáneo*

El modelo de punto de contacto es una combinación de las ecuaciones de Hodgkin – Huxley modificadas para reproducir la actividad electrofisiológica de las células NG108-15 y un modelo que simplifica y reproduce el comportamiento global de la interfase a circuitos eléctricos. El objetivo de este modelo es el de reproducir específicamente el sistema de registro simultáneo así como el de mostrar algunas de las diferencias existentes con el modelo desarrollado mediante el MEF.

El modelo reproduce la actividad electrofisiológica del experimento del registro simultáneo de manera muy precisa aunque, con algunas pequeñas diferencias en la morfología de la señal tanto del potencial de acción como de las corrientes iónicas, debidas principalmente a que el modelo no captura todas las variables experimentales.

La principal diferencia con el MEF es que este modelado no permite adquirir y analizar las señales en los distintos puntos (geometrías) de la interfase sino que presenta la señal final o integrada de cada etapa o componente, de manera que algún cambio en la geometría que afecte la transmisión de señales pudiera no ser observado y así afectar el diseño y la construcción del sistema de registro/estimulación final.

El modelado y la simulación obtenida es relevante en el sentido que busca reproducir el comportamiento total del sistema mediante la solución numérica de las ecuaciones que describen el fenómeno físico que se está estudiando, empleando las condiciones geométricas reales; que como ya se observó, tienen un efecto importante sobre este. Si este trabajo logra reproducir los resultados experimentales, entonces es posible que prediga con cierto grado de precisión el comportamiento de la interfase cuando se modifiquen los parámetros, las condiciones de operación, de diseño, o geométricas, etc. y de esa manera diseñar un electrodo reduciendo los tiempos y costos que presentan los desarrollos experimentales.

Por otro lado la importancia de la adaptación en el sistema de registro así como el uso de un electrodo de NTCPM para obtener el potencial de acción y las corrientes iónicas de manera



simultánea radica en que es posible observar el panorama completo de los procesos electrofisiológicos celulares de manera extracelular, cuando normalmente esto se hace de manera intracelular.

## IX. Conclusiones

Gracias a los materiales nanoestructurados (NTCPM) se construyó un electrodo cuya superficie cuenta con las características morfológicas, químicas y eléctricas que permiten el crecimiento y la funcionalidad de las células neuronales en su superficie. En particular, las micrografías SEM y AFM muestran que la película de NTCPM es adecuada para el crecimiento, la adhesión y la proliferación celular ya que se observaron células fuertemente adheridas a la película con la presencia de neuritas o extensiones citoplasmáticas y somas de morfología regular (observado de manera cualitativa). Asimismo, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los registros, tanto de corrientes iónicas como de potenciales de acción, obtenidos en las células control y en las cultivadas sobre el electrodo (observado de manera cuantitativa). Esto indica que se obtuvo un sustrato biocompatible estructural y funcionalmente.

El modelado y la simulación por el MEF ofrece una manera interesante de estudiar la interfase en la que se pueden introducir las características de los materiales, geometrías, condiciones de frontera, modelos matemáticos y otras variables que permiten el desarrollo de un modelo más completo y realista, además de que se puede observar el comportamiento de ésta en el tiempo y casi en cualquier punto de la geometría; todo esto claro con su respectivo coste computacional. También, este método permite modificar de manera relativamente sencilla las condiciones de operación con el fin de diseñar y construir el sistema óptimo para este fin, sin la necesidad de construir todo el esquema experimental; por tanto, el modelado y la simulación por el MEF también presenta un carácter predictivo.

En otro orden de ideas, se desarrolló un método eficiente para registrar de manera simultánea el potencial de acción de células NG108-15 y la corriente iónica que lo origina mediante un eNTCPM. Este método está basado en la modificación de un sistema de "Patch Clamp" convencional para conectar un electrodo a tierra virtual y la explotación de las propiedades mecánicas, eléctricas y de adhesión celular de los NTCPM. A diferencia de los trabajos anteriores, este procedimiento no interfiere con la actividad electrofisiológica de los canales iónicos ni interrumpe los registros durante el experimento, lo cual es de vital importancia para determinar como un cambio en la cinética y la magnitud de estas corrientes podría afectar la frecuencia de disparo, amplitud o forma entre otras características del potencial de acción. Por lo que se puede concluir que hasta antes de este trabajo, no había sido posible medir la corriente total que da origen al potencial de la célula.

Cabe mencionar que en células auto excitables, el sistema construido puede ser utilizado para medir los cambios en la corriente que produce la actividad electrofisiológica espontánea en el tiempo, utilizando únicamente el eNTCPM conectado a tierra virtual, lo que hace innecesario el uso de un segundo amplificador de fijación de corriente/voltaje.

Se asume que la técnica presentada podría ser de particular importancia en electrofisiología de células cardiacas la cual ha sido estudiada por décadas y sobre todo, él cómo

medir de manera simultánea el potencial de acción y las corrientes transmembranales que les dan origen. Como ejemplo, es todavía sujeto de investigación la mayoría de las corrientes iónicas cardiacas que producen potenciales de acción en las células marcapasos (Bartolucci *et al.*, 2015), (Van Putten *et al.*, 2015), (Clay, 2013). Además, esta técnica permite la evaluación directa medición de drogas o ciertos tipos de moduladores que se conoce tienen un efecto sobre los canales iónicos y por consecuencia, en las propiedades electrofisiológicas de las células excitables mediante la observación de las corrientes iónicas y los potenciales de acción de manera simultánea. Finalmente, este trabajo presenta un nuevo avance en el campo con dos puntos importantes, el registro simultáneo del potencial de acción con su corriente iónica asociada y el mejoramiento de la SNR.

### Perspectivas

A partir de lo expuesto en esta tesis, las perspectivas de trabajo futuro se pueden orientar en dos direcciones, respecto al modelado de la interfase y respecto al sistema experimental de registro simultáneo construido. Si bien muchas de las incógnitas planteadas quedaron sin resolver, la investigación realizada introduce y facilita la continuación de la investigación en dicha direcciones.

En cuestión del modelo se tiene la facilidad de generar diferentes diseños de electrodos que incluyan las propiedades eléctricas y morfológicas que faciliten la transmisión/recepción de las señales eléctricas en la interfase basados en las técnicas de fabricación y materiales disponibles. Esto es que se pueden modificar las geometrías, condiciones de frontera, propiedades intrínsecas de los materiales, etc., sin la necesidad de modificar el algoritmo de simulación. También, se tiene la posibilidad de enriquecer el modelo si se toman en cuenta los distintos procesos fisicoquímicos existentes, como la difusión de iones, en la interfase.

Si bien el modelado y la simulación presentada en esta tesis se trabajó a nivel macro, existe y se contempla la posibilidad a futuro de crear un modelo de NTCPM de manera individual, es decir, construir una geometría que represente físicamente al elemento y emplear el modelo de "Luttinger liquid" (Burke, 2002), para describir su comportamiento eléctrico. Este modelo permitiría simular la interfase a mayor detalle en el componente del electrodo pues se podría utilizar desde un NTCPM hasta unos cuantos de ellos, por ejemplo orientados de manera vertical o como película ultra delgada. Así pues, se tendrían características más realistas del modelo respecto al presentado en esta tesis, no sólo en cuanto a geometría sino también en cuanto a la forma transmisión de señales eléctricas en los NTCPM y la interfase. Visiblemente se podrían diseñar por este método, electrodos más pequeños y con mejores características para aplicaciones del tipo invasivo y como películas delgadas para ciencia básica o aplicada.

Cabe mencionar que el modelo de punto de contacto en combinación con el modelo computacional de la actividad electrofisiológica de la célula NG108-15 desarrollado para reproducir específicamente el sistema de registro simultáneo, es un trabajo que se puede resolver mediante el método de los elementos finitos a futuro cercano pues se tienen todos los elementos disponibles para poder construirlo.

En cuanto a la aplicación, las mediciones simultáneas del potencial de acción (micro-pipeta) y las corrientes iónicas que los originan (eNTCPM) en células excitables pueden abrir nuevas perspectivas en estudios electrofisiológicos y complementar o incrementar el conocimiento acerca de los procesos de señalización intracelular. Ciertamente existe la posibilidad de mejorar el diseño del electrodo para que pueda registrar desde una célula excitable hasta una población de ellas, utilizar distintos tipo de materiales nanoestructurados en su fabricación, diseñar y construir la instrumentación que facilite la adquisición de los registros, etc., pero un trabajo que se plantea a futuro cercano es el estudio de distintos tipos de células excitables y su posible aplicación en estudios farmacológicos.

## X. Referencias

- Acharya, J. N. (1997). *Neurophysiology. Journal of Clinical Neurophysiology* (Vol. 14).  
<http://doi.org/10.1097/00004691-199703000-00009>
- Adelman, J. P., Maylie, J., & Sah, P. (2012). Small-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels: Form and Function. *Annual Review of Physiology*, 74(1), 245–269. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153336>
- Ajayan, P. M., & Ebbesen, T. W. (1999). Nanometre-size tubes of carbon. *Reports on Progress in Physics*, 60(10), 1025–1062. <http://doi.org/10.1088/0034-4885/60/10/001>
- American, S., & New, S. (2007). Carbon Spark New. *Carbon Nanotubes*, 76–83.  
<https://bwn.ece.gatech.edu/nanos/papers/nanonets.pdf> (Rev. 2017)
- Andrews, R. J. (2007). Neuroprotection at the nanolevel - Part II: Nanodevices for neuromodulation - Deep brain stimulation and spinal cord injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1122, 185–196. <http://doi.org/10.1196/annals.1403.013>
- Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M. J., Kadler, K. E., & Shuttleworth, A. (1998). *Laminins. The Extracellular Matrix FactsBook*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-012068911-8.50137-8>
- Baranauskas, G., Maggiolini, E., Castagnola, E., Ansaldo, A., Mazzoni, A., Angotzi, G. N., Fadiga, L. (2011). Carbon nanotube composite coating of neural microelectrodes preferentially improves the multiunit signal-to-noise ratio. *Journal of Neural Engineering*, 8(6), 66013.  
<http://doi.org/10.1088/1741-2560/8/6/066013>
- Bareket-Keren, L., & Hanein, Y. (2012). Carbon nanotube-based multi electrode arrays for neuronal interfacing: progress and prospects. *Frontiers in Neural Circuits*, 6(January), 122.  
<http://doi.org/10.3389/fncir.2012.00122>
- Bartolucci, C., Altomare, C., Bennati, M., Furini, S., Zaza, A., & Severi, S. (2015). Combined action potential- and dynamic-clamp for accurate computational modelling of the cardiac IKr current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 79, 187–194. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.011>
- Bekyarova, E., Itkis, M. E., Cabrera, N., Zhao, B., Yu, A., Gao, J., & Haddon, R. C. (2005). Electronic properties of single-walled carbon nanotube networks. *Journal of the American Chemical Society*, 127(16), 5990–5995. <http://doi.org/10.1021/ja043153l>
- Ben-Jacob, E., & Hanein, Y. (2008). Carbon nanotube micro-electrodes for neuronal interfacing. *Journal of Materials Chemistry*, 18(43), 5181. <http://doi.org/10.1039/b805878b>
- Bioanalytical Systems Inc. (2001). BAS 100B/W Version 2.3. Indiana USA: Bioanalytical Systems.  
<http://mmrc.caltech.edu/BAS-100/Manual/BAS%20100B:W%20manual%202.3.pdf> (Rev. 2017)

- Blau, A. (2013). Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array in vitro electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(5), 481–492. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.07.005>
- Bokobza, L., & Zhang, J. (2012). Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites. *Express Polymer Letters*, 6(7), 601–608. <http://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2012.63>
- Bray, D. (2000). Critical point drying of biological specimens for scanning electron microscopy. In J. R. Williams & A. A. Clifford (Eds.), *Supercritical Fluid Methods and Protocols* (Vol. 13, pp. 235–243). Lethbridge, CA: Humana Press. <http://doi.org/10.1385/1-59259-030-6:235>
- Brüggemann, D., Wolfrum, B., Maybeck, V., Mourzina, Y., Jansen, M., & Offenhäusser, A. (2011). Nanostructured gold microelectrodes for extracellular recording from electrogenic cells. *Nanotechnology*, 22(26), 265104. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/22/26/265104>
- Buitenweg, J. R., Rutten, W. L. C., & Marani, E. (2003). Geometry based finite-element modeling of the electrical contact between a culture neuron and a microelectrode. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 50(4), 501–510.
- Bulai, P. M., Molchanov, P. G., Denisov, A. A., Pitlik, T. N., & Cherenkevich, S. N. (2012). Extracellular electrical signals in a neuron-surface junction: Model of heterogeneous membrane conductivity. *European Biophysics Journal*, 41(3), 319–327. <http://doi.org/10.1007/s00249-012-0787-7>
- Burke, P. J. (2002). Luttinger liquid theory as a model of the gigahertz electrical properties of carbon nanotubes. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 1(3), 129–145. <http://doi.org/10.1109/TNANO.2002.806823>
- Carnevale, N. T., & Hines, M. L. (2006). *The NEURON Book. Neuron* (Vol. 30). Cambridge, UK: Cambridge University Press. <http://doi.org/10.1017/CBO9780511541612>
- Cellot, G., Cilia, E., Cipollone, S., Rancic, V., Sucapane, A., Giordani, S., Ballerini, L. (2009). Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nature Nanotechnology*, 4(2), 126–133. <http://doi.org/10.1038/nnano.2008.374>
- Chen-Izu, Y., Izu, L. T., Nanasi, P. P., & Banyasz, T. (2012). From Action Potential-Clamp to “Onion-Peeling” Technique-Recording of Ionic Currents under Physiological Conditions. In F. S. Kanez (Ed.), *Patch Clamp Technique* (First Edit, pp. 143–162). InTech. <http://doi.org/10.5772/35284>
- Chen, L. H., Su, H. C., Chuang, S. C., Yeh, S. R., Yew, T. R., Chang, Y. C., & Yao, D. J. (2011). Comparison of extracellular signals between gold and carbon nanotubes based microelectrode arrays. In *Carbon Nanotubes* (pp. 2144–2147). Beijing, CN: IEEE. <http://doi.org/10.1109/TRANSDUCERS.2011.5969297>
- Chen, M. Y., Yeh, C. M., Huang, C. J., Hwang, J., Lee, A. P., & Kou, C. S. (2006). Carbon Nanotubes Grown on Cu/Ti/Si(100) Assisted by Amorphous Carbon Nanotips in a Plasma-Enhanced CVD Process. *Journal of The Electrochemical Society*. <http://doi.org/10.1149/1.2338645>



- Cheung, K. C. (2009). *Thin-Film Microelectrode Arrays for Biomedical Applications. Implantable Neural Prostheses 2: Techniques and Engineering Approaches* (Vol. 2). Springer New York.  
<http://doi.org/10.1007/978-0-387-98120-8>
- Clay, J. R. (2013). A novel analysis of excitatory currents during an action potential from suprachiasmatic nucleus neurons. *Journal of Neurophysiology*, *110*(11), 2574–2579.  
<http://doi.org/10.1152/jn.00462.2013>
- Cogan, S. F. (2008). Neural stimulation and recording electrodes. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *10*, 275–309. <http://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518>
- Daenen, M., Fouw, R. D. de, Hamers, B., Janssen, P. G. A., Schouteden, K., & Veld, M. A. J. (2003). *The Wondrous World of Carbon Nanotubes*. Eindhoven University of Technology.  
<https://www.scribd.com/document/71037527/Wondrous-World-of-Carbon-Nanotubes> (Rev. 2017)
- Dietrich, D., Clusmann, H., & Kral, T. (2002). Improved hybrid clamp: Resolution of tail currents following single action potentials. *Journal of Neuroscience Methods*, *116*(1), 55–63.  
[http://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00027-4](http://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00027-4)
- Doerr, T., Denger, R., & Trautwein, W. (1989). Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp. *Pflügers Arch*, *413*(6), 599–603.  
<http://doi.org/10.1007/BF00581808>
- Domingo, C., & Santoro, G. (2007). Espectroscopía Raman de nanotubos de carbono. *Optica Pura Y Aplicada*, *40*(2), 175–186.
- Donoghue, J. P. (2002). Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces. *Nature Neuroscience*, *5 Suppl*, 1085–8. <http://doi.org/10.1038/nn947>
- Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., Saito, R., & Jorio, A. (2008). Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics Reports*, *409*(2), 47–99.
- Duan, X., Gao, R., Xie, P., Cohen-Karni, T., Qing, Q., Choe, H. S., Lieber, C. M. (2012). Intracellular recordings of action potentials by an extracellular nanoscale field-effect transistor. *Nature Nanotechnology*, *7*(3), 174–9. <http://doi.org/10.1038/nnano.2011.223>
- Eberle, W., Mecheri, A. S., Musa, S., Gielen, G., Borghs, G., & Bartic, C. (2009). FEM-based investigation of spatial stimulation properties of a multi-electrode probe with micrometer-size electrodes for cortical and DBS applications. *IFMBE Proceedings*, *25*(9), 154–157. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-03889-1-42>
- Elia, S., Lamberti, P., & Tucci, V. (2009). A Finite Element Model for the Axon of Nervous Cells. *COMSOL Europe Conference*, 1–7. <http://doi.org/http://www.comsol.com/paper/a-finite-element-model-for-the-axon-of-nervous-cells-6735>
- Evans-Martin, F. F. (2010). *The Nervous System - The Human Body, How It Works*. Chelsea House Publications. UK.

- Fabbro, A., Bosi, S., Ballerini, L., & Prato, M. (2012). Carbon nanotubes: Artificial nanomaterials to engineer single neurons and neuronal networks. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(8), 611–618. <http://doi.org/10.1021/cn300048q>
- Faber, G. M., & Rudy, Y. (2000). Action potential and contractility changes in  $[Na^{+}]_i$  overloaded cardiac myocytes: a simulation study. *Biophysical Journal*, 78(5), 2392–2404. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76783-X](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76783-X)
- Fan, Y. W., Cui, F. Z., Hou, S. P., Xu, Q. Y., Chen, L. N., & Lee, I. S. (2002). Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *Journal of Neuroscience Methods*, 120(1), 17–23. [http://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00181-4](http://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00181-4)
- Fang, Q., & Boas, D. A. (2009). Tetrahedral mesh generation from volumetric binary and grayscale images. *Proceedings - 2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, ISBI 2009*, 1142–1145. <http://doi.org/10.1109/ISBI.2009.5193259>
- Ferguson, J. E., Boldt, C., Puhl, J. G., Stigen, T. W., Jackson, J. C., Crisp, K. M., Redish, A. D. (2012). Nanowires precisely grown on the ends of microwire electrodes permit the recording of intracellular action potentials within deeper neural structures. *Nanomedicine (London, England)*, 7(6), 847–53. <http://doi.org/10.2217/nmm.11.157>
- Fischmeister, R., DeFelice, L. J., Ayer Jr, R. K., Levi, R., & DeHaan, R. L. (1984). Channel currents during spontaneous action potentials in embryonic chick heart cells. *Biophysical Journal*, 46(2), 267–271. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84020-5](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84020-5)
- Fromherz, P. (2003). Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells, and Brain. *Nanoelectronics and Information Technology*, 781–810. <http://www.biochem.mpg.de/478578/02fro3.pdf> (Rev. 2017)
- Gaddamanugu, D. (2009). Finite element modelling and molecular dynamic simulations of carbon nanotubes polymer composites, (May). <http://oaktrust.library.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/ETD-TAMU-2009-05-503/GADDAMANUGU-THESIS.pdf> (Rev. 2017)
- Germann, W., & Stanfield, C. (2004). *Principles of Human Physiology*. Benjamin-Cummings Publishing Company, U.S.A.
- Grant, A. O. (2009). Cardiac ion channels: Basic science for the clinical electrophysiologist. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(2), 185–194. <http://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.789081>
- Guitchounts, G., Markowitz, J. E., Liberti, W. A., & Gardner, T. J. (2013). A carbon-fiber electrode array for long-term neural recording. *Journal of Neural Engineering*, 10(4), 46016. <http://doi.org/10.1088/1741-2560/10/4/046016>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100. <http://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Heaney, M. B. (2004). Electrical Conductivity and Resistivity. *Electrical Measurement, Signal Processing, and Displays*, 7–1–7–14. <http://doi.org/10.1201/9780203009406.ch7>

- Hierlemann, A., Frey, U., Hafizovic, S., & Heer, F. (n.d.). Growing Cells atop Microelectronic Chips: Interfacing Electrogenic Cells In Vitro with CMOS-Based Microelectrode Arrays. *Proceedings of the IEEE*, 99(2), 252–284. <http://doi.org/10.1109/JPROC.2010.2066532>
- Hille, B. (2001). *Ion Channel Excitable Membranes*. Sunderland Massachusetts USA. Sinauer Associates, Inc. [http://doi.org/10.1007/3-540-29623-9\\_5640](http://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_5640)
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Bulletin of Mathematical Biology*, 52(1–2), 25–71. <http://doi.org/10.1007/BF02459568> (Rev. 2017)
- Hsu, C. C., Parker, A. C., & Joshi, J. (2008). A Carbon Nanotube Neuron with Dendritic Computations. *Ceng.Usc.Edu*, 5–8. <http://ceng.usc.edu/~parker/prepublication.pdf>
- Huang, C.-W., Huang, C.-C., Lin, M.-W., Tsai, J.-J., & Wu, S.-N. (2008). The synergistic inhibitory actions of oxcarbazepine on voltage-gated sodium and potassium currents in differentiated NG108-15 neuronal cells and model neurons. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 11(5), 597–610. <http://doi.org/10.1017/S1461145707008346>
- Hutton, D. V. (2001). *Fundamentals of Finite Element Analysis*. McGraw-Hill, U.S.A.
- Jack, D. a, Yeh, C.-S., Liang, Z., Li, S., Park, J. G., & Fielding, J. C. (2010). Electrical conductivity modeling and experimental study of densely packed SWCNT networks. *Nanotechnology*, 21, 195703. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/21/19/195703>
- Joucla, S., & Yvert, B. (2009). Improved focalization of electrical microstimulation using microelectrode arrays: A modeling study. *PLoS ONE*, 4(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0004828>
- Joucla, S., & Yvert, B. (2012). Modeling extracellular electrical neural stimulation: From basic understanding to MEA-based applications. *Journal of Physiology Paris*, 106(3–4), 146–158. <http://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2011.10.003>
- Joucla, S., Yvert, B., Glière, A., & Yvert, B. (2014). Current approaches to model extracellular electrical neural microstimulation. *Frontiers in Neuroscience*, 8(February), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fncom.2014.00013>
- Joye, N., Schmid, A., & Leblebici, Y. (2009). Electrical modeling of the cell-electrode interface for recording neural activity from high-density microelectrode arrays. *Neurocomputing*, 73(1–3), 250–259. <http://doi.org/10.1016/j.neucom.2009.09.006>
- Kaiser, A. B., Challis, K. J., McIntosh, G. C., Kim, G. T., Yu, H. Y., Park, J. G., Park, Y. W. (2002). Frequency and field dependent conductivity of carbon nanotube networks. *Current Applied Physics*, 2(2), 163–166. [http://doi.org/10.1016/S1567-1739\(01\)00090-6](http://doi.org/10.1016/S1567-1739(01)00090-6)
- Keefer, E. W., Botterman, B. R., Romero, M. I., Rossi, A. F., & Gross, G. W. (2008). Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nature Nanotechnology*, 3(7), 434–439. <http://doi.org/10.1038/nnano.2008.174>

- Klemic, K. G., Klemic, J. F., Reed, M. A., & Sigworth, F. J. (2002). Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *17*(6–7), 597–604. [http://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00015-5](http://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00015-5)
- Kolarcik, C. L., Catt, K., Rost, E., Albrecht, I. N., Bourbeau, D., Du, Z. (2015). Evaluation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotube neural electrode coatings for stimulation in the dorsal root ganglion. *Journal of Neural Engineering*, *12*(1), 16008. <http://doi.org/10.1088/1741-2560/12/1/016008>
- Kotov, N. A., Winter, J. O., Clements, I. P., Jan, E., Timko, B. P., Campidelli, S., Ballerini, L. (2009). Nanomaterials for neural interfaces. *Advanced Materials*, *21*(40), 3970–4004. <http://doi.org/10.1002/adma.200801984>
- Kozai, T. D. Y., Langhals, N. B., Patel, P. R., Deng, X., Zhang, H., Smith, K. L., Kipke, D. R. (2012). Ultrasmall implantable composite microelectrodes with bioactive surfaces for chronic neural interfaces. *Nature Materials*, *11*(12), 1065–73. <http://doi.org/10.1038/nmat3468>
- Laviron, E., & Roullier, L. (1985). The square scheme with the electrochemical reactions at equilibrium: A study by diffusion or thin layer cyclic voltammetry and by scanning potential coulometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *186*(1–2), 1–15. [http://doi.org/10.1016/0368-1874\(85\)85750-6](http://doi.org/10.1016/0368-1874(85)85750-6)
- Leão, R. N., Reis, A., Emirandetti, A., Lewicka, M., Hermanson, O., & Fisahn, A. (2010). A voltage-sensitive dye-based assay for the identification of differentiated neurons derived from embryonic neural stem cell cultures. *PLoS ONE*, *5*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013833>
- Liu, J., Tu, H., Zhang, D., Zheng, H., & Li, Y.-L. (2012). Voltage-gated sodium channel expression and action potential generation in differentiated NG108-15 cells. *BMC Neuroscience*, *13*(1), 129. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-13-129>
- Logan, D. (2007). *A First Course in the Finite Element Method*. Cengage Learning, U.K. [http://doi.org/10.1016/0022-460X\(91\)90505-E](http://doi.org/10.1016/0022-460X(91)90505-E)
- Lu, Y., Li, T., Zhao, X., Li, M., Cao, Y., Yang, H., & Duan, Y. Y. (2010). Electrodeposited polypyrrole/carbon nanotubes composite films electrodes for neural interfaces. *Biomaterials*, *31*(19), 5169–5181. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.022>
- Ludwig, K., Uram, J. D., Yang, J., Martin, D. C., & Kipke, D. R. (2006). Chronic neural recordings using silicon microelectrode arrays electrochemically deposited with a poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film. *Journal of Neural Engineering*, *3*(1), 59–70. <http://doi.org/10.1088/1741-2560/3/1/007>
- Ma, P.-C., Siddiqui, N. A., Marom, G., & Kim, J.-K. (2010). Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *41*(10), 1345–1367. <http://doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.07.003>
- Mabbott, G. A. (1983). An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, *60*(9), 697–702. <http://doi.org/10.1021/ed060p697>

- Marinho, B., Ghislandi, M., Tkalya, E., Koning, C. E., & de With, G. (2012). Electrical conductivity of compacts of graphene, multi-wall carbon nanotubes, carbon black, and graphite powder. *Powder Technology*, 221, 351–358. <http://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.01.024>
- Mariotti, D., Švrček, V., Mathur, Dickinson, C., Matsubara, K., Kondo, M., Address, I. P. (2013). Carbon nanotube growth activated by quantum-confined silicon nanocrystals. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46(12), 122001. <http://doi.org/10.1088/0022-3727/46/12/122001>
- Marom, S., & Shahaf, G. (2002). Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(1), 63–87. <http://doi.org/10.1017/S0033583501003742>
- Martin-Fernandez, I., Gabriel, G., Guimerà, A., Palomer, X., Reig, R., Sanchez-Vives, M. V., Godignon, P. (2013). Multi-walled carbon nanotube based multi-electrode arrays for the detection of the emergent activity in the cortical network. *Microelectronic Engineering*, 112, 14–20. <http://doi.org/10.1016/j.mee.2013.05.009>
- Massobrio, G., & Massobrio, A. (2009). Neuron-to-carbon nanotubes interface under temperature variations : modeling and simulation, 8(c), 790–793. *IEEE Conf. Nanotechnol.*, 9<sup>th</sup>, 790-793
- Massobrio, G., Massobrio, A., Massobrio, L., & Massobrio, P. (2011). Silicon-based biosensor functionalised with carbon nanotubes to investigate neuronal electrical activity in pH-stimulated environment: a modelling approach. *Micro & Nano Letters*, 6(8), 689. <http://doi.org/10.1049/mnl.2011.0336>
- Massobrio, G., Massobrio, P., & Martinoia, S. (2008). Modeling the neuron-carbon nanotube-ISFET junction to investigate the electrophysiological neuronal activity. *Nano Letters*, 8(12), 4433–4440. <http://doi.org/10.1021/nl802341r>
- Massobrio, P., Bajjon, P. L., Maccione, A., Chiappalone, M., & Martinoia, S. (2007). Activity modulation elicited by electrical stimulation in networks of dissociated cortical neurons. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings*, (June), 3008–3011. <http://doi.org/10.1109/IEMBS.2007.4352962>
- Massobrio, P., Massobrio, G., & Martinoia, S. (2009). Modeling the neuron-to-carbon nanotubes interface. *2009 4th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering, NER '09*, 108–111. <http://doi.org/10.1109/NER.2009.5109246>
- Mazzatenta, A., Giugliano, M., Campidelli, S., Gambazzi, L., Businaro, L., Markram, H., Ballerini, L. (2007). Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits. *The Journal of Neuroscience*, 27(26), 6931–6936. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1051-07.2007>
- Meier, J. H., Rutten, W. L. C., & Boom, H. B. K. (1998). Extracellular potentials from active myelinated fibers inside insulated and noninsulated peripheral nerve. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 45(9), 1146–1153. <http://doi.org/10.1109/10.709558>

- Mejía-Rodríguez, G., & Mozumder, C. (2006). Multi-scale Material Modeling of Fracture and Crack Propagation. *Nd.Edu*, (Md), 1–9. [http://www.nd.edu/~malber/multi\\_scale\\_06/cracks.pdf](http://www.nd.edu/~malber/multi_scale_06/cracks.pdf)
- Merrill, D. R., Bikson, M., & Jefferys, J. G. R. (2005). Electrical stimulation of excitable tissue: Design of efficacious and safe protocols. *Journal of Neuroscience Methods*, 141(2), 171–198. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.020>
- Mogilnera, A. Y., Benabidb, A., & Rezai, A. R. (2001). Brain stimulation: current applications and future prospects. *Thalamus Related Syst*, 1(3), 255–267. [http://doi.org/10.1016/S1472-9288\(01\)00024-3](http://doi.org/10.1016/S1472-9288(01)00024-3)
- Morales-Reyes, I. (2009). *Diseño y caracterización de interfaz células neuronales-substrato metálico a través de una película de nanotubos de carbono*. Trabajo de tesis. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Moulin, C., Glière, A., Barbier, D., Joucla, S., Yvert, B., Mailley, P., & Guillemaud, R. (2008). A new 3-D finite-element model based on thin-film approximation for microelectrode array recording of extracellular action potential. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55(2), 683–692. <http://doi.org/10.1109/TBME.2007.903522>
- Navarro, X., Krueger, T. B., Lago, N., Micera, S., Stieglitz, T., & Dario, P. (2005). A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 10(3), 229–258. <http://doi.org/10.1111/j.1085-9489.2005.10303.x>
- Ngo, C. L., Le, Q. T., Ngo, T. T., Nguyen, D. N., Vu, M. T. (2013). Surface modification and functionalization of carbon nanotube with some organic compounds. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 35017.
- Ntim, S. A., Sae-Khow, O., Witzmann, F. A., & Mitra, S. (2011). Effects of polymer wrapping and covalent functionalization on the stability of MWCNT in aqueous dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 355(2), 383–388. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.12.052>
- Nunes, A., Al-Jamal, K., Nakajima, T., Hariz, M., & Kostarelos, K. (2012). Application of carbon nanotubes in neurology: Clinical perspectives and toxicological risks. *Archives of Toxicology*, 86(7), 1009–1020. <http://doi.org/10.1007/s00204-012-0860-0>
- Oweiss, K., Wise, M., Lopez, C., Wiler, J., & Anderson, D. (1999). Chronic electrode-brain interface modeled with FEM. *Proceedings of the First Joint BMES/EMBS Conference. 1999 IEEE Engineering in Medicine and Biology 21st Annual Conference and the 1999 Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society (Cat. N, 1, 7803*. <http://doi.org/10.1109/IEMBS.1999.802531>
- Park, J. G., Li, S., Liang, R., Fan, X., Zhang, C., & Wang, B. (2008). The high current-carrying capacity of various carbon nanotube-based buckypapers. *Nanotechnology*, 19(18), 185710. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/19/18/185710>
- Polikov, V. S., Tresco, P. A., & Reichert, W. M. (2005). Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *Journal of Neuroscience Methods*, 148(1), 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.08.015>



- Price, R. L., Ellison, K., Haberstroh, K. M., & Webster, T. J. (2004). Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 70(1), 129–138. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.30073>
- Quiroz, F. G., Moreno, A. V., & Jaramillo, P. C. (2007). Interfaces neuronales y sistemas máquina-cerebro: fundamentos y aplicaciones. *Revista Ingeniería Biomédica*, 14–22. <http://revis-tabme.eia.edu.co/numeros/1/art/InterfacesNeuronales.pdf>
- Reddy, J. N. (2006). *An Introduction to the Finite Element* (Third edit). New York: McGraw-Hill Education. <https://books.google.com.mx/books?id=8gqnRwAACAAJ>
- Robinson, J. T., Jorgolli, M., Shalek, A. K., Yoon, M.-H., Gertner, R. S., & Park, H. (2012). Vertical nanowire electrode arrays as a scalable platform for intracellular interfacing to neuronal circuits. *Nature Nanotechnology*, 7(3), 180–4. <http://doi.org/10.1038/nnano.2011.249>
- Rosenblatt, S. (2006). Pushing the Limits of Carbon Nanotube Transistors, (January). [http://www.mceuengroup.lassp.cornell.edu/sites/mceuen/files/publications/Thesis\\_Rosenblatt.pdf](http://www.mceuengroup.lassp.cornell.edu/sites/mceuen/files/publications/Thesis_Rosenblatt.pdf) (Rev. 2017)
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2004). Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: What Clinicians Need to Know. *Clinical Infectious Diseases*, 39(5), 702–709. <http://doi.org/10.1086/423182>
- Rutten, W. L. C. (2002). Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4, 407–452. <http://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153427>
- Sah, P., & Davies, P. (2000). Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 27(9), 657–63. <http://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03317.x>
- Sala, O. (1996). Capítulo 1: Fundamentos de espectroscopía Raman. *Fundamentos Da Espectroscopia Raman E No Infravermelho*, 10–34.
- Sariciftci, S. N. (2006). Studies towards a bio – organic – cell – chip interface. <https://www.jku.at/ipc/content/e166717/e180430/e180447/e180484/thesis-spiegel.pdf> (Rev. 2017)
- Schwartz, A. B. (2004). Cortical Neural Prosthetics. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 487–507. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144233>
- Seetharamappa, J., Yellappa, S., & D'Souza, F. (2006). Carbon nanotubes: Next generation of electronic material. *The Electrochemical Society Interface*, 23–26. <http://doi.org/10.1149/1.2338645>
- Semiconductor, V. (2002). The General Properties of Si, Ge, SiGe, SiO<sub>2</sub> and Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. *Tables*. <http://www.virginiasemi.com/pdf/generalpropertiesSi62002.pdf> (Rev. 2017)
- Sheet Resistance and the Calculation of Resistivity or Thickness Relative to Semiconductor Applications. (Rev. 2017). <http://four-point-probes.com/sheet-resistance-and-the-calculation-of-resistivity-or-thickness-relative-to-semiconductor-applications/>
- Siciliano, R. (2012). The Hodgkin-Huxley model - Its extensions, analysis and numerics, 41. <http://www.math.mcgill.ca/gantumur/docs/reps/RyanSicilianoHH.pdf> (Rev. 2017)

- Sigworth, F. J., & Klemic, K. G. (2005). Microchip technology in ion-channel research. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 4(1), 121–127. <http://doi.org/10.1109/TNB.2004.842471>
- Sinkjær, T., & Popovic, D. B. (2006). Restoration of Movement by Implantable Neural Motor Prostheses. In *Handbook of Neural Engineering* (pp. 227–241). John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/9780470068298.ch14>
- Sorkin, R., Greenbaum, A., David-Pur, M., Anava, S., Ayali, A., Ben-Jacob, E., & Hanein, Y. (2009). Process entanglement as a neuronal anchorage mechanism to rough surfaces. *Nanotechnology*, 20(1), 15101. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/20/1/015101>
- Szentandrassy, N., Kistamás, K., Hegyi, B., Horváth, B., Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Nánási, P. P. (2014). Contribution of ion currents to beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(7), 1431–1443. <http://doi.org/10.1007/s00424-014-1581-4>
- Timko, B. P., Cohen-Karni, T., Qing, Q., Tian, B., & Lieber, C. M. (2010). Design and implementation of functional nanoelectronic interfaces with biomolecules, cells, and tissue using nanowire device arrays. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 9(3), 269–280. <http://doi.org/10.1109/TNANO.2009.2031807>
- Van Putten, R. M. E. M., Mengarelli, I., Guan, K., Zegers, J. G., Van Ginneken, A. C. G., Verkerk, A. O., & Wilders, R. (2015). Ion channelopathies in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes: A dynamic clamp study with virtual IK1. *Frontiers in Physiology*, 6(FEB), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00007>
- Veraart, C., Raftopoulos, C., Mortimer, J. T., Delbeke, J., Pins, D., Michaux, G., Wanet-Defalque, M. C. (1998). Visual sensations produced by optic nerve stimulation using an implanted self-sizing spiral cuff electrode. *Brain Research*, 813(1), 181–186. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00977-9](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00977-9)
- Vitale, F., Summerson, S. R., Aazhang, B., Kemere, C., & Pasquali, M. (2015). Neural stimulation and recording with bidirectional, soft carbon nanotube fiber microelectrodes. *ACS Nano*, 9(4), 4465–4474. <http://doi.org/10.1021/acs.nano.5b01060>
- Voge, C. M., & Stegemann, J. P. (2011). Carbon nanotubes in neural interfacing applications. *Journal of Neural Engineering*, 8, 11001. <http://doi.org/10.1088/1741-2560/8/1/011001>
- Walker, R. W., Markillie, L. M., Colotelo, A. H., Gay, M. E., Woodley, C. M., & Brown, R. S. (2012). The Efficacy of Ultraviolet Radiation for Sterilizing Tools Used for Surgically Implanting Transmitters into Fish, (February), 44.
- Wang, K., Fishman, H. A. H. a, Dai, H., & Harris, J. S. J. S. (2006). Neural stimulation with a carbon nanotube microelectrode array. *Nano Letters*, 6(9), 2043–8. <http://doi.org/10.1021/nl061241t>
- Wang, Q., & Moriyama, H. (2011). Carbon Nanotube-Based Thin Films : Synthesis and Properties. In S. Yellampalli (Ed.), *Carbon-nanotubes – Synthesis, Characterization, Applications* (pp. 487-514). Rijeka, HR: InTech. <http://doi.org/10.5772/22021>

- Waterhouse, B. R., & Farmery, A. D. (2012). The organization and composition of body fluids. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, *13*(12), 603–608. <http://doi.org/10.1016/j.mpaic.2012.09.007>
- Wu, S. N., Yeh, C. C., Huang, H. C., So, E. C., & Lo, Y. C. (2012). Electrophysiological characterization of sodium-activated potassium channels in NG108-15 and NSC-34 motor neuron-like cells. *Acta Physiologica*, *206*(2), 120–134. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02438.x>
- Xie, J., Chen, L., Varadan, V. K., Yancey, J., & Srivatsan, M. (2008). The effects of functional magnetic nanotubes with incorporated nerve growth factor in neuronal differentiation of PC12 cells. *Nanotechnology*, *19*(10), 105101. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/19/10/105101>
- Yoon, I., Hamaguchi, K., Borzenets, I. V., Finkelstein, G., Mooney, R., & Donald, B. R. (2013). Intracellular Neural Recording with Pure Carbon Nanotube Probes. *PLoS ONE*, *8*(6), 6–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0065715>
- Zhang, D., Ryu, K., Liu, X., Polikarpov, E., Ly, J., Tompson, M. E., & Zhou, C. (2006). Transparent, conductive, and flexible carbon nanotube films and their application in organic light-emitting diodes. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl0608543>