



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa**

---

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

“ESTUDIO DE LA PROPAGACIÓN DE ESTÍMULOS ELÉCTRICOS EN CÉLULAS  
DEL SISTEMA NERVIOSO EMPLEANDO MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA”

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Doctora en Biología Experimental

**P R E S E N T A:**

**M.A. CRISTINA COSTA GARCÍA**

**CODIRECTORES DE TESIS:**

**DR. NIKOLA BATINA**

**DRA. ANABEL JIMÉNEZ ANGUIANO**

**ASESOR:**

**DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**

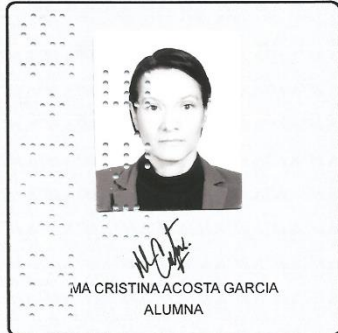
**Enero, 2018.**



ESTUDIO DE LA PROPAGACIÓN DE ESTIMULOS ELÉCTRICOS EN CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO EMPLEANDO MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 11 del mes de enero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ
- DR. GERARDO JORGE FELIX MARTINEZ
- DRA. ELIZABETH MALDONADO ALVARADO
- DR. ALBERTO PARRA BARRERA
- DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ



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:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
DE: MA CRISTINA ACOSTA GARCIA

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 CÉSAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

VOCAL

DR. GERARDO JORGE FELIX MARTINEZ

VOCAL

DRA. ELIZABETH MALDONADO ALVARADO

VOCAL

DR. ALBERTO PARRA BARRERA

SECRETARIO

DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ

**El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.**

**La alumna Ma. Cristina Acosta García fue apoyada con la beca otorgada por parte del CONACYT con el No. de registro 39998.**

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "ESTUDIO DE LA PROPAGACIÓN DE ESTIMULOS ELECTRICOS EN CELULAS DEL SISTEMA NERVIOSO EMPLEANDO MICROSCOPIA DE FUERZA ATOMICA", que presentó

**Ma. Cristina Acosta García.**

El día 11 de enero del año 2018.

SINODALES:



**Dr. J. Rafael Godínez Fernández**

Presidente

Departamento de Ingeniería Eléctrica.

División de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

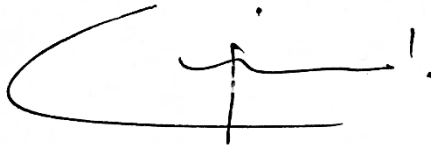
*Claudia Barbosa Mtz.*  
**Dra. Claudia Barbosa Martínez**

Secretario

Departamento de Biología.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



**Dr. Gerardo J. Félix Martínez**

Vocal

Departamento de Ingeniería Eléctrica

División de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



**Dra. Elizabeth Maldonado Alvarado**

Vocal

Estancia Postdoctoral, departamento de Química.

División de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



**Dr. Alberto Parra Barrera**

Vocal

Escuela Superior de Medicina

Instituto Politécnico Nacional

## **COMITÉ TUTORAL**

### **CODIRECTORES:**

#### **Dr. Nikola Batina**

Departamento de Química.

División de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

bani@xanum.uam.mx

#### **Dra. Anabel Jiménez Anguiano**

Departamento de Biología de la reproducción.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

aja@xanum.uam.mx

### **ASESOR:**

#### **Dr. Luis Felipe Jiménez García**

Profesor de Carrera Titular C,

Departamento de Biología Celular,

Facultad de Ciencias, UNAM

lfjg@hp.fciencias.unam.mx

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Anabel Jiménez Anguiano, por sus valiosos consejos, por su comprensión en el camino de esta jornada.

Al Dr. Nikola Batina, por apoyarme en todo este camino, por sus enseñanzas, confianza y guía en esta travesía de la ciencia y la vida.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez, por su tiempo y consejos para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. J. Rafael Godínez Fernández, por su ayuda invaluable, por su ejemplo de tenacidad e integridad, por no dejarme claudicar.

Al Dr. Israel Morales Reyes, por su apoyo incondicional, su amistad y su ejemplo.

Al Dr. José David Sepúlveda Sánchez, por su apoyo en la microscopía electrónica, por compartirme sus conocimientos y su amistad.

Al Dr. José Luis Gómez Quiroz, por su apoyo y comprensión.

A mis compañeros del laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular y del laboratorio de Biofísica, por su apoyo y aliento.

A mis sinodales:

Les agradezco su tiempo, su esfuerzo y dedicación en la revisión del contenido de este trabajo, así como, sus valiosas propuestas.

## DEDICATORIAS

A Dios

Por llenarme de bendiciones, por sembrar la semilla que da la fragancia a mi ser, por pintar la luz de su bondad en el lienzo de mi vida...

A mis padres: Cristina y Roberto

Por todo su amor y apoyo incondicional, por darme la mayor de las herencias: la educación, por hacer suyos mis sueños y anhelos... ¡los amo!

A Bayardo

Por ser mi cómplice, por escribir a mi lado esta parte de la vida, por viajar juntos en esta ruta de aventuras y seguir construyendo sueños juntos... ¡te amo!

A mis hijos Bayardo Zahir y Gibran Farid

Por ser el impulso que me mueve, por hacerme sentir al máximo todas las emociones, por sus primeras palabras, lagrimas, risas...por mostrarme que el amor no tiene límites... ¡los amo!

A mis hermanos: Yolanda, Roberto, José Luis, Rodrigo y Rogelio.

Por ser el mejor regalo que mis padres me pudieron dar, por todo su amor...

A mis sobrinos

Por su cariño y aliento...



## RESUMEN

Las células excitables han sido estudiadas desde un punto de vista eléctrico durante décadas. Actualmente continúan estudiándose intensamente pero ya no sólo por biofísicos y electrofisiólogos; sino también por farmacólogos, neurocientíficos, ingenieros biomédicos, bioquímicos, biólogos moleculares, entre otros.

Los avances más importantes en el estudio de las células excitables ha estado íntimamente relacionado con el desarrollo de nuevas metodologías que van desde la instrumentación y adquisición de señales eléctricas hasta el desarrollo de modelos biológicos apropiados. El trabajo de tesis que se presenta se ubica en este contexto; es decir, mejorar las técnicas tradicionales de adquisición de las señales eléctricas de las células excitables empleando para ello los avances que la nanotecnología nos brinda. Asimismo, mejorar la calidad de las imágenes que es posible obtener con la microscopía de fuerza atómica. Consideramos que los resultados aquí reportados servirán para mejorar la calidad de las mediciones eléctricas de las células y obtener algo que hasta la fecha no había sido posible: la medición simultánea de los potenciales de acción y las corrientes iónicas transmembranales que les dan origen.

## ABSTRACT

Excitable cells have been studied for decades from an electrical point of view. Currently, they are still studied intensively not only by biophysicists and electrophysiologists; but also by pharmacologists, neuroscientists, biomedical engineers, biochemicals, molecular biologists, among others.

The most important advances in the study of excitable cells have been intimately related to the development of new methodologies ranging from the instrumentation and acquisition of electrical signals to the development of appropriate biological models. The thesis work here presented is located in this context; that is to say, to improve the traditional techniques of acquisition of the electrical signals of the excitable cells using the advances offered by nanotechnology. Additionally, we aim to improve the quality of the images obtained through atomic force microscopy. We believe that the results reported here will serve to improve the quality of the electrical measurements of the cells and to achieve a goal that has remained elusive: the simultaneous measurement of the action potentials and the underlying transmembrane ion currents.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
LAS CÉLULAS EXCITABLES .....	11
<i>Neuronas</i> .....	12
<i>Transmisión de señales eléctricas por células nerviosas</i> .....	13
<i>Impulso nervioso</i> .....	14
MÉTODOS DE MONITOREO DE ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN CÉLULAS .....	16
ELECTRODOS INTRACELULARES.....	16
<i>Neurotoxinas</i> .....	17
<i>Microelectrodos</i> .....	18
<i>Técnica de fijación de corriente</i> .....	18
<i>Técnica de fijación del voltaje</i> .....	19
MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA EN BIOLOGÍA.....	21
MICROSCOPIA DE FUERZA ELECTROSTÁTICA .....	22
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>24</b>
EMPLEO DEL AFM EN EL ESTUDIO DEL SISTEMA NERVIOSO.....	24
MEDICIÓN SIMULTANEA DEL POTENCIAL DE ACCIÓN Y LAS CORRIENTES IÓNICAS QUE LE DAN ORIGEN. ....	24
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR NG108-15 .....	30
ELABORACIÓN DE UN ELECTRODO A PARTIR DEL SUBSTRATO DE AU (111). ....	31
TRATAMIENTO AL SUBSTRATO DE AU(111) CON POLI-L-LISINA.....	32
CULTIVO CELULAR SOBRE EL SUBSTRATO AU(111). ....	32
CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NEURONALES CULTIVADAS EN LOS DIFERENTES SUBSTRATOS EMPLEANDO AFM Y EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO ( <i>SCANNING ELECTRON MICROSCOPY</i> ( <i>SEM</i> ))......	33
<i>Caracterización morfológica empleando el SEM</i> . ....	33
<i>Caracterización morfológica empleando el AFM</i> . ....	33
<i>Optimización de las condiciones de estudio para visualización in vitro de células neuronales         empleando el AFM</i> .....	34
VISUALIZACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS SUBSTRATOS EMPLEANDO EL AFM Y EFM.....	35
<i>Microelectrodo IAME-co- IME</i> . ....	36
<i>Cultivo de neuronas en el microelectrodo</i> .....	36

<i>Caracterización del microelectrodo con AFM / EFM.</i> .....	36
<i>Registro electrofisiológico.</i> .....	37
MEDICIÓN SIMULTANEA DEL POTENCIAL DE ACCIÓN Y LAS CORRIENTES IÓNICAS QUE LE DAN ORIGEN. ....	38
CAPACITANCIA DE LA MEMBRANA CELULAR. ....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>CARACTERIZACIÓN DEL SUBSTRATO DE AU(111).</b> .....	<b>43</b>
<b>MICROELECTRODO</b> .....	<b>44</b>
<b>CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR NG108 EN EL CHIP IAME CO IME.</b> .....	<b>47</b>
CALIBRACIÓN DE POTENCIAL EN EL CHIP IAME CO IME. ....	48
<b>CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR (LÍNEA NG108-15)</b> .....	<b>56</b>
<b>REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.</b> .....	<b>62</b>
<i>Análisis comparativo de propiedades eléctricas pasivas y no lineales de las células NG108-15</i> <i>cultivadas sobre cajas de plástico y placas de Au(111).</i> .....	63
<i>Registro de <math>I_m</math> a través de un segundo sistema de fijación del voltaje.</i> .....	73
<i>Medición simultánea del potencial de membrana y la corriente de membrana</i> .....	76
<b>DISCUSIÓN.</b> .....	<b>79</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>84</b>
<b>APENDICE</b> .....	<b>86</b>
MEDIO DE CULTIVO DMEM ENRIQUECIDO .....	86
SOLUCIÓN DE TRIPSINA .....	86
SOLUCIÓN DE POLI-L-LISINA .....	87
SOLUCIÓN DE AZUL TRIPANO .....	87
CONTEO CELULAR .....	88
TÉCNICA DE LAVADO DE MATERIAL.....	88
CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS DE CEREBELO.....	89
<i>Procedimiento:</i> .....	89
<i>Siliconización del material de vidrio:</i> .....	91
CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR PC12.....	91
CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR N1E-115 .....	92
EQUIPO ELECTROFISIOLÓGICO .....	92
CONSTRUCCIÓN DE MICROPIPETAS.....	93
SOLUCIÓN INTRACELULAR .....	94
SOLUCIÓN EXTRACELULAR.....	94
DISPOSITIVO EXTERNO PARA LA APLICACIÓN Y CONTROL DE LA SEÑAL ELÉCTRICA EN EFM .....	95
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>97</b>
URL'S CONSULTADAS .....	107
ARTÍCULO CIENTÍFICO .....	108

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha hecho evidente que los cultivos de células son excelentes modelos para estudiar el sistema nervioso, debido a que las células son capaces de diferenciarse morfológicamente y asemejarse a las células del tejido original. Los cultivos de células del sistema nervioso proveen de información esencial para entender diversos procesos que se llevan a cabo en el sistema nervioso. La necesidad de nuevas herramientas para su estudio ha llevado a inspeccionar campos de las ciencias modernas como la nanotecnología y la nanomedicina, que han ayudado a entender y dilucidar los procesos biológicos partiendo de un punto de vista molecular y moderno.

### Las células excitables

Las células excitables son aquellas capaces de generar, ante estímulos apropiados, cambios bruscos en su potencial de membrana denominados potenciales de acción. Algunos ejemplos de tales células son las musculares como las cardíacas, esqueléticas y lisas, en las que la actividad eléctrica induce y modula la intensidad de la fuerza contráctil, lo que implica que sin la actividad eléctrica no sería posible la contracción [1]. Otro tipo importante de células excitables son las del tejido nervioso. Por ejemplo, las neuronas únicamente pueden desempeñar su papel fisiológico generando actividad eléctrica en forma de potenciales de acción y de potenciales postsinápticos. Asimismo, la capacidad del sistema nervioso para recabar información del medio interno y externo del organismo, procesar la información y dar respuestas apropiadas a un medio interno y externo cambiantes solo es posible por la actividad eléctrica de las neuronas [1, 2]. Además, se tienen células del tejido glandular en donde

la inducción e intensidad de la liberación de hormonas solo es posible por la actividad eléctrica. Un ejemplo típico lo constituyen las células beta del páncreas que, en respuesta a un estímulo hiperglucémico, se despolarizan generando potenciales de acción indispensables para la exocitosis de insulina. Basten estos ejemplos para destacar por qué las células excitables han sido estudiadas desde un punto de vista eléctrico durante décadas. Actualmente, las células excitables continúan estudiándose intensamente; no sólo por biofísicos y electrofisiólogos, sino también por farmacólogos, neurocientíficos, ingenieros biomédicos, bioquímicos, biólogos moleculares, entre otros. [3-5].

## Neuronas

Santiago Ramón y Cajal propusieron que el cerebro estaba constituido por unidades, a las cuales se les conoce como neuronas. Se estima que el cuerpo humano cuenta con cerca de cien mil millones de neuronas; y que a su vez cada una de ellas está conectada con 10 mil. La neurona es una célula largada, especializada en conducir impulsos nerviosos y es considerada la célula fundamental y básica del sistema nervioso [2, 3].

En las neuronas se pueden distinguir tres partes fundamentales: el soma, el axón y las dendritas. El soma o cuerpo celular, corresponde a la parte más voluminosa de la neurona. En él se puede observar una estructura esférica llamada núcleo, que contiene la información que dirige la actividad de la neurona. Además, en el soma se encuentra el citoplasma, en el que se ubican otras estructuras que son importantes para el funcionamiento de la neurona. Por su parte, las dendritas, son prolongaciones que se

originan del soma neural, tienen como función recibir impulsos de otras neuronas y enviarlas hasta el soma de la neurona. Finalmente, el axón es una prolongación única que, en algunas ocasiones, puede medir hasta un metro de longitud. Su función es sacar el impulso desde el soma neuronal y conducirlo hasta otro lugar del sistema [1-3].

Las neuronas se reconocen como los elementos celulares responsables del procesamiento de información del sistema nervioso gracias a la excitabilidad eléctrica, una de sus propiedades fundamentales que constituye el substrato biofísico de la codificación de información neuronal. Las neuronas transfieren la información entre ellas a través de sinapsis, principalmente mediante la liberación desde la terminal presináptica de neurotransmisores químicos que provocan la activación de receptores específicos en la membrana postsináptica. Es esta la principal forma de comunicación en el sistema nervioso [3, 6].

#### Transmisión de señales eléctricas por células nerviosas

Las células nerviosas, o neuronas, reciben, conducen y transmiten señales eléctricas y químicas. El significado de las señales varía de acuerdo con el papel que desempeña la célula en cuestión en el funcionamiento del sistema nervioso en conjunto, pero a pesar del variado significado de las señales, su forma en todos los casos es la misma: consiste en cambios del potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de la neurona. La comunicación depende de que una alteración eléctrica producida en una parte de la célula se extienda hacia otras partes. Sin una amplificación activa, la señal eléctrica se atenúa al aumentar la distancia respecto a la fuente. En distancias cortas,

la atenuación pasiva de la señal producida en un gran número de neuronas es imperceptible, pero para la comunicación a largas distancias, esta atenuación pasiva es importante impidiendo se logre el objetivo. Por ello, algunas neuronas han desarrollado un mecanismo activo de señalización que representa uno de sus rasgos más notables y característicos, el potencial de acción o también llamado impulso nervioso, que es la actividad eléctrica que se propaga a lo largo de la membrana plasmática, como respuesta a un estímulo eléctrico [1, 6].

### Impulso nervioso

Una serie de experimentos llevados a cabo entre 1934 y 1952 por Hodgkin y Huxley aclararon muchos de los aspectos de la transmisión de información y propagación del potencial de acción en neuronas [7-9]. La existencia de gradientes electroquímicos de los iones a ambos lados de las membranas celulares constituye la base para la propagación del potencial de acción. Los gradientes de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  surgen y se mantienen por la acción de la ATPasa de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ; además, la permeabilidad selectiva a los iones de  $\text{K}^+$  y en menor grado a otros iones como el  $\text{Na}^+$  conducen a que el potencial de membrana sea negativo en el espacio intracelular con respecto al medio extracelular. Así, el potencial de reposo de las neuronas de los mamíferos es de unos  $-70 \text{ mV}$  [2, 6].

Las neuronas son células eléctricamente excitables, puesto que su membrana plasmática posee canales específicos para los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a los cambios en el voltaje y a ligandos [1, 2]. Estos iones transportan carga eléctrica a través de la membrana plasmática de las neuronas. La apertura y cierre de los canales



permite el movimiento de estos iones a través de la membrana plasmática, con el resultado de la variación en la distribución de carga y, por tanto, en el potencial de dicha membrana. Así, por ejemplo, se puede decir que existe una despolarización cuando los cationes fluyen al interior del axón y aumenta el número de cargas positivas en el interior de la célula, haciendo su potencial menos negativo, mientras que cuando los cationes salen al medio extracelular, hacen más negativo el potencial de la membrana, el proceso se denomina hiperpolarización. Durante el proceso de envío de señales, los cambios de potencial de membrana (potenciales de acción, potenciales sinápticos y potenciales de receptor) están causados por modificaciones sustanciales de la permeabilidad relativa de la membrana para los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Cl}^-$  [2].

Un potencial de acción se produce cuando una señal eléctrica, en forma de flujo de iones, atraviesa la membrana plasmática de una neurona y produce una despolarización desde el potencial de reposo de  $-70$  mV a un potencial de aproximadamente  $-50$  mV. El valor del potencial de membrana requerido para que se genere un potencial de acción se denomina *potencial umbral* [1, 2, 6]. El potencial de acción es un proceso regenerativo que obedece a la ley del todo o nada. Posee una amplitud fija, donde el estímulo simplemente inicia una cadena de sucesos. Los incrementos posteriores en la magnitud o en la duración del potencial que desencadena la despolarización no poseen efecto alguno en la magnitud o en la duración del potencial que se está propagando, aunque sí en la frecuencia de disparo de potenciales de acción. Así, este mecanismo de conducción del impulso nervioso

permite la transmisión de señales a larga distancia sin necesidad de mecanismos de amplificación [1, 2, 6].

### Métodos de monitoreo de actividad eléctrica en células

El potencial de acción de una célula nerviosa puede ser registrado usando microelectrodos intracelulares y extracelulares. Además, una manera para visualizarlo es usando colorantes potenciométricos [6,10]. Se puede generar un potencial de acción, aplicando un estímulo eléctrico a la célula. Esto se puede hacer usando ambas técnicas: intracelulares y extracelulares [10, 11]. El efecto de una droga en el sistema nervioso puede alterar la frecuencia y forma en que son producidas las señales eléctricas en las células. Estas señales pueden ser monitoreadas y por medio de los datos obtenidos, se puede determinar el efecto de la droga sobre el sistema nervioso.

De manera breve y general, en el siguiente apartado se describen algunas de las técnicas utilizadas para el registro de la actividad eléctrica en células.

#### Electrodos intracelulares.

El surgimiento de los electrodos intracelulares o microelectrodos ha revolucionado el estudio de la función y estructura de los canales iónicos en la membrana plasmática, usualmente son de tubo de vidrio pulido, formando puntas de diámetros menores a un micrón. Estos tubos son llenados con soluciones conductoras, por ejemplo, de una solución de sales, como el cloruro de potasio. La punta de estos electrodos es insertada en la membrana plasmática. Estos microelectrodos se colocan sobre la superficie de las membranas celulares y mediante succión se generan sellos de alta

resistencia eléctrica ("gigasellos") que permiten medir la corriente de un sólo canal iónico; o bien, mediante una succión vigorosa que rompa la membrana celular, es posible medir la corriente total de la membrana celular. A esta técnica se le conoce de "fijación del voltaje"; existen diferentes técnicas de fijación del voltaje, en este trabajo de tesis empleamos la técnica de "*Patch-clamp*" en la variedad de célula completa que permite medir la corriente iónica que se produce en toda la membrana celular. Una vez medidas las corrientes iónicas con la técnica de fijación del voltaje, es posible cambiar la configuración del amplificador de *Patch-clamp* a la de "fijación de corriente" permitiendo ahora medir los potenciales de acción. En resumen, con la técnica de *Patch-clamp* que emplea microelectrodos, es posible medir las corrientes iónicas en fijación del voltaje y los potenciales de acción en fijación de corriente en la misma célula [11-13].

#### Neurotoxinas.

Otra técnica en el estudio de las diferentes poblaciones de canales iónicos, es el empleo de neurotoxinas, las cuales han desempeñado un papel fundamental debido a su característica de ser altamente selectivas; esto es, bloquean de manera selectiva y específica algunas poblaciones de canales iónicos permitiendo estudiar con detalle al resto de canales iónicos insensible a la neurotoxina. ejemplos de estas incluyen las ficotoxinas: anatoxinas, tetrodoxina (TTX), saxitoxina (STX), brevetoxina (PbTX) y ciguatoxina (CTX); toxinas de anfibios: batracotoxina; toxinas de coral: palitoxina; toxina de molusco: onchidal. El mecanismo de acción de algunas de estas neurotoxinas es por interacción con canales dependientes de voltaje [14, 15].

## Microelectrodos

En años recientes ha sido posible monitorear la actividad de poblaciones neuronales en condiciones fisiológicas (*in vitro*) con técnicas electrofisiológicas, mediante el uso de microelectrodos integrados en el substrato de crecimiento de cultivos celulares, haciendo posible la estimulación eléctrica al tejido o cultivo neuronal. Esto expande el intervalo de aplicaciones y ensayos, permitiendo la evaluación de diversos puntos de interés (toxicidad de fármacos, estimulación, redes neuronales, entre otros). Además, las técnicas electrofisiológicas recientes nos permiten elegir entre diferentes diseños, a diversas escalas y materiales [16-20].

Como ya se mencionó, dos técnicas experimentales en el campo de la electrofisiología y biofísica han sido fundamentales para conocer las bases iónicas de la actividad eléctrica de las células excitables: 1) la técnica de fijación de corriente y 2) la técnica de fijación del voltaje. A continuación, se describen brevemente ambas técnicas.

### Técnica de fijación de corriente

Las células excitables a registrar se mantienen sumergidas en solución fisiológica (baño). Para mantener a un potencial de cero el baño se conecta la solución a tierra mediante un electrodo de plata clorurado. Posteriormente, con el empleo de un micromanipulador se acerca el microelectrodo a la célula seleccionada, hasta que se hace contacto con la membrana celular, y este a su vez está conectado al amplificador. Se realiza una primera succión al microelectrodo para que se adhiera firmemente la punta a la superficie de la membrana celular formando el "gigasello", posteriormente se aplica una segunda succión al microelectrodo lo suficientemente fuerte para romper

la membrana celular y de esta manera tener acceso eléctrico al interior celular; además, la solución denominada intracelular que contiene la micropipeta difunde al interior celular. por lo anterior, con esta técnica también se controla el medio iónico intracelular como extracelular. Bajo estas condiciones, en la configuración de fijación de corriente, es posible medir su potencial de reposo y aplicar pulsos de corriente rectangulares para despolarizar la membrana celular e inducir potenciales de acción. Con esta técnica es posible estudiar el comportamiento eléctrico de las células excitables bajo diferentes condiciones experimentales, así como el efecto de diferentes agentes endógenos o exógenos (fármacos) en la actividad eléctrica de las células. Con esta técnica inyectamos corriente a la célula y como resultado se miden los cambios en el potencial de membrana inducidos por el estímulo de corriente [11, 21, 22]. Aunque es una técnica muy importante en electrofisiología, tiene la limitante de que no podemos observar simultáneamente las corrientes iónicas transmembranales que generan los potenciales de acción.

#### Técnica de fijación del voltaje

Esta técnica fue diseñada para analizar las corrientes iónicas transmembranales, lo que no es posible con la técnica de fijación de corriente. Consiste en aplicar pulsos rectangulares de voltaje de diferente magnitud y duración a la célula modificando de esta manera el potencial transmembranal, lo que nos permite observar cómo se generan las corrientes iónicas por la apertura de los canales voltaje dependientes. De esta manera, al cambiar el voltaje de la membrana observamos cómo se inducen las diferentes corrientes iónicas ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , entre otros.) con lo cual obtenemos la

dependencia del voltaje de las corrientes iónicas, así como su evolución en el tiempo. Al igual que en la técnica de fijación de corriente, la célula a estudiar se sumerge en la solución del baño conectada a tierra y mediante una micropipeta se aplican los pulsos de fijación del voltaje y se miden las corrientes iónicas inducidas por la apertura de los canales voltaje dependientes. En la práctica, se aplican las técnicas de fijación de corriente y del voltaje a la misma célula y con el mismo electrodo [11-13, 21, 22].

La variedad de métodos existentes para el estudio de la actividad eléctrica en células del sistema nervioso nos permite elegir la técnica más adecuada según sea nuestro propósito. En muchos casos la combinación de estas herramientas es usada para proveer mayores detalles. En la búsqueda de resultados, se han explorado diversas técnicas, tal es el caso del microscopio de fuerza atómica (AFM), que es una herramienta que en las últimas décadas ha ido ganando terreno en el campo de la biología, ésta ha tenido un rápido desarrollo en la aplicación de medición de fuerzas de interacciones específicas en diversas células, además no existe tanta restricción sobre el tamaño del espécimen a estudiar, las muestras biológicas van desde las dimensiones que comprenden moléculas individuales hasta células o tejidos. Las imágenes generadas pueden ser analizadas en su estado nativo es decir que podemos visualizar células vivas mantenidas con medio de cultivo adecuado, a temperatura controlada y en condiciones específicas de crecimiento, a continuación, se describe de manera general la incorporación del AFM en estos estudios.

## Microscopía de fuerza atómica en biología

La microscopía de fuerza atómica, ha sido muy utilizada para estudios de análisis de superficies, en ciencias físicas. El microscopio de fuerza atómica (AFM) fue inventado en 1986 por Binnig, Quate y Gerber [23], y permite la visualización de material a nivel molecular y atómico, en tiempo real y en diferentes medios (medio acuoso, medio fisiológico, atmósfera de gases, vacío). Estudios recientes muestran un gran potencial para ser usado en el campo de la biología molecular y medicina (nanomedicina) [24-26]. El emplear esta microscopía nos proporciona grandes ventajas: la adquisición de imágenes a alta resolución e incluso a nivel molecular, así como la posibilidad de trabajar en medios acuosos, como sería el medio de cultivo de las células, lo que nos permite mantener intacto el material biológico empleado. Es importante resaltar que el AFM también nos ofrece las herramientas para obtener información sobre diferentes fuerzas de interacciones moleculares y celulares (fuerzas de adhesión, fuerzas de atracción) [27-28].

La información que registra el AFM de la superficie de una muestra se obtiene por el movimiento de una punta muy delgada sobre la muestra, esta punta también se le conoce como sonda. Esta se coloca sobre un pequeño brazo de palanca, la cual se mueve en respuesta a las fuerzas de interacción atómica que se dan entre la superficie y la punta. La resolución del AFM depende del radio de curvatura de la punta o sonda que se emplee y en términos de píxeles también dependerá del tamaño del área analizada, ya que se pueden tomar desde 256 x 256, 512 x 512 y 1024 x 1024 píxeles,

o combinaciones de estos, independiente del tamaño a visualizar, este parámetro depende del modelo y marca del equipo empleado [29, 30].

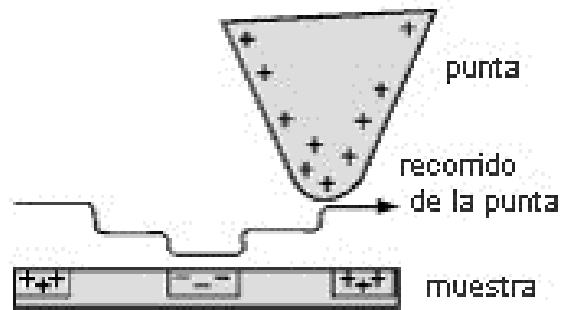
Los conjuntos de puntos tomados por el AFM se pueden representar como una imagen en tres dimensiones, en donde las alturas relativas entre punto y punto se diferencian por tonalidades. Las partes más claras representan zonas de mayor altura, respecto al valor determinado como medio, y las áreas más oscuras corresponden a las de menor altura en la superficie. Esto permite identificar la altura de los objetos de la superficie y detectar rugosidades, así como analizar las muestras a nivel atómico [31, 32].

Existen diferentes tipos de imágenes que se pueden obtener con el AFM, dependiendo de la interacción de la punta con la muestra, siendo las tres principales: el modo de contacto (*Contact Mode*), modo oscilante o intermitente (*Tapping Mode*) y modo de no-contacto (*non-contact mode*).

#### Microscopía de fuerza electrostática

La microscopía de fuerza electrostática (EFM, *Electrostatic Force Microscopy*) es otra de las técnicas de las microscopías de sonda de barrido (SPM, *Scanning Probe Microscopy*). Es utilizada para detectar y medir potencial eléctrico superficial en muestras de materiales, la medición de potencial permite dar un perfil de la distribución superficial de los dominios de carga electrostática, a través de imágenes de alta resolución (Figura 1).





**Figura 1. Modo de exploración en la microscopía de fuerza electrostática. La punta de EFM explora la muestra y registra la distribución de cargas electrostáticas, lo cual permite obtener una imagen de diferencia de potencial [URL 2].**

Esta microscopía, emplea una sonda para escanear la superficie de la muestra, la interacción entre la superficie y la punta se da en modo de no-contacto, permitiendo que exista una distancia de separación entre ambas, misma que no permanece constante, ya que esta dependerá de la magnitud de la fuerza resultante de las variaciones de carga acumulada, manteniéndose constante la flexión de la micropalanca; la imagen obtenida con esta técnica nos muestra las variaciones en la distribución de carga, dada por las diferencias de potencial entre la punta y la superficie de la muestra [30-33].

Inicialmente, esta técnica fue utilizada solo para medir carga superficial local, pero se ha vuelto una herramienta cotidiana en pruebas de calidad de microcircuitos electrónicos (microchips), para verificar su eficiencia [32, 33]. En el presente trabajo se pretendió emplear EFM en el estudio de las células nerviosas para observar la diferencia de cargas al aplicar un estímulo eléctrico.

## ANTECEDENTES

### Empleo del AFM en el estudio del sistema nervioso

A nivel internacional existen trabajos donde se ha empleado AFM para abordar el estudio de diversos aspectos relacionados con las células del sistema nervioso [34-44]. En marzo del 2004, Mc Nally empleo AFM para la visualización de neuronas vivas y fijadas [45], en ese mismo año Shenai M.B. y colaboradores propusieron el uso de una nueva plataforma formada por la conjunción de AFM y un microelectrodo, mediante el cual se podrá medir en tiempo real alteraciones morfológicas a nivel nanométrico en células del neuroblastoma, cuando son estimuladas eléctricamente [46]. En otros estudios, Patolsky y colaboradores (agosto, 2006) publicaron en *Science* las propiedades eléctricas de estructuras híbridas, a partir de un arreglo de nanotransistores integrados con axones y dendritas de neuronas de mamíferos [47]. Así mismo, Peter Framherz, del Instituto de Max Planck analizó los procesos llevados a cabo en la interfase neuroelectrónica (semiconductor - células del sistema nervioso) [48].

### Medición simultanea del potencial de acción y las corrientes iónicas que le dan origen.

En 1984, Fischmeister y colaboradores desarrollaron una de las primeras técnicas experimentales 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) [49]. Este diseño experimental no

permitió medir la corriente iónica de una célula completa pues esta se producía por un solo canal.

Doerr y colaboradores en 1989, desarrollan la técnica: “fijación del potencial de acción” [50] y más tarde en 2012 Chen-Izu y su grupo de trabajo daría a conocer la “fijación del potencial de acción dinámica”, con esto se pudo registrar tanto la corriente iónica de célula completa como el potencial de acción específico [51]. La problemática con estas técnicas es que no son simultáneas y son medidas de forma indirecta y para la adquisición de las corrientes se emplean bloqueadores de canales iónicos. La técnica consiste primero en medir el potencial de acción a la célula en fijación de corriente, y posteriormente, aplicar la señal del potencial de acción como un pulso de estimulación en fijación del voltaje para la medición de las corrientes iónicas. Como se puede observar, es una técnica indirecta y no mide las corrientes iónicas asociadas al potencial de acción de manera directa, sino inferida; además, supone el comportamiento óhmico de los canales iónicos, sabemos que este no es el caso, ya que los canales también son afectados por ligandos.

Dietrich y colaboradores en 2002, proponen una técnica llamada "sistema de fijación de voltaje híbrido", donde con un amplificador de características especiales se conmuta entre fijación de corriente y fijación de voltaje para medir el potencial de acción y la corriente iónica subyacente de manera casi-simultánea [52]. El inconveniente de esta técnica es que se interrumpe el avance normal del potencial de acción para medir la corriente iónica.

## JUSTIFICACIÓN

Los electrodos de registro extracelular *in vitro* han sido desarrollados desde hace 30 años para observar los procesos electrofisiológicos en células excitables de manera individual y en red, con la finalidad de entender la relación que existe entre su comportamiento eléctrico y la función celular, así como sus posibles aplicaciones en otros campos como la farmacología [53-57].

En los últimos años se han realizado esfuerzos para la obtención de cultivos celulares de células excitables sobre sustratos que contienen pistas metálicas (biochips, microelectrodos) para el registro extracelular de las señales eléctricas. Entre los metales más empleados destaca las superficies de Au(111) en forma pura o modificada y nanoestructurada a nivel molecular [58, 60]. Entre las razones por las que el uso del sustrato de Au(111) es cada vez más generalizado están que este es un metal noble que no reacciona fácilmente con sales y moléculas presentes en soluciones fisiológicas, que aparentemente no afecta el crecimiento de células (biocompatible) y, como se ve en la literatura reciente, es un material que puede ser utilizado en estudios con microscopía de fuerza atómica (AFM) para caracterización de propiedades morfológicas de material celular y sustratos planos a nivel molecular y nanométrico [31, 60-67].

Bajo las condiciones de registro en un cultivo celular, el Au(111) ha mostrado ser un excelente conductor eléctrico, que no afecta a las células cultivadas. Sin embargo, los estudios realizados para descartar efectos nocivos del Au(111) sobre las células cultivadas ha sido básicamente de tipo morfológico [64-67]. En la parte

electrofisiológica, en la mayoría de los casos, solo se hace mención que los electrodos de Au(111) fueron apropiados para el registro eléctrico [62, 63]. Por lo anterior, es indispensable realizar un estudio más detallado sobre el posible efecto del Au(111) sobre las propiedades eléctricas de las células excitables.

Las técnicas de fijación del voltaje y la de fijación de corriente han sido fundamentales para la caracterización electrofisiológica de las células [12, 13, 21]. Sin embargo, aún existen algunas limitaciones importantes con estas técnicas y su posible solución, ha sido tema de investigación por décadas. Por ejemplo, con la técnica de fijación de corriente existe un problema cuando registramos células que producen corrientes grandes de membrana ( $I_m$ ), existe un error en la medición del potencial de membrana ( $V_m$ ) debido a la caída de voltaje producida por la  $I_m$  y la resistencia en serie originada en la solución fisiológica donde se encuentran inmersas las células a registrar. Otra limitación importante es la imposibilidad de medir los potenciales de acción de las células excitables y simultáneamente medir las  $I_m$  que les dan origen, con una buena relación señal a ruido [11, 12].

Este problema ha sido abordado por diferentes grupos de investigación a lo largo de décadas. Recientemente nuestro grupo de trabajo se planteó este problema, proponiendo que con el desarrollo actual de la nanotecnología era posible resolver finalmente este problema [68].

## HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado que el Au(111) es químicamente inerte, tiene propiedades de biocompatibilidad y que además es un excelente conductor eléctrico, puede ser empleado tanto para la medición de las corrientes iónicas que subyacen durante el disparo de los potenciales de acción, así también como sustrato para crecer y visualizar células por medio de microscopía de fuerza atómica.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Realizar el registro simultáneo del potencial de acción y de la corriente iónica transmembranal que le da origen empleando el sustrato de Au(111) en neuronas cultivadas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Optimización de las condiciones del cultivo de neuronas en el sustrato de Au(111).
2. Obtener un electrodo que sirva como sustrato para el cultivo de células neuronales para el posterior estudio y análisis de sus propiedades electrofisiológicas.
3. Caracterizar las células neuronales en condiciones fisiológicas, en un grupo control (caja Petri) y en Au(111) por AFM y SEM: topografía, morfología y organización celular.
4. Visualizar las características de los sustratos a emplear para el registro electrofisiológico y la distribución de cargas en tiempo real al aplicar un estímulo eléctrico con y sin células crecidas, empleando AFM y EFM.
5. Registro de la actividad eléctrica de las células por medio de las técnicas de fijación de voltaje y fijación de corriente.
6. Análisis de los posibles efectos del sustrato de oro sobre el potencial de reposo, potencial de acción y de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .
7. Obtención del registro de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  durante el desarrollo del potencial de acción.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Como parte de la optimización del cultivo celular, se procedió a la búsqueda de una línea celular y/o cultivo primario que nos diera como resultado la obtención de células excitables en las que pudiéramos registrar su actividad eléctrica, por lo que se realizaron diversos cultivos celulares (PC12, N1E-115, cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo, entre otras), cuya metodología se anexa en el apéndice. Resultado de esta búsqueda se tomó como modelo experimental a la línea celular NG108-15.

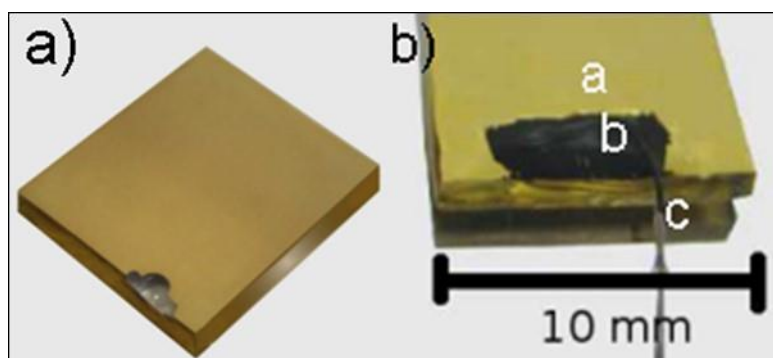
### Cultivo de la línea celular NG108-15

La línea celular NG108-15 fue formada por la fusión de las células de neuroblastoma de ratón N18TG2 con las células de glioma de rata C6-BU-1 glioma, en presencia de un virus Sendai inactivado. Esta línea fue desarrollada en 1971 por Bernd Hamprecht [67]. La línea celular fue adquirida de ATCC (Lote No. 58078652). Las células NG108-15 fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM con alta glucosa (GIBCO, cat. No. 21063029), complementado con 10% suero fetal bovino (GIBCO, cat. No. 16000), 1% de L-Glutamina, 0.1 Mm hipoxantina, 400 nm aminopterina, 0.016 mM de timidina, y 1% penicilina/estreptomicina (GIBCO, cat. No. 15140), mantenidas a 37°C, en una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. Las células fueron subcultivadas de 15 a 20 veces antes de sembrarlas sobre cajas de plástico y los substratos de Au(111). Las células se cultivaron por 4 días antes de ser observadas.



### Caracterización del sustrato de Au(111).

Se utilizaron placas de Au(111) (goldArrandee™), como sustrato para el cultivo de las células NG108-15). La composición de las placas utilizadas como sustrato Au(111) consiste de un soporte de vidrio de aproximadamente 2 mm de espesor, seguida de una película de cromo de 200 nm, la cual está cubierta con otra película de Au(111) de 2000 nm, con un arreglo cristalino específico de su celda unitaria: (111), siguiendo los índices de Miller. Las placas de Au(111) se prepararon con un área aproximada de 1 cm<sup>2</sup> (Figura 2), se caracterizó su superficie por medio de AFM.



**Figura 2. Sustrato empleado. a) Placa de Au(111), b) modificación de la placa para emplearse como electrodo: se aprecia la superficie de Au(111) (a), la pintura conductiva de carbono (b) y el alambre de plata (c), así como, el tamaño del mismo.**

### Elaboración de un electrodo a partir del sustrato de Au (111).

A las placas de Au(111) (Figura 2) se les conectó un alambre de plata (AGT0510 WPI USA) de 30 mm de longitud. Para la conexión eléctrica del alambre de plata sobre un borde de la superficie de Au(111) se empleó pintura conductiva de carbono (PELCO

16053, Ted Pella Inc USA) que se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 12 hrs. Para proveer un mejor soporte mecánico y aislar eléctricamente la unión y al alambre de plata en contacto con la solución del baño, se recubrieron con Sylgard Brand (SYLG184 WPI USA). La placa con el alambre adherido se colocó sobre una parrilla eléctrica a una temperatura de 60 a 80 °C durante 5 min para acelerar el proceso de secado del Sylgard. Después se cubrió con una caja de Petri y se dejó que el proceso de secado continuara por 24 hrs. Se comprobó la continuidad eléctrica entre el alambre de plata y el substrato metálico de Au(111) con un multímetro digital.

#### Tratamiento al substrato de Au(111) con poli-L-lisina.

Para favorecer la adhesión de las células a la superficie del substrato se le adicionó poli-L-lisina, para lo cual se disolvió la poli-L-lisina en agua ultrapura (10 mg/l). La mezcla se esterilizó por filtración, después se adicionó 1 ml de poli-L-lisina a cada uno de los substratos de Au(111). La poli-L-lisina fue removida después de 60 min, y se adicionó de 1-1.5 ml de agua estéril para su enjuague, se retiró el agua y se colocaron los substratos a 37°C en una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire, para su posterior uso.

#### Cultivo celular sobre el substrato Au(111).

El substrato de Au(111) fue sumergido en una solución de etanol al 70% por 5 minutos. Se lavó mínimo 2 veces con agua destilada y se puso a secar a temperatura ambiente. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 15 libras por 20 minutos a 140°C para después exponerlo por 30 minutos a luz ultravioleta. Se colocó la placa en una caja Petri de cultivo celular (Corning 35 mm) y se le adicionó medio de cultivo DMEM

suplementado hasta cubrir la superficie del sustrato. Se mantuvo a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire por 2 horas antes de sembrar las células. Se sembraron 1 x10<sup>5</sup> células y se mantuvieron por 4 días. El medio fue reemplazado cada 48 horas hasta su estudio electrofisiológico.

Caracterización de las células neuronales cultivadas en los diferentes sustratos empleando AFM y el Microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscopy (SEM)*).

Como parte de la caracterización morfológica se realizaron visualizaciones en SEM y AFM, para lo cual se procedió a la preparación de las muestras como se indica a continuación.

Caracterización morfológica empleando el SEM.

Todas las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 5% tratadas en un tren de deshidratación con etanol del 30-100 % para ser llevadas a punto crítico, y después recubiertas con Au(111). Las micrografías se tomaron con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV). El SEM fue operado con un voltaje de aceleración de 15 kV, con electrones electrodispersados, a una distancia de trabajo de 25 mm.

Caracterización morfológica empleando el AFM.

Los estudios de la morfología celular fueron llevados a cabo con microscopía de fuerza atómica (AFM Nanoscope III, Multimode SPM, Digital Instruments, Santa Barbara, California), en modo oscilante ("*tapping*") con una punta de silicio modelo TESP (f: 325-

382 kHz, k: 20-80 N/m, Veeco), a una velocidad de barrido de 0.5 Hz. Las muestras se trataron siguiendo las técnicas para procesamiento de SEM.

### Optimización de las condiciones de estudio para visualización *in vitro* de células neuronales empleando el AFM

El estudio de la morfología y topografía de las células en cultivo requirió de la optimización de diferentes condiciones para ser visualizadas en AFM. Se estudiaron y probaron los diferentes substratos. Para visualizar el material en estado fisiológico se tomaron en consideración varios puntos críticos en el cultivo de células, como cuidar las condiciones óptimas del crecimiento y mantenimiento de las células en cultivo. Se buscaron obtener en el AFM todas las condiciones para poder observar a las células en estado fisiológico. Para abordar el experimento planteamos una estrategia que se desarrolló paso por paso, utilizando el modelo del AFM, Multimode III, Digital Instruments y la celda de fluidos del AFM.

De manera breve se describe el método empleado en el tratamiento del cultivo para la visualización de células vivas por el AFM.

1.- Se depositó 1 ml de colágeno Tipo I (50  $\mu\text{g/ml}$  en ácido acético al 0.1%) por cada placa de cultivo (con o sin substrato de Au(111)), cubriendo toda la superficie de forma homogénea, y se incubó durante una hora a 37°C, en condiciones de una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

2.-Se retiró el colágeno y se enjuago tres veces con agua desionizada, quitando todo resto de agua con ayuda de pipetas Pasteur, siempre cuidando la esterilidad del proceso. Se incubo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> mientras se obtuvieron las células.

3.- Se colocaron 50,000 células por caja Petri, con 2 ml de medio de cultivo, añadiendo el medio adecuado según el tipo celular. Se incubó a 37°C en condiciones de una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> por 2 días, sin cambio de medio.

4.- Después de 2 días de incubación fueron llevadas las cajas Petri al cuarto de trabajo del AFM, se les cambió el medio de cultivo (el medio debe estar a temperatura ambiente), se dejó que las células se estabilizaran a la temperatura del cuarto de trabajo ( $\approx$  24-25°C) por un tiempo de 10-30 minutos.

5.- Se realizaron todos los ajustes al equipo del AFM previamente al montaje de la muestra sobre la platina de trabajo, para después colocar la celda de fluidos del AFM.

6.-Se cuidaron todos los parámetros (alineación del láser, ajuste del escáner a una distancia óptima de trabajo, posición de la punta sobre la célula que se desea estudiar, entre otros), y se procedió a la obtención de imágenes de células vivas en modo contacto con puntas MLCT-AUNM (marca Veeco).

#### Visualización de las características de los substratos empleando el AFM y EFM.

Para obtener el registro de la distribución de cargas por medio del AFM y/o EFM, se emplearon diversos electrodos con pistas de Au(111) en su composición, esto para conocer y poder observar la sensibilidad del equipo del AFM. A continuación, se describe el uso de uno de ellos.

### Microelectrodo IAME-co- IME.

Para el uso del microelectrodo comercial como substrato para el crecimiento de las células del cultivo se procedió a su caracterización a nivel estructural. Se resolvió el detalle del arreglo de los electrodos a través de la toma de imágenes fotográficas y de video, con ayuda del microscopio estereoscópico y óptico. Se realizó la caracterización al nivel de superficie de la red de microelectrodos que conforman el electrodo, por medio del AFM.

### Cultivo de neuronas en el microelectrodo.

El microelectrodo fue lavado por ultrasonificación en una solución de dri-decon y agua destilada por 10 minutos y se enjuagó en el grifo por 15 minutos, se puso a secar a temperatura ambiente, luego fue sumergido en una solución de 1-dodecanetiol al 98% 0.1 mM (Aldrich), con etanol al 70% por 20 minutos. Se enjuagó el microelectrodo 6 veces con agua destilada. Se aplicó un tratamiento con poli-L-lisina como se describió. Se cultivaron las neuronas siguiendo el mismo protocolo que se aplicó a las células cultivadas en el substrato de Au(111). Se incubaron a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en una estufa de incubación con control de CO<sub>2</sub> y regulación de temperatura de alta precisión (Nuair).

### Caracterización del microelectrodo con AFM / EFM.

El microelectrodo fue caracterizado con EFM, utilizando un dispositivo que se describe en el apéndice, con el cual se aplicó una diferencia de potencial al microelectrodo. Para este propósito el microelectrodo se conectó con una serie de alambres de 0.25 cm de diámetro en el inicio de la trayectoria de los electrodos para aplicar una

diferencia de potencial de 9 Volts empleando una batería (pila alcalina). Todo esto se realizó con la finalidad de estudiar el efecto de la diferencia de potencial en el microelectrodo y determinar cómo se podría registrar utilizando EFM.

Registro de la actividad eléctrica de las células NG108-15 por medio de las técnicas de fijación de voltaje y fijación de corriente.

#### Registro electrofisiológico.

Para poder asegurarnos de la funcionalidad de las células empleadas se siguió un protocolo para el registro electrofisiológico, por lo que se evaluaron las propiedades eléctricas de las células NG108-15 cultivadas sobre superficies de cajas de Petri de plástico y sobre placas de Au(111). Se empleó el amplificador Axopatch en la configuración de *Patch-clamp* en la variedad de célula completa (*whole-cell*) para la medición de la  $I_m$ , y en la configuración de fijación de corriente (*current-clamp*) para la medición del  $V_m$ . Se empleó el software Pclamp para la generación de los protocolos de estimulación y adquisición. Las señales fueron adquiridas con la tarjeta de conversión Digidata. Las señales fueron procesadas y analizadas con el software Clampfit y Prisma. Se emplearon pipetas de 2-4 M  $\Omega$  las cuales se llenaron con la solución intracelular de: NaCl (10 mM), KCl (140 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), EGTA (11 mM), HEPES (10 mM) con pH de 7.2 ajustado con KOH. La solución del baño contenía: NaCl (151.5 mM), KCl (4.5 mM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), HEPES (5 mM), pH ajustado a 7.4 con NaOH. Todos los reactivos fueron de Sigma Aldrich. Las soluciones fueron filtradas con filtros de 0.2  $\mu$ m. Se realizó un análisis comparativo del potencial de reposo ( $V_r$ ), resistencia de la membrana ( $R_m$ ), la presencia de

potenciales de acción y de las corrientes de sodio ( $I_{Na^+}$ ) y de las corrientes de potasio ( $I_{K^+}$ ) dependientes del voltaje de las células NG-108 cultivadas sobre superficies de cajas de plástico y sobre placas de Au(111). En estos experimentos la solución del baño se mantuvo conectada a tierra. Los resultados se reportan como los valores promedio con su error estándar. Se realizó una prueba t-Student para observar diferencias significativas entre los valores promedio.

#### Medición simultanea del potencial de acción y las corrientes iónicas que le dan origen.

En una segunda serie de experimentos se modificó el arreglo experimental descrito con el objetivo de medir la corriente de membrana ( $I_m$ ) en todo momento; esto es, independientemente de si los experimentos eran de fijación del voltaje o de fijación de corriente. Para este propósito se empleó un segundo sistema de fijación del voltaje (2 en Figura 3), para mantener en tierra virtual la placa de Au(111) que sirvió como superficie de cultivo para las células. El sistema de fijación del voltaje se construyó siguiendo las especificaciones de Neher y cols [11]. Se tuvo especial cuidado en ajustar la corriente de polarización (*bias*) y los voltajes de compensación a cero (*offset*). Con el segundo sistema de fijación del voltaje (2 en la Figura 3) se midió  $I_m$  independientemente de la configuración del amplificador 1 (*axopatch*), ya sea en fijación del voltaje o en fijación de corriente. El arreglo experimental propuesto se muestra en la Figura 3.

El sistema de fijación del voltaje 1 se empleó en la configuración de *Patch-clamp* en la variedad de célula completa para los experimentos de fijación del voltaje. En la Figura 3,  $V_{cmd}$  indica los pulsos de fijación del voltaje que se aplicaron a la célula y la salida



del convertidor fue  $I_m$ ; asimismo, cuando se empleó en la configuración de fijación de corriente,  $V_{cmd}$  indica los pulsos de corriente que se aplicaron a la célula, siendo  $V_m$  la salida del convertidor. El sistema de fijación del voltaje 2 se empleó para mantener en tierra virtual la placa de Au(111) y simultáneamente medir  $I_m$ ; esto es posible porque el segundo amplificador inyecta una corriente de la misma magnitud y curso temporal que  $I_m$ , aunque de signo contrario para mantener en tierra virtual la placa de Au(111) (Figura 3). El amplificador 1 se conectó a la micropipeta (M) de registro y el amplificador 2 a la placa de Au(111) (Au) a través de un alambre de plata aislado eléctricamente de la solución del baño. Con este diseño experimental, con el amplificador 1 fue posible medir  $I_m$  o  $V_m$  en los experimentos de Fijación del Voltaje o de Fijación de Corriente respectivamente. Además, se puede medir simultáneamente  $I_m$  en todo momento a través del amplificador 2.

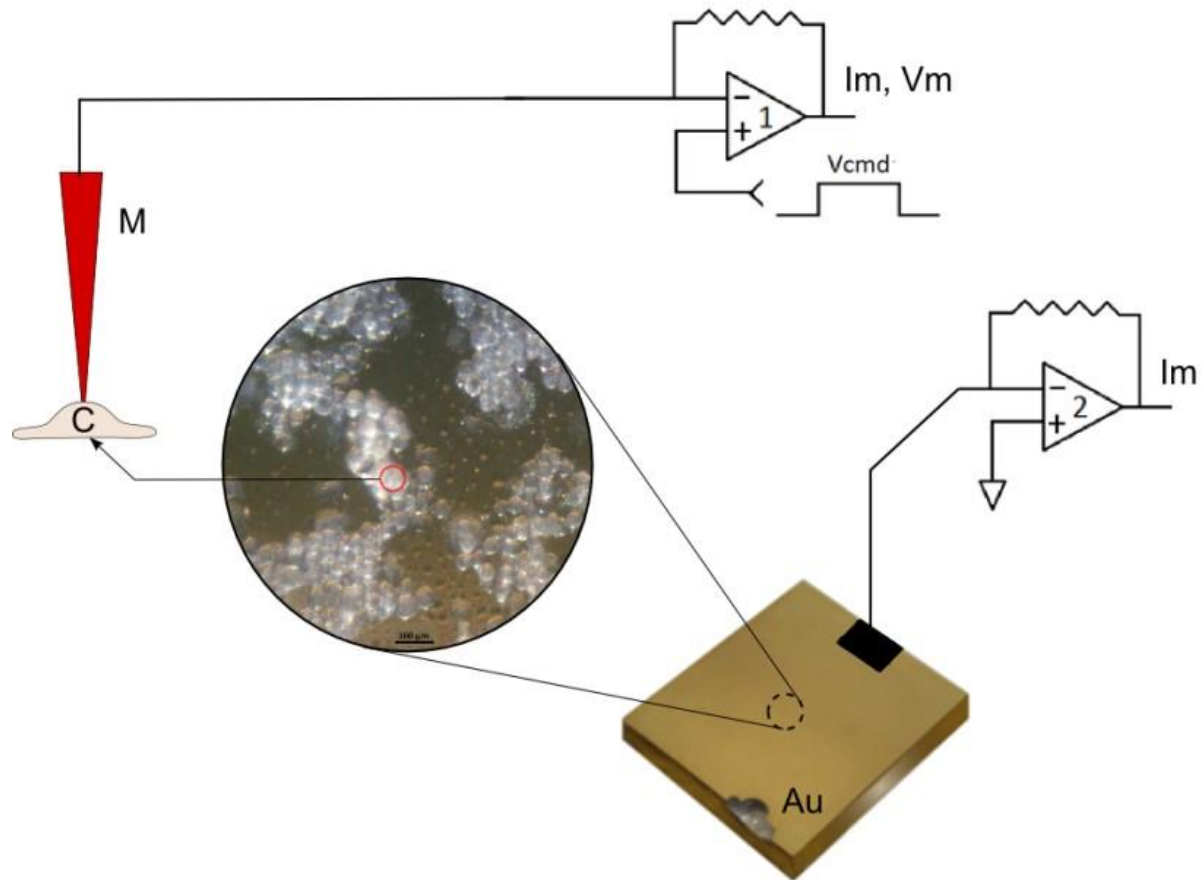
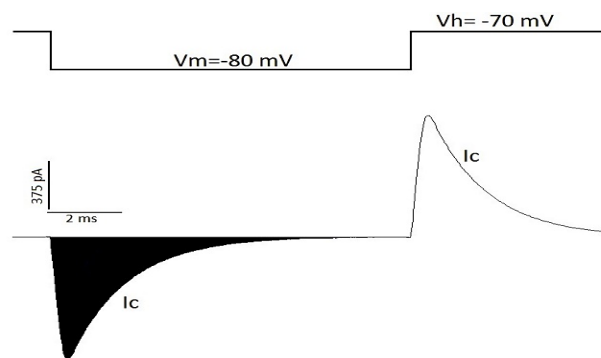


Figura 3. Esquema del arreglo experimental con dos equipos de *Patch-Clamp* y células crecidas en placa de Au(111) (Au). (C) indica la célula seleccionada para su registro. Con el amplificador 1 se realizan las técnicas estándar de fijación del voltaje o de corriente empleando una micropipeta (M). Con el amplificador 2 se mantiene en tierra virtual la placa de Au(111).

### Capacitancia de la membrana celular.

La corriente capacitiva en una célula es  $I_c = C_m \frac{dV_m}{dt}$ , por lo que se cumple que  $\int I_c dt = C_m \int dV_m = C_m(V_{m2} - V_{m1})$ . Despejando la expresión anterior podemos obtener  $C_m$ , en donde  $V_{m1}$  es el potencial de mantenimiento y  $V_{m2}$  es el pulso de fijación del voltaje. El pulso  $V_{m2}$  es de magnitud pequeña e hiperpolarizante (-10 mV) para no activar corrientes iónicas dependientes del voltaje, y así obtener únicamente corrientes capacitivas (y corrientes iónicas lineales que se pueden eliminar). Una vez obtenida la corriente capacitiva transitoria (Figura 4) se obtuvo el área bajo la curva ( $\int I_c dt$ ) para evaluar la capacitancia de la membrana celular. El cálculo de la capacitancia es importante ya que es directamente proporcional al área de superficie de la membrana celular por donde se producen las corrientes iónicas. Para comparar las corrientes iónicas en las células NG108-15 cultivadas sobre diferentes substratos, fue necesario normalizarlas con respecto al área, o bien con respecto a la capacitancia (normalmente en pF), para comparar así las densidades de corriente.

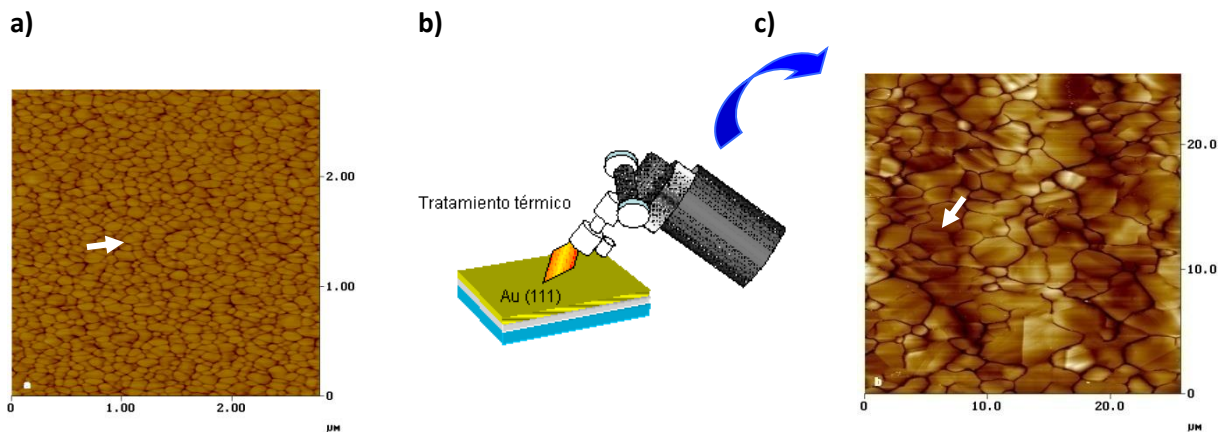


**Figura 4. Evaluación del área bajo la curva (sombreada) de la corriente capacitiva de la membrana celular de una célula NG108-15, después de la aplicación de un pulso de -10 mV de amplitud a partir de un potencial de mantenimiento  $V_h=-70$  mV. ( $I_c$ ) Corrientes transitorias capacitivas.**

## RESULTADOS

### Caracterización del sustrato de Au(111).

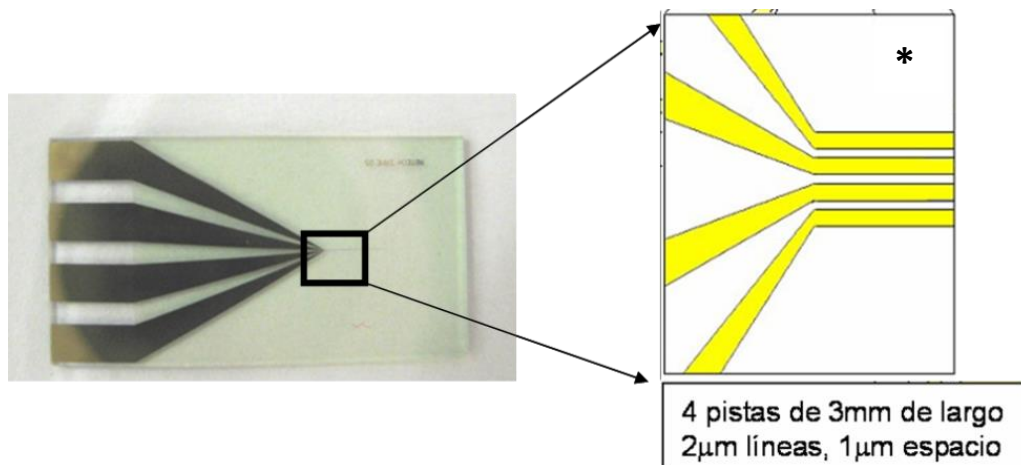
El sustrato de Au(111) tiene un arreglo específico a nivel molecular de tal manera que, cuando se somete a altas temperaturas, ocurren cambios en su superficie. Sustratos de Au(111) con y sin tratamiento térmico fueron caracterizados, observándose que los granos de Au(111) en la muestra sin tratamiento térmico son más pequeños con respecto a los presentes en el tratamiento térmico, tal y como se observa en la figura 5. El sustrato con tratamiento térmico fue finalmente empleado para el cultivo celular, al proporcionarnos un área mayor con un arreglo plano a nivel atómico, lo cual fue útil en la resolución lateral de nuestra muestra al ser visualizada en AFM.



**Figura 5. Visualización de placas de Au(111) a través de AFM. a) Placa de Au(111) sin tratamiento térmico, área de barrido de 7.7841  $\mu\text{m}^2$ . Se puede observar que los granos que la constituyen son más pequeños (flecha), en comparación a la placa con tratamiento térmico (b). c) Imagen de AFM, área de barrido de 661  $\mu\text{m}^2$ . Presenta una composición en forma de granos (flecha), los cuales, son más grandes cuando se somete a tratamiento térmico el sustrato de Au(111).**

## Microelectrodo.

El microelectrodo empleado corresponde a un chip para aplicaciones biológicas IAME-co-IME fabricado por la compañía Abstechsci USA, usado principalmente para cultivos de células y sensores biológicos. La Figura 6 muestra el diagrama de una sección de la parte interna del chip definida por cuatro electrodos o pistas de  $2\ \mu\text{m}$  de ancho y  $1\ \mu\text{m}$  de separación, con una longitud total de  $3\ \text{mm}$  (sección 1). El chip se encuentra recubierto por una capa de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , con excepción de dos áreas: los electrodos de trabajo y los electrodos que sirven para conexiones externas. Otro factor importante era el tamaño total del chip de aproximadamente  $1\ \text{cm}^2$ , lo que también resultó beneficioso, ya que el área para poner las muestras en el microscopio de fuerza atómica no puede exceder de  $1.5\ \text{cm}$  de ancho.

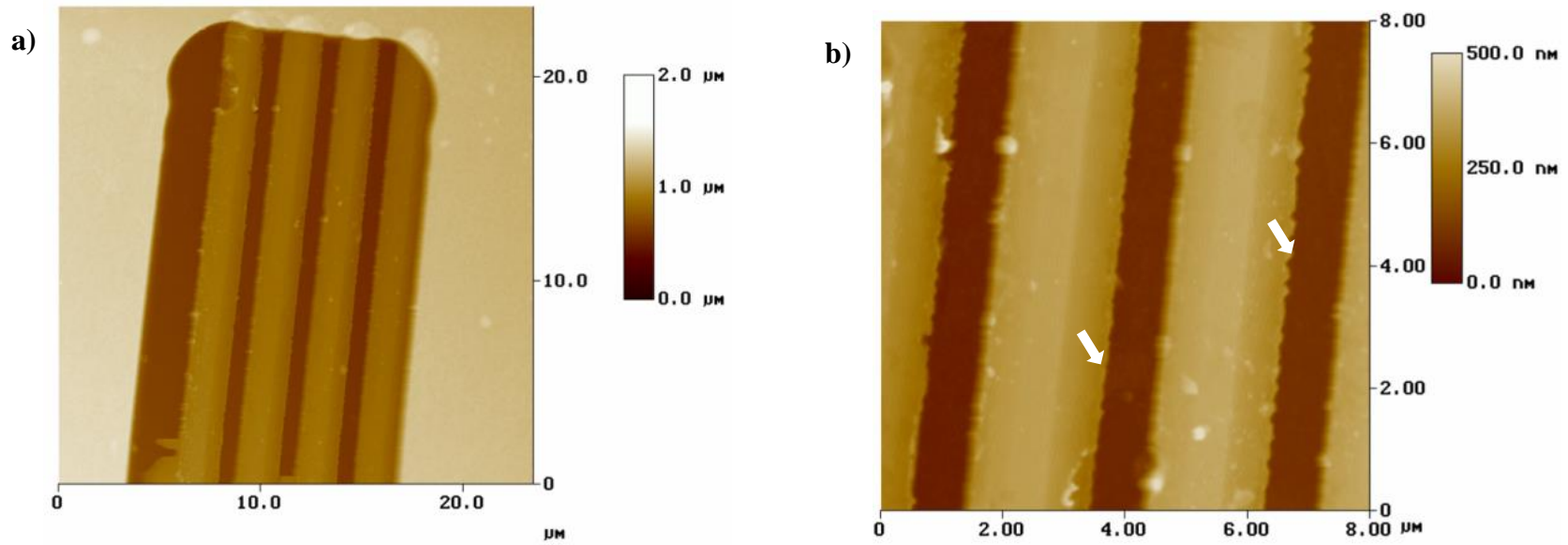


**Figura 6. Chip IAME-co-IME. Los electrodos de Au(111) fueron fabricados en un substrato  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , consta de 4 electrodos (sección 1\*).**

Posteriormente a su adquisición, el chip se colocó en el microscopio de fuerza atómica con el fin de visualizar los electrodos y determinar la distancia entre ellos; lo que se hizo con la finalidad de comprobar la información proporcionada por el fabricante, así como para medir la dificultad que supondría obtener imágenes de los electrodos.

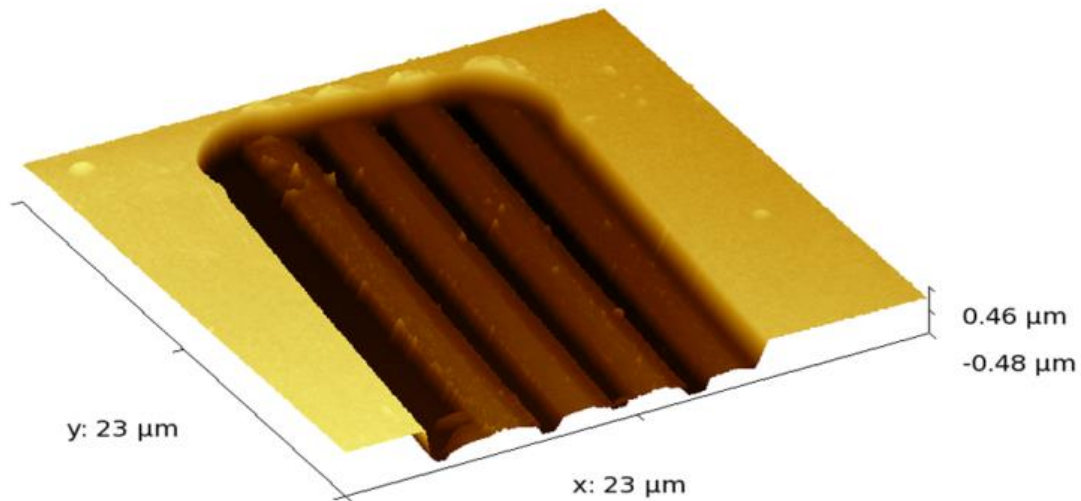
Las distancias medidas en el ancho y en la separación de los electrodos se acercaron mucho a los datos que se habían proporcionado: el ancho de los electrodos que se registró fue  $1.97 \mu\text{m}$ , y la separación entre ellos, de  $1.12 \mu\text{m}$ . En las figuras 7 y 8 fue posible apreciar que las pistas de los electrodos están embebidas en el substrato.

Otro detalle importante que se observó en los electrodos durante la visualización fue la presencia de irregularidades en cada orilla derecha de cada electrodo, aspecto que no fue mencionado por el fabricante. La Figura 7 muestra que la estructura de la orilla izquierda de los electrodos está bien definida en comparación con la otra orilla del electrodo. De aquí la importancia de caracterizar y visualizar el chip por medio de la microscopia de fuerza atómica.



**Figura 7. Imágenes de AFM. Sección I del chip IAME-co-IME. a) Se observan los cuatro electrodos b) acercamiento a la estructura de los electrodos, se pueden observar defectos en las orillas de cada electrodo debido al proceso de fabricación (flechas).**



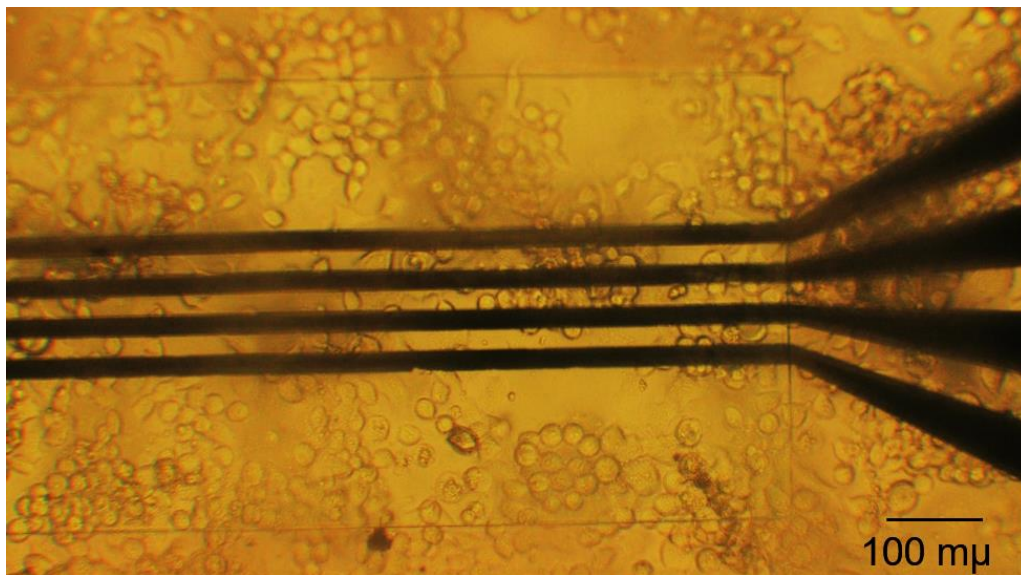


**Figura 8. Imagen tridimensional de AFM, Sección I del chip IAME-co-IME. Se aprecian los 4 electrodos embebidos en el sustrato.**

### **Cultivo de la línea celular NG108 en el chip IAME co IME.**

El microelectrodo se trató como previamente se describe en la metodología (pp. 38). Se observaron células sobre las pistas de Au(111) del electrodo (Figura 9) y los procesos de división celular siguieron presentes, incluso después de 6 días. El Au(111) es un sustrato que nos permitió el crecimiento de las células NG108-15, observándose una confluencia celular del 100% sobre la superficie del microelectrodo, lo que nos brindó la posibilidad de crecimiento de la línea celular sobre pistas definidas de Au(111), así como su estimulación eléctrica, además de que nos permitió su estudio a través del sistema de AFM y EFM.

La utilización de un microelectrodo comercial con pistas de Au(111) nos permitió la selección y estimulación diferenciada de las células en cultivo en el AFM, ya que se podía estimular las células crecidas sobre las pistas, en contraste con el microelectrodo que se fabricó en el laboratorio (la placa de Au(111)), que no contó con pistas en su diseño.



**Figura 9. Cultivo de células NG108-15 en el microelectrodo comercial. Se observan las pistas de Au(111) y el crecimiento celular sobre todo el sustrato.**

#### Calibración de potencial en el chip IAME co IME.

Con el objetivo de determinar si era posible utilizar el microscopio de fuerza atómica para visualizar el potencial generado a nivel nanométrico, se consideró la aplicación de potencial sobre los electrodos del chip (Figura 10) por medio del software del microscopio (Nanoscope IV, Veeco, digital instruments). Se obtuvieron secciones

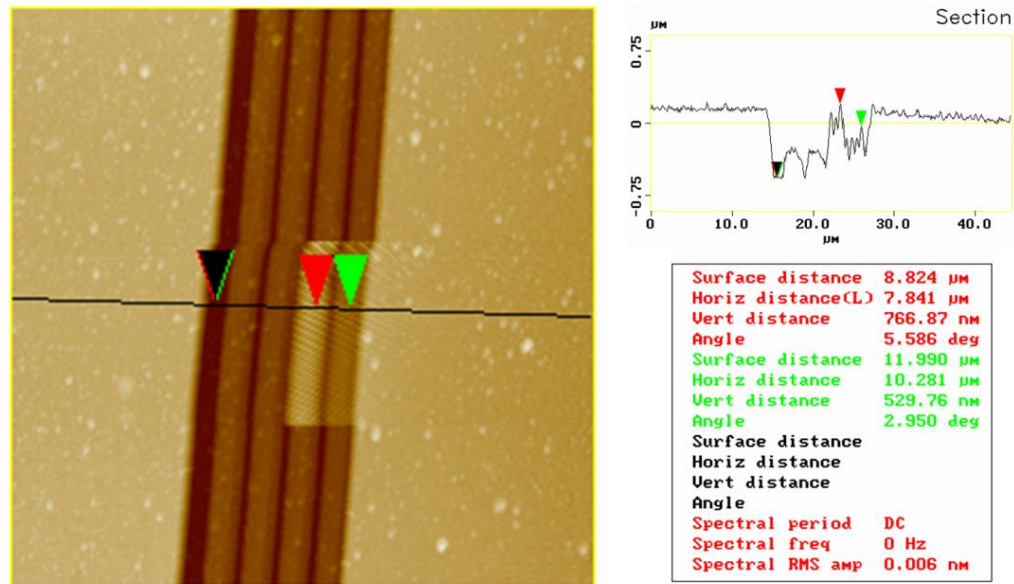
transversales de los electrodos justamente en las partes donde se observaron cambios al aplicar el voltaje.

En la Figura 10 se aprecia el montaje del microelectrodo en el AFM, para la adquisición de imágenes al aplicar el voltaje.



**Figura 10. Montaje del microelectrodo con el circuito externo en el AFM. Se observa: a) El AFM, b) pila o fuente de poder, c) circuito externo, d) conexión del circuito externo al microelectrodo, e) cabeza del AFM, donde se colocó el microelectrodo para ser visualizado, f) proyección de la imagen del microelectrodo, ésta ayudó a posicionar la punta en el área de interés a analizar.**

En la siguiente imagen se muestra el arreglo experimental usado para aplicar un voltaje de 5.3 V a los dos últimos electrodos (el negativo es el de la izquierda indicado con un indicador triangular rojo, positivo el de la derecha con indicador verde). Justo cuando la punta se encontraba en medio de la imagen se encendió la fuente de alimentación (Figura 11). Por medio del microscopio se obtuvieron secciones transversales de los electrodos en las partes donde se registraron cambios al aplicar el voltaje.



**Figura11. Imagen de AFM. Chip IAME-co-IME. Se observa con claridad un cambio en el centro de la imagen con respecto a las partes de arriba y abajo, aparecieron una serie de líneas justamente en los electrodos donde se aplicó el voltaje, el análisis de la sección transversal comprueba diferencias de altura en esta área (área escaneada:44.98  $\mu\text{m}$  x 44.98  $\mu\text{m}$ ).**

Posteriormente, los mismos 5.3 V se aplicaron en dos electrodos, aunque esta vez se movieron de lugar en diferentes tiempos, con el objetivo de notar que el potencial afecta solamente al lugar donde está conectada la fuente de voltaje (Figura 12).

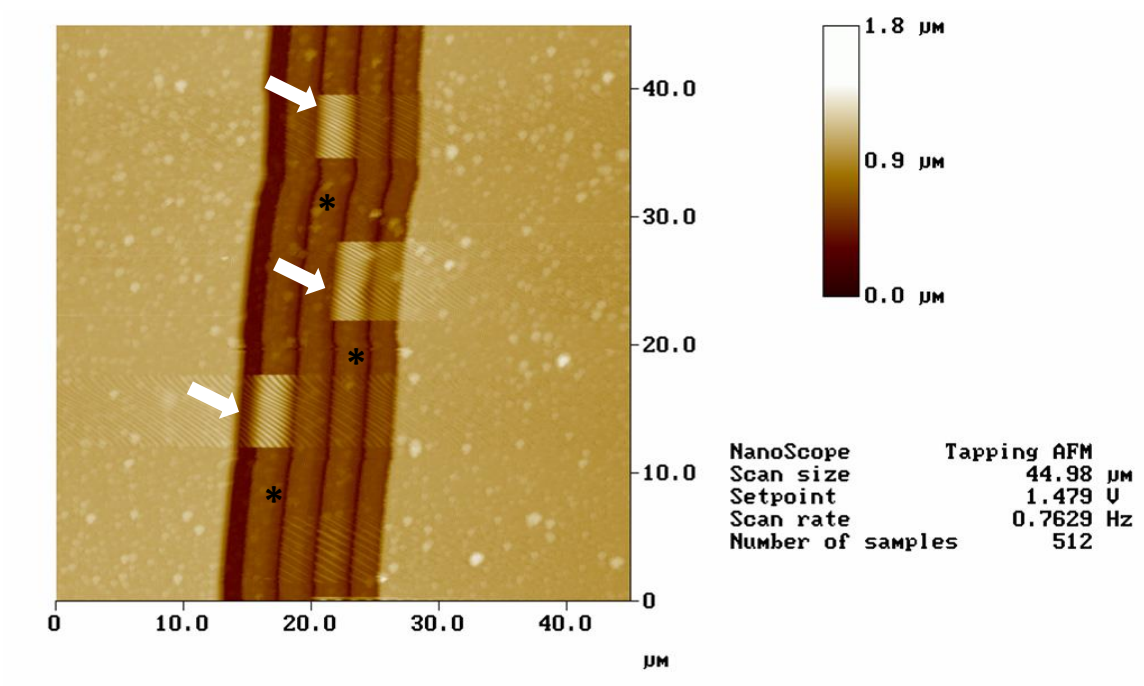


Figura 12. Imagen de AFM. Chip IAME-co-IME con aplicación de 5.3 V a diferentes tiempos. Se observan diferencias en la toma de la imagen (flechas) y cuando se desconectó la fuente de voltaje (\*).

En esta ocasión se conectaron los primeros dos electrodos de izquierda a derecha (positivo y negativo), y se aplicó 3 V durante toda la obtención de la imagen, como se muestra en la Figura 13.

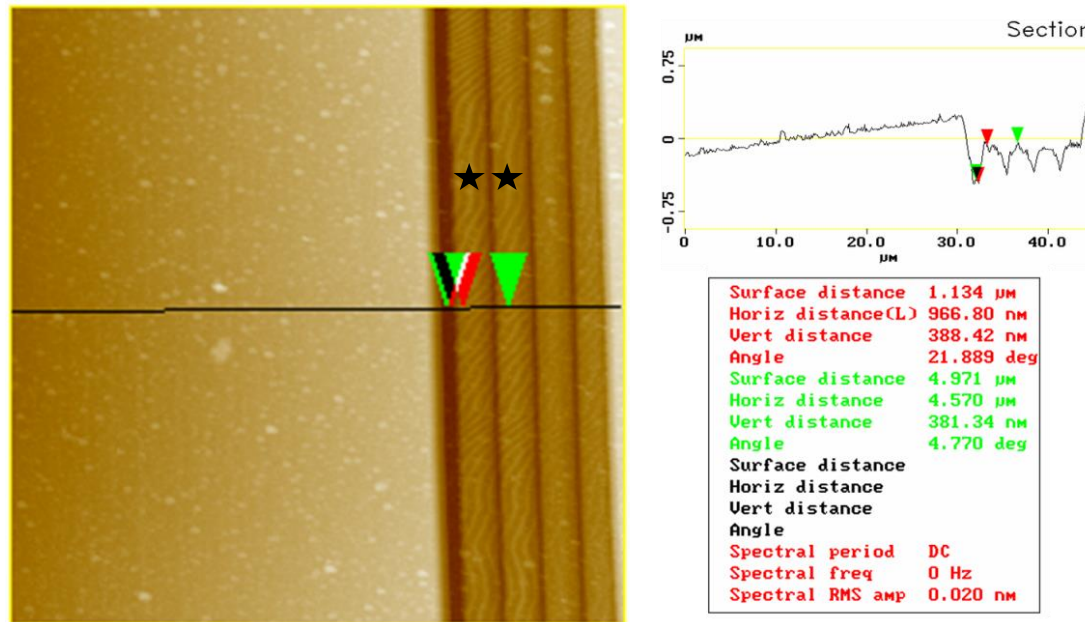


Figura 13. Imagen de AFM (área escaneada: 44.98  $\mu\text{m}$  x 44.98  $\mu\text{m}$ , Z: 0 - 1.8  $\mu\text{m}$ ). Chip IAME-co-IME. Al disminuir el voltaje no se aprecian cambios drásticos en la toma de la imagen, se puede alcanzar a observar los electrodos a los cuales se les aplicó el voltaje(★). De las gráficas de análisis transversal, se obtiene la altura al aplicar los 3 V: 381.34  $\mu\text{m}$  y 388.42  $\mu\text{m}$ ).

Después se aplicó un voltaje de 5.8 V con la misma configuración de conexión en los electrodos que en el caso anterior y se dejaron conectados durante la toma de la imagen, siguiendo el mismo protocolo (ver Figura 14).

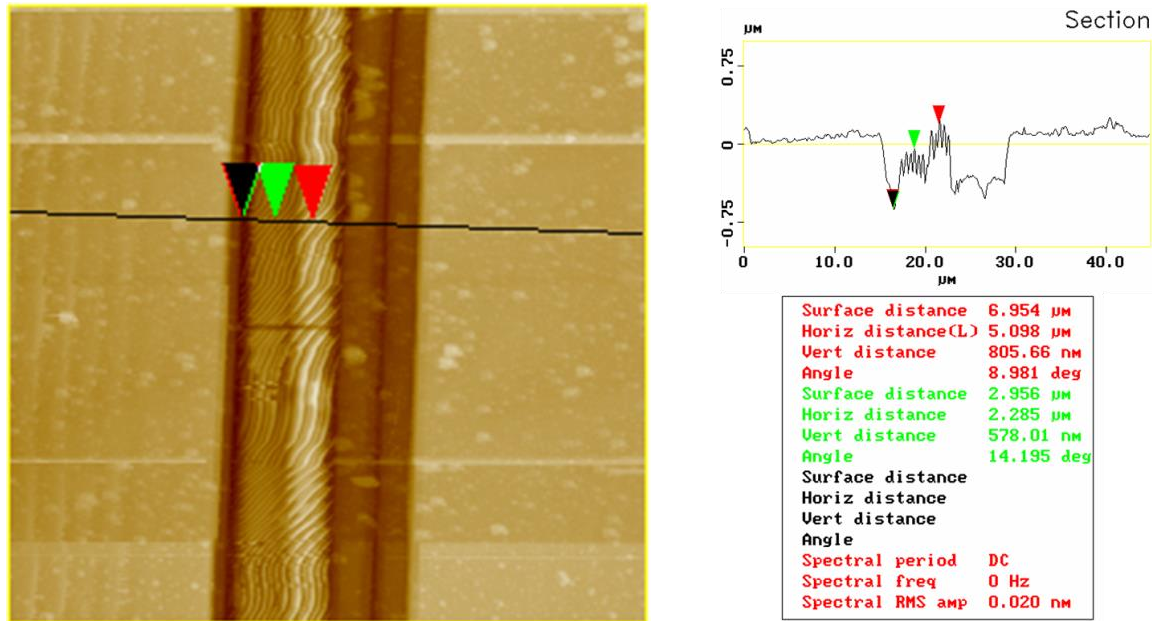


Figura 14. Imagen de AFM. Chip IAME-co-IME. Al aumentar el voltaje de 3 V a 5.8 V, se volvió a notar la diferencia en la toma de la imagen entre los electrodos: las líneas más claras corresponden a la carga negativa en el electrodo mientras las líneas de la izquierda al electrodo con carga positiva. En el análisis de sección se observa la diferencia de altura del electrodo marcado con el triángulo rojo de 805.66  $\mu\text{m}$ , y el del electrodo marcado con triángulo verde de: 578.01  $\mu\text{m}$  (área escaneada: 44.98  $\mu\text{m}$  x 44.98  $\mu\text{m}$ ).

El experimento se repitió con la misma configuración, con la diferencia de que en esta ocasión el voltaje se aumentó a 7.3 V sobre los electrodos (Figura 15).

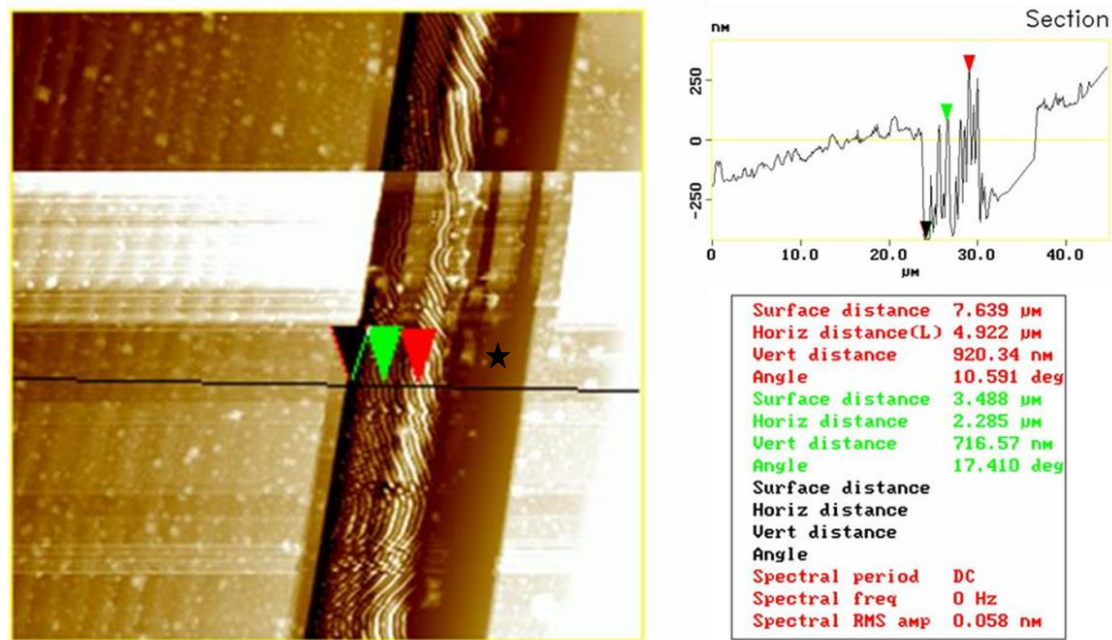


Figura 15. Imagen de AFM. Chip IAME-co-IME. Se puede apreciar una distorsión en la adquisición de la imagen, los electrodos a los que no se les aplicó voltaje no pudieron ser barridos por la punta del microscopio (★), como lo revela el análisis de sección (área escaneada: 44.98 $\mu\text{m}$  x44.98 $\mu\text{m}$ ).



En la última parte de la calibración se cambió el voltaje a 10.3 V con la misma configuración de los electrodos, pero con la diferencia de que el potencial se aplicó a la mitad del escaneo del chip (Figura 16).

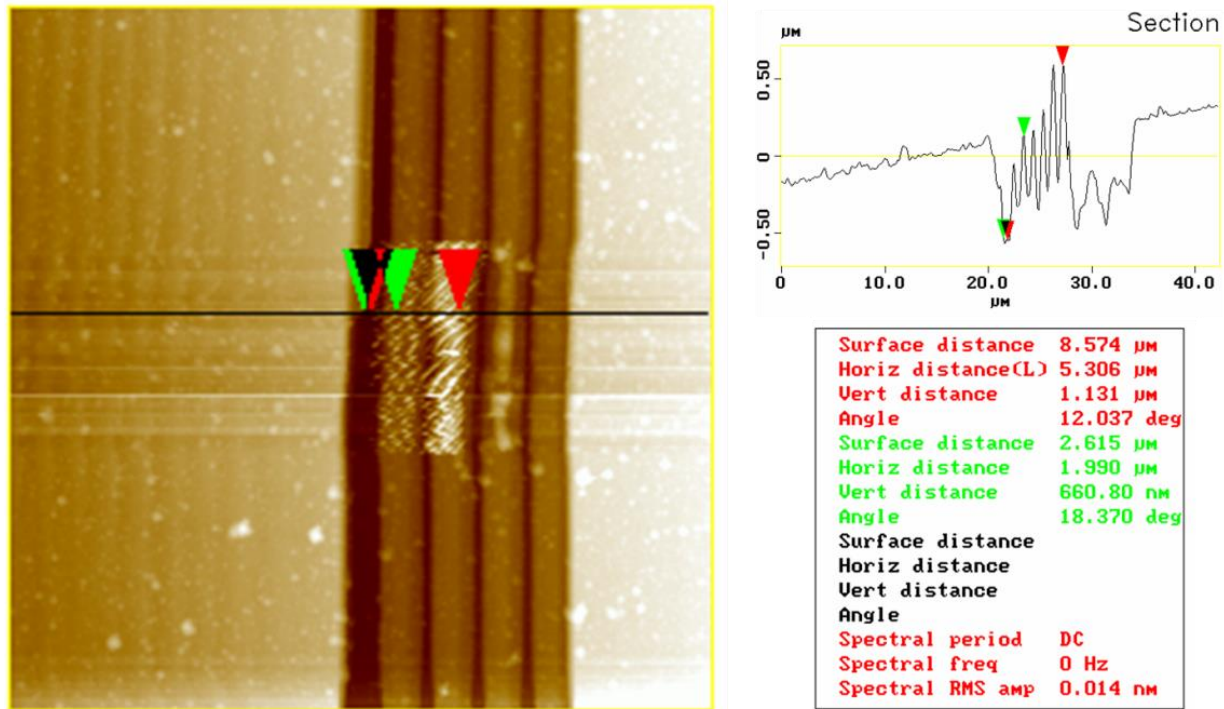


Figura 16. Imagen de AFM. Chip IAME-co-IME. Se observan diferencias en la adquisición de la imagen en la zona de aplicación del voltaje. En el análisis de sección se puede ver que la máxima altura registrada en este caso fue de 1.131  $\mu\text{m}$ . (44.98  $\mu\text{m}$  x 44.98  $\mu\text{m}$ ).

De las imágenes de sección de los experimentos anteriores se pueden resumir las diferencias en la altura que registra la punta sobre los electrodos conforme se aumentó la diferencia de potencial, como se presenta en la Tabla 1 a continuación.

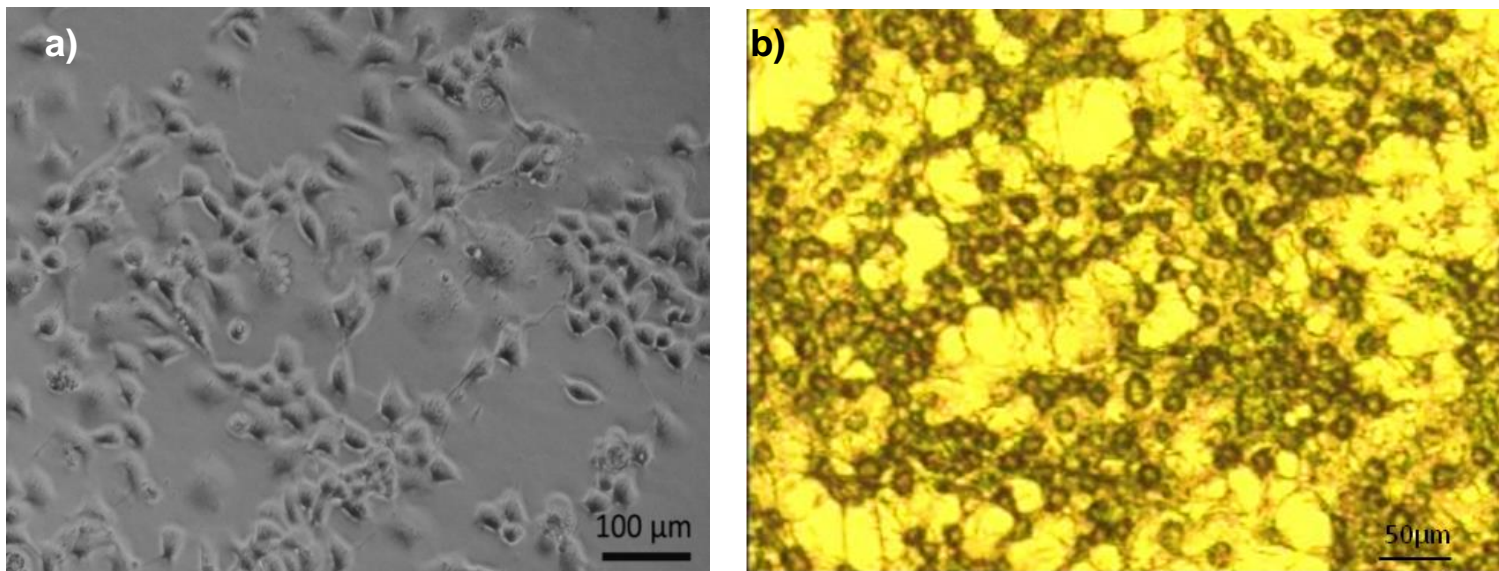
**Tabla 1. Valores de altura registrados por la punta de AFM en respuesta a la aplicación de una serie de voltajes.**

<b>Voltaje (V)</b>	<b>Electrodo (+) nm</b>	<b>Electrodo (-) nm</b>
<b>3</b>	381.34	388.42
<b>5.3</b>	529.76	766.87
<b>5.8</b>	545.48	805.66
<b>7.3</b>	540.23	930.34
<b>10.3</b>	660.80	1131.0

### **Caracterización del cultivo celular (línea NG108-15).**

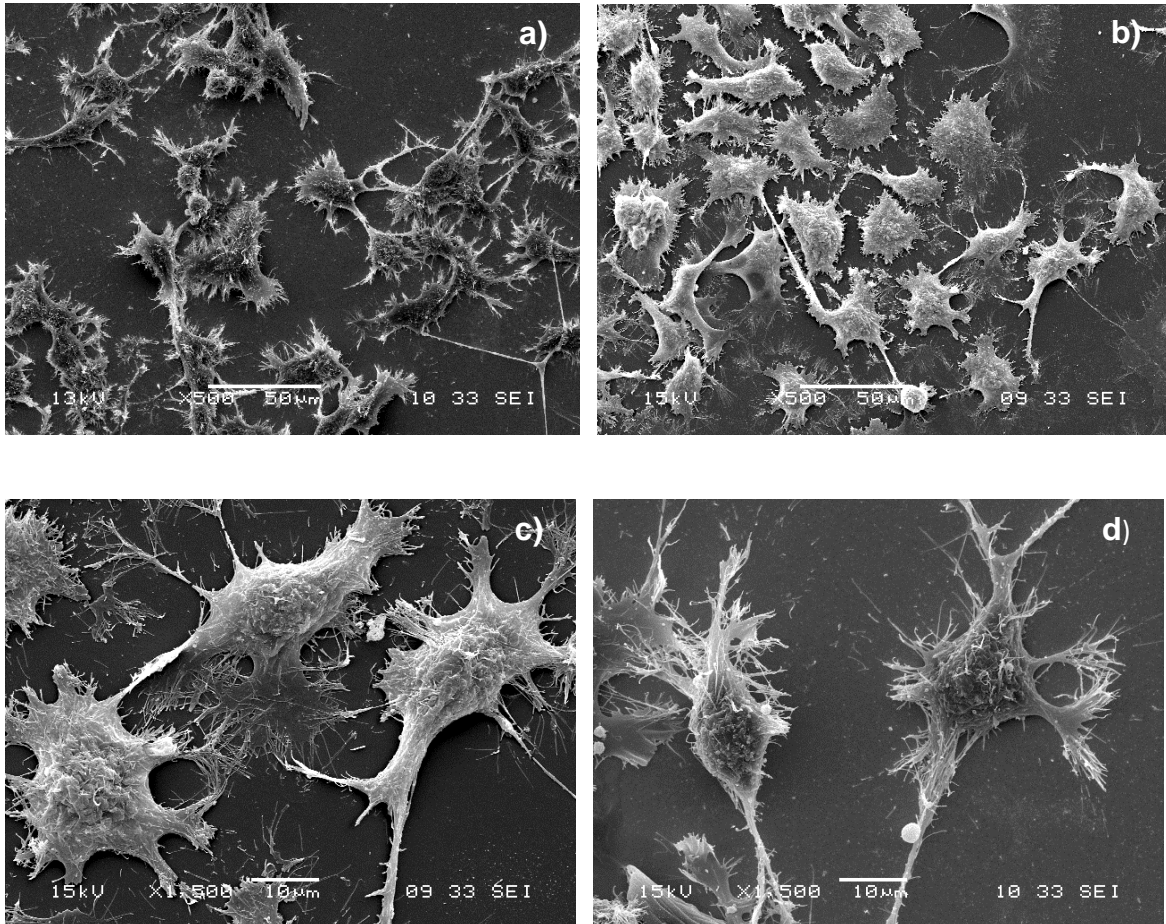
Para comprobar que el Au(111) es un buen sustrato para el cultivo de células NG108-15 se evaluó el crecimiento y calidad del material celular en diferentes fases y en distintas condiciones a través del monitoreo de la morfología celular (Figura17). El cultivo en cajas de plástico Petri (grupo control) y en placas de Au(111) fue observado por microscopía óptica (Figuras 17a y 17b, respectivamente). En el caso de las células

cultivadas sobre las placas de Au(111), el crecimiento de las células se observó a través de un microscopio óptico en modo reflectivo. En particular, es importante mencionar que las células cultivadas sobre placas de Au(111) presentaron buena adhesión, lo que les permitió proliferar e incluso llegar a confluencia al 100% en pocos días. No se observaron diferencias morfológicas entre las células cultivadas sobre las cajas de Petri y sobre las placas de Au(111).

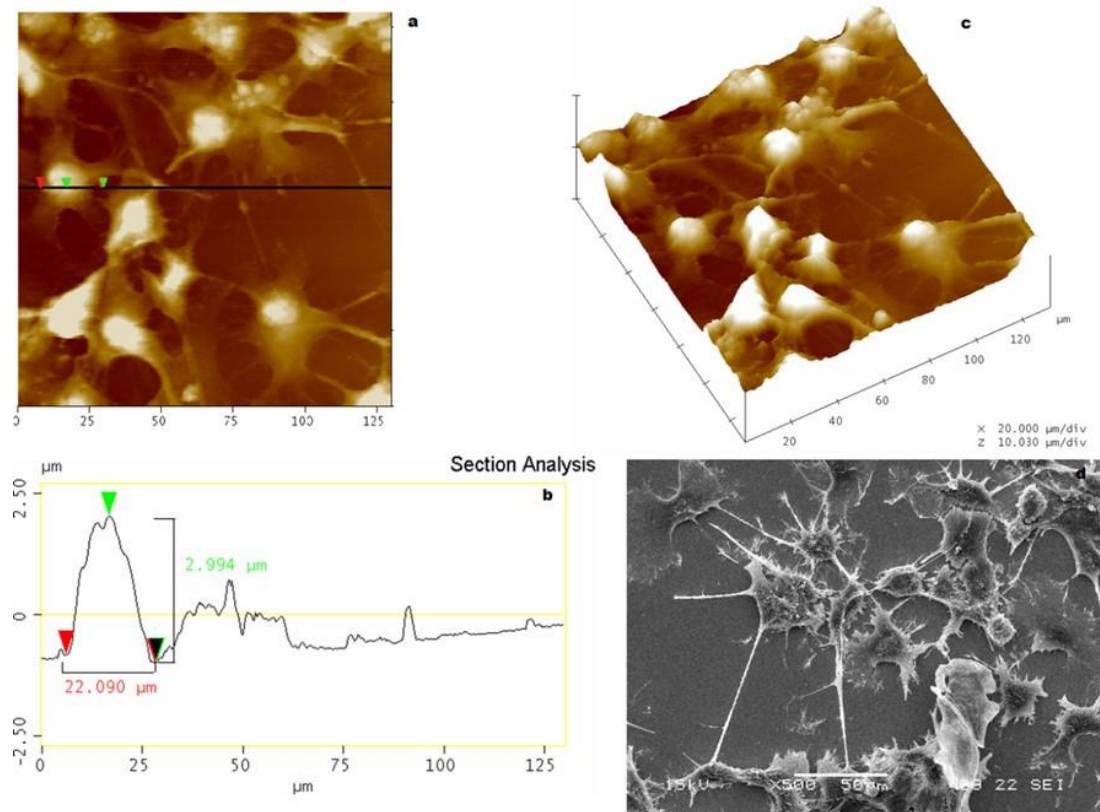


**Figura 17. Imágenes del cultivo de la línea celular NG108-15, obtenidas por microscopía óptica a 4 días de su cultivo en la caja de Petri (a), y sobre la placa de Au(111) (b).**

Más detalles de la morfología celular se pueden observar en el caso del uso de microscopias de alta resolución: SEM y AFM. En las micrografías obtenidas con SEM (Figura 18) y AFM (Figura 19) claramente observamos células bien adheridas sobre la superficie de Au(111).

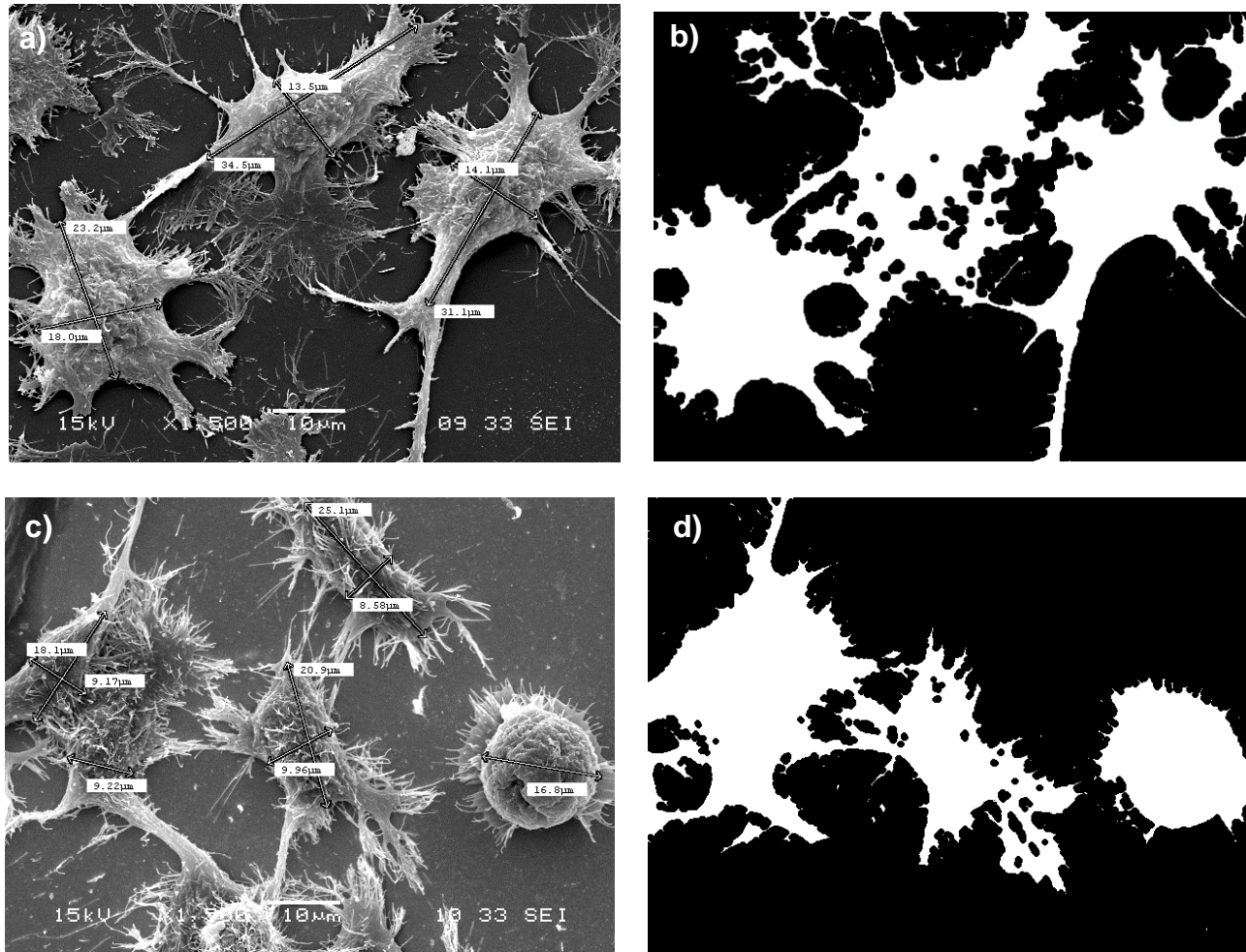


**Figura 18. Micrografías de SEM de células NG108-15. a-b) Células cultivadas en caja Petri (grupo control), c-d) en el sustrato de Au(111), se observan los somas de las células y sus prolongaciones citoplasmáticas.**



**Figura 19. Imagen y análisis de estructuras celulares sobre la placa de Au(111). a-b) Análisis cuantitativo de la morfología celular de NG108-115, por AFM. Evaluación del perfil de una sección marcada en la imagen. Los marcadores verdes indican la altura del soma de la célula (2.991  $\mu\text{m}$ ) y los rojos nos marcan el diámetro (16.250  $\mu\text{m}$ ). c) Imagen de altura de AFM, en modo tridimensional, de la morfología y distribución celular sobre la placa de Au(111). El color de la imagen provee información en el eje Z. Los tonos más claros en la imagen corresponden a las partes más altas con respecto al límite en Z que es de 0-10.030  $\mu\text{m}/\text{div}$ , siendo estas las somas celulares, también se observan prolongaciones citoplasmáticas, d) Micrografía de SEM, se visualizan claramente las células de neuroblastoma crecidas sobre la placa de Au(111), observándose somas y prolongaciones citoplasmáticas.**

El corroborar que las células crecen sobre la superficie del Au(111) y extienden sus procesos neuríticos es un aspecto importante que nos permitió realizar la adecuada obtención de los registros electrofisiológicos desarrollados en este trabajo. Se realizó una comparación de las células cultivadas en el substrato de Au(111) y en la caja de Petri, para lo cual se recurrió a una serie de micrografías de SEM. En ambas condiciones se realizaron mediciones del soma de las células utilizando herramientas del microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV), y con software de procesamiento de imágenes se obtuvieron las mediciones del área celular (Figura 20). Las áreas medidas a partir de células cultivadas en placas de Petri ( $1.1264 \times 10^3 \pm 0.292 \times 10^3 \mu^2$ , n= 112) y substrato de Au(111) ( $1.2675 \times 10^3 \pm 0.289 \times 10^3 \mu^2$ , n= 63) no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 20. Micrografías de SEM de células NG108-15. a-b) Se observan mediciones de células cultivadas en caja Petri, c-d) células cultivadas en el sustrato de Au(111); b, d) las zonas en blanco corresponden a las áreas consideradas para las mediciones celulares.**

## Registro Electrofisiológico.

Con la finalidad de corroborar las condiciones fisiológicas de las células para producir diferencias de potencial y registrarlas utilizando EFM se procedió a la implementación de una metodología que nos permitiera realizar el registro electrofisiológico del material celular sembrado en los substratos empleados (Au, microelectrodos, con superficies tratadas como se mencionó) y sus correspondientes controles empleando las técnicas de registro extracelular e intracelular.

La técnica de registro extracelular sirve para registrar la actividad eléctrica fuera de la célula, en este caso a través del electrodo. Por su parte, el registro intracelular permite la medición del potencial de membrana en reposo o durante la producción de potenciales de acción, así como la inyección de corriente o voltaje para modificar o mantener el potencial de membrana y observar el comportamiento eléctrico de las células con las que se está trabajando.

Antes de iniciar el experimento, fue necesario preparar las soluciones intracelulares, extracelulares y las micropipetas que se utilizan en el equipo correspondiente a la técnica de registro "*Patch clamp*". Las micropipetas que son llenadas con solución intracelular ofrecen, una vez introducidas en la solución extracelular, una cierta magnitud de resistencia. Para estos experimentos fue necesario mantener la resistencia en el intervalo de 2 a 4 M $\Omega$ . Previamente, fueron programados los

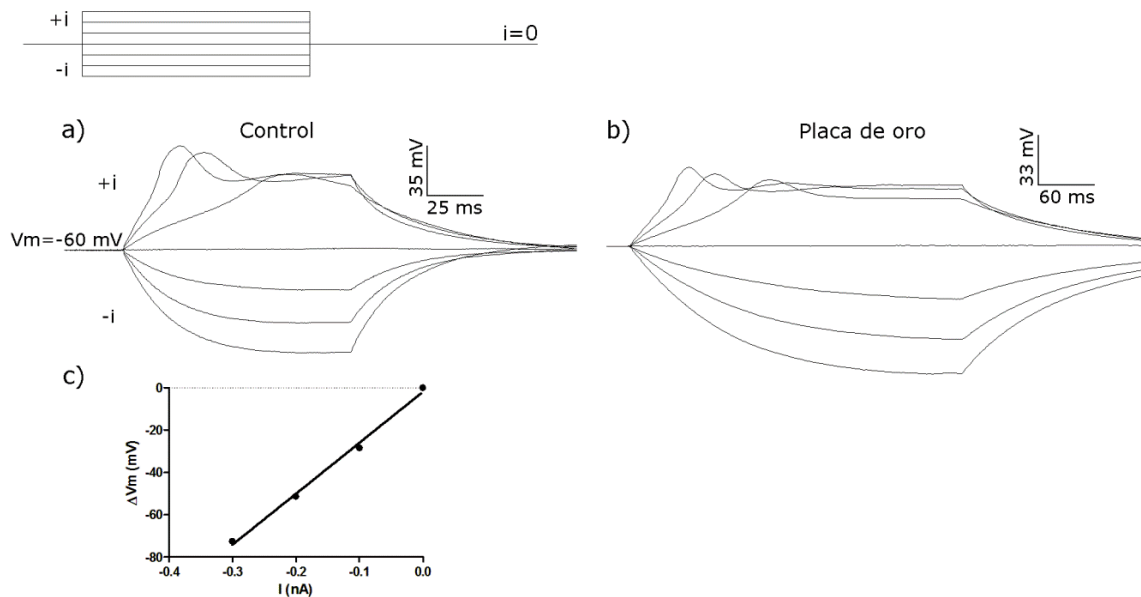


protocolos de registro que fueron aplicados al material celular, así como las conexiones eléctricas necesarias para la obtención de la señal eléctrica a través del electrodo. Otro detalle que vale la pena mencionar es que no fue necesario conservar la esterilidad de los materiales, pues una vez extraídas las cajas Petri de la incubadora no fue necesario guardarlas para su posterior utilización.

Análisis comparativo de propiedades eléctricas pasivas y no lineales de las células NG108-15 cultivadas sobre cajas de plástico y placas de Au(111).

Como un segundo paso para comprobar que el Au(111) es un buen sustrato para cultivo celular fueron estudiadas las propiedades eléctricas pasivas y no lineales de las células NG108-15 cultivadas en cajas de Petri convencionales y sobre el electrodo de Au(111). La idea fue capturar las diferencias eléctricas esenciales utilizando dos diferentes sustratos como cajas Petri y electrodos construidos con base en las placas de Au(111). Inicialmente se analizaron comparativamente las propiedades eléctricas pasivas de la membrana celular evaluando el potencial de reposo ( $V_r$ ) y la resistencia de la membrana ( $R_m$ ). Los resultados se obtuvieron con la solución del baño conectada a tierra y el amplificador 1 en la configuración de fijación de corriente (ver pp 39-40) Se evaluó  $V_r$  de las células cultivadas en cajas de plástico y sobre placas de Au(111). Una vez medido el  $V_r$ , se polarizaba la célula a -60 mV por inyección de corriente de DC y posteriormente se aplicaban pulsos negativos de corriente (-i) de diferente magnitud que originaban cambios en el voltaje ( $\Delta V_m$ ) hiperpolarizantes, con lo cual fue posible

construir curvas  $\Delta V_m$  vs  $I_m$  como la que se muestra en la Figura 21. Una vez hecho esto se calculó  $R_m$ , que está dada por el valor de la pendiente de la curva  $\Delta V_m$  vs  $I_m$ .



**Figura 21. Pulsos de corriente aplicados a la célula y los cambios en el  $V_m$  asociados. a) Registros típicos obtenidos de células cultivadas sobre cajas de Petri (Control), se aplicaron pulsos de corriente hiperpolarizante (-i) y despolarizantes (+i), los pulsos hiperpolarizantes producían  $\Delta V_m$  lineales y los despolarizantes  $\Delta V_m$  no lineales con la producción de potenciales de acción. c) Gráfica  $\Delta V_m$  vs -i,  $\Delta V_m$  corresponde a las deflexiones negativas mostradas en a) cuando se aplica una corriente -i, el comportamiento es lineal, la recta se ajustó por regresión lineal, la pendiente da el valor de la  $R_m$ . b) El mismo protocolo de estimulación y análisis de  $R_m$  se aplicó a las células cultivadas sobre placas de Au(111); la duración de los pulsos fue mayor para obtener el valor asintótico de  $V_m$ . Las células cultivadas sobre cajas de Petri o placas de Au(111), presentaron potenciales de acción cuando se aplicaban pulsos de corriente despolarizante +i.**

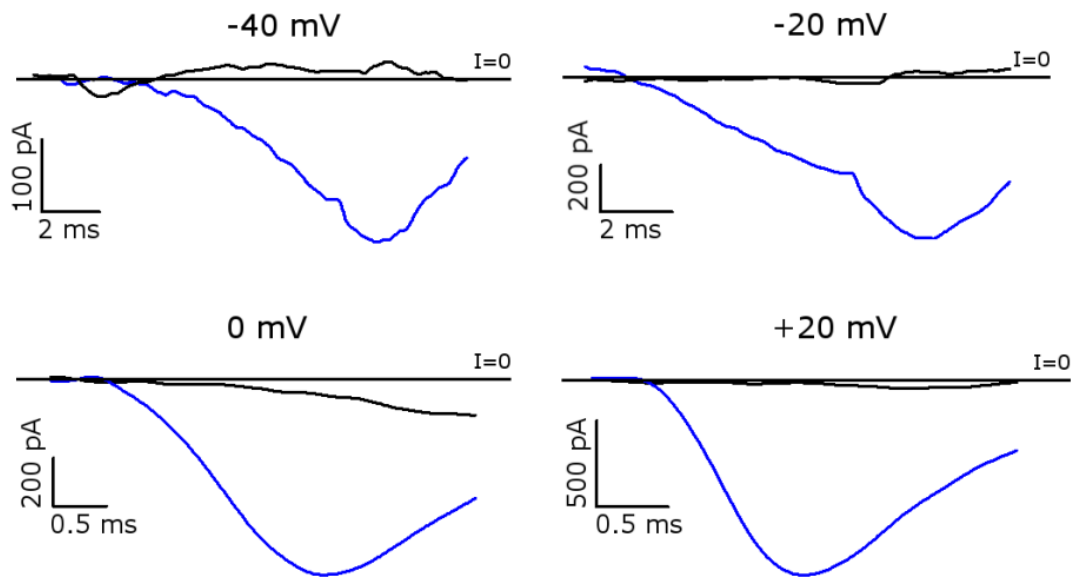
Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. En las células cultivadas sobre Au(111) el valor promedio de  $V_r$  fue ligeramente menor y la  $R_m$  mayor con respecto a las células cultivadas en cajas de plástico; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La ausencia de diferencias significativas en el  $V_r$  y  $R_m$  indicó que el cultivo celular sobre placa de Au(111) no afectó las propiedades pasivas de la membrana celular. Los pulsos de corriente despolarizante (+i) produjo respuestas no lineales; esto es, el disparo de potenciales de acción en las células cultivadas sobre ambas superficies de cultivo. Las Figuras 21 a-b muestran trazos de potencial de acción para células en cajas de plástico (a) y sobre placas de Au(111) (b), respectivamente. Se observa de manera clara, que la forma y las magnitudes de las señales fueron similares en ambas superficies de cultivo, con la producción de potenciales de acción lentos

**Tabla 2. No hay diferencia significativa,  $p > 0.05$**

	Control	Placa Au(111)
$V_r$ (mV)	$-30.1 \pm 1.7$ , n=18	$-26.2 \pm 3.1$ , n=25
$R_m$ (M $\Omega$ )	$110.6 \pm 21.0$ , n=14	$201.4 \pm 40.2$ , n=20

Además, los valores de las corrientes iónicas transmembranales dependientes del voltaje fueron determinados para ambos sistemas de crecimiento. Con el amplificador 1 en la configuración de fijación del voltaje y la solución del baño a tierra se evaluaron las corrientes iónicas dependientes del voltaje en células cultivadas en cajas de plástico y sobre placa de Au(111). A partir de un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de -

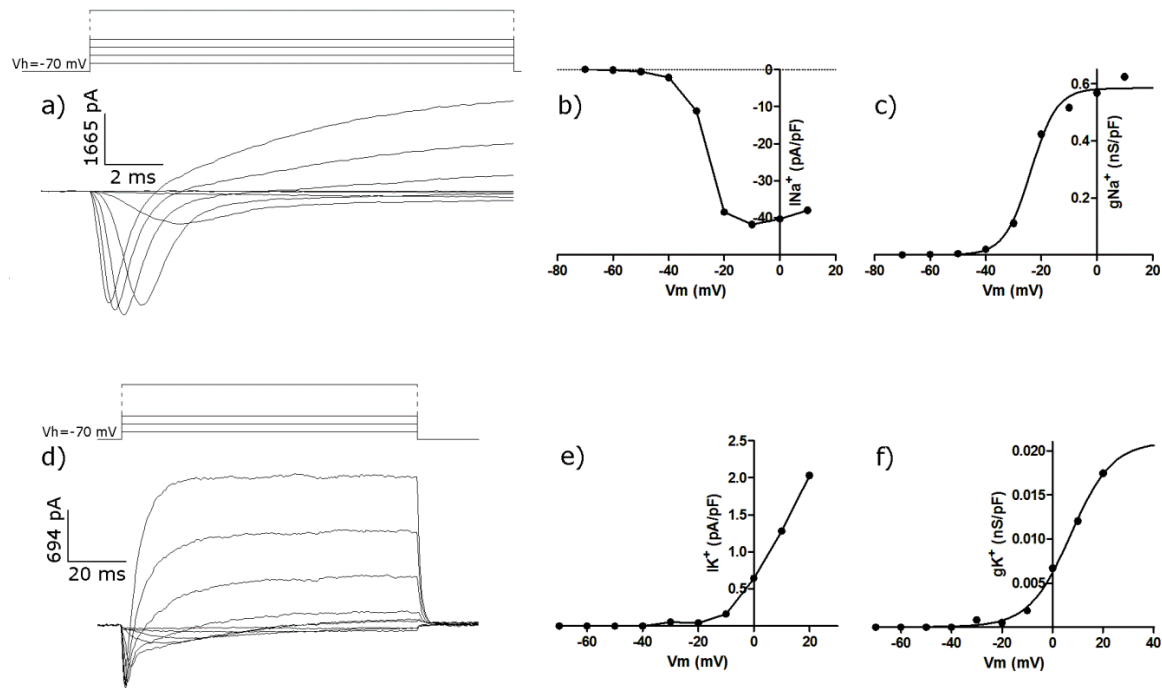
70 mV se aplicaron pulsos despolarizantes breves (10 ms) de diferente magnitud para evaluar la corriente al pico de la  $I_{Na+}$  y pulsos despolarizantes de 100 ms para obtener la corriente máxima de  $I_{K+}$ . Fue posible medir la corriente al pico de la  $I_{Na+}$  sin contaminación de la  $I_{K+}$  debido a la activación rápida de la  $I_{Na+}$  y a la activación lenta de la  $I_{K+}$ . Para mostrar que éste era el caso, se obtuvieron las  $I_{Na+}$  y  $I_{K+}$  por separado y luego se superpusieron. Como se puede observar en la Figura 22, no se observó contaminación de la  $I_{Na+}$  al pico por  $I_{K+}$ , en la que en azul se muestra la  $I_{Na+}$  aislada (negativa) como resultado del bloqueo de  $I_{K+}$  mediante la sustitución del  $K^+$  con  $Cs^+$  en la solución de la pipeta. Asimismo, se bloqueó  $I_{Na+}$  mediante la aplicación de TTX a la solución del baño, no observándose ni la corriente  $I_{Na+}$  ni  $I_{K+}$  (trazos en negro) a esa escala de tiempo como resultado de su activación lenta. Al comparar los trazos en azul y negro podemos observar que el valor máximo de la corriente  $I_{Na+}$  aparece sin contaminación por alguna corriente  $I_{K+}$  positiva.



**Figura 22. Bloqueo selectivo de las corrientes de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ . Las  $I_{\text{Na}^+}$  negativas se indican en azul, la  $I_{\text{K}^+}$  fue bloqueada al sustituir el  $\text{K}^+$  por  $\text{Cs}^+$  en la solución de la pipeta. Los trazos en negro se obtuvieron al bloquear la  $I_{\text{Na}^+}$  con TTX en la solución del baño, bajo estas condiciones, únicamente se obtenía  $I_{\text{K}^+}$  positiva la cual no se observa en esta escala de tiempo por activarse tardíamente. No se observa contaminación de la  $I_{\text{Na}^+}$  (negativa) por la  $I_{\text{K}^+}$  (positiva). Los números arriba indican la despolarización de la membrana a partir de un  $V_h = -70$  mV. Las líneas horizontales indican  $I=0$ .**

En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos a partir de experimentos similares hechos en células cultivadas en cajas de plástico. En la Figura 23a se muestran corrientes rápidas negativas que muestran un proceso de inactivación. Los trazos de corriente obtenidos son típicos de las  $I_{\text{Na}^+}$ . Con los valores máximos de la corriente  $I_{\text{Na}^+}$  se construyeron curvas  $I_{\text{Na}^+}$  vs  $V_m$  como se muestra en b). Finalmente, con los datos de la  $I_{\text{Na}^+}$  fue posible evaluar la conductancia al  $\text{Na}^+$  ( $g_{\text{Na}^+}$ ) con respecto al  $V_m$ , la gráfica  $g_{\text{Na}^+}$  vs  $V_m$  se muestra en c). Se ajustó la función de Boltzmann a los datos de conductancia como se ilustra con la curva suave en c). Los parámetros

resultantes del ajuste son característicos de cada corriente iónica y sirven para caracterizar cada población de canales iónicos. El mismo procedimiento de análisis descrito para las  $I_{Na^+}$  se aplicó a las  $I_{K^+}$  como se ilustra en d), e) y f) de la Figura 23. Es importante mencionar, sin embargo, que para obtener la  $I_{K^+}$  máxima fue indispensable aplicar pulsos despolarizantes de mayor duración (100 ms) debido a su activación más lenta, ya que típicamente las corrientes de  $K^+$  son positivas y no muestran un proceso de inactivación. Es importante resaltar que el comportamiento de la  $I_{Na^+}$  y de la  $I_{K^+}$  son similares a las reportadas en las células NG108-15.

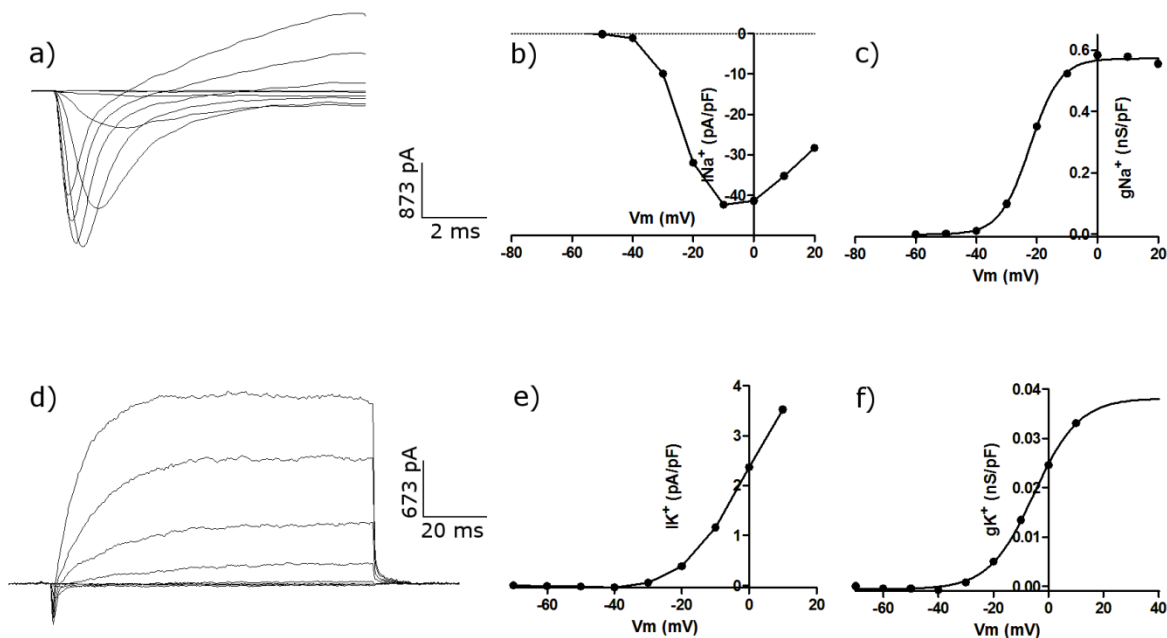


**Figura 23. a)  $I_{Na^+}$  evocadas por 9 pulsos despolarizantes iniciando con 10 mV y con incremento de 10 mV de amplitud y de 10 ms de duración a partir de un  $V_h = -70$  mV; b) curva  $I_{Na^+}$  vs  $V_m$  y c) curva  $g_{Na^+}$  vs  $V_m$ , la curva suave fue ajustada empleando la función de Boltzmann. d)  $I_{K^+}$  evocadas por el mismo protocolo que en a), pero con pulsos despolarizantes de 100 ms de duración; e) curva  $I_{K^+}$  vs  $V_m$ ; f) curva  $g_{K^+}$  vs  $V_m$ , la curva suave fue ajustada con la función de Boltzmann. El cultivo celular se realizó en cajas de Petri.**

Se repitió este procedimiento de análisis de la  $I_{Na^+}$  y de la  $I_{K^+}$  para el caso de las células cultivadas sobre placas de Au(111). En la Figura 24 se muestran las  $I_{Na^+}$  y  $I_{K^+}$ , así como sus respectivas curvas  $I_{Na^+}-V_m$ ,  $g_{Na^+}-V_m$ ,  $I_{K^+}-V_m$  y  $g_{K^+}-V_m$ . La  $I_{Na^+}$  y la  $I_{K^+}$  fueron similares a las observadas en las células cultivadas sobre cajas de Petri; es decir, la  $I_{Na^+}$  presentó una activación e inactivación rápida, por un lado, mientras que por su parte la  $I_{K^+}$  mostró una activación lenta y ausencia de inactivación. Las curvas  $g_{Na^+}-V_m$  y  $g_{K^+}-V_m$  fueron similares. Las gráficas como las mostradas en las Figuras 23 y

Figuras 24 son importantes para observar el comportamiento de los canales iónicos de la membrana celular con respecto a  $V_m$ . En vez de comparar las corrientes iónicas directamente se compararon las densidades de corriente iónica, para evitar cualquier efecto del tamaño celular en la magnitud de las corrientes obtenidas. La forma en que se normalizaron las corrientes iónicas, es decir, se obtuvieron las densidades de corriente, fue dividiendo la corriente entre la capacitancia eléctrica (en pF) de la célula, ya que la capacitancia es directamente proporcional al área de superficie de la célula. El análisis comparativo de las gráficas  $g_{Na^+}-V_m$  y  $g_{K^+}-V_m$  de células cultivadas en cajas de plástico y sobre placas de Au(111) se llevó a cabo comparando los parámetros de ajuste de la función de Boltzmann.





**Figura 24. a)  $I_{Na^+}$  evocadas por pulsos despolarizantes de igual magnitud y duraci3n que en la Fig. 23a; b) curva  $I_{Na^+}$ - $V_m$  y c) curva  $g_{Na^+}$ - $V_m$ , la curva suave fue ajustada empleando la funci3n de Boltzmann. d)  $I_{K^+}$  evocadas por pulsos despolarizantes de igual magnitud y duraci3n que en la Fig. 23d; e) curva  $I_{K^+}$ - $V_m$  y f) curva  $g_{K^+}$ - $V_m$ , la curva suave fue ajustada empleando la funci3n de Boltzmann. El cultivo celular se realiz3 sobre la superficie de placas de Au(111).**

En la Tabla 3 se muestran los valores promedio de los par3metros de ajuste de la funci3n de Boltzmann a las curvas  $g_{Na^+}$ - $V_m$  y  $g_{K^+}$ - $V_m$  de c3lulas sembradas sobre cajas de Petri y sobre placas de Au(111). Los resultados obtenidos del an3lisis comparativo indican que no hubo diferencias significativas entre los par3metros de ajuste de la funci3n de Boltzmann a las conductancias al  $Na^+$  y al  $K^+$  de c3lulas sembradas en cajas de pl3stico y sobre placas de Au(111).

**Tabla 3.** Parámetros de ajuste de la función de Boltzmann a los datos de las curvas de conductancia- $V_m$ . Al comparar los parámetros de ajuste de las conductancias de células sembradas sobre cajas de Petri y sobre placas de Au(111), no se observó diferencia significativa en  $gK^+$  ni en  $gNa^+$ ,  $p>0.05$ .

Valores de ajuste	Control		Placa Au	
	$gNa^+-V_m$ ( $n=10$ )	$gK^+-V_m$ ( $n=10$ )	$gNa^+-V_m$ ( $n=5$ )	$gK^+-V_m$ ( $n=10$ )
<b>Mínimo</b>	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Máximo</b>	$0.21 \pm 0.04$	$0.26 \pm 0.03$	$0.21 \pm 0.10$	$0.36 \pm 0.06$
<b>V50</b>	$-17.60 \pm 1.60$	$-2.40 \pm 0.50$	$-19.10 \pm 1.70$	$-1.80 \pm 2.70$
<b>Pendiente</b>	$7.50 \pm 0.90$	$7.40 \pm 0.50$	$6.30 \pm 0.90$	$8.90 \pm 0.70$

Hasta ahora se ha demostrado en este trabajo que el crecimiento y propiedades electrofisiológicas de las células crecidas en cajas de plástico y en placas de Au(111) no muestran diferencias estadísticamente significativas, lo que nos permite concluir que en ambos casos tenemos el sistema celular con las mismas características. Además, esto nos permite concluir que el crecer en Au(111), la línea celular NG108-15 no produce ninguna alteración. En la siguiente sección mostramos una ventaja del uso de las placas de Au(111) para medir las propiedades electrofisiológicas de éstas

células, la cual se basa en la evaluación simultánea de la medición de potenciales de acción (a través de la pipeta de registro) y las corrientes iónicas que los originan (a través de placas de Au(111)), usando dos instrumentos *Patch-clamp*. El significado de este tipo de evaluación se discute a continuación.

#### Registro de $I_m$ a través de un segundo sistema de fijación del voltaje.

Todos los experimentos anteriores de fijación del voltaje y fijación de corriente se realizaron empleando una micropipeta de registro conectada al amplificador 1 y con la solución del baño conectada a tierra, lo que constituye el protocolo convencional de registro. En este trabajo se modificó ésta técnica de registro manteniendo en tierra virtual la placa de Au(111) a través de un segundo sistema de fijación del voltaje (amplificador 2, Figura 3) y eliminando la conexión a tierra de la solución del baño. Inicialmente se realizaron experimentos de fijación del voltaje con el amplificador 1 en la configuración de patch-clamp en la variedad de whole-cell. Se aplicaron pulsos breves (10 ms) subumbrales que no activaran la  $I_{Na^+}$  con la finalidad de observar únicamente corrientes de fuga y corrientes capacitivas rápidas. En la Figura 25a se muestra el pulso de fijación de voltaje que despolariza la membrana celular a -50 mV a partir de un potencial de mantenimiento  $V_h = -70$  mV, el cual evoca corrientes capacitivas transitorias rápidas al inicio y final del pulso de fijación del voltaje. Como se observa en la misma figura, la corriente de fuga no fue perceptible durante los experimentos que se muestran. En la Figura 25b se muestra la corriente medida simultáneamente a través del amplificador 2. Es de resaltar la similitud del trazo de corriente con el mostrado en la Figura 25a, como se puede observar en la Figura 25c

en la que se muestran los trazos superpuestos de estas dos figuras (25a y 25b). Posteriormente, con el amplificador 1 se aplicaron pulsos despolarizantes de mayor magnitud para evocar la corriente de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje. En la Figura 25d se ilustra el pulso de fijación del voltaje a 0 mV a partir de un potencial de mantenimiento  $V_h$  de -70 mV. El pulso aplicado es de suficiente amplitud para activar  $I_{\text{Na}^+}$ . En la Figura 25e se observa el registro simultáneo de  $I_{\text{Na}^+}$  con el amplificador 2. Es de resaltar la gran similitud de los trazos de corriente, como se muestra en la Figura 25e, en la que se aprecia mejor la similitud al superponer los trazos de las Figuras anteriores (25e y 25f). Es también importante mencionar que el amplificador 2 sigue fielmente las corrientes capacitivas y las corrientes rápidas de  $\text{Na}^+$  medidas con el amplificador 1 y que estas fueron obtenidas con una buena relación señal a ruido. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando se aplicaron pulsos despolarizantes largos (100 ms) con la finalidad de observar además de las corrientes capacitivas y las  $I_{\text{Na}^+}$  rápidas, la  $I_{\text{K}^+}$  de activación lenta (datos no mostrados).

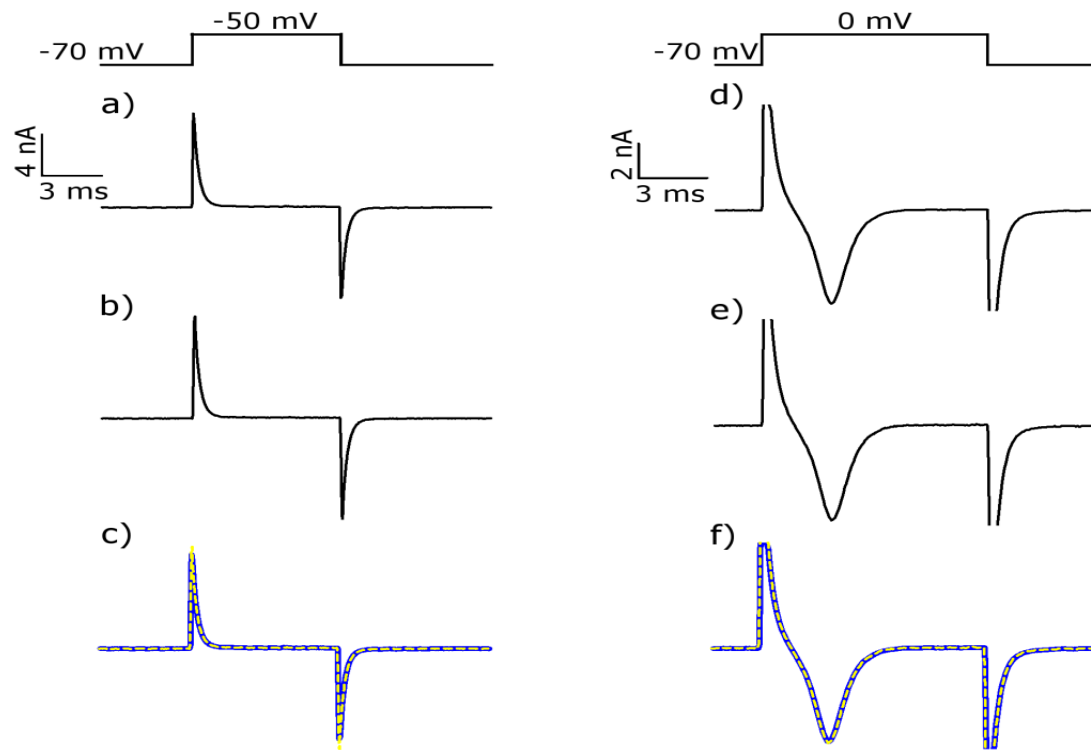


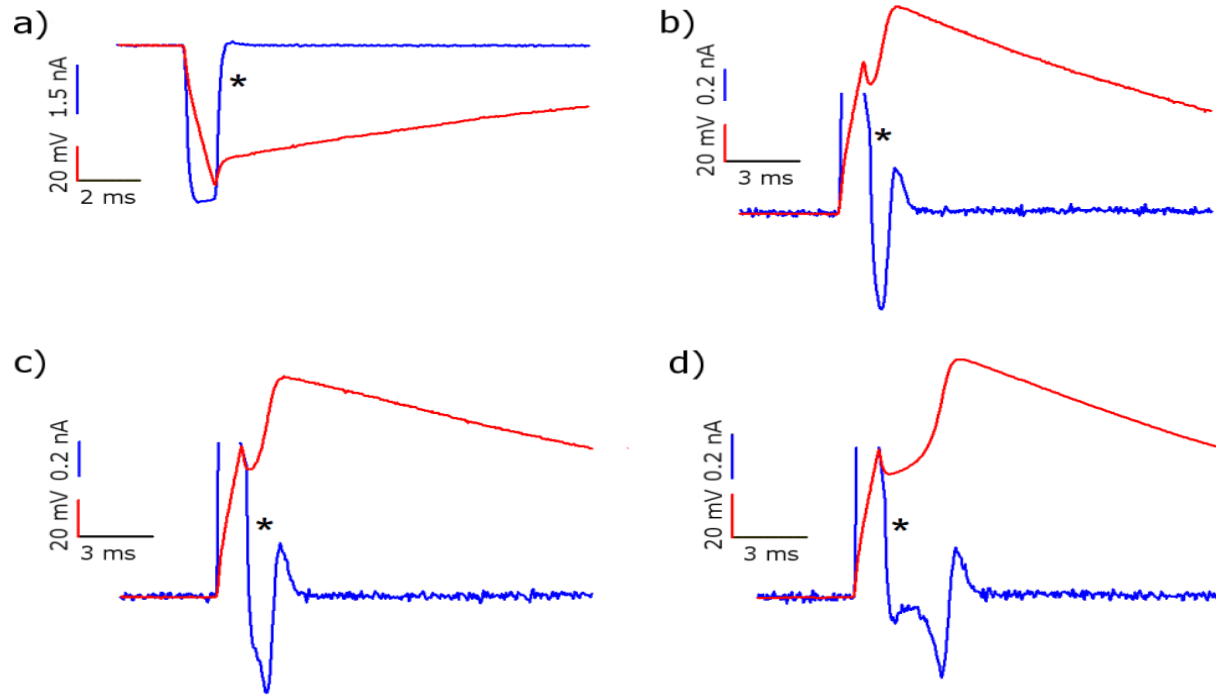
Figura 25. a)  $I_m$  evocada por un pulso de fijación del voltaje subumbral, con  $V_h = -70$  mV se aplicó un pulso despolarizante a  $-50$  mV, únicamente se observan corrientes capacitivas (corrientes transitorias al inicio y final del pulso), corriente registrada con el amplificador 1; b) corriente registrada simultáneamente con el amplificador 2; en c) se muestran las corrientes superpuestas medidas con los amplificadores 1 (línea continua) y 2 (línea punteada). d) Con el amplificador 1 se indujeron y midieron corrientes capacitivas y de  $\text{Na}^+$  evocadas por una despolarización de la membrana a  $0$  mV, se aprecian las corrientes capacitivas transitorias y una corriente negativa de  $\text{Na}^+$ . e) Corriente medida simultáneamente con el amplificador 2. f) Corrientes superpuestas medidas con los amplificadores 1 (línea continua) y 2 (línea punteada). Los trazos de corrientes capacitivas se encuentran truncados para destacar las  $I_{\text{Na}^+}$ . En la parte superior se ilustra la magnitud del pulso de fijación del voltaje.

## Medición simultánea del potencial de membrana y la corriente de membrana

Con el amplificador 1 en la configuración de fijación de corriente y el amplificador 2 en la configuración de fijación del voltaje, manteniendo en tierra virtual la placa de Au(111), fue posible aplicar pulsos de corriente y medir los cambios en  $V_m$  con el amplificador 1, y simultáneamente medir la corriente de membrana  $I_m$  con el amplificador 2. En la Figura 26 se muestran registros típicos de  $I_m$  y  $V_m$ . En la Figura 26a se aplicó un pulso negativo de corriente que aumentó (hiperpolarizó) el  $V_m$  como era de esperarse (trazo rojo), no observándose potenciales de acción. Asimismo, el trazo en azul muestra únicamente la corriente de estimulación. Por otro lado, cuando se aplicaron pulsos de corriente positivos se despolarizó la membrana hasta un voltaje umbral que resultó en el disparo de potenciales de acción, como se indica en el trazo rojo de la Figura 26b. La corriente registrada simultáneamente (trazo azul) muestra el pulso de estimulación (asterisco), seguida de la señal bifásica de la corriente iónica ( $I_m$ ) dependiente del voltaje que produce el potencial de acción. En la figura no es posible discriminar la magnitud y curso temporal de la corriente iónica de interés, ya que se superpone a la corriente de estimulación. Para resolver este problema, se aplicaron pulsos de corriente de mayor magnitud y menor duración de tal manera que apenas se alcanzara el voltaje umbral para el disparo de potenciales de acción, y así discriminar temporalmente las señales de estimulación y las de  $I_m$  dependientes del voltaje. En las Figuras 26c y 26d se observa cómo se separan las corrientes de estimulación de las corrientes iónicas voltaje dependiente. En la Figura 26d, la separación es clara permitiendo observar la señal bifásica de corriente que da origen al potencial de acción. La deflexión negativa se asocia a  $I_{Na^+}$  y la positiva a  $I_{K^+}$ . Como

era de esperarse,  $I_{Na^+}$  se asocia temporalmente a la fase de despolarización e  $I_{K^+}$  a la fase de repolarización del potencial de acción.

Bajo las condiciones de cultivo seguidas en el trabajo, las células NG108-15 produjeron potenciales de acción lentos en la mayoría de los casos independientemente de la superficie de cultivo (caja de plástico o placa de Au(111)). Con técnicas convencionales de registro, no es posible saber claramente el origen de estos potenciales de acción lentos, midiendo únicamente el potencial de membrana. Una ventaja de la técnica propuesta en este trabajo es que sabemos de manera directa su origen: la corriente rápida de  $Na^+$  que da origen a la fase despolarizante del potencial de acción es normal; sin embargo, la  $I_{K^+}$  que se activa es transitoria y no se mantiene durante la fase de repolarización como era de esperarse, haciendo más lenta esta fase.



**Figura 26. Medición simultánea de la  $I_m$  y del  $V_m$ . En rojo se muestra el  $V_m$  obtenido con la pipeta de registro (amplificador1). El trazo azul muestra la señal de la  $I_m$  que se registró simultáneamente a través de la placa de Au(111) (amplificador2). El asterisco indica la corriente de estimulación. a) Hiperpolarización causada por un pulso de corriente negativo (asterisco), no se observa potencial de acción ni corriente iónica voltaje dependiente. b) El pulso de corriente positivo induce un potencial de acción, cuyas corrientes iónicas que lo producen se muestran en el trazo azul como una señal bifásica inmediatamente después de terminar el pulso de estimulación. c) Se aplica un pulso de corriente de mayor magnitud y menor duración para inducir un potencial de acción y separar temporalmente las señales de la corriente de estimulación y la iónica voltaje dependiente. d) Se incrementa más el pulso de corriente de estimulación y se disminuye más su duración, se logra separar claramente la señal de corriente de estimulación de la corriente iónica que da origen al potencial de acción. En b), c) y d) los trazos de corriente de estimulación están truncados por la amplificación de la imagen.**



## DISCUSIÓN.

Con respecto a la caracterización del microelectrodo comercial, el estudio en AFM nos corrobora que este sustrato no es totalmente plano (Figuras 7 y 8) y que funciona como un buen sustrato para las células. La realización de los estudios de las células cultivadas en este microelectrodo “*in vivo*” conlleva a diversos problemas en el AFM (Nanoscope IV, Veeco), como fue la correcta posición del láser sobre la punta de exploración, ya que al entrar está en medio líquido, al ser diferente la densidad del aire a la de un líquido, el ángulo de reflexión cambia, lo que ocasiona que el fotodetector no pueda registrar la deflexión de la punta dando como resultado la no adquisición de imágenes. Esto conlleva a un proceso de reajuste de la posición del láser que puede ser tardado, lo que constituyó un obstáculo que fue posible superar satisfactoriamente. Con respecto a trabajar en el microelectrodo para medir las diferencias de potencial en las células, o la distribución de cargas en la membrana celular al momento de darse un potencial de acción utilizando como herramienta el EFM es sin duda un reto, el cual nos planteamos al principio de este trabajo, pero que no alcanzamos, dado que la velocidad de un impulso nervioso es muy rápida, esto es, en el orden de milisegundos y las diferencias de potencial de milivoltios, sensibilidad que no fue posible alcanzar debido a limitaciones en la infraestructura.

En relación a los cultivos celulares sobre las placas de oro estos fueron similares a los obtenidos sobre cajas de plástico (grupo control) en cuanto a la adhesión y

proliferación celular; de tal manera que, fue posible cubrir la superficie de oro con células NG108-15 a los pocos días de cultivo. También las morfologías celulares fueron semejantes en ambas superficies de cultivo, como se mostró en la Sección Caracterización del cultivo celular (línea NG108-15), pp 57-61, de este trabajo. Tomando todo esto, podemos concluir que las placas de oro son sustratos adecuados para el crecimiento y proliferación celular. Asimismo, al analizar las propiedades eléctricas pasivas como  $V_r$  y  $R_m$ , no se observaron diferencias significativas entre ambas superficies de cultivo. En cuanto a la generación de potenciales de acción, las células NG108-15 no fueron una población eléctricamente homogénea, ya que las células control presentaron en su mayoría potenciales de acción lentos y ocasionalmente potenciales de acción rápidos, características que también se observaron en las células cultivadas sobre placas de oro; esto es, en ambas superficies de cultivo los potenciales de acción fueron parecidos. Se realizó un análisis cuantitativo del comportamiento de los canales iónicos dependientes del voltaje construyendo curvas conductancia- $V_m$  con ajuste de una función de Boltzmann a los datos (ver pp. 62-77) [13]. Estas curvas son características de cada población de canales iónicos, por lo que los parámetros de ajuste resultantes también lo son [13]. En este sentido, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de ajuste para las curvas  $g_{K^+}-V_m$  y  $g_{Na^+}-V_m$  de las células cultivadas en cajas de Petri con respecto a las células cultivadas sobre placas de oro. De esto, se puede concluir que las placas de oro no afectan la conductancia de los canales de  $Na^+$  ( $g_{Na^+}$ ) dependiente del voltaje, que es vital para la fase de despolarización, ni la conductancia de los

canales de  $K^+$  ( $g_{K^+}$ ), que es de suma importancia para la fase de repolarización del potencial de acción [13, 21].

Un problema importante en los experimentos electrofisiológicos es la caída de voltaje que sucede a través de la resistencia en serie producida por la solución del baño (conectada a tierra) en donde se encuentran inmersas las células. Esto es equivalente a una resistencia en serie entre la célula y la tierra, que puede producir errores en la medición de  $V_m$ , ya que el voltaje medido con la técnica de fijación de corriente es la suma de  $V_m$  más la caída de voltaje a través de la resistencia de la solución electrolítica del baño producida por la corriente de membrana  $I_m$ . El problema se agrava cuando las corrientes de membrana son de gran magnitud, ya que la caída de voltaje a través de la solución del baño es aún mayor [11]. Para la solución parcial de este problema, se han empleado diseños especiales de amplificadores de fijación de corriente [68]. El problema se resolvería si tuviéramos la posibilidad de tener un buen conductor eléctrico a tierra en la vecindad inmediata de la membrana plasmática de la célula a registrar, ya que se abatiría la resistencia en serie. Una ventaja de utilizar las placas de oro como sustrato de cultivo es que el oro es un buen conductor eléctrico que una vez conectado a tierra o tierra virtual, resuelve el problema de la resistencia en serie, ya que  $I_m$  fluye a tierra a través de la placa de oro y no a través de la solución electrolítica. Esto se comprobó por medio de las imágenes obtenidas por AFM, en las que se observa que las células se adhieren, haciendo contacto íntimo con la superficie de estructura granular de las placas de oro.

El empleo de una placa de oro y de dos sistemas de fijación del voltaje permite utilizar un amplificador de manera convencional y el otro para mantener en tierra virtual la placa de oro sobre la cual se cultivaron células. La ventaja que brinda esta configuración es la posibilidad de medir  $I_m$  a través del segundo amplificador, independientemente si los experimentos son de fijación del voltaje o de fijación de corriente. Un aspecto a destacar de la metodología propuesta es la posibilidad de medir simultáneamente la corriente iónica que da origen a los potenciales de acción (ver pp 75). Este problema ya ha sido abordado anteriormente con el empleo de sistemas de fijación del voltaje “híbridos” [52, 69-76]; es decir, configuraciones que pasan instantáneamente de fijación de corriente a fijación del voltaje para medir la corriente asociada a un potencial de acción. Esta técnica tiene algunos inconvenientes, como son la necesidad de crear un amplificador especial capaz de cambiar de configuración rápidamente, o aún peor, que en el proceso se interrumpe el desarrollo normal de un potencial de acción para medir  $I_m$ . Por lo anterior, se desarrollaron técnicas alternativas como Fijación del potencial de acción y Fijación del potencial de acción dinámica [74] que miden indirectamente  $I_m$  empleando el potencial de acción (medido previamente con la técnica de fijación de corriente) como pulso comando en un experimento de fijación del voltaje que induciría una corriente de membrana de curso temporal y magnitud semejante a la que sucede en la célula cuando dispara potenciales de acción. Estas técnicas también tienen inconvenientes importantes, ya que se basan en la suposición de que la conductancia de membrana depende únicamente de  $V_m$ , lo que no es necesariamente cierto ya que las actividades de los canales iónicos son fuertemente moduladas por mensajeros intracelulares y

extracelulares durante el desarrollo de potenciales de acción. Con el empleo de un segundo amplificador que mantiene en tierra virtual una placa de oro con células cultivadas sobre su superficie se evitan estos problemas ya que se miden directamente y de manera simultánea  $V_m$  e  $I_m$  sin la necesidad de un amplificador especial. Con el empleo de dos sistemas de fijación del voltaje comerciales se puede medir y analizar la  $I_m$  que induce los potenciales de acción con una buena relación señal a ruido y sin interrumpir el desarrollo normal de los potenciales de acción. Esta técnica sería especialmente importante en la electrofisiología de células cardíacas, donde se ha trabajado por décadas en cómo registrar simultáneamente los potenciales de acción y las corrientes de membrana que les dan origen. Por ejemplo, sigue siendo tema de investigación actual el origen de las corrientes iónicas que producen los potenciales de acción en las células marcapaso [69, 72, 73, 76]. Por otra parte, nuestra técnica permite la observación directa del efecto de fármacos o moduladores de canales iónicos sobre las corrientes iónicas y sobre el potencial de acción simultáneamente. Asimismo, se puede emplear para medir las corrientes iónicas que producen células con actividad eléctrica espontánea empleando únicamente el amplificador de tierra virtual sin el uso de micropipetas.

## CONCLUSIÓN.

Se desarrolló un novedoso método basado en el uso de dos sistemas de *Patch-Clamp*, a través del cual es posible medir de manera simultánea los potenciales de acción y las corrientes iónicas que lo originan en la línea celular NG108-15, utilizando como sustrato de crecimiento una placa de Au(111). Este nuevo desarrollo tiene su base en el uso de un sustrato metálico biocompatible con buena conductividad eléctrica que no altere el crecimiento celular ni la medición de parámetros electrofisiológicos. Todos estos requerimientos fueron cumplidos con el uso de placas de Au(111) como sustrato para el crecimiento celular (NG108-15). En un estudio detallado y sistemático se describió el crecimiento y caracterización de células NG108-15 en dos diferentes sustratos: en cajas de plástico y sobre placas de Au(111). La idea fue buscar una posible alteración en las características morfológicas del material celular después de su crecimiento en los diferentes sustratos. Los resultados del análisis morfológico por microscopía óptica, SEM y AFM, demuestran claramente que no hay diferencia entre los cultivos de las células crecidas en las diferentes condiciones. En particular, las micrografías obtenidas con SEM y AFM muestran células crecidas, adheridas al sustrato de Au(111), con presencia de prolongaciones citoplasmáticas y somas regulares. En ambos sustratos las células adheridas presentaron una morfología y calidad requeridas para estudios electrofisiológicos.

Las medidas del  $V_r$  y  $R_m$ , del potencial de acción, de las corrientes iónicas, y otras propiedades electrofisiológicas obtenidas mediante la técnica clásica de *Patch-Clamp*, demuestran que no hay una diferencia significativa entre las células crecidas en la caja de plástico y las células crecidas en la placa de Au(111). Los parámetros obtenidos

fueron similares. Esto sostiene claramente la idea del uso de placas de Au(111) como material preferencial para usar en estudios electrofisiológicos y morfológicos de células. Además de la biocompatibilidad, el uso de placas de Au(111) también ayuda en la obtención de imágenes de AFM de alta resolución (a nivel nanométrico) para la caracterización de morfología celular. Una vez comprobado que no existen diferencias ni en la morfología ni en el comportamiento electrofisiológico entre las células crecidas en caja de plástico y sobre la placa de Au(111), se midieron las propiedades electrofisiológicas a través del substrato de alta conductividad como son las placas de Au(111).

La medición de manera simultánea de los potenciales de acción y las corrientes iónicas que lo originan (en un substrato de Au(111)), de sistemas de células puede abrir nuevas opciones en estudios electrofisiológicos y complementar conocimientos sobre procesos de señalización intra e intercelulares, con posibles aplicaciones en prótesis o implantes artificiales (interfaces electrónicas con bio-neuro-sistemas). También tiene un uso potencial para determinar las causas y tratamiento de algunas patologías de tejidos excitables.

## APENDICE.

### Medio de cultivo DMEM enriquecido

Para preparar 100 ml se utilizan las siguientes cantidades:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (ml)</b>
<b>DMEM enriquecido</b>	<b>87.5</b>
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>2.5</b>
<b>Suero Fetal Bovino(SFB)</b>	<b>10</b>
<b>Antimicrobiano / Antifúngico</b>	<b>1</b>
<b>L-Glutamina</b>	

Debemos considerar la concentración de SFB, ya que se recomienda utilizar una concentración al 10% en el medio con el fin de estimular el crecimiento celular, de 2-5% sólo para mantener la población constante y 15% cuando se van a congelar las células para conservarlas por un período de varios meses. El medio de cultivo complementado se almacena a -4°C y se calentara a 37°C al momento de su uso.

### Solución de Tripsina

Para preparar 100 ml al 0.025% de tripsina se utilizaron las siguientes cantidades:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Tripsina</b>	<b>0.025 g</b>
<b>HBSS</b>	<b>100 ml</b>



Mezclar perfectamente, esterilizar por filtración y envasar.

#### Solución de Poli-L-lisina

Para preparar 100 ml se utilizaron las siguientes cantidades:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Poli-L-lisina (Peso-mol. total &gt; 300,000).</b>	<b>1 mg</b>
<b>Agua ultrapura</b>	<b>100 ml</b>

Mezclar perfectamente, esterilizar por filtración y envasar. Almacenar a -20°C.

#### Solución de Azul tripano

Para preparar 10 ml de este colorante se utilizó:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Azul tripano</b>	<b>0.02 g</b>
<b>PBS</b>	<b>10 ml</b>

Se disuelve perfectamente, filtrar y envasar protegiéndolo de la luz.

## Conteo Celular

Se utilizó el método del hemocitómetro que se describe a continuación:

1. Se limpió perfectamente una cámara de Neubauer y el cubreobjetos de esta.
2. De una alícuota de las células obtenidas en suspensión, se tomó 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular a contar y se diluyó en 900  $\mu\text{l}$  de azul tripano (dilución 1:10), se mezcló bien y se tomó un volumen suficiente para cubrir las 2 cuadrículas del hemocitómetro. Se dejó reposar 1 minuto y se procedió a realizar la cuenta celular.
3. Se contó el número de células presentes en los cuadrantes, se multiplicó por  $10^4$  y por el factor de dilución realizado, de esta forma se obtuvo el número de células por mililitro.

## Técnica de lavado de material

Cuando el material se va a utilizar por primera vez en el cultivo de células es necesario utilizar agua y detergente, tomando en cuenta lo anterior se procede de la siguiente manera:

1. Sumergir el material en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 24 horas.
2. Sacar y enjuagar con agua de la llave, mínimo 10 veces y tallando con un escobillón exclusivo para el material de cultivo.

3. Introducir el material en una solución de HCl al 5% durante 24 horas.
4. Sacar y enjuagar con agua de la llave, mínimo 10 veces.
5. Introducir el material en agua bidestilada durante 24 horas.
6. Dejar escurrir y secar al horno a 100° C por 1 hora.

Una vez completamente seco el material se prepara para esterilizar en autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> de presión y 121°C por 15 minutos.

#### Cultivo primario de neuronas de cerebelo.

Las células fueron obtenidas del cerebelo de ratas de 7-8 días de edad, el crecimiento de células no neuronales, se previene con la adición al cultivo de citosina arabinosa [77].

En términos generales:

El cerebelo de cuatro ratas cepa Wistar de 7-8 días de edad, fue extraído y cortado dentro de pequeñas cajas y tripsinizado por 15 minutos a 37°C en Hanks's BSS. Las células en suspensión fueron sembradas en placas de cultivo (Nunc, 6 pozos) previamente tratadas con poli-L-lisina [78].

#### Procedimiento:

1. Se limpió la cabeza del animal con etanol al 70%.
2. Las ratas fueron anestesiadas con cloroformo, y sacrificadas.
3. Con ayuda de pinzas y tijeras se extrajo el cerebelo.
4. El cerebelo fue colocado sobre una caja de Petri con HBSS.
5. Enseguida se disocio el tejido con ayuda del bisturí, en pequeños cubos de aproximadamente 0.5 mm<sup>3</sup>.

6. Se realizaron 3 lavados al tejido con HBSS.
7. El tejido seccionado se transfirió a un matraz Erlenmeyer (25 ml) y se adiciono 10 ml de tripsina al 0.025% (en HBSS), se colocó en agitación, suavemente por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.
8. El sobrenadante se filtró sobre tela de organza, vaciándolo a un tubo para centrifuga, y se agregó 5 ml del medio de crecimiento para parar la acción de la tripsina.
9. La suspensión de células se colocó en la centrifuga de 3 a 5 minutos hasta que sedimento para obtener un botón celular, a 200 g, una vez formado, se removió el sobrenadante y se adicionó 2 ml del medio de cultivo.
10. Se realizó la cuenta celular por el método del hemocitómetro.
11. El botón celular fue resuspendido en el medio de crecimiento y se sembraron las células a una concentración de  $2.5-3.0 \times 10^6$  células por microplaca (de 6 pozos), la cual contenía 3 placas de oro previamente tratadas, y tres laminillas (cubreobjetos redondos).
12. Las células se incubaron a 37°C, en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.
13. Después de 2 días, se incubó los cultivos con citosina arabinosa 10 M por 24 hrs.
14. Se cambió cada 2-3 días el medio de cultivo.

### Siliconización del material de vidrio:

El material de vidrio empleado en la elaboración del cultivo primario se siliconizo (pipetas Pasteur, cajas de Petri). Para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

Se diluyó la solución de SIGMACOTE a 0.1-1% en agua ultrapura. El material se sumergió en la solución anterior, para lavarlo por dentro y por fuera. Se secó por varios minutos a 100°C. La esterilización se realizó con calor seco.

### Cultivo de la línea celular PC12

Las células PC12 son una conveniente alternativa para cultivar neuronas, para estudiar el efecto y los procesos de diferenciación del factor de crecimiento neural. Cuando las células PC12 son cultivadas en medio que contenga suero, estas adoptan una forma redondeada, proliferando a alta densidad. Bajo estas condiciones, PC12 dispara muchas de las propiedades asociadas con las células adrenales cromafin inmaduras y con simpaticoblastos. Cuando se cambian las concentraciones de NGF, estas células cesan la división, empiezan a ser eléctricamente excitables, extienden largas neuritas, y gradualmente adquieren muchas características de neuronas maduras. En condiciones libres de suero, el NGF no solo promueve la diferenciación celular, sino también su supervivencia [79].

El medio de cultivo para crecimiento de PC12, se compuso de RPMI 1640, adicionado con 10% de suero de caballo, 5% de suero bovino fetal, y 1% de penicilina/estreptomicina, y fue almacenado a 4°C. El medio para congelar células

consistió en mezclar 1 volumen de dimethyl sulfoxido (DMSO) con 9 volúmenes del medio completo de crecimiento.

Para la diferenciación de PC12, las superficies de las cajas de cultivo fueron previamente tratadas con 50µg/mL de colágeno, en ácido acético al 0.1%, toda la noche, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### Cultivo de la línea celular N1E-115

Las células de Neuroblastoma Murino (N1E-115) fueron crecidas en Dulbecco's modified Eagle médium (DMEM), con 4.5 g/litro D-glucosa, con 10% de suero bovino fetal, 1% de L-Glutamina y 1% de antibiótico-antimicótico. La diferenciación fue inducida con 2% de DMSO en el medio, como se ha descrito previamente [80].

#### Equipo Electrofisiológico

Los equipos empleados para hacer las mediciones correspondientes de la actividad eléctrica en el sistema desarrollado, forman parte de la instrumentación necesaria en el estudio de dos de las técnicas más comúnmente utilizadas en electrofisiología: el registro intracelular y el registro extracelular.

El material celular a estudiar y la terminal a tierra del equipo son sumergidos en una solución electrolítica. Posteriormente, se hace contacto físico entre el material celular y la micropipeta. Ambas técnicas, utilizan micropipetas con características diferentes dependiendo la técnica que se vaya a trabajar.

## Construcción de micropipetas

Las micropipetas son construidas a base de capilares de vidrio que se colocan en un estirador el cual aplica una tensión en los extremos mientras que en el centro se aplica calor, con esto se logra que el capilar se parta en dos. Con los parámetros que se programan en el equipo se pueden obtener diferentes diámetros y longitudes de la punta de la micropipeta, a continuación, se pule la punta calentando su superficie con el fin de eliminar cualquier residuo de vidrio que pudiera rasgar el material celular o modificar las mediciones. Con esto, es posible modificar la resistencia que se obtiene de la micropipeta. Dependiendo su uso, la resistencia de una micropipeta puede variar entre 1 y 100 M $\Omega$ . A continuación, se llena con una solución electrolítica que ayuda a conservar la continuidad eléctrica en el circuito cuando la micropipeta se coloque en la terminal del equipo. En ocasiones al llenar la micropipeta con la solución, es posible que queden burbujas de aire en la punta lo que provoca efectos indeseables en el sistema agregando una resistencia en serie muy grande, es por lo tanto necesario eliminarlas completamente.

### Solución Intracelular

Para preparar 100 ml, a pH = 7.2 (Ajustado con KOH).

<b>Componente</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>mM</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>NaCl</b>	<b>58.44</b>	<b>10</b>	<b>0.05844</b>
<b>KCl</b>	<b>74.55</b>	<b>140</b>	<b>1.0437</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>110.99</b>	<b>1</b>	<b>0.011099</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>203.30</b>	<b>1</b>	<b>0.02033</b>
<b>Glucosa</b>	<b>180.16</b>	<b>100.</b>	<b>1802</b>
<b>HEPES</b>	<b>238.3</b>	<b>10</b>	<b>0.23831</b>
<b>EGTA</b>	<b>380.35</b>	<b>11</b>	<b>0.418385</b>

### Solución Extracelular

Para preparar 100 ml, a pH = 7.4 (ajustado con NaOH).

<b>Componente</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>mM</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>NaCl</b>	58.44	151.5	<b>0.885</b>
<b>KCl</b>	74.55	4.5	<b>0.0335</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	110.99	2	<b>0.02220</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	203.30	1	<b>0.02033</b>
<b>HEPES</b>	238.31	5	<b>2.383</b>



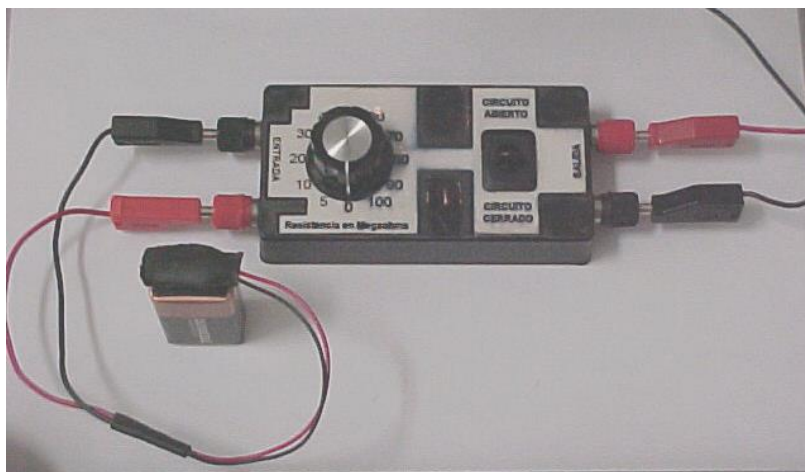
## Dispositivo externo para la aplicación y control de la señal eléctrica en EFM

En la microscopía de fuerza electrostática se requiere que la muestra presente propiedades eléctricas, específicamente carga electrostática superficial. Recientemente se ha buscado la forma de caracterizar muestras de materiales conductores, que necesitan de una fuente de energía externa para proporcionar ya sea una diferencia de potencial o una corriente eléctrica y así incrementar el efecto de las cargas en la superficie del material, facilitando con ello, la adquisición de imágenes de potencial con el EFM. Dada esta necesidad, se requería un dispositivo que proporcionará esta energía, la idea de este dispositivo es usar el microelectrodo comercial como una muestra conductora que forma parte de un circuito eléctrico y poder enviar una diferencia de potencial a través de sus electrodos. En el caso del estudio de las células nerviosas esta parte es crucial para observar el mecanismo de transporte de señales entre estas.

El dispositivo fue diseñado anteriormente en el laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular de la UAM-Iztapalapa. Tiene la finalidad de proporcionar y controlar la diferencia de potencial que debe ser aplicado a la muestra que fue caracterizada con EFM. El dispositivo está constituido por un conjunto de elementos resistivos, una llave de cambio o llave de selección y un interruptor. El diseño permite seleccionar con la llave, la magnitud de la resistencia eléctrica que presentara el dispositivo, la selección se puede hacer entre 12 valores discretos de resistencia que van de 0 ohm a 100 Megaohms [32].

Este dispositivo cuenta con dos terminales de entrada y dos terminales de salida, en la entrada debe ser conectada una fuente de potencial, para lo cual es recomendable

utilizar una o varias pilas o baterías, ya que el potencial que proporcionan es muy estable, en las terminales de salida se debe conectar la muestra. Es importante mencionar que el uso de la corriente eléctrica puede dañar el sistema de control del piezoeléctrico de AFM. Una vez conectado el dispositivo externo, el interruptor es utilizado para aplicar o eliminar el potencial eléctrico.



**Figura 26. Dispositivo externo para la aplicación y control de la señal eléctrica en EFM.**

El diseño del circuito permite conectar un amperímetro o multímetro para monitorear la corriente eléctrica o la diferencia de potencial, esto es posible gracias al empleo de conectores hembra del tipo universal. En la Figura 26, se puede apreciar los cables de conexión: un par de cables con micropinzas tipo caimán para la conexión de las muestras, un “broche” para batería de 9 Volts y un cable con pinza tipo caimán para conexión a tierra [32].

## REFERENCIAS

1. **Squire Larry R., Bloom F. E., Mc Connell Susan.** 2003. Fundamental Neuroscience. Academia Press, San Diego California.
2. **Kandel E.R, Schwartz J. H. y Jessell T. M.** 2001. Principios de Neurociencia. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España.
3. **Perea, G. y Araque A.** 2003. Nuevas vías de información en el sistema nervioso: comunicación entre astrocitos y neuronas. Rev.Neurol.; 36(2):137-144.
4. **Zhang Su-Chun and Fedoroff Sergey.** 1996. Neuron-microglia interactions in vitro. Acta Neuropathol. 385-395.
5. **Delgado-García J. M.,** 2001. Estructura y función del cerebelo. Rev. Neurol. 33(7):635-642.
6. **Zach W. Hall.** With 11 contributors.1992. An introduction to Molecular Neurobiology. Sinauer Associates, inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
7. **Hodgkin A.L., and Huxley A.F.** 1939. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. Nature. 144:710–711.
8. **Hodgkin A.L., and Huxley A.F.** 1945. Resting and action potentials in single nerve fibres. J. Physiol. 104:176–195.
9. **Hodgkin A. L., Huxley A. F.** 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117, 500–544
10. **Audrey McEwan Caroly.** 2000. Stimulation of Human Neuroblastoma Cells using a Planar Microelectrode Array. Tesis de doctorado, Universidad de Glasgow. USA.
11. **The Axon™ Guide** 2012. A guide to Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques. Third Edition. Molecular Devices.

12. **Purves, R.D.** 1981. Microelectrode Methods for Intracellular Recording and iontophoresis. London: Academic Press.
13. **Hille, B.** 2001. Ion channels of excitable membranes. Sunderland Massachusetts USA. Third Edition: Sinauer Associates, Inc.
14. **Catterall WA.** 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 20:15-43.
15. **Patockaa, J; Stredab, L.** 2002. Brief review of natural nonprotein neurotoxins. *ASA Newslett*, 89, 16–24.
16. **Haemmerle, H., Egert, U., Mohr, A. and Nisch, W.** 1994. Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays, *Biosensors & Bioelectronic* 9: 691-696.
17. **Yasuhiko Jimbo, Nahoko Kasai, Keiichi Torimitsu, Takashi Tateno, and Hugo P.C. Robinson.** 2003. A System for MEA-Based Multisite Stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 50, No. 2, February.
18. **Morin, F.O., Takamura, Y. and Tamiya, E.,** 2005 Jan. Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 100, Issue 2.
19. **Wagenaar, Daniel A., Pine Jerome, Potter Steve M.** 2004. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods* 138, 27-37.
20. **E Claverol-Tinturé, M Ghirardi, F Fiumara, X Rosell, J Cabestany,** Jun 2005. Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. *Journal of Neural Engineering*. 2 L1–L7.

21. **Marty, A., Neher, E.** 1995. Tight-Seal Whole Cell Recording, in Single-Channel Recording. New York City, USA: Second Edition, Springer Science, 31-51.
22. **Molnar, P., Hickman, J.J.** 2007. Patch-Clamp Methods and Protocols. New Jersey USA: Humana Press Inc.
23. **Binnig, G. C. F. Quate & Gerber Ch.** 1986. Atomic Force Microscopy. Physical Review Letters, 56(9):930-933.
24. **Morris V.J., Kirby A.R. & Cuning A.P.** 1999, Atomic Force Microscopy for Biologists. Imperial College Press.
25. **Braga Pier Carlo and Ricci Davide.** 2004. Methods in Molecular Biology. Volume 242, Atomic Force Microscopy, Biomedical Methods and Applications. Humana Press. Totowa, New Jersey.
26. **Bhanu P Jena and Hörber Heinrich J.K.** 2002. Methods in Cell Biology. Volume 68, Atomic Force Microscopy in Cell Biology. Academic Press. U.S.A.
27. **Giessibl, F.J.,** 2005 May. AFM's path to atomic resolution, May 2005, Materials Today. Vol. 8, Issue 5. Pages 32-41.
28. **Silva Gabriel A.** 2006 Jan. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. Nature Rev. Neurosci. Vol 7, 65-74.
29. **D. Álvaro San Paulo Hernando.** 1997, Dinámica de la Microscopía de Fuerzas con modulación de amplitud: descripción teórica e implicaciones experimentales. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas. Departamento de Física de la Materia Condensada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

30. **Prater, C. B., Strausser, Y.E.** 1994. Tapping Mode Atomic Force Microscopy. Applications to semiconductors. Digital Instruments, California, USA.
31. **Acosta G. Ma. Cristina.** 2005. Estudio de Células del sistema nervioso por microscopía de fuerza atómica. Tesis de Maestría. Directores de tesis: Dr. Nikola Batina y Dra. Eva Ramón Gallegos. ENCB-IPN. México, D.F. México.
32. **Manzano Martínez Juan Carlos.** 2002. Microscopía de Fuerzas Electroestáticas, EFM. Proyecto Terminal en Ingeniería Física. División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco. México, D.F.
33. **Weaver, J. M. R., Wickramasinghe, HK.** 1991. Semiconductor characterization by Scanning Force Microscopy surface photovoltage microscopy. J. Vac. Sci. Technol., B); 1562.
34. **Púrpura V, Haydo P. G, Sakaguchi D. S. and Henderson E.** 1993 Atomic force microscopy and manipulation of living glial cells. J. Vac. Sci. Technol. A. 11(4), Jul/Aug.
35. **Parpura Vladimir, Haydon Philip G and Henderson Eric.** 1993. Three-dimensional imaging of living neurons and glia with atomic force microscopy. Journal of Cell Science 104, 427-432.
36. **Shin Nagayama, Takuro Tojima, Mayumi Morimoto, Shigeo Sasaki, Kazushige Kawabata, Tatsuo Ushiki, Kazuhiro Abe and Etsuro Ito.** 1997. Practical Scan Speed in Atomic Force Microscopy for Live Neurons in a Physiological Solution. Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 36, 3877-3880.
37. **Takuro Tojima Dai Hatakeyama, Yukako Yamame, Kazushige Kawabata, Tatsuo Ushiki, Shigeaki Ogura, Kazuhiro Abe and Etsuro Ito.** 1998.

- Comparative Atomic Force and Scanning Electron Microscopy for Fine Structural Images of Nerve Cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* Vol. 37. 3855-3859.
38. **Yukako Yamame, Dai Hatakeyama, Takuro Tojima, Kazushige Kawabata, Tatsuo Ushiki, Shigeaki Ogura, Kazuhiro Abe and Etsuro Ito.** 1998. Fine Surface Images That Reflect Cytoskeletal Structures in Cultured Glial Cells by Atomic Force Microscopy. *Jpn. J. Appl. Phys.* Vol. 37. 3849-3854.
39. **Eshrich R., Kumar G.L. Keil T.A. and Guckenberger R.** 1998. Atomic-force microscopy on the olfactory dendrites of the silkmoths *Antheraea polyphemus* and *A. pernyi*. *Cell Tissue Res.* 294:179-185.
40. **Hatsuki Shiga, Yukako Yamane, Etsuro Ito, Kazuhiro Abe, Kazushige Kawabata and Hisashi Haga.** 2000. Mechanical Properties of Membrane Surface of Cultured Astrocyte Reveled by Atomic Force Microscopy. *Jpn.J. Appl. Phys.* Vol. 39, 3711-3716.
41. **Fan Y.W., Cui F.Z., Chen L.N., Zhai Y., Xu Q.Y., Lee I-S.** 2001. Adhesion of neural cells on silicon wafer with nano-topographic surface. *Applied Surface Science*, 187, 313-318  
**Takuro Tojima and Etsuro Ito.** 2004. Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. *Progress in Neurobiology* 72, 183-193.
42. **Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K.** 2003. Nanotechnology for neuronal ion channels. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* 74:1466-1475.
43. **McNally H. A, Borgens R. B.** 2004 Mar. Three-dimensional imaging of living and dying neurons with atomic force microscopy. *J Neurocytol.* 33(2):251-8.

44. **Moreno-Herrero F, Pérez M, Baro AM, Avila J.** 2004 Jan. Characterization by atomic force microscopy of Alzheimer paired helical filaments under physiological conditions. *Biophys J.* 86(1 Pt 1):517-25.
45. **McNally HA, Rajwa B, Sturgis J, Robinson JP.** 2005. Comparative three-dimensional imaging of living neurons with confocal and atomic force microscopy. *J Neurosci Methods.* 142(2):177-84.
46. **Shenai M. B, Putschakayala K. G, Hessler J. A, Orr B. G, Banaszak Holl M. M, Baker Jr.** 2004 Jun. A novel MEA/AFM platform for measurement of real-time, nanometric morphological alterations of electrically stimulated neuroblastoma cells. *IEEE Trans Nanobioscience.* 3(2):111-7.
47. **Patolsky F, Timbo B. P., Yu G, Fang Y, Greytak A.B., Zheng G. Lieber C.M.** 2006 august. Detection, Stimulation, and Inhibition of Neuronal Signals with High-Density Nanowire Transistor Arrays. 313:1100-1104.
48. **Fromherz P. 2003.** Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells, and Brain. In: *Nanoelectronics and Information Technology*, Wiley-VCH, 781-810. Berlin, Alemania.
49. **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
50. **Doerr, T., Denger, R., & Trautwein, W.** (1989). Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp. *Pflfigers Arch*, 413(6), 599–603.



51. **Chen-Izu, Y., Izu, L. T., Nanasi, P. P., & Banyasz, T.** (2012). From Action Potential-Clamp to “OnionPeeling” Technique-Recording of Ionic Currents under Physiological Conditions. In F. S. Kaneez (Ed.), *Patch Clamp Technique (First Edit*, pp. 143–162).
52. **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.
53. **Lemon R.** 1984. *Methods for neural recording in conscious animals*, Oxford: IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences.
54. **Lin, S.P., Chen, J.J.J., Liao, J.D., Tzeng, S.F.** 2008. Characterization of surface modification on microelectrode arrays for in vitro cell culture. *Biomed Microdevices* 10, 99-111.
55. **Hai, A., Dormann, A., Shappir, J., Yitzchaik, S., Bartic, C., Borghs, G., Langedijk, J. P.M., Spira, M.E.** 2009. Spine-shaped gold protrusions improve the adherence and electrical coupling of neurons with the surface of micro-electronic devices. *J. R. Soc. Interface* 6, 1153–65.
56. **Fertig, N., Blick, R.H., Behrends, J.C.** 2002. Whole Cell patch clamp recording performed on a planar glass chip. *Biophysical Journal* 82, 3056-62.
57. **Xie, C., Lin, Z., Hanson, L., Cui, Y., Cui, B.** 2012. Intracellular recording of action potentials by nanopillar electroporation. *Nature Nanotechnology* 7, 185–90.
58. **Nam, Y., Chang, J.C., Wheeler, B.C., Brewer, G.J.** 2004. Gold-coated microelectrode array with thiol linked self-assembled monolayers for engineering neuronal cultures. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 51(1), 158-65.

59. **Heller, D.A., Garga, V., Kelleher, K.J., Lee, T.C., Mahbubani, S., Sigworth, L.A., Lee, T.R., Rea, M.A.** 2005. Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide-coated gold surfaces. *Biomaterials* 26, 883–9.
60. **Brunetti, V., Maiorano, G., Rizzello, L., Sorce, B., Sabella, S., Cingolani, R., Pompa, P. P.** 2010. Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (14), 6264-9.
61. **Mrksich, M., Chen, C.S., Xia, Y., Dike, L.E., Ingber, D.E., Whitesides, G.M.** 1996. Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10775-8.
62. **Romanova, E.V., Oxley, S.P., Rubakhin, S.S., Bohn, P.W., Sweedler, J.V.** 2006. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold modulate electrophysiological parameters and cellular morphology of cultured neurons. *Biomaterials* 27, 1665-9.
63. **Soussou, W.V., Yoon, G.J., Brinton, R.D., Berger, T.W.** 2007. Neuronal network morphology and electrophysiology of hippocampal neurons cultured on surface-treated multielectrode arrays. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 54(7), 1309-20.
64. **Coletti, D., Scaramuzzo, F.A., Montemiglio, L.C., Pristerá, A., Teodori, L., Adamo, S., Barteri, M.** 2009. Culture of skeletal muscle cells in unprecedented proximity to a gold surface. *J Biomed Mater Res Part A* 91(2), 370-7.
65. **Yoon, S.H., Mofrad, M.R.K.** 2011. Cell adhesion and detachment on gold surfaces modified with a thiol-functionalized RGD peptide. *Biomaterials* 32, 7286-96.
66. **Staii, C., Viesselmann, C., Ballweg, J., Shi, L., Liu, G.Y., Williams, J.C., Dent, E.W., Coppersmith, S.N., Eriksson, M.A.** 2009. Positioning and guidance of

neurons on gold surfaces by directed assembly of proteins using atomic force microscopy. *Biomaterials* 30, 3397-04.

67. **McAdams, E.T., Jossinet, J., Subramanian, R., McCauley, R.G.E.** 2006. Characterization of gold electrodes in phosphate buffered saline solution by impedance and noise measurements for biological applications. Proceedings of the 28th IEEE SaB05.2 EMBS Annual International Conference New York City.
68. **Morales, R.I., Seseña, R.A., Acosta, G.M.C., Batina, N., Godínez, F.R.** 2016. Simultaneous recording of the action potential and its whole-cell associated ion current on NG108-15 cells cultured over a MWCNT electrode. *Measurement Science and Technology*, 27(8), 1-15.
69. **Banyasz, T., Horvath, B., Jiang, Z., Izu, L.T., Chen-Izu, Y.** 2011. Sequential dissection of multiple ionic currents in single cardiac myocytes under action potential clamp. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50, 578-81.
70. **Barra, P.F.A.** 1996. Ionic currents during the action potential in the molluscan neurone with the self-clamp technique. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 113 (2), 185–9.
71. **Bean, B.P.** 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews, Neuroscience* 8, 451-65.
72. **Berecki, G., Zegers, J.G., Verkerk, A.O., Bhuiyan, Z.A., De Jonge, B., Veldkamp, M.W., Wilders, R., van Ginneken, A.C.G.** 2005. HERG Channel (Dys)function Revealed by Dynamic Action Potential Clamp Technique. *Biophysical Journal* 88, 566-78.

73. **Doerr, Th., Denger, R., Doerr, A., Trautwein, W.** 1990. Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea pig studied with action potential clamp. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 416, 230-7.
74. **Economo, M.N., Fernández, F.R., White, J.A.** 2010. Dynamic clamp: alteration of response properties and creation of virtual realities in neurophysiology. *Journal of Neuroscience*. 30(7), 2407-13.
75. **Nowotny, T., Szucs, A., Pinto, R.D., Selverston, A.I.** 2006. StdpC: A modern dynamic clamp. *Journal of Neuroscience Methods* 158, 287-99.
76. **Wilders, R.** 2006. Dynamic clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology. *Journal of Physiology* 576, 349–59.
77. **Dessi F., Pollard H., Moreau J., Ben-Ari Y., and Charriaut-Marlangue C.,** 1995. Cytosine Arabinoside Induces Apoptosis in Cerebellar Neurons in Culture. *J. Neurochem.*, Vol. 64, No. 5.
78. **Freshney Ian R.** 1994. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique.* 4th Wiley-Liss.
79. **Greene L. A, Tischler A. S.** 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73:2424–2428.
80. **Kimhi Y, Palfrey C, Spector I, Barak Y, Littauer U. Z.** 1976. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73:462–6.

## URL'S CONSULTADAS

**URL 1.-** Microelectrode Arrays (MEA), Manual de uso. Multi-Channel Systems desarrolla instrumentos útiles en el campo de la electrofisiología que pueden ser utilizados por diversos grupos de investigación, así como, en la industria farmacéutica. Se encuentran aplicaciones sobre diversos tipos de microelectrodos, vínculos para consultar su manejo, también se encuentra información sobre congresos y reuniones con respecto a esta área.

<http://multichannelsystems.com>

**URL 2.-** Introducción a la microscopía de fuerza atómica. Información sobre el principio y funcionamiento de AFM y STM, diversos esquemas que simplifican la comprensión del tema, amplios vínculos. Página del Instituto de Ciencias Weizmann.

[http://www.weizmann.ac.il/Chemical\\_Research\\_Support/surflab/peter/afmworks/index.html](http://www.weizmann.ac.il/Chemical_Research_Support/surflab/peter/afmworks/index.html)



Received:  
10 October 2017  
Revised:  
28 December 2017  
Accepted:  
16 February 2018

Cite as:  
Ma. Cristina Acosta-García,  
Israel Morales-Reyes,  
Anabel Jiménez-Anguiano,  
Nikola Batina,  
N. P. Castellanos,  
R. Godínez-Fernández.  
Simultaneous recording of  
electrical activity and the  
underlying ionic currents in  
NG108-15 cells cultured on  
gold substrate.  
Heliyon 4 (2018) e00550.  
doi: 10.1016/j.heliyon.2018.  
e00550



# Simultaneous recording of electrical activity and the underlying ionic currents in NG108-15 cells cultured on gold substrate

Ma. Cristina Acosta-García<sup>a,b</sup>, Israel Morales-Reyes<sup>c,d</sup>, Anabel Jiménez-Anguiano<sup>b</sup>, Nikola Batina<sup>c</sup>, N. P. Castellanos<sup>d</sup>, R. Godínez-Fernández<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Biología Experimental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City, Mexico

<sup>c</sup> Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City, Mexico

<sup>d</sup> Laboratorio de Biofísica, Departamento de Ingeniería eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City, Mexico

\* Corresponding author.

E-mail address: [gfrj@xanum.uam.mx](mailto:gfrj@xanum.uam.mx) (R. Godínez-Fernández).

## Abstract

This paper shows the simultaneous recording of electrical activity and the underlying ionic currents by using a gold substrate to culture NG108-15 cells. Cells grown on two different substrates (plastic Petri dishes and gold substrates) were characterized quantitatively through scanning electron microscopy (SEM) as well as qualitatively by optical and atomic force microscopy (AFM). No significant differences were observed between the surface area of cells cultured on gold substrates and Petri dishes, as indicated by measurements performed on SEM images. We also evaluated the electrophysiological compatibility of the cells through standard patch-clamp experiments by analyzing features such as the resting potential, membrane resistance, ionic currents, etc. Cells grown on both

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00550>

2405-8440/© 2018 The Author. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

substrates showed no significant differences in their dependency on voltage, as well as in the magnitude of the Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> current density; however, cells cultured on the gold substrate showed a lower membrane capacitance when compared to those grown on Petri dishes. By using two separate patch-clamp amplifiers, we were able to record the membrane current with the conventional patch-clamp technique and through the gold substrate simultaneously. Furthermore, the proposed technique allowed us to obtain simultaneous recordings of the electrical activity (such as action potentials firing) and the underlying membrane ionic currents. The excellent conductivity of gold makes it possible to overcome important difficulties found in conventional electrophysiological experiments such as those presented by the resistance of the electrolytic bath solution. We conclude that the technique here presented constitutes a solution to the problem of the simultaneous recording of electrical activity and the underlying ionic currents, which for decades, had been solved only partially.

Keywords: Biophysics, Cell biology

## 1. Introduction

The use of biomaterials has become increasingly important for the design of new medical devices, where it is extremely important to have a deep understanding of both its constitution and properties. In this regard, biocompatibility is a key aspect that should be always addressed. One of the materials recently proposed as a substrate for cell culturing is gold. In fact, several excitable cells have been successfully cultured on gold electrodes (Nam et al., 2004; Heller et al., 2005; Brunetti et al., 2010; Mrksich et al., 1996; Romanova et al., 2006; Soussou et al., 2007; Coletti et al., 2009; Yoon and Mofrad, 2011). However, to our knowledge, a systematical study of the effects of gold on the electrical properties of cells as well as a detailed study of its electrophysiological biocompatibility are still missing. In spite of this, there are some good reasons for using gold as a substrate: it is a noble metal that does not readily react with salts and molecules found in physiological solutions; it does not react with cellular material and it is a biocompatible material. Moreover, as has been shown in recent studies, it possesses interesting features that make it suitable for atomic force microscopy (AFM) studies of the morphological properties of cells at a molecular level (flat gold substrate Au(111)) (Brunetti et al., 2010; Staii et al., 2009; Acosta-García, 2005).

*In vitro* extracellular recording electrodes have been developed for over 30 years in order to study the electrophysiological processes occurring in both isolated and coupled excitable cells. This has led to a better understanding of the relationship between their electrical behavior and function, which in turn has allowed us to elucidate possible applications in other fields such as pharmacology. In recent years, there

have been important efforts aiming to culture excitable cells on substrates containing metal tracks (biochips, microelectrode arrays) in order to perform extracellular recordings of their electrical signals. Gold, in its pure or modified state was among the most used metals in these experiments (Nam et al., 2004; Heller et al., 2005; Brunetti et al., 2010; Mrksich et al., 1996; Romanova et al., 2006; Soussou et al., 2007; Coletti et al., 2009; Yoon and Mofrad, 2011).

In general, cell cultures are grown on suitable substrates to ensure proper adhesion and cell proliferation. Normally, gold tracks are added to the recording electrodes to measure the electrophysiological behavior of cells (Lin et al., 2008). A common variation of this technique consists in using gold spot electrodes instead of tracks. For this purpose, gold hemispheres have been designed to increase the contact surface between the recording electrode and the cell membrane (Hai et al., 2009). These techniques have allowed both extracellular and intracellular recordings of the electrical signals and have shown promising results (Fertig et al., 2002; Xie et al., 2012).

In summary, gold has proven to be an excellent electrical conductor for the recording of the electrical signals of cells. Moreover, evidence suggests that it does not have negative effects on cultured cells. Studies performed to discard harmful effects of gold were focused mainly on the morphology of the cells. In most cases, gold substrates were suitable for performing electrophysiological experiments at the cellular level (Nam et al., 2004; Brunetti et al., 2010; Xie et al., 2012; McAdams et al., 2006; Heller et al., 2005). For these reasons, a study of the possible effects of gold on the electrical properties of excitable cells is needed.

Voltage-clamp and current-clamp techniques have been extremely valuable for the electrophysiological characterization of excitable cells (Hille, 2001; Marty and Neher, 1995; Purves, 1981). However, these techniques are known to have several important limitations that have been the subject of intensive research for decades. For instance, when studying cells with large membrane currents ( $I_m$ ) using the current-clamp technique, a voltage drop caused by  $I_m$  itself and the resistance originated by the electrolytic bath solution (in which cells are immersed during the experiments), introduce an undesirable error in the measurement of the membrane potential ( $V_m$ ) (Purves, 1981; *The Axon Guide*, 2012). This resistance is equivalent to an additional resistor in series between the cell and ground, which often results in an additional source of error when measuring  $V_m$ , since the voltage measured in the current-clamp mode is, in fact, the sum of  $V_m$  and the voltage drop across the resistance of the electrolytic bath. This problem is accentuated when the membrane current ( $I_m$ ) increases significantly because it also increases the voltage drop across the bath solution (Purves, 1981; *The Axon Guide*, 2012). Another important limitation is that these techniques do not allow us to obtain simultaneous high-quality recordings (i.e. with good signal to noise ratio) of the action potentials and the underlying ionic currents (Dietrich et al., 2002; Banyasz et al., 2011; Barra, 1996; Bean, 2007;



Berecki et al., 2005; Doerr et al., 1990; Economo et al., 2010; Nowotny et al., 2006; Molnar and Hickman, 2007; Wilders, 2006). Recently, this limitation was overcome by using carbon nanotubes as a substrate for cell culturing (Morales-Reyes et al., 2016). In this work, we propose that gold substrates can be used instead of carbon nanotubes to perform simultaneous measurements of electrical activity and the underlying membrane currents. In addition, it is important to note that given the excellent conductivity of the gold substrate, it makes possible to eliminate the resistance produced by the electrolytic bath solution in electrophysiological studies.

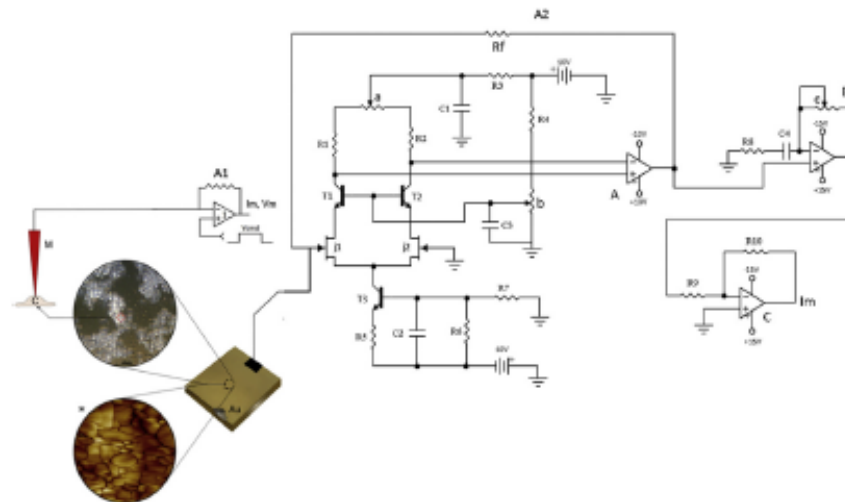
This work is structured as follows. First, we investigated if the gold substrates used are suitable surfaces for cell culturing. Next, we evaluated the electrical response of the cells grown on the gold substrate by analyzing the voltage-dependent  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}^+}$ ) and  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{K}^+}$ ) currents, which are mainly responsible for the generation of action potentials. Then, we use the gold substrate as an electrode by connecting it to virtual ground, which ensures a zero voltage in the immediate vicinity of the cell membrane, thus preventing the flow of ions to ground through the bath solution, which introduces an error in the measurement of  $V_m$  in electrophysiological experiments. Finally, we show how the use of this electrode allowed us to perform simultaneous recordings of the electrical activity and the underlying ionic currents, which represents an important improvement over the standard patch-clamp and other similar techniques.

## 2. Material and methods

### 2.1. Gold substrate (Au(111))

Gold substrate (Gold Arrandee TM, Au(111)) was used for culturing NG108-15 cells (Fig. 1\*). The substrate area was about  $1 \text{ cm}^2$  and 0.8 mm thick. It was cleaned by immersion in pure water (milliQ) and subjected to ultrasonic treatment for 5 minutes in absolute ethanol. Gold substrate was electrically connected to a silver wire (AGT0510 WPI USA) of 30 mm length with carbon conductive paint (Pelco 16053, Ted Pella Inc., USA) to build the electrodes.

The system was allowed to dry at room temperature for approximately 12 hrs. Electrical continuity between the silver wire and the gold substrate was verified and measured before usage. In order to achieve better mechanical support and electrical isolation, the connections and the silver wire were coated with Sylgard (SYLG184 WPI, USA). Then, it was placed on an electrical grid at a temperature of 60–80 °C for 5 minutes to accelerate the curing process. The substrate was sterilized (before being used for cell culturing) by autoclaving at 15 lbs., 140 °C for 20 minutes and then exposed to ultraviolet light for 5 minutes.



**Fig. 1.** Diagram of the experimental setup showing the two patch-clamp systems and the cells grown on the gold substrate. (C) Indicates the cell under study. Amplifier A1 was used to perform the standard voltage or current clamp experiments using a micropipette (M) while Amplifier A2 is used to maintain the gold substrate at virtual ground. (R) resistances, (C) capacitances, (T) 2N4401 transistor, (J) U430 FET transistor, (A, B, C) LF356 Op-Amp., (Rf) Current-voltage converter feedback resistance (100 M $\Omega$ ), ( $I_m$ ) output current. Potentiometers in A: (a) is used to adjust the bias current to zero, (b) is used to improve the signal to noise ratio. Potentiometer (c) in B does the frequency compensation (increase the bandwidth in the current-voltage converter). \*Gold substrate with an area of 1 cm<sup>2</sup>. Structural details of a of 200  $\mu\text{m}^2$  surface obtained by atomic force microscopy are shown (zoom). It consists of gold grains with a diameter of about 1–2  $\mu\text{m}$ . Note that the grain surface is atomically flat.

## 2.2. Cell culture

The NG108-15 cell line was acquired from ATCC (Lot No. 58078652). NG108-15 cells were grown in monolayer cultures on plastic Petri dishes containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, cat. 21063029) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS Gibco, cat No. 160000), 1% L-glutamine, 0.1 mM hypoxanthine, 400 nm aminopterin, 0.016 mM thymidine and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO, cat. No. 15140) in a humidified incubator equilibrated with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C. Cells were subcultured 15–20 times before grown in both plastic Petri dishes (control) and on the gold substrates.

## 2.3. Cell culture on the gold substrate

The gold substrate was placed in a plastic Petri dish (Corning 35 mm). Supplemented DMEM culture medium was added until the substrate surface was covered. The substrate was then maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air for 2 hours before seeding. NG108-15 cells were placed onto the gold substrate at a density of  $1 \times 10^5$  cells/ml and afterwards were incubated for 4 days. The medium was replaced every 48 hours until the beginning of the electrophysiological experiments.

## 2.4. Atomic force microscopy (AFM)

Studies of cell morphology were performed with atomic force microscopy (AFM, Nanoscope III Multimode SPM, Digital Instruments, Santa Barbara, California), in tapping mode, with AFM tips model TESP (f silicon: 325–382 kHz, k: 20–80 N/m, Veeco), at a scan rate of 0.5 Hz.

## 2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM Micrographs were taken with a scanning electron microscope (JEOL JSM-5900 LV). All the samples were fixed in 5% glutaraldehyde for 2 hrs and dehydrated in 20–100% ethanol. After drying using the critical point dryer, the samples were coated with gold. The SEM was operated at 15 kV accelerating voltage, with scattered electrons at a working distance of 25 mm. SEM images (500X amplification) were digitally processed to quantify the surface area of the cells cultured over both the gold substrates and petri dishes. Surface area was computed by segmenting the cells using a threshold value; then the noise was removed with an erosion procedure, followed by a closing process applied in order to fill the holes in the region of interest. Incomplete cells at the border regions of the images were manually removed.

## 2.6. Electrophysiology measurements

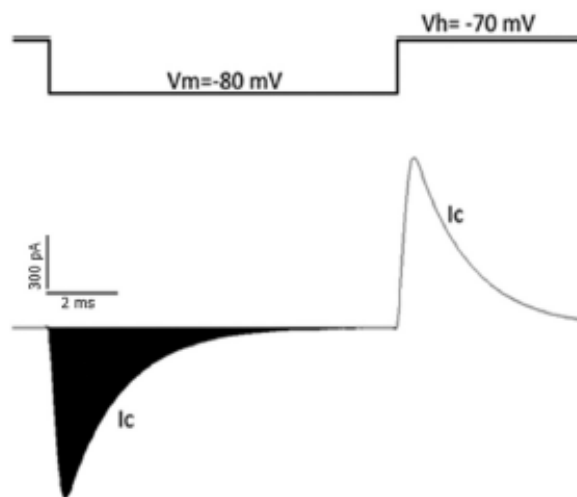
The electrical properties of the NG108-15 cells cultured in plastic Petri dishes and on the gold substrate were evaluated. An Axopatch 200A (Axon Instruments) amplifier in the whole-cell and current-clamp configurations was used to measure  $V_m$  and  $I_m$ , respectively (Fig. 1). pClamp software (Axon Instruments) was used for stimulation control and data acquisition. Signals were acquired through a Digidata 1200 converter card (Molecular Devices, CA). Signal processing was performed in Clampfit 10.2 (Molecular Devices, CA) and GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The sampling rate for the INa and IK was 20.4 kHz and 2.56 kHz respectively.

Pipettes (2–4 M $\Omega$ ) were filled with intracellular solution containing (in mM) 10 NaCl, 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 11 EGTA and 10 HEPES adjusted to pH 7.2 with KOH. The bath electrolytic solution contained (in mM) 151.5 NaCl, 4.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES (pH adjusted to 7.4 with NaOH). All reagents were obtained from Sigma Aldrich. Solutions were filtered using 0.2  $\mu$ m filters. A comparative analysis of the resting potential ( $V_r$ ), input resistance ( $R_i$ ), membrane capacitance ( $C_m$ ) and voltage-dependent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents was performed in NG108-15 cells grown on plastic Petri dishes and on gold substrate.  $V_r$  was registered in current clamp mode with  $I = 0$ .

Membrane capacitance was obtained using the voltage step method as described elsewhere (Lollike, 1999; Gentet et al., 2000). The capacitive current through the cell

membrane can be expressed as  $I_c = C_m(dV_m/dt)$ . Integrating both sides of this equation we obtain  $\int I_c dt = C_m \int dV_m = C_m(V_{m2} - V_{m1})$ , wherein this case  $V_{m1}$  is the holding potential and  $V_{m2}$  is the voltage pulse applied to the cell. We used a small hyperpolarizing pulse ( $V_{m2} = -10$  mV) in order to prevent the activation of the voltage-gated ionic currents and, as a result, to only obtain the transient capacitive currents (along with a linear ionic current that was completely eliminated). Once the transient capacitive current was obtained (see Fig. 2), the capacitance of the cell membrane (typically in the pF range) was determined as  $C_m = \int I_c dt / (V_{m2} - V_{m1})$ , where  $\int I_c dt$  is the area under the curve shown in Fig. 2. Ionic currents were normalized to cell capacitance in order to obtain the corresponding current densities, which allowed us to compare the ionic currents produced by the NG108-15 cells grown on the different substrates, regardless of the size of the cells. In these experiments, the bath solution was kept grounded. Results are presented as means  $\pm$  SD. Student t-test was used to examine significant differences between groups means.

The experimental arrangement described above was modified for a second series of experiments in which  $I_m$  was measured at all times regardless the patch-clamp configuration used (voltage or current-clamp). For this purpose, a second voltage-clamp system was constructed following the specifications of Hamill O. P. et al. (Hamill et al., 1981; Sigworth, 2009). Special care was always taken to ensure that the bias current and the offset voltage were set to zero (Fig. 1). Thus,  $I_m$  was measured through the second voltage-clamp system regardless the settings used in the first amplifier (voltage or current-clamp mode). As shown in Fig. 1, Amplifier A1 was used in the whole-cell mode for voltage-clamp experiments where  $V_{cmd}$  indicates the voltage pulses applied to the cell and  $I_m$  is, in this case, the output of the Amplifier A1. When Amplifier A1 was configured in the current-clamp mode,  $V_{cmd}$  in Fig. 1 indicates the



**Fig. 2.** The area under the curve (shaded) of the transient capacitive current ( $I_c$ ) of the cell membrane of a NG108-15 cell elicited by a voltage pulse of  $-10$  mV from a holding potential ( $V_h$ ) of  $-70$  mV.

current pulses applied to the cell while  $V_m$  would be the output of Amplifier A1. On the other hand, Amplifier A2 was used both to maintain the gold substrate in virtual ground and to measure  $I_m$  simultaneously. It is worth mentioning that this is possible because, in order to keep the gold substrate in virtual ground, Amplifier A2 injects a current of identical magnitude and temporal course of  $I_m$  but opposite in sign. Amplifier A1 was connected to the recording micropipette (M) while Amplifier A2 was connected to the gold substrate through a silver wire electrically isolated from the bath solution. This experimental design allowed us to measure  $I_m$  or  $V_m$  during voltage or current-clamp experiments through Amplifier A1, respectively. In addition, it was possible to simultaneously measure the course of  $I_m$  through Amplifier A2. Sampling rate for the simultaneous recording of  $V_m$  and  $I_m$  was 24.4 kHz.

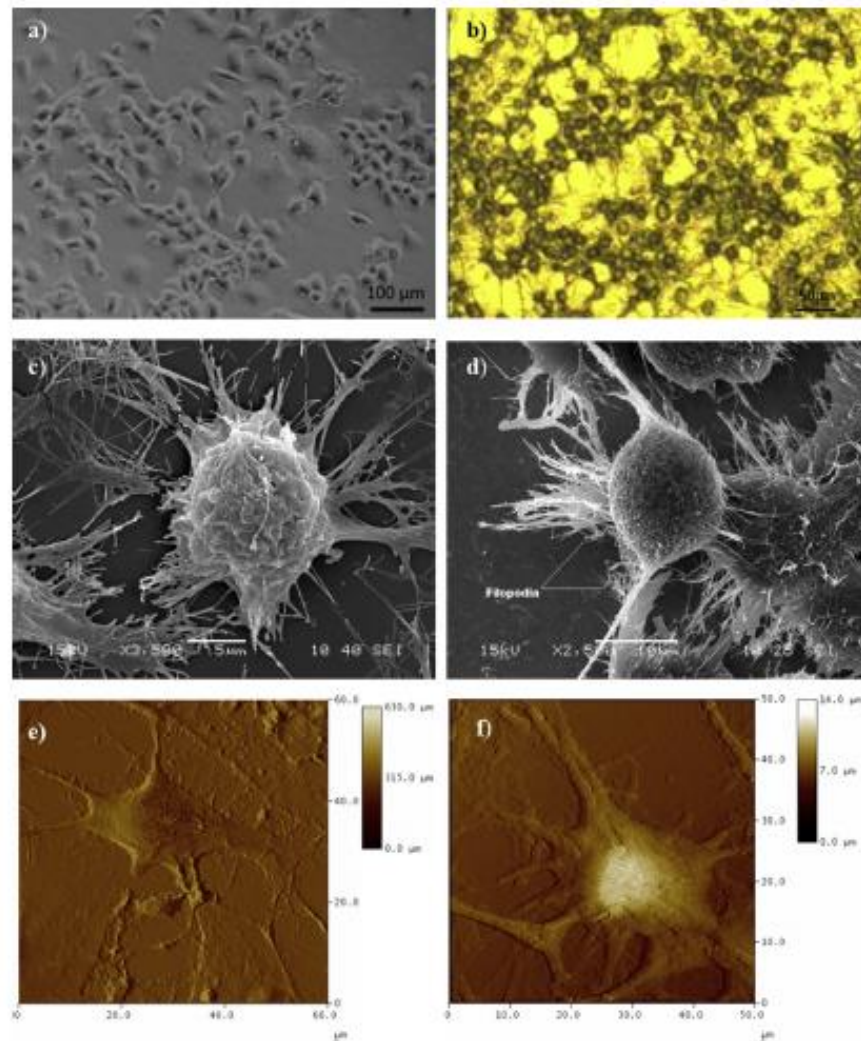
### 3. Results

#### 3.1. Characterization of the cell culture

To verify that gold is a suitable substrate for culturing NG108-15 cells, we evaluated the growth and the quality of the cellular material at different phases and conditions by monitoring the morphology of the cells (Fig. 3). The progress of cell growth in plastic Petri dishes and on gold substrate was monitored daily by optical microscopy (reflective mode, Fig. 3a and b, respectively). In particular, it is important to mention that cells cultured on gold substrate showed good adhesion which allowed them to proliferate to such extent that 100% confluence was reached in just 5 days. Qualitatively, no significant morphological differences between cells cultured in plastic Petri dishes and on gold substrate were observed. The size of the cells ranged between 16 to 25  $\mu\text{m}$ . Well-adhered cells and dendrites growth were observed in both cultures (Fig. 3c,d,e,f). In addition, these cells showed regular and typical cell bodies which is consistent with previous reports about the morphological characteristics of the NG108-15 cells (Tojima et al., 1998, 2000a, 2000b). Areas measured from SEM images (500X) of cells cultured on Petri dishes ( $1.1264 \times 10^3 \pm 0.292 \times 10^3 \mu^2$ ,  $n = 112$ ) and gold substrate ( $1.2675 \times 10^3 \pm 0.289 \times 10^3 \mu^2$ ,  $n = 63$ ) did not show significant differences ( $p < 0.05$ ). Overall, these results, obtained by different microscopy techniques, show that morphologically, cultured cells are in good conditions and well adhered to the substrate, which is particularly important to obtain adequate electrophysiological measurements.

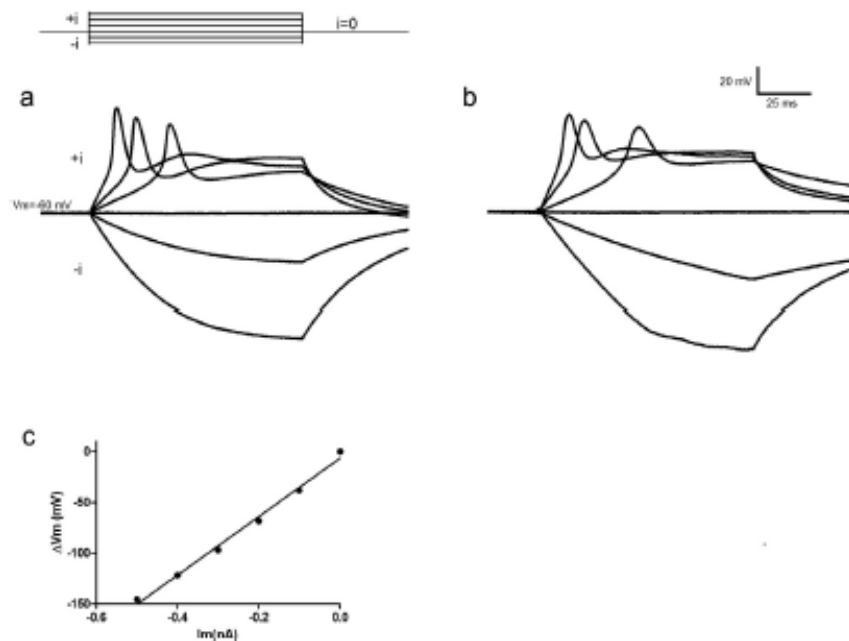
#### 3.2. Comparison of the passive and nonlinear electrical properties of the NG108-15 cells cultured in plastic Petri dishes and on gold substrate

Passive electrical properties of the NG108-15 cells cultured were studied in order to identify the differences between cells grown in plastic Petri dishes and on gold



**Fig. 3.** Images of the NG108-15 cell culture obtained by optical microscopy at 4 days of cultivation in plastic Petri dishes (a) and on gold substrate (b). Morphological details are clearly observed in the SEM micrograph (c–d) and in the AFM image (e–f). Typical bodies, well-adhered cells and dendrites growth were observed in both cultures; the size of the cells ranged between 16 to 25  $\mu\text{m}$ .

substrate. Initially, the resting potential ( $V_r$ ) and input resistance ( $R_i$ ) were analyzed in both substrates.  $V_r$  was measured using Amplifier 1 in current-clamp mode with the bath solution grounded (see Section 2.6). Then, the cell was polarized to  $-60$  mV by the injection of a DC current, where current pulses of different magnitudes were applied to produce changes in the membrane potential ( $\Delta V_m$ ) (Fig. 4a). Voltage-current curves ( $\Delta V_m - I_m$ ) were constructed and fitted by linear regression (Fig. 4c).  $R_i$  was then determined by the slope of the line fitted to the  $\Delta V_m - I_m$  relation. The results obtained are summarized in Table 1. The average value of the  $V_r$  measured from cells cultured on gold substrate was slightly lower in comparison to the value obtained from the cells grown in plastic dishes. In contrast, the average



**Fig. 4.** Current pulses applied to the cell and the associated changes in  $V_m$ . a) Typical slow membrane potential recording obtained from cells grown on plastic Petri dishes (control). Hyperpolarizing (-i) and depolarizing (+i) current pulses were applied. The hyperpolarizing pulses produced linear changes in  $V_m$  while the depolarizing pulses produced a nonlinear response of  $V_m$ , often triggering the appearance of action potentials. b) The same protocol of current pulses was used for cells grown on gold substrate. In this case, an induced cell threshold depolarization shows a slow depolarizing-repolarizing NG108-15 voltage wave. Cells grown on both Petri dishes and gold substrate displayed slow membrane potentials when depolarizing current pulses were applied. c) The  $\Delta V_m - I_m$  relation was obtained by plotting the asymptotic value of  $V_m$  against the magnitude of the corresponding hyperpolarizing pulses ( $-i = I_m$ ), in the range where  $\Delta V_m$  shows a linear behavior. The  $\Delta V_m - I_m$  relation was then fitted using linear regression to obtain  $R_i$ , which is given by the slope of the fitted line.

value of the  $R_i$  of cells grown on gold substrate was larger than the one obtained in cells cultured in Petri dishes. It should be noted, however, that these differences were not statistically significant ( $p > 0.05$ ), which allows us to conclude that the gold substrate did not affect the  $R_i$  and the  $V_r$  of the cells. On the other hand,  $C_m$  is affected in a very significant way ( $p < 0.01$ ), being lower in the cells cultured on gold. As can be seen in Figs. 3b and 4a, depolarizing current pulses (+i) produced a nonlinear response of the  $V_m$  in cells cultured on both plastic Petri dishes (Fig. 4a) and on gold substrate (Fig. 4b). In addition, it can also be observed that the shape and magnitude of the slow depolarizing-repolarizing NG108-15 voltage wave produced were similar in both cases.

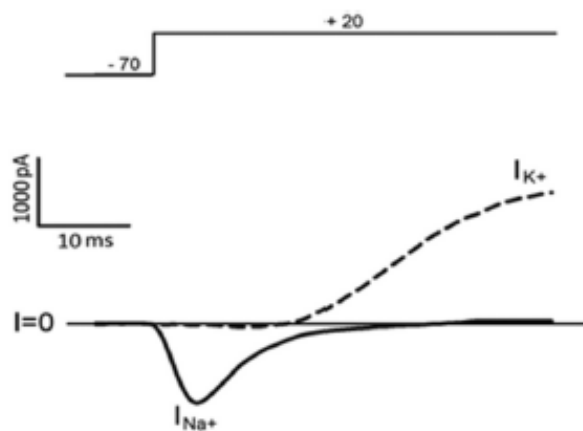
Voltage dependent  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents ( $I_{\text{Na}^+}$  and  $I_{\text{K}^+}$ , respectively) were recorded in cells grown in both plastic Petri dishes and gold substrate using Amplifier A1 in voltage-clamp mode with the bath solution grounded (described in Section 2.6).  $I_{\text{Na}^+}$  and  $I_{\text{K}^+}$  were elicited by 10 and 100 ms depolarizing pulses, respectively. Due to the

**Table 1.** Passive and nonlinear electrical properties of NG108-15 cells cultured on conventional plastic Petri dishes and on gold substrate (\*\*denotes very significant differences  $p < 0.005$ , the rest of the experiments show no significant differences  $p > 0.05$ ).

	Plastic Petri dish	Gold substrate
$V_r$ (mV)	$-30.1 \pm 7.21$ , $n = 18$	$-26.2 \pm 15.5$ , $n = 25$
$R_i$ (M $\Omega$ )	$110.6 \pm 78.57$ , $n = 14$	$201.4 \pm 179.78$ , $n = 20$
$C_m$ (pF)	$119.9 \pm 64.1$ , $n = 10$	$41.6 \pm 22.0$ , $n = 10^{**}$

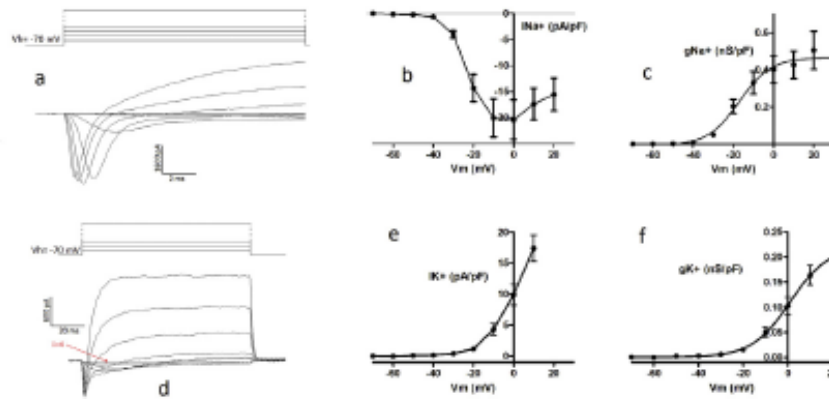
rapid activation of  $I_{Na^+}$  and the slow activation of  $I_{K^+}$ , it was possible to measure the  $Na^+$  peak currents without the need of selective blockade of the  $K^+$  current. Similarly, when the  $K^+$  peak current is reached, the  $Na^+$  current is fully inactivated already, which indicates that the  $K^+$  peak current is not affected by the  $Na^+$  current. This is demonstrated in Fig. 5, where both currents (recorded separately) are shown superimposed ( $Na^+$  solid line and  $K^+$  dashed line). The inward  $Na^+$  current was recorded by replacing  $K^+$  by  $Cs^+$  in the pipette solution in order to block the  $K^+$  current. Similarly, the  $K^+$  current was isolated by adding Tetrodotoxin (600 nM) to the bath solution.

Results of the voltage-clamp experiments performed in cells cultured in Petri dishes are shown in Fig. 6. Negative fast-inactivating currents showing the characteristic behavior of  $Na^+$  currents ( $I_{Na^+}$ ) are displayed in Fig. 6a. The peak  $I_{Na^+} - V_m$  relation (Fig. 6b) was used to determine the maximal  $Na^+$  conductance for each value of



**Fig. 5.** Peak  $Na^+$  and  $K^+$  currents can be recorded without selective blockade of the  $Na^+$  and  $K^+$  currents respectively.  $Na^+$  (solid line) and  $K^+$  (dashed line) currents were elicited separately and are shown superimposed. Both currents were elicited by the voltage protocol showed above. The inward  $Na^+$  current was recorded by replacing  $K^+$  by  $Cs^+$  in the pipette solution in order to block the  $K^+$  current. Similarly, the  $K^+$  current was isolated by adding tetrodotoxin (600 nM) to the bath solution. The numbers above indicate the depolarization of the membrane from a  $V_h = -70$  mV.





**Fig. 6.** Voltage clamp experiments in cells cultured on plastic Petri dishes. a)  $\text{Na}^+$  currents elicited by 10-ms depolarizing pulses ( $-60$  to  $10$  mV) from a holding potential of  $-70$  mV. b)  $I_{\text{Na}^+}$  vs.  $V_m$  curve. c)  $g_{\text{Na}^+}$  vs  $V_m$  curve and the fitted Boltzmann function (smooth curve). d)  $\text{K}^+$  currents evoked by the same protocol used in a) but using 100-ms pulses. e)  $I_{\text{K}^+}$  vs.  $V_m$  curve. f)  $g_{\text{K}^+}$  vs.  $V_m$  curve and the fitted Boltzmann function ( $n = 10$ ). In b, c, e, and f data are presented as mean  $\pm$  SD.

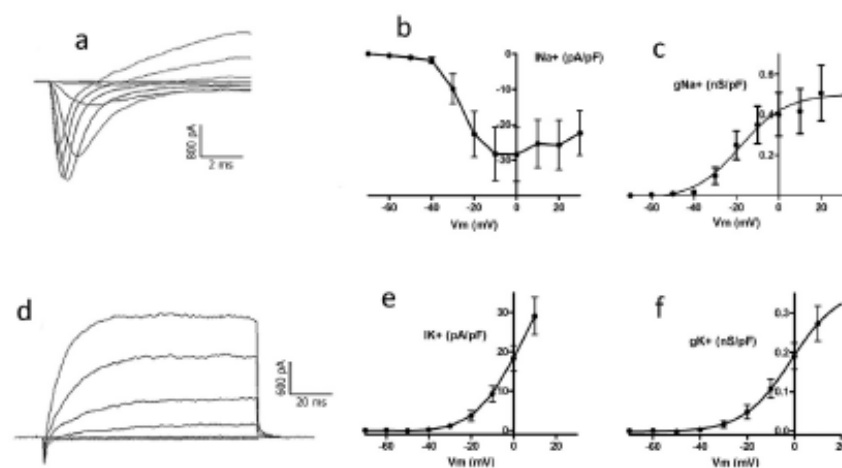
$V_m$  ( $g_{\text{Na}^+} = I_{\text{Na}^+}/(V_m - V_{\text{Na}^+})$ ), where  $V_{\text{Na}^+} = 68$  mV is the reversal potential of  $\text{Na}^+$  (Fig. 6c). A Boltzmann function was fitted to the resulting data points yielding a set of parameters (Table 2) that characterize the  $\text{Na}^+$  current and the  $\text{Na}^+$  ionic channels (Hille, 2001). The same procedure was used to analyze the  $\text{K}^+$  current with a reversal potential  $V_{\text{K}^+} = -86$  mV. However, due to its slower activation process, longer depolarizing pulses (100 ms) were applied (see Section 2.6). It should be noted that, as mentioned above, measurements of  $I_{\text{K}^+}$  were not contaminated by the  $\text{Na}^+$  current since the inactivation process of  $I_{\text{Na}^+}$  is much more rapid than the activation process of  $I_{\text{K}^+}$  (see Fig. 5). In general, we can say that the behavior observed in Fig. 6 is similar to that previously reported in NG108-15 cells by other groups (Huang et al., 2008; Liu et al., 2012; Wu et al., 2012). The same experiments and analyses

**Table 2.** Parameters of the Boltzmann functions ( $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + \exp((V_{50} - V_m) / \text{Slope}))$ ) fitted to the conductance- $V_m$  relations. No significant differences between the cells grown in Petri dishes and on gold substrate were detected in the parameters obtained from the fitting procedure of the conductance- $V_m$  relations of the  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents (no significant differences  $p > 0.05$  for all parameters).

Best-fit values	Control (Petri dishes)		Gold substrate	
	$g_{\text{Na}^+} - V_m$ (n = 10)	$g_{\text{K}^+} - V_m$ (n = 10)	$g_{\text{Na}^+} - V_m$ (n = 10)	$g_{\text{K}^+} - V_m$ (n = 10)
Bottom	0.00	0.00	0.00	0.00
Top	$0.21 \pm 0.14$	$0.26 \pm 0.09$	$0.35 \pm 0.32$	$0.36 \pm 0.19$
$V_{50}$	$-17.60 \pm 4.89$	$-2.40 \pm 1.58$	$-20.75 \pm 4.09$	$-1.80 \pm 8.54$
Slope	$7.52 \pm 2.72$	$7.40 \pm 1.58$	$6.98 \pm 2.30$	$8.90 \pm 2.21$

were done in cells cultured on the gold substrate. The  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents produced by the same voltage-clamp protocol shown in Fig. 7, as well as the corresponding current- $V_m$  and conductance- $V_m$  relations are displayed in Fig. 7. It can be seen that both currents were similar to those observed for cells grown in plastic Petri dishes; that is,  $I_{\text{Na}^+}$  presented both rapid activation and inactivation processes and  $I_{\text{K}^+}$  showed a slow activation and a complete absence of inactivation (compare Figs. 6 and 7). Moreover, the conductance- $V_m$  relations (see Fig. 7c and f), as well as the parameters obtained from the fitting procedure (Table 2), were also similar. It is worth mentioning that to be able to compare the registered currents in cells grown on plastic Petri dishes and on gold substrate, we use the current densities obtained by normalizing the measured current to the cell capacitance (since the cell capacitance is proportional to the cell area). The parameters obtained from the fitting procedure of Boltzmann functions to the conductance- $V_m$  relations were also compared in order to identify possible differences in the electrical response between the cells of both cultures.

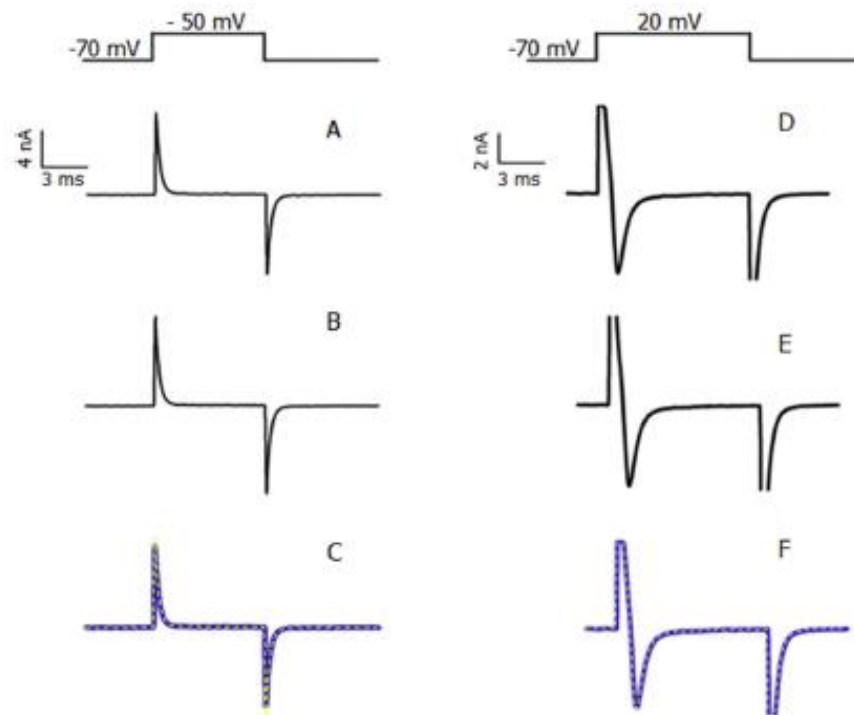
So far, we found no significant differences between the cells cultured on plastic Petri dishes and on gold substrate, although  $C_m$  is in fact affected in a very significant way. In the next section, we show that it is possible to use a gold substrate to perform electrophysiological measurements in NG108-15 cells, allowing us to record action potentials (through the recording pipette) and the underlying ionic currents (recorded through the gold substrate) simultaneously. The relevance of this methodology based on the proposed experimental technique is discussed below.



**Fig. 7.** Voltage-clamp experiments in cells cultured on gold substrate. a)  $\text{Na}^+$  currents elicited by 10 ms depolarizing pulses ( $-60$  to  $10$  mV) from a holding potential of  $-70$  mV. b)  $I_{\text{Na}^+}$  vs.  $V_m$  curve. c)  $g_{\text{Na}^+}$  vs  $V_m$  curve and the fitted Boltzmann function (smooth curve). d)  $\text{K}^+$  currents evoked by the same protocol used in a) but using 100 ms pulses. e)  $I_{\text{K}^+}$  vs.  $V_m$  curve. f)  $g_{\text{K}^+}$  vs.  $V_m$  curve and the fitted Boltzmann function ( $n = 10$ ). In b, c, e, and f data are presented as mean  $\pm$  SD.

### 3.3. Recording the membrane current through a second voltage-clamp system

All the previous current and voltage-clamp experiments were carried out using the standard electrophysiological techniques; that is, with the recording micropipette connected to Amplifier 1 and the bath solution grounded. From now on, electrophysiological measurements were performed using a modified technique consisting in the establishment setting the gold substrate as virtual ground while measuring the ion currents through the second voltage-clamp system (Amplifier A2, Fig. 1). Initially, voltage stimuli were applied through Amplifier 1 configured in the whole-cell mode. Brief (10 ms) subthreshold voltage pulses were applied (from a holding potential of  $-70$  mV to  $-50$  mV) in order to observe only the leakage and fast capacitive currents. This is shown in Fig. 8A, where the fast-capacitive currents evoked at the beginning and at the end of the voltage pulse can be observed. It should be noted

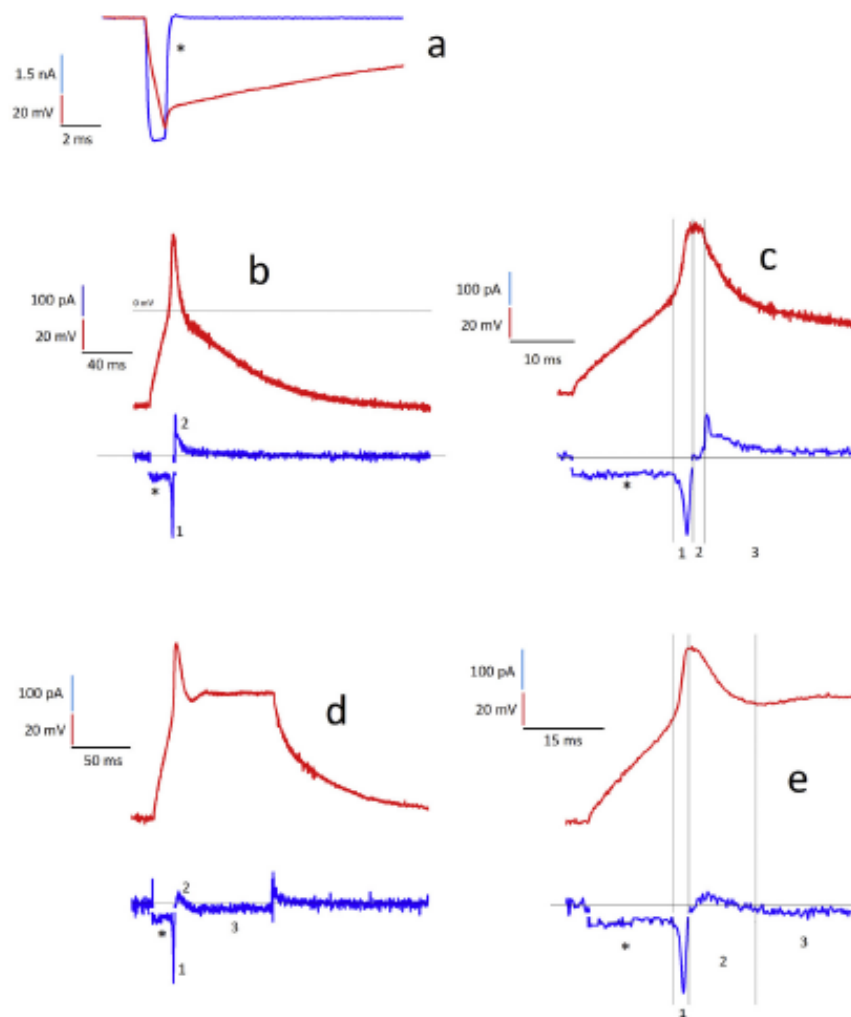


**Fig. 8.** A) Membrane current ( $I_m$ ) evoked by a subthreshold voltage clamp pulse from a holding potential  $V_h = -70$  mV to a membrane voltage of  $-50$  mV. Only capacitive currents were observed as indicated by the transient currents observed at the start and the end of the pulse. The current was registered through the amplifier A1. B) Membrane current simultaneously recorded through the amplifier A2. C) Currents shown in (A) and (B) are displayed superimposed (solid and dotted lines, respectively). D) A greater depolarizing pulses (to 20 mV) was applied to evoke the  $\text{Na}^+$  current ( $I_{\text{Na}^+}$ ). Both capacitive transient currents and the inward  $\text{Na}^+$  current was observed. E) Current measured simultaneously through the amplifier A2. F) Currents measured through Amplifiers A1 (solid) and 2 (dashed line) are shown superimposed. Note that in D), E) and F), the capacitive currents were truncated to highlight the temporal course of  $I_{\text{Na}^+}$ .

that the leakage current was undetectable. The current simultaneously measured through the gold substrate connected to Amplifier 2 is displayed in Fig. 8B. Notice the similarity between the current traces obtained through both amplifiers. This can be clearly appreciated in Fig. 8C where both traces are shown overlapped. Next, a depolarizing pulse of a greater magnitude (to 0 mV from a holding potential of  $-70$  mV) were applied through Amplifier 1 to elicit the voltage-dependent  $\text{Na}^+$  current (Fig. 8D). The current measured simultaneously through Amplifier 2 is also shown in Fig. 8E. The similarity between the two measurements can be clearly observed in Fig. 8F where both current traces are shown superimposed. It is noteworthy that Amplifier 2 faithfully follows the capacitive currents while  $I_{\text{Na}^+}$  is measured with the Amplifier 1. Both are very rapid currents, and the proposed technique allowed us to obtain recordings with a good signal to noise ratio. The same results were obtained when long depolarizing pulse (100 ms) were applied to elicit and record  $I_{\text{K}^+}$  (not shown).

### 3.4. Simultaneous measurements of the membrane potential and the membrane current

By using Amplifier A1 in the current-clamp mode and Amplifier A2 in voltage-clamp mode, while maintaining the gold substrate in virtual ground, we were able to apply current pulses and to measure the membrane potential through Amplifier A1, while at the same time, being able to measure the membrane current through Amplifier A2. Typical recordings of these simultaneous measurements of  $V_m$  and  $I_m$  are shown in Fig. 9. In the experiment shown in Fig. 9a, a negative current pulse (\*) was used (blue line), resulting in the hyperpolarization of the membrane potential as expected (red line). In this particular case, the stimulating current pulse was not capable of triggering the firing of an action potential. On the other hand, when a positive current pulse (\*) was applied (as indicated by the blue line in Fig. 9b), the membrane was depolarized, eventually reaching a threshold value where an action potential was produced (red line). The simultaneous measurement of the membrane current (blue line) shows the positive current pulse (\*) followed by the biphasic response of the membrane currents produced by the action potential. In Fig. 9c, a temporal magnification of 9b is shown, where it is possible to discriminate between the stimulating current pulse and the temporal course of the ionic currents underlying the action potential. In Fig. 9d, a stimulating current pulse of 100 ms was imposed, which allowed us to observe  $I_{\text{K}^+}$  and  $I_{\text{Na}^+}$  added to the stimulus current pulse. In Fig. 9e, where a temporal magnification of Fig. 9d is shown, it is possible to observe the stimulating pulse and the ionic currents underlying the action potential. This biphasic behavior is produced firstly by the inward (negative)  $\text{Na}^+$  current, followed by the outward (positive)  $\text{K}^+$  current. As expected, the depolarization and repolarization phases of the action potential (red line) are associated to the  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents respectively. The fast  $I_{\text{Na}^+}$  that originates the depolarizing phase of the action



**Fig. 9.** Simultaneous measurement of  $I_m$  and  $V_m$ .  $V_m$  recorded through the pipette using Amplifier A1 is shown in red.  $I_m$  (blue line) was registered through the gold substrate using Amplifier A2. The asterisk (\*) indicates the current stimulus applied. a) A negative current pulse ( $-4.9$  nA,  $1$  ms) produced membrane hyperpolarization, preventing the appearance of action potentials or voltage-dependent activation of the ionic currents ( $V_r = -47$  mV). b) A positive current pulse triggered the firing of an action potential. The biphasic signal shown after the stimulating pulse are the currents producing the action potential ( $V_r = -65$  mV). c) is a temporal magnification of b) which allowed us to discriminate between the stimulating pulse and the ionic currents underlying the action potential. d) A positive stimulating current pulse of  $100$  ms where  $I_{K^+}$ ,  $I_{Na^+}$  currents are added to the stimulus current pulse. e) Temporal magnification of d) which allowed us to observe the stimulating pulse and the ionic currents underlying the action potential. Note that the stimulation current were truncated in all traces.

potential shows a typical behavior. On the other hand,  $I_{K^+}$  is only activated transiently, not being maintained during the repolarization phase. These results highlight the advantages of using the methodology here proposed over the conventional techniques, which only enable us to measure the membrane potential and not the underlying membrane currents.

#### 4. Discussion

Images in Fig. 3 show a qualitative characterization of NG108-15 cells grown on the plastic Petri dish and on the gold substrate, where cytoplasmic extensions and regular somas can be observed. It can be seen in the AFM images, the gold substrate does not seem to interfere with the topography nor with the shape and distribution of the cultured cells. Areas measured from SEM images (500X) of cells cultured on Petri dishes and gold substrate did not show significant differences. However, membrane capacitance measurements ( $C_m$ ) indicate that the surface area of cells cultured on gold substrates is significantly lower when compared to that of cells cultured on Petri dishes. This effect could be due to the presence of a higher quantity of small cytoplasmic projections (filopodia) that would be increasing the area of the cells cultured on Petri dishes. In other words, the number of filopodia would be affected by gold but not the soma size, since the soma area showed no significant difference with respect to the cells cultured on Petri dishes. Due to the great variability in sizes of the NG108-15 cells it was necessary to report the results of the currents in terms of their density, where it is presumed that the ion channels are distributed on the cell surface that includes the filopodia (Heckman and Plummer, 2013; Schwab et al., 2012).

When analyzing the passive electrical properties of the cells (i.e.  $R_i$  and  $V_r$ ), we did not find significant differences between the two substrates evaluated. Regarding the production of action potentials, the NG108-15 cells did not show a homogeneous behavior. For instance, control cells presented mostly slow depolarizing-repolarizing voltage waves while rapid action potentials were only observed occasionally. It is important to mention that, in our experience,  $Na^+$  and  $K^+$  ionic currents, as well as the quality and magnitude of action potentials depended heavily on the culture time. However, if cell cultures were maintained longer, dendritic like processes started to grow and the voltage clamp quality decreased. For this reason, our cell culture lasted only 4 days. During this culturing period cells grown on Petri dishes and on gold substrates exhibited different kinetics and low amplitude action potentials.

Cells grown on both surfaces also exhibited similar electrical characteristics. This was shown through a quantitative analysis of the behavior of the nonlinear voltage-dependent ion channels, which consisted in analyzing the conductance- $V_m$  curves by fitting a Boltzmann function in order to characterize the ionic currents underlying the firing of action potentials (Hille, 1994). We did not find significant differences between the fitting parameters obtained from the  $K^+$  and the  $Na^+$  currents obtained from cells grown on the plastic Petri dishes and on the gold substrate. These results allow us to conclude that the gold substrate do not affect the ionic currents underlying the action potentials.

One of the most important problems found during an electrophysiological experiment is the voltage drop across the resistance produced by the bath solution (grounded) where cells are immersed. Although special designs of current-clamp amplifiers can solve this problem partially, it would be solved entirely if there were a good electrical conductor (as gold) grounded in the immediate vicinity of the cell membrane instead of the electrolytic bath solution. This would reduce the resistance considerably by allowing the membrane current to flow directly to ground through the electrical conductor and not through the electrolytic bath solution. In this work, we solved this problem by using the gold substrate as an electrode to ground.

The use of a gold substrate along with two voltage-clamp systems, one in the conventional manner and the other keeping the gold substrate in virtual ground has several advantages. One of the most important is that such a setup allows us to measure  $I_m$  through the second amplifier regardless if the experiment is conducted in the voltage or current-clamp mode. In addition, a key aspect of this experimental configuration is that it makes possible the simultaneous measurement of the action potentials and the underlying ionic currents without the need of a special amplifier. The latter problem had been partially solved by other approaches (Dietrich et al., 2002; Banyasz et al., 2011; Barra, 1996; Bean, 2007; Berecki et al., 2005; Doerr et al., 1990; Economo et al., 2010; Nowotny et al., 2006; Molnar and Hickman, 2007; Wilders, 2006; Hille, 1994; Levitan, 1994). Very recently, it was fully solved by using carbon nanotubes (maintained at virtual ground) as a substrate for cell culturing (Morales-Reyes et al., 2016).

Here, we showed that gold substrate is a suitable and effective alternative to the carbon nanotubes with the advantage that gold, by being an excellent electrical conductor, allows the reduction of the resistance observed in electrophysiological experiments. It should be noted, however, that in contrast to what was observed in cells grown on carbon nanotubes, patch-clamp experiments are a bit more difficult to perform on gold substrate due to its opaque surface and its relatively lower adhesivity. The former problem could be solved by using the appropriate lighting conditions, and the latter by using biomolecules such as Poly-L-lysine. It is worth mentioning that with the methodology proposed, cell adhesion requires short culturing periods (a day), and not 4 days as in this work.

These results support the idea of using gold substrates as a suitable material for both electrophysiological and morphological studies of cells, although the experimenter must be aware of the possible effects of gold on the cellular morphology. These effects can be minimized by adopting short culturing periods (from hours to a day) or by the deposition of biological molecules on its surface to promote the adhesion and wellbeing of the cells on the gold substrate.

## 5. Conclusions

By being inert, conductive and atomically flat, gold substrate poses important benefits over other conventional substrates for cell culturing, design and construction of electrophysiological instrumentation as well as for AFM and SEM studies.

In this work, we observed that NG108-15 cells grown in gold substrates exhibited a typical morphology and that they were suitable to perform further electrophysiological studies, although it should be noted, however, that depending on the culture time used, gold might affect the growth of filopodia. Besides, the electrophysiological properties of these cells, acquired through conventional patch-clamp techniques, showed no significant differences in respect to the controls, although significant differences were found in  $C_m$ . Additionally, we propose that gold substrate should be used when it is of great importance to eliminate the resistance produced by the electrolytic bath (e.g. when studying cells with large current densities).

On the other hand, by using a second amplifier to maintain the gold substrate as virtual ground, it was possible to measure  $V_m$  and  $I_m$  simultaneously with a good signal to noise ratio and, even more, without interrupting the normal development of the action potential. We think that this simultaneous recording technique can be a useful tool for electrophysiological studies like those involved in the identification of specific ionic currents underlying the firing of action potentials, which is still a subject of intensive research (see for instance Refs. Banyasz et al. (2011), Berecki et al. (2005), Doerr et al. (1990), Wilders (2006)). Moreover, the proposed methodology may allow the direct observation of the effects of pharmacological agents or modulators on action potentials and the underlying ionic currents simultaneously.

## Declarations

### Author contribution statement

Ma Cristina Acosta-García: Performed the experiments; Wrote the paper.

Israel Morales-Reyes: Performed the experiments.

Anabel Jiménez-Anguiano, Norma Pilar Castellanos: Analyzed and interpreted the data.

Nikola Batina: Contributed reagents, materials, analysis tools or data.

Rafael Godínez: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.



### Funding statement

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant CB-2006-1-61242, Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTI, before ICYTDF) grant (ICYTDF/274/2010-12411497). Ma. Cristina Acosta-García was supported by a scholarship from CONACyT and the support from the Posgrado en Biología Experimental (212870), División CBS, UAM-Iztapalapa.

### Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest.

### Additional information

No additional information is available for this paper.

### References

- Acosta-García, M.C., 2005. Estudio de Células del Sistema Nervioso por Microscopía de Fuerza Atómica [MsC thesis]. ENCB, IPN, México City, México.
- Banyasz, T., Horvath, B., Jiang, Z., Izu, L.T., Chen-Izu, Y., 2011. Sequential dissection of multiple ionic currents in single cardiac myocytes under action potential clamp. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 578–581.
- Barra, P.F.A., 1996. Ionic currents during the action potential in the molluscan neuron with the self-clamp technique. *Comp. Biochem. Physiol. Physiol. Part A* 113 (2), 185–189.
- Bean, B.P., 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 451–465.
- Berecki, G., Zegers, J.G., Verkerk, A.O., Bhuiyan, Z.A., De Jonge, B., Veldkamp, M.W., Wilders, R., van Ginneken, A.C.G., 2005. HERG channel (Dys)function revealed by dynamic action potential clamp technique. *Biophys. J.* 88, 566–578.
- Brunetti, V., Maiorano, G., Rizzello, L., Sorce, B., Sabella, S., Cingolani, R., Pompa, P.P., 2010. Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (14), 6264–6269.
- Coletti, D., Scaramuzza, F.A., Montemiglio, L.C., Pristerá, A., Teodori, L., Adamo, S., Barteri, M., 2009. Culture of skeletal muscle cells in unprecedented proximity to a gold surface. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 91 (2), 370–377.

- Dietrich, D., Clusmann, H., Kral, T., 2002. Improved hybrid clamp: resolution of tail currents following single action potentials. *J. Neurosci. Meth.* 116, 55–63.
- Doerr, Th., Denger, R., Doerr, A., Trautwein, W., 1990. Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the Guinea pig studied with action potential clamp. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 416, 230–237.
- Economo, M.N., Fernández, F.R., White, J.A., 2010. Dynamic clamp: alteration of response properties and creation of virtual realities in neurophysiology. *J. Neurosci.* 30 (7), 2407–2413.
- Fertig, N., Blick, R.H., Behrends, J.C., 2002. Whole Cell patch clamp recording performed on a planar glass chip. *Biophys. J.* 82, 3056–3062.
- Gentet, L.J., Stuart, G.J., Clements, J.D., 2000. Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophys. J.* 79, 314–320.
- Hai, A., Dormann, A., Shappir, J., Yitzchaik, S., Bartic, C., Borghs, G., Langedijk, J.P.M., Spira, M.E., 2009. Spine-shaped gold protrusions improve the adherence and electrical coupling of neurons with the surface of micro-electronic devices. *J. R. Soc. Interface* 6, 1153–1165.
- 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. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 391 (2), 85–100.
- Heckman, C.A., Plummer III, H.K., 2013. Filopodia as sensor. *Cell. Signal.* 25, 2298–2311.
- Heller, D.A., Garga, V., Kelleher, K.J., Lee, T.C., Mahbubani, S., Sigworth, L.A., Lee, T.R., Rea, M.A., 2005. Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide-coated gold surfaces. *Biomaterials* 26, 883–889.
- Hille, B., 1994. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 17 (12), 531–536.
- Hille, B., 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland Massachusetts USA, third ed. Sinauer Associates, Inc. QH603. I54 H54 2001.
- 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. *Int. J. Neuropharmacol.* 1–14.
- Levitan, I.B., 1994. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 193–212.

- Lin, S.P., Chen, J.J.J., Liao, J.D., Tzeng, S.F., 2008. Characterization of surface modification on microelectrode arrays for in vitro cell culture. *Biomed. Micro-devices* 10, 99–111.
- 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 Neurosci.* 13, 129.
- Lollike, K., Lindau, M., 1999. Membrane capacitance techniques to monitor granule exocytosis in neutrophils. *J. Immunol. Meth.* 232, 111–120.
- Marty, A., Neher, E., 1995. Tight-seal Whole Cell Recording, in *Single-channel Recording*, second ed. Springer Science, New York City, USA, pp. 31–51.
- McAdams, E.T., Jossinet, J., Subramanian, R., McCauley, R.G.E., 2006. Characterization of gold electrodes in phosphate buffered saline solution by impedance and noise measurements for biological applications. In: *Proceedings of the 28th IEEE SaB05.2 EMBS Annual International Conference*, New York City, USA.
- Molnar, P., Hickman, J.J., 2007. *Patch-clamp Methods and Protocols*. Humana Press Inc., New Jersey USA.
- Morales, R.I., Seseña, R.A., Acosta, G.M.C., Batina, N., Godínez, F.R., 2016. Simultaneous recording of the action potential and its whole-cell associated ion current on NG108-15 cells cultured over a MWCNT electrode. *Meas. Sci. Technol.* 27 (8), 1–15.
- Mrksich, M., Chen, C.S., Xia, Y., Dike, L.E., Ingber, D.E., Whitesides, G.M., 1996. Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10775–10778.
- Nam, Y., Chang, J.C., Wheeler, B.C., Brewer, G.J., 2004. Gold-coated microelectrode array with thiol linked self-assembled monolayers for engineering neuronal cultures. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51 (1), 158–165.
- Nowotny, T., Szucs, A., Pinto, R.D., Selverston, A.I., 2006. StdpC: a modern dynamic clamp. *J. Neurosci. Meth.* 158, 287–299.
- Purves, R.D., 1981. *Microelectrode Methods for Intracellular Recording and Iontophoresis*. Academic Press, London.
- Romanova, E.V., Oxley, S.P., Rubakhin, S.S., Bohn, P.W., Sweedler, J.V., 2006. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold modulate electrophysiological parameters and cellular morphology of cultured neurons. *Biomaterials* 27, 1665–1669.

Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P.J., Stock, C., 2012. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol. Rev.* 92, 1865–1913.

Sigworth, F.J., 2009. Electronic design of the patch clamp. In: Sakmann, B., Neher, E. (Eds.), *Single-channel Recording*, second ed. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 95–126.

Soussou, W.V., Yoon, G.J., Brinton, R.D., Berger, T.W., 2007. Neuronal network morphology and electrophysiology of hippocampal neurons cultured on surface-treated multielectrode arrays. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54 (7), 1309–1320.

Staii, C., Viesselmann, C., Ballweg, J., Shi, L., Liu, G.Y., Williams, J.C., Dent, E.W., Coppersmith, S.N., Eriksson, M.A., 2009. Positioning and guidance of neurons on gold surfaces by directed assembly of proteins using atomic force microscopy. *Biomaterials* 30, 3397–3404.

The Axon™ Guide, 2012. A Guide to Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques, third ed. Molecular Devices. <https://www.moleculardevices.com/sites/default/files/en/asset/dd/product-brochures/axon-guide-edition-3.5-sample.pdf>.

Tojima, T., Hatakeyama, D., Yamane, Y., Kawabata, K., Ushiki, T., Ogura, S., Abe, K., Ito, E., 1998. Comparative atomic force and scanning electron microscopy for fine structural images of nerve cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* 37, 3855–3859.

Tojima, T., Yamane, Y., Takagi, H., Takeshita, T., Sugiyama, T., Haga, H., Kawabata, K., Ushiki, T., Abe, K., Yoshioka, T., Ito, E., 2000a. Three-dimensional characterization of interior structures of exocytotic apertures of nerve cells using atomic force microscopy. *Neuroscience* 101 (2), 471–481.

Tojima, T., Yamane, Y., Takahashi, M., Ito, E., 2000b. Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108-15 cells. *Neurosci. Res.* 37, 153–161.

Wilders, R., 2006. Dynamic clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology. *J. Physiol.* 576, 349–359.

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 Physiol.* 206, 120–134.

Xie, C., Lin, Z., Hanson, L., Cui, Y., Cui, B., 2012. Intracellular recording of action potentials by nanopillar electroporation. *Nat. Nanotechnol.* 7, 185–190.

Yoon, S.H., Mofrad, M.R.K., 2011. Cell adhesion and detachment on gold surfaces modified with a thiol-functionalized RGD peptide. *Biomaterials* 32, 7286–7296.