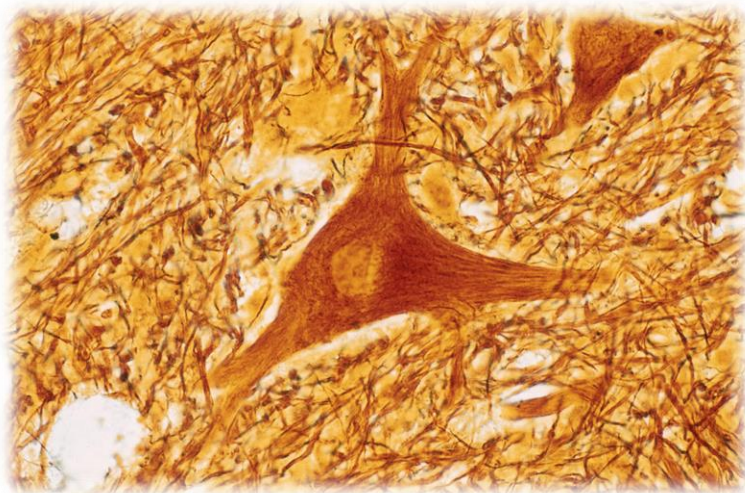




TÉCNICAS AVANZADAS PARA EL ESTUDIO DE LA FISIOLOGÍA NEURONAL



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

ALBERTO CERPA ROMÁN



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

**TÉCNICAS AVANZADAS PARA EL
ESTUDIO DE LA FISIOLOGÍA
NEURONAL**

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

ALBERTO CERPA ROMÁN

TUTORA: LIVIA CARRASCAL MORENO

Sevilla, julio de 2022

Resumen

El estudio del sistema nervioso central ha sembrado inquietudes en los investigadores a lo largo de toda la historia de la humanidad. Con el descubrimiento de las propiedades eléctricas de las células excitables, nació la electrofisiología y se abrió un nuevo frente de investigación para estudiar el funcionamiento del sistema nervioso y sus células. Las técnicas de registro electrofisiológico son muy variadas y son capaces de medir desde la actividad conjunta y síncrona de las neuronas de la corteza hasta la actividad de una única célula o canal. En esta revisión se hará un repaso por ellas, centrándose en las de mayor resolución. En 1936 Hodgkin y Huxley desarrollaron un sistema de registros intracelulares con el que consiguieron, no sólo medir el potencial de membrana de una célula sino dilucidar las corrientes que subyacen al potencial de acción, lo que les valió el premio Nobel de Medicina en 1963. Posteriormente, en los años 70, Neher y Sakmann desarrollaron la técnica de patch-clamp (Premio Nobel de Medicina, 1991). Esta técnica supuso un gran avance en el estudio de la fisiología neuronal ya que no sólo permite medir las propiedades intrínsecas de una célula y las corrientes macroscópicas con una mayor eficacia que los registros intracelulares clásicos, sino que es capaz de estudiar la cinética de un único canal iónico. Las propiedades de esta técnica la hacen idónea para establecer mejoras sustanciales que aumenten su eficiencia, así como hacer combinaciones con técnicas de otras disciplinas. Así, combinando electrofisiología y genética surge el patch-seq que consigue medir tanto la actividad eléctrica de una célula única como realizar una secuenciación completa de su genoma. Todavía queda mucho por conocer del sistema nervioso pero el avance en las técnicas de estudio hace que cada día se de un paso adelante en su comprensión.

Palabras clave: fisiología neuronal, electrofisiología, neurofisiología, patch-clamp, neurociencia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	4
1.2 INICIO DE LA ELECTROFISIOLOGÍA	5
1.3 DESCUBRIMIENTO DE LOS NEUROTRANSMISORES Y LA “DOCTRINA DE LA NEURONA”	7
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGÍA	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1 ELECTROENCEFALOGRAMA	11
4.2 REGISTROS EXTRACELULARES DE CAMPO	13
4.2.1 Aplicaciones de la técnica MEA in vivo	13
4.2.2 Aplicaciones de la técnica MEA in vitro	14
4.3 REGISTRO EXTRACELULAR UNITARIO	16
4.4 REGISTRO INTRACELULAR CLÁSICO	17
4.5 PATCH-CLAMP	19
4.5.1 Configuraciones de la técnica de patch-clamp	20
4.5.2 Protocolo de la técnica de patch-clamp	22
4.5.3 Avances de la técnica de patch-clamp	29
5. CONCLUSIONES	31
6. BIBLIOGRAFÍA	31

1.INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Prácticamente, desde que la humanidad ha tenido capacidad para documentar, han quedado registrados estudios sobre la anatomía y funcionalidad del sistema nervioso. Un buen ejemplo de ello es el Papiro de Edwin Smith que incluye casos de lesiones de la columna cerebral y, en concreto, un caso sobre una fractura craneal, en el que se describe la morfología del encéfalo. El papiro se realizó en escritura hierática, por lo que se entiende que debió de ser escrito durante el siglo XVI a.C. (Van Middendorp et al., 2010).

En el periodo Helenístico, Grecia llega a ser un importante centro intelectual de su época. Herófilo (335-280 a.C.) es considerado por muchos el primer anatomista. Estudió la anatomía cerebral. Descubrió las meninges, el cerebelo y describió el surco medio y el IV ventrículo. Diferenció por primera vez los nervios clasificándolos como motores o sensitivos; y también en somáticos y autónomos. Fue el primero que se atrevió a abandonar la teoría de que la inteligencia residía en el corazón y afirmó que esta era función del cerebro (Campohermoso Rodríguez and Soliz Soliz, 2009). Erasistratus (310-250 a.C.), por su parte, describió la estructura del cerebro incluyendo cavidades (ventrículos) y las membranas (meninges), y distinguió el cerebro del cerebelo. Comparó los cerebros de seres humanos con los de otros animales y llegó a la conclusión de que un mayor número de “giros” del cerebro infundían mayor inteligencia (Romero Reverón, 2008).

Fueron pocos los avances en fisiología y anatomía hasta el Renacimiento, época en la que se permitieron las disecciones. De la mano de Andrés Vesalio (1514-1564), llegó en 1543 la obra “De humani corporis fabrica”. Esta obra es considerada por muchos como el primer atlas de anatomía de la historia (Sánchez Silva, 2008). Su séptima parte está dedicada al sistema nervioso central, y plasma con gran lujo de

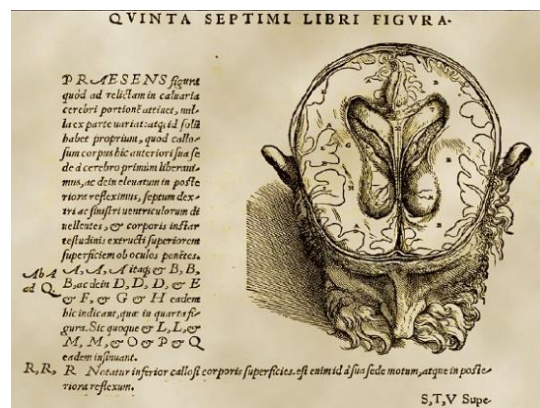


Figura 1: Lámina de la obra “De humani corporis fabrica”. Ilustración de la anatomía cerebral en un corte plano horizontal (Álvarez Cordero, 2013).

detalles en un total de 17 ilustraciones del sistema nervioso central (Figura 1). A pesar de que aportó grandes avances en anatomía cerebral, apenas proporcionó avances en lo que a funcionalidad se refiere (Alcocer-Maldonado, 2015).

1.2 INICIO DE LA ELECTROFISIOLOGÍA

A mediados del siglo XVIII, Luigi Galvani (1737-1798) comenzó a interesarse por la función neuromuscular y en posibles aplicaciones terapéuticas de la electricidad. Sus aspiraciones investigadoras combinaban por una parte la tradición del estudio típico de anatomía de la italiana escuela de Bolonia con Malpighi como uno de los principales referentes; con nuevos enfoques dinámicos basados principalmente en el empleo de preparaciones de animales in-vivo; dejando constancia de ello en su principal obra, “*De viribus electricitatis in motu musculari*” (Piccolino, 2006). Galvani realizó una preparación con la mitad inferior de una rana, quedando los nervios expuestos al aire, y con un alambre de un material conductor atravesando el canal vertebral. Al tocar con un escalpelo conectado a una máquina generadora de pulsos eléctricos los nervios femorales o crurales, emerge una “chispa” que provoca la contracción vigorosa de los músculos de la rana (Figura 2-A) (Piccolino, 1997). En la segunda parte de la obra de Galvani, aparece descrito un experimento sobre el efecto de la electricidad atmosférica (procedente de truenos durante una tormenta eléctrica) concluyendo resultados similares a los observados en el empleo de electricidad artificial. En esta ocasión (Figura 2-B), aparece representada la mitad inferior de la rana de manera similar al primer experimento, pero esta vez, realizado en el exterior del laboratorio y conectada a unos cables que apuntan al cielo durante un día de tormenta. Al ser alcanzado el cable por una corriente eléctrica atmosférica, los músculos se contraen de manera similar a lo observado en el interior del laboratorio. Con este experimento, Galvani fue capaz de demostrar que esa tormenta podía producir la contracción muscular como la electricidad artificial. (Piccolino, 2006). Basándose en sus experimentos, Galvani se atrevió a afirmar que los músculos y nervios son capaces de conducir impulsos eléctricos incluso después de la muerte (Moreno et al., 2019).

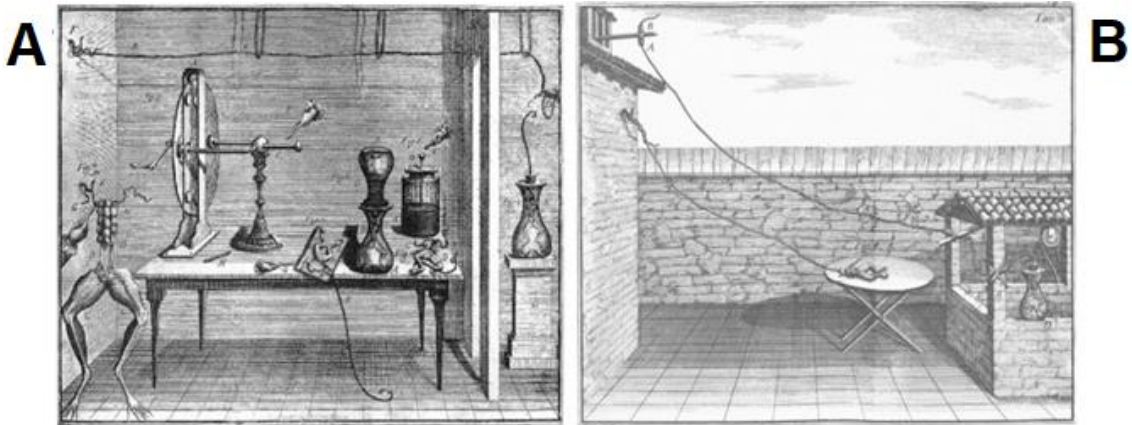


Figura 2: Ilustraciones de la obra “De viribus electricitatis in motu musculari”. Se muestran dos de los experimentos de Galvani. A: experimento en el que se emplea una máquina de pulsos eléctricos. B: experimento en el que se usa la electricidad natural de una tormenta (Piccolino, 2006).

El fisiólogo alemán Julius Bernstein (1839–1917) marcó la historia de la neurofisiología por ser el primero en dar una descripción precisa del potencial de membrana. Expuso que las células excitables cuentan con una membrana que debe ser permeable selectivamente a iones en reposo, y que, al ser excitada, la permeabilidad va cambiando, haciéndose más permeable a otros iones, lo que permite un intercambio con el medio exterior. Desarrolló un nuevo instrumento basándose en el galvanómetro, el reótomo diferencial (Figura 3), con el que fue capaz de medir la velocidad de conducción del impulso nervioso y pudo resolver el curso temporal de la actividad eléctrica de músculos y nervios (Seyfarth, 2006).

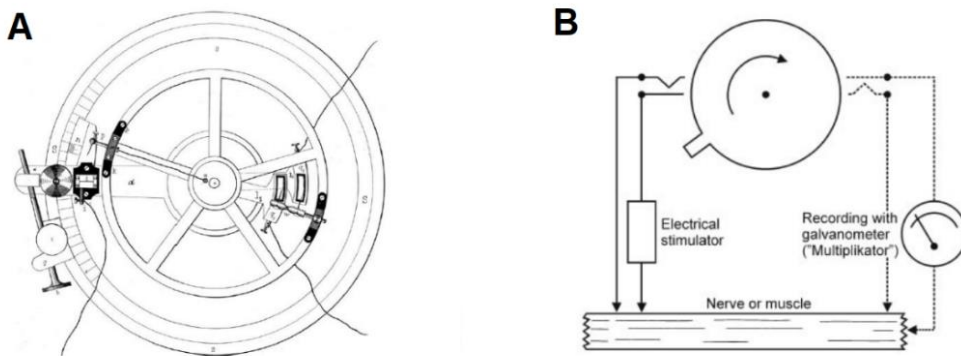


Figura 3: El reótomo diferencial de Julius Bernstein. A: Esquema de la vista superior del reótomo diferencial, instrumento usado por Bernstein en sus experimentos. B: Esquematación del proceso llevado a cabo por el reótomo. Por un lado, existe una fuente que estimula el nervio y al otro lado de dicho nervio, se encuentra un multiplicador capaz de registrar la señal (Seyfarth, 2006).

1.3 DESCUBRIMIENTO DE LOS NEUROTRANSMISORES Y LA “DOCTRINA DE LA NEURONA”

Los neurotransmisores son sustancias endógenas cuya principal función es la modulación de acciones fisiológicas por ser capaces de transmitir señales desde una neurona hacia otra conectada con esta o hacia una fibra muscular para estimular su contracción. El primer neurotransmisor en ser descubierto fue la acetilcolina, un neurotransmisor encargado de la regulación de numerosos procesos como la estimulación del músculo, participa en la regulación del ciclo sueño-vigilia, en la neurotransmisión de neuronas somatosensoriales... (Charroo Portilla et al., 2006). La acetilcolina fue aislada por Otto Loewi (1873-1961) en 1921, descubrimiento por el que fue galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1936. El descubrimiento de Loewi supuso una nueva era para disciplinas como la neurociencia y la farmacología, ya que permitía explicar el mecanismo de acción de diferentes fármacos. Para demostrar la teoría de la neurotransmisión química, como se aprecia en la figura 4, Loewi empleó dos corazones de rana, uno unido al nervio vago y otro sin dicho nervio. El corazón que conservaba el nervio vago fue perfundido con una solución, y a través de ese nervio vago fue estimulado mediante una corriente eléctrica, lo que generaba patrones de inhibición de la contracción del corazón. La solución fue transferida al corazón que carecía de nervios externos y este comenzaba a reproducir patrones de inhibición de contracción similares al primer corazón y propias de los efectos inhibitorios de la estimulación del nervio vago. Con este experimento, se demostró que las fibras nerviosas liberan sustancias capaces de generar efectos sobre los órganos (García Sacristán, 2021).

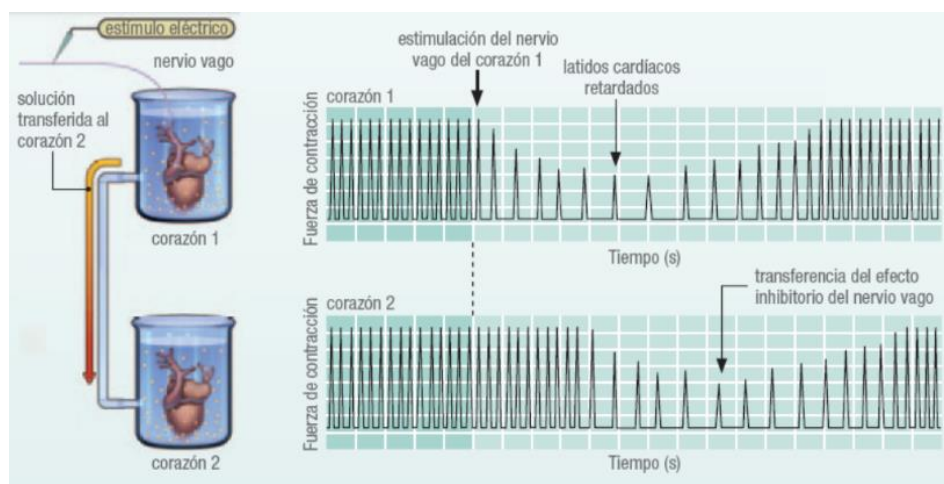


Figura 4: Esquema del experimento de Otto Loewi. Se aprecia como al transferir la solución que baña a un corazón cuyo nervio vago ha sido estimulado a otro corazón sin dicho nervio, el segundo reproduce los patrones de contracción del primero (Santibáñez Gómez, 2015).

A finales del siglo XIX, comenzó a acuñarse la llamada “Doctrina de la neurona”. Camillo Golgi (1843-1926) y Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) fueron galardonados en 1906 con el premio Nobel de Fisiología por sus avances en la anatomía microscópica del sistema nervioso. Golgi defendía que las neuronas se encontraban físicamente unidas formando redes difusas. Por su parte, Cajal aseguraba que las neuronas son células totalmente independientes, aunque se encuentran interconectadas entre sí como dejó plasmado en las ilustraciones que él mismo hizo (Figura 5). Este descubrimiento es considerado como la base de la “Doctrina de la neurona”. Cajal consiguió una mejora de las técnicas de tinción hasta ese momento empleadas; lo llamó “método de doble impregnación”, además, optó por estudiar tejido cerebral de animales inmaduros de pequeño tamaño, que, al carecer de un recubrimiento de mielina maduro, eran más permeables a los colorantes empleados (Bock, 2013). La doctrina de la neurona combinada con la ley de polarización dinámica (la cual dispone que los impulsos nerviosos siempre siguen el mismo recorrido, es decir, están polarizados dentro de cada neurona), proporcionaron una explicación de las vías neuronales (Guillery, 2007).

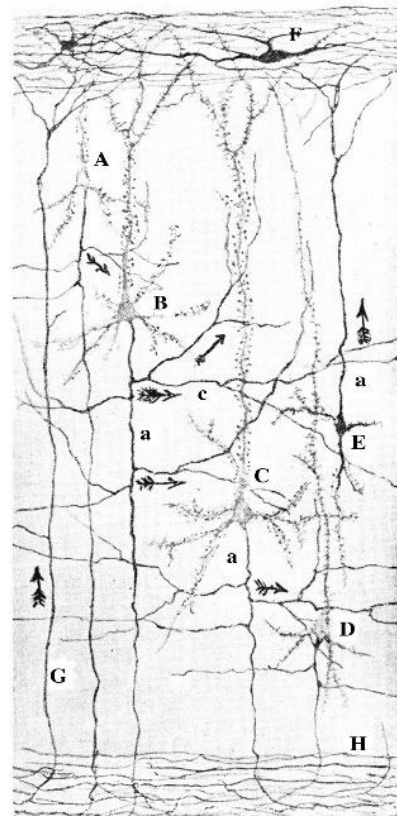


Figura 5: Vista de Ramón y Cajal de las neuronas. Dibujo de Ramón y Cajal sobre las conexiones neuronales del córtex cerebral, publicada en 1911. (Guillery, 2007).

En la actualidad, existe un gran número de técnicas para el estudio de la fisiología neuronal. Estas técnicas se basan principalmente en el análisis de la anatomía y de las características electrofisiológicas de las neuronas. Estos métodos se han visto desarrollados en gran medida gracias a los grandes descubrimientos en la materia durante el siglo XX. Este trabajo pretende realizar una revisión de las técnicas electrofisiológicas más actuales y reseñables.

2. OBJETIVOS

En este trabajo se ha realizado un breve recorrido de la historia de la neurofisiología, desde que la humanidad tiene capacidad de documentar sus hallazgos hasta las técnicas descubiertas y empleadas en los últimos años. El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión lo más actualizada posible de las técnicas empleadas en el estudio de la fisiología neuronal, sobre todo centrándose en la técnica de patch-clamp.

Los objetivos específicos son:

- Diferenciar y describir brevemente las técnicas de registro electrofisiológicas según su grado de resolución.
- Describir las preparaciones necesarias para realizar estas técnicas.
- Profundizar sobre los modos y configuraciones que se pueden emplear, así como el protocolo general de la técnica de patch-clamp en su configuración whole-cell.
- Investigar sobre los avances más actuales de la técnica de patch-clamp.

3. METODOLOGÍA

Esta memoria sigue las características propias de una revisión bibliográfica.

En esta revisión se ha realizado una recopilación de fragmentos de artículos de revista, capítulos de libros, sitios web y documentos de trabajos institucionales como tesis doctorales para lograr los objetivos anteriormente expuestos.

Para consultar las fuentes bibliográficas, se ha empleado por un lado el buscador de Google (especialmente la herramienta Google Académico o Google Scholar). Por otro lado, para poder acceder a la mayoría de las fuentes consultadas, se ha hecho uso del acceso institucional de la Universidad de Sevilla, a través del catálogo de Fama + de la biblioteca de la Universidad. Este acceso institucional ha permitido visualizar el texto completo de artículos incluidos en bases de datos como PubMed (National Center for Biotechnology information), ScienceDirect (Journals & Books; Elsevier B.V.), y SciELO (Scientific Electronic Library Online)

La estrategia de búsqueda no ha sido idéntica en todos los apartados.

- Por ser una introducción histórica, en dicho apartado se han consultado fuentes que trataban sobre la historia de neurofisiología, y, basándose en la cronología expuesta, se han realizado búsquedas empleando principalmente como palabras claves los nombres de sus autores o bien de sus experimentos o aportaciones. También se han realizado búsquedas que combinaban ambas, es decir, su nombre y sus experimentos o aportaciones.
- En el apartado de resultados y discusión, se han empleado principalmente las palabras claves “fisiología neuronal”, “electrofisiología”, “neurofisiología”, “patch-clamp” y “neurociencia”. Estas palabras clave se introducían solas o en combinación entre ellas; o bien con palabras de los epígrafes expuestos.

A lo largo de toda la memoria, los términos se introducían en lengua inglesa en los motores de búsqueda, por ser este el principal idioma en el que se redactan la mayoría de las publicaciones científicas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La electrofisiología centrada en el estudio de la fisiología neuronal se basa en que cada neurona forma un pequeño dipolo, en el que la polaridad varía según el flujo hacia la célula sea inhibitorio o excitatorio. Esa diferencia de potencial puede ser amplificada y medida gracias al instrumental adecuado (Ramos-Argüelles et al., 2009). Para indagar en la actividad neuronal, los investigadores han desarrollado varios tipos de técnicas de registro electrofisiológico, que se dividen a grandes rasgos en métodos extracelulares e intracelulares. Mientras que los registros extracelulares de campo permiten obtener datos sobre el disparo neuronal y la dinámica colectiva generada por múltiples células que rodean los electrodos de registro; los registros intracelulares y extracelulares unitarios permiten medir la dinámica del potencial de membrana subumbral y la actividad de disparo supraumbral a nivel de una sola célula (Noguchi et al., 2021).

Las técnicas empleadas en neurociencia pueden clasificarse en función de su grado de resolución (Windhorst and Johansson, 1999):

- Electroencefalograma.
- Registros extracelulares de campo.
- Registros extracelulares unitarios.

- Registro intracelular clásico.
- Patch-clamp.

4.1 ELECTROENCEFALOGRAMA

La electroencefalografía es una técnica de exploración que permite registrar la actividad eléctrica y la funcionalidad cerebral. Fue empleada por primera vez en 1929 por Hans Berger. Consiste en colocar unos electrodos de una sustancia conductora fijados al cuero cabelludo. Gracias a esta técnica poco invasiva, se pueden evaluar cambios y fluctuaciones en la actividad cerebral normal (Ramos-Argüelles et al., 2009).

Para realizar el electroencefalograma, se suele emplear el “sistema Internacional 10-20” (Figura 6); este sistema estandarizado cuenta con un total de 26 electrodos. Los electrodos se colocan cubriendo las diferentes zonas: prefrontal (Pf), frontal (F), central (C), parietal (P), temporal (T) y occipital (O). Los electrodos que se sitúan en la línea media son además etiquetados con la letra “z” (Novo et al., 2010).

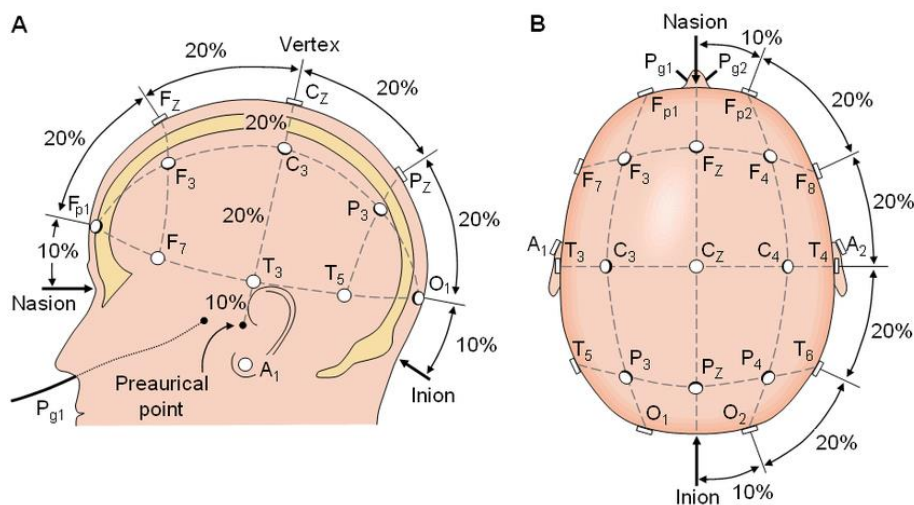


Figura 6: Sistema 10-20. Esquematación del, protocolo estandarizado para la colocación de electrodos extracraneales en el electroencefalograma (Novo et al., 2010).

El electroencefalograma es capaz de captar dos características fundamentales de los potenciales corticales (Ramos-Argüelles et al., 2009):

- La frecuencia: se define como la rapidez de onda, y es medida en hercios (Hz).
- La amplitud: se define como la variación máxima que puede alcanzar una onda, y es medida en voltios (V).

Se entiende que cuanto mayor sea la amplitud, mayor es el número de sinapsis generadas simultáneamente; mientras que cuanto menor sea la amplitud, mayor es la velocidad de producción de las sinapsis (Novo et al., 2010).

El registro se realiza estratificando las ondas en función de los parámetros de amplitud y frecuencia (Novo et al., 2010):

- Ondas alfa (α): poseen una frecuencia media de entre 8 y 13 Hz. Es típico de adultos sanos en estado de vigilia mientras se encuentran relajados.
- Ondas beta (β): poseen una frecuencia media de 13 a 30 Hz. Se relacionan con estados que requieran una concentración activa o atención.
- Ondas gamma (γ): poseen una frecuencia de 30 a 200 Hz. No siempre se pueden medir mediante el electroencefalograma cuando son superiores a 100 Hz. Son típicas de situaciones de percepción de estímulos como el sobresalto o el dolor.
- Ondas delta (δ): poseen una frecuencia baja, de 1 a 4 Hz. Suelen relacionarse con el sueño profundo de adultos sin patologías.
- Ondas theta (θ): poseen una frecuencia de 4 a 8 Hz. Se suelen asociar con somnolencia, sueño y relajación. En algunos casos se han asociado con esfuerzo mental cuando se fija el registro en la línea media frontal.

Cabe resaltar que, aunque los ritmos se pueden asociar a eventos o circunstancias, al comparar ensayos parecidos, las oscilaciones de los ritmos no suelen tener la misma fase a pesar de que el comportamiento de la amplitud puede ser similar (Figura 7). El método que se emplea generalmente es comparar los valores de potencial con los periodos de referencia (Müller-Putz, 2020).

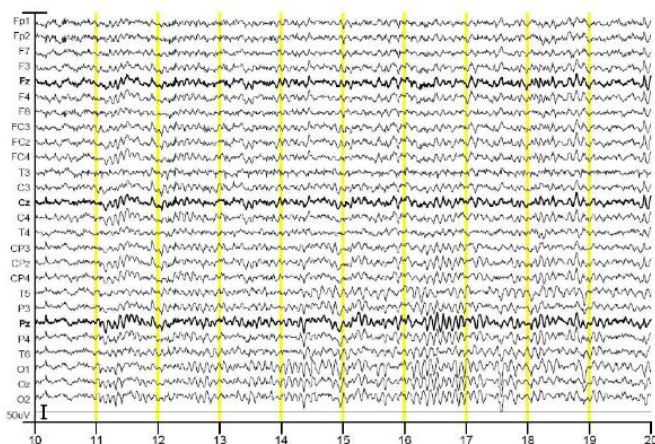


Figura 7: Electroencefalograma común. Registro de electroencefalografía tomado durante 20 segundos con un total de 26 electrodos siguiendo el “sistema 10-20” (Novo et al., 2010).

La utilidad de la electroencefalografía ha sido cuestionada por numerosos autores, sin embargo, es una técnica con utilidad para la detección y el seguimiento de distintas patologías y además no es invasiva y supone un bajo coste. Algunas de las patologías en las que es empleada son el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, la depresión, la epilepsia, demencias y enfermedades neurodegenerativas (Novo et al., 2010).

4.2 REGISTROS EXTRACELULARES DE CAMPO

Las técnicas de registro extracelulares de campo permiten grabaciones del sumatorio de potenciales de acción extracelulares de una población de neuronas. Los electrodos empleados registran señales de todas las fuentes cercanas al detector; esta es una gran diferencia respecto a las técnicas de registro unitario (Obien et al., 2015). Para realizar estos registros, una de las técnicas más novedosas se basa en el uso de matrices de microelectrodos o microelectrode array (MEA), que son un conjunto de un gran número de terminales conductores capaces de evaluar las fluctuaciones en las corrientes neuronales (di Credico et al., 2021). Presentan una ventaja fundamental, y es que son capaces de estimular y registrar la actividad neuronal de diferentes localizaciones simultáneamente en lugar de centrarse en una única neurona (Obien et al., 2015). Por ser las más novedosas y proporcionar mejores resultados, este apartado se centrará en las matrices de microelectrodos o MEA.

Se suele generalizar a la hora de clasificar las técnicas de registro de campo que empleen matrices de microelectrodos. A grandes rasgos, se suelen dividir según si los electrodos son implantables (in-vivo), o si los electrodos registran actividad de cultivos celulares o porciones de tejido (in-vitro o ex-vivo). También se pueden clasificar las técnicas basadas en MEA en función de si se tratan de agrupaciones de “cableado fijo”, en las que cada conjunto cuenta con un cable que va directo hacia el exterior de la matriz, y “matrices multiplexadas”, que cuentan con sistemas de comunicación dentro de la propia matriz (Obien et al., 2015).

4.2.1 Aplicaciones de la técnica MEA in vivo

A lo largo de los años, los investigadores han tratado de encontrar técnicas para la monitorización de órganos como el corazón o el cerebro de seres vivos. La metodología basada en matrices de microelectrodos proporciona una información precisa, estable y

en tiempo real de la electrofisiología de órganos como el cerebro o el corazón. Las MEA más prometedoras para el mapeo y registro electrofisiológico en la actualidad incluyen las membranas estirables de electrodos tridimensionales conectados a nanocables de Au-TiO₂ recubiertos de platino (Figura 8-A), sondas MEA flexibles para implantación cerebral (Figura 8-B), y las sondas bioelectrónicas con características estructurales parecidas a las de las propias neuronas (Figura 8-C) (Choi et al., 2021).

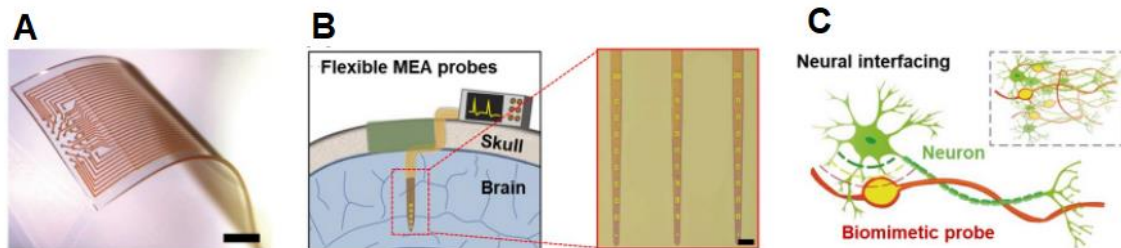


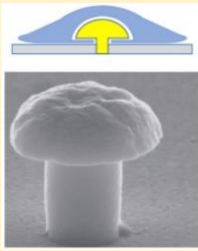
Figura 8: MEA para registro electrofisiológico in vivo. A: membranas flexibles de electrodos tridimensionales. B: sonda implantable ultraflexible. C: sonda bioelectrónica que imita la fisiología propia de la neurona. (Choi et al., 2021).

Al proporcionar una buena área de contacto, este tipo de técnicas proporcionan una buena sensibilidad y adaptabilidad frente a las complejidades anatómicas de tejidos como el cerebro. Este tipo de técnicas de MEA han llegado a ser tecnologías atractivas para proporcionar una información estable, reproducible, precisa y en tiempo real de señales electrofisiológicas de órganos vivos (Choi et al., 2021).

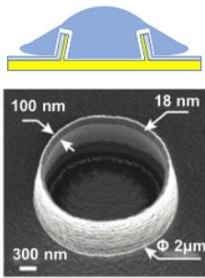
4.2.2 Aplicaciones de la técnica MEA in vitro

Actualmente, están descritas diferentes MEA para registros in vitro con variaciones en sus materiales, métodos de fabricación y diseños (tabla 1). Las modificaciones de materiales de la superficie, la composición del material y los parámetros de registro y procesamiento de los MEA son enfoques muy tenidos en cuenta para mejorar la técnica. La capacidad para detectar cambios en los potenciales de acción proporciona una información valiosa para comprender el comportamiento de tejidos como el cerebral o el cardíaco (Choi et al., 2021). Para las técnicas MEA in vitro, generalmente suele ser necesaria una placa de cultivo celular o algún otro tipo de cámara de medio que reproduzca las condiciones fisiológicas de las células estudiadas. Estas células pueden provenir de cultivos de líneas celulares o bien ser secciones de tejidos (Obien et al., 2015).

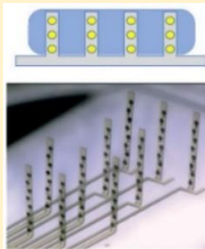
Los MEA convencionales son planos y rígidos, por lo que no terminan de ser apropiadas para conformarse y evaluar dinámicas celulares. En la actualidad, se está enfocando el desarrollo de los registros in vitro a los diseños MEA tridimensionales (tabla 1). Un gran número de estudios han demostrado las ventajas de estas nuevas técnicas para detectar y evaluar señales electrofisiológicas. El empleo de MEA 3D consigue un mejor acople tejido-detector, logrando así interfaces más continuas. Las estructuras de electrodo que más suelen emplearse en la actualidad se representan en la tabla 1 (Choi et al., 2021).



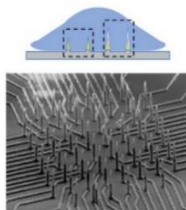
Forma de hongo: pueden mejorar el acoplamiento eléctrico entre los electrodos y las neuronas.



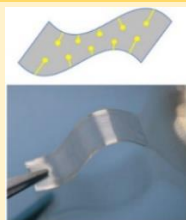
Estructura de volcán: adquieren señales de potencial de acción más altas en comparación con los electrodos planos.



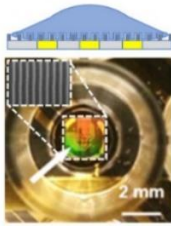
Microelectrodos flexibles: pueden deformarse y permitir que las sondas de electrodos permanezcan erguidas durante el control.



Electrodos de nanocables colocados verticalmente: Presentan la capacidad de direccionar el impulso eléctrico, consiguiendo mediciones de alto rendimiento intra y extracelular.



Matriz flexible porosa: han sido diseñadas para mantener poco contacto con los tejidos estudiados y ser permeables a los nutrientes.



MEA con superficies nanotopográficas: son permeables y canalizan la transferencia de iones. Proporcionan además organización y maduración al tejido.

Tabla 1: Tipos de matrices de microelectrodos. Representación de los modelos más empleados en la actualidad en la técnica de MEA in vitro (Choi et al., 2021)

4.3 REGISTRO EXTRACELULAR UNITARIO

Los registros extracelulares unitarios proporcionan información sobre la frecuencia de disparo de potenciales de acción, pero no llegan a detectar qué integración subumbral de entradas sinápticas es la que origina ese potencial (Mariño et al., 2003). Una característica fundamental de las señales extracelulares es que son de baja intensidad, y surgen principalmente del flujo de corrientes iónicas en el medio extracelular (Sánchez López and Gómez González, 2014).

En estas técnicas se emplean microelectrodos de punta muy fina. Estos electrodos son acercados a la neurona cuyas propiedades se pretendan registrar hasta que se detecte actividad de esa única célula. De los electrodos que se emplean cabe destacar dos tipos (Sánchez López and Gómez González, 2014):

- Electrodo metálico: son agujas finas metálicas recubiertas de un aislante hasta la punta (Figura 9-A).
- Electrodo de armazón metálico: combinan dos materiales distintos, un material aislante resistente y un metal con buenas propiedades de conductividad eléctrica (Figura 9-B).



Figura 9: Estructura de electrodos empleados en el registro extracelular unitario. A: electrodo metálico. B: Electrodo de armazón metálico (Sánchez López and Gómez González, 2014).

Los métodos de registro con electrodos cuyas puntas se colocan en el exterior celular, presentan una ventaja fundamental con respecto a las técnicas intracelulares, y es que una misma neurona pueden ser registrada durante largos períodos de tiempo, e incluso poblaciones de neuronas pueden estudiarse en tándem o de forma seriada. Los registros intracelulares no pueden prolongarse más de unos minutos ya que la célula muere (Mejía Merino, 1998).

4.4 REGISTRO INTRACELULAR CLÁSICO

Realizar registros electrofisiológicos intracelulares es indispensable para llegar a comprender cómo las señales eléctricas modulan diversas funciones fisiológicas. La transducción de señales eléctricas en eventos fisiológicos generalmente depende de la activación o inactivación de canales iónicos, que son capaces de inducir corrientes activadas mecánicamente, convirtiendo así las señales mecánicas en señales eléctricas (Clay, 2005).

El registro intracelular fue descrito por primera vez por Hodgkin y Huxley en 1936. Estudiaron el comportamiento de las neuronas usando como modelo el axón gigante del calamar. Emplearon como electrodo un alambre fino de plata insertado en el interior del axón y otro en el exterior cerca de la membrana bañado por la misma solución, quedando ambos conectados a un voltímetro. Esta se considera la primera medida directa del potencial de membrana. Así mismo, mediante la introducción de un tercer electrodo que inyectaba corriente pudieron estudiar la respuesta en voltaje a la inyección de corriente, conocido como modo fijación de corriente y así estudiar las características del potencial de acción (Kotsias, 2006). También desarrollaron la técnica de configuración de voltaje en la que fijaban el voltaje y estudiaban los cambios en corriente. La configuración de estos experimentos se ilustra en la figura 10. El experimento consistió en colocar en primer lugar dos electrodos, uno en el interior celular y otro de referencia fuera, bañado por la misma solución que la célula en estudio; estos electrodos se encontraban conectados a un voltímetro y amplificador capaz de detectar el potencial de membrana de reposo del axón. Por otro lado, el experimentador marca o fija un potencial de membrana determinado, el amplificador detecta la diferencia entre el potencial fijado y el potencial de membrana de reposo e inyecta la corriente necesaria para llevarlo al potencial deseado. Una vez la célula alcanza el

potencial fijado el dispositivo es capaz de medir las corrientes transmembranas que fluyen a su través como consecuencia del cambio en el potencial de membrana. Gracias a este descubrimiento se pudieron descubrir las corrientes macroscópicas que subyacían al potencial de acción, así como el mecanismo de la propagación de señales a lo largo del axón de las neuronas por lo que obtuvieron el premio Nobel en 1963 (Alonso, 2015).

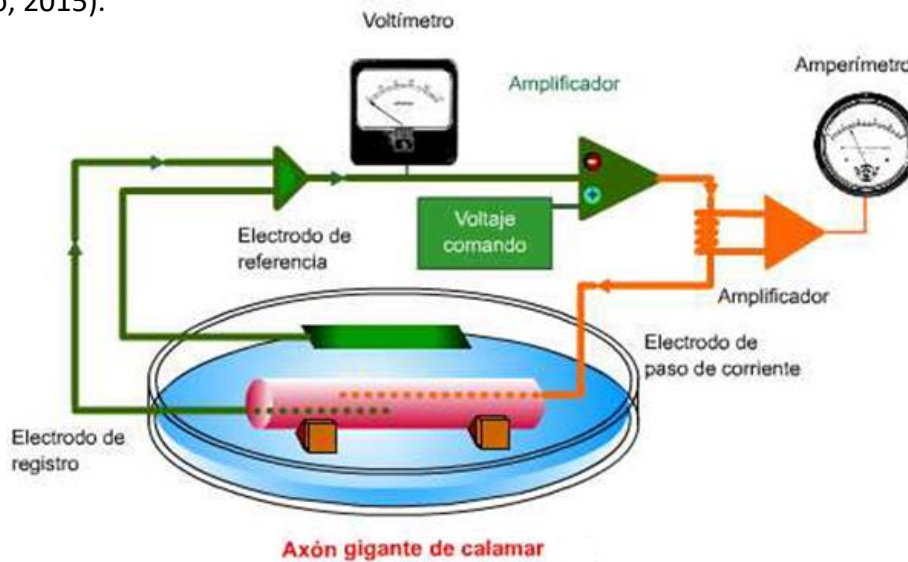


Figura 10: Esquematación de la "Voltage Clamp". Experimento realizado por Hodgkin y Huxley para evaluar las corrientes iónicas que se dan en el axón de un calamar gigante (Escobar Ferreyra, 2017).

En general, el trabajo de Hodgkin y Huxley se puede dividir en análisis y síntesis. La parte de análisis se refiere al uso de la técnica de fijación de voltaje para determinar los mecanismos de corriente iónica que subyacen al potencial de acción, centrándose sobre todo en las corrientes de iones de sodio y de potasio. La parte de síntesis se refiere a las descripciones matemáticas de las corrientes, y, a una reconstrucción del potencial de acción, a partir de esas descripciones numéricas. Este trabajo ha tenido tanto éxito que sus ecuaciones continúan siendo utilizadas por los neurocientíficos en la actualidad a pesar de que diversos autores aseguran que necesita ciertas correcciones (Clay, 2005). La utilidad del modelo de Hodgkin y Huxley basado en el axón gigante del calamar se considera extrapolable al sistema nervioso de los mamíferos. Los principios fundamentales del modelo siguen siendo válidos (hasta el uso de valores de parámetros apropiados) para especies de sangre caliente, sin la necesidad de una revisión sustancial de la formulación matemática (Krouchev et al., 2015).

4.5 PATCH-CLAMP

A pesar de que los registros intracelulares supusieron un gran avance para el estudio de la fisiología neuronal mediante la evaluación de sus propiedades eléctricas, presentaban un inconveniente fundamental, y es que al penetrar la célula y romperla, se producía una deriva eléctrica o corriente de fuga, lo que impide por ejemplo registrar las corrientes transmembrana aisladas (Pardillo Díaz, 2017)

La técnica de patch-clamp permite registrar los potenciales de membrana y los potenciales de acción de neuronas individuales, así como llegar a registrar un único canal. Este método de registro es capaz de revelar cómo las actividades neuronales respaldan la función cerebral a nivel de una sola célula (Noguchi et al., 2021). La electrofisiología de patch-clamp se convirtió en algo habitual desde su desarrollo por Bert Sakmann y Erwin Neher a finales de los 70 (MolnarJames, and Hickman, 2007) quienes obtuvieron el premio Nobel en 1991. El método de patch-clamp es la única forma de capturar la actividad intracelular de neuronas individuales con una alta relación señal-ruido (Noguchi et al., 2021).

Esta técnica es empleada en el estudio de las propiedades eléctricas, tanto activas como pasivas de las células. Se fundamenta en la formación de un “sello” entre la pipeta del electrodo de registro y la membrana de la célula (Figura 11). Dependiendo de la configuración adoptada, puede conseguirse desde que no se pierde la continuidad de la membrana, hasta el registro de corrientes generadas por canales iónicos integrados en esa membrana (Gómez Rodríguez and Fajardo Puig, 2018).

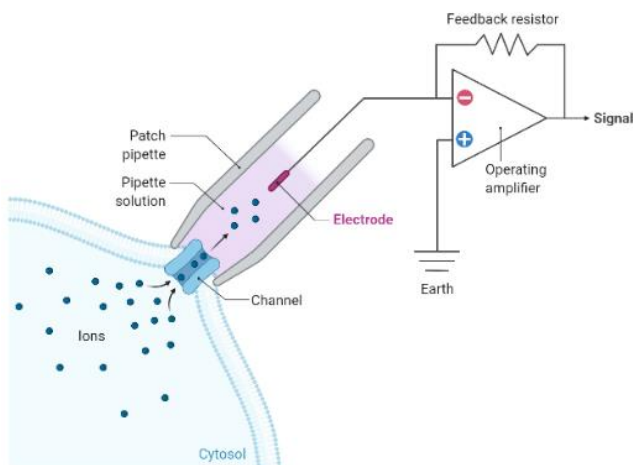


Figura 11: Esquema general de la técnica de patch-clamp. Se aprecia el estrecho contacto entre la pipeta del electrodo y la membrana celular (Creado con BioRender.com)

Esta técnica emplea una micropipeta de vidrio que debe ser preparada mediante el estiramiento de un capilar de vidrio hasta que su punta tenga una abertura de entre 1 y 5µm. La pipeta será rellena con una solución cuya composición dependerá del estudio o configuración de la técnica que se pretenda realizar. Dentro de la pipeta se introduce el electrodo, que debe ser de un metal noble como la plata, asegurando que este terminal quede bañado por la solución de la está llena la pipeta. El electrodo metálico tiene la función de conducir las fluctuaciones eléctricas hacia un amplificador de voltaje al que se encuentra conectado. Para poder registrar las propiedades electrofisiológicas de una sola célula, la neurona que se pretenda evaluar debe estar libre de tejido conectivo y otros restos celulares además de encontrarse aislada y separada de otras neuronas. Para proceder al registro, la punta de la pipeta debe colocarse con una determinada inclinación directamente sobre la membrana de la célula y se debe aplicar una presión negativa para absorber parte de la membrana hacia las paredes interiores de la micropipeta; gracias a esto se forma el llamado “giga-sello”, un sello o parche eléctrico de gran firmeza. La técnica recibe su nombre inglés “patch-clamp” debido ya que se fundamenta en la formación de un “parche” (“patch”) gracias al que se pueden “fijar” (“clamp”) corriente o voltaje, al igual que en los registros intracelulares clásicos (Pardillo Díaz, 2017)

4.5.1 Configuraciones de la técnica de patch-clamp

Las primeras aproximaciones de la técnica se diferencian en función de la fijación de corriente o voltaje.

Mediante la aproximación de fijación de corriente o current clamp, pueden estudiarse las características de las propiedades intrínsecas de la célula. En resumidas cuentas, fijando corriente, se registran las variaciones de voltaje (Lemus-Aguilar et al., 2006).

Mediante la aproximación de fijación de voltaje o voltage clamp, se pueden medir las corrientes iónicas y la cinética de canales únicos. En esta aproximación se pueden registrar las corrientes dependientes de voltaje aplicando comandos de amplitud y duración determinados. Se parte de la base de que en esta aproximación se eliminan o minimizan las corrientes capacitivas de la membrana, y, por tanto, se pueden obtener directamente las corrientes transmembrana que fluyen por los canales iónicos integrados en la membrana. Gracias a esta medida, se pueden dilucidar cuales son las

corrientes iónicas supraumbrales y subumbrales que controlan el disparo y la actividad celular. En resumidas cuentas, fijando voltaje, se registran las variaciones de corriente (Lemus-Aguilar et al., 2006).

Partiendo de las primeras aproximaciones, surgieron diferentes configuraciones. Todas tienen en común la necesidad de formación del giga-sello (Figura 12-B). La configuración que se emplee dependerá del objetivo y las necesidades propias de cada estudio (Pardillo Díaz, 2017):

- Configuración cell-attached o de célula adherida (Figura 12-B): Consiste en la formación del giga-sello. En esta configuración la pipeta queda completamente adherida a la membrana de la célula. Se consigue retirando la presión positiva de la pipeta cuando está justo sobre la célula. Permite estudiar canales iónicos en condiciones totalmente fisiológicas pues no hay rotura de membrana. Solo se usa en modo fijación de voltaje (Torres and Carrascal, 2014)
- Configuración whole-cell o célula entera (Figura 12-C): Tras formar el giga-sello, se aplica presión negativa (en forma de pulsos cortos y fuertes de succión) para romper la membrana y que esta quede ligeramente adherida al interior de la pipeta, de forma que quedan conectados el interior de la pipeta con el interior celular y aislados del medio exterior. Mediante esta técnica en configuración de voltaje se pueden medir corrientes macroscópicas y mediante fijación de corriente las propiedades intrínsecas de las células (González Rueda, 2013).
- Configuración patch perforado por antibióticos en célula entera (Figura 12-G): en esta configuración no se produce una rotura de la membrana. Gracias a la acción de un antibiótico, se forman poros en la membrana de la célula, a través de estos poros se consigue el contacto eléctrico. Permite estudiar lo mismo que la configuración whole-cell pero sin dializar la célula. (Torres and Carrascal, 2014)
- Configuración outside-out o de fuera hacia dentro (Figura 12-E): Tras conseguir la configuración whole-cell, la pipeta se retira lentamente de la célula de forma que queda adherida una porción de la membrana que se vuelve a unir sobre sí misma. Con esta configuración, se pueden registrar de canales individuales que queden en la porción de membrana extraída y estudiar el efecto de determinados factores sobre la cara extracelular de estos canales (Leech and Holz, 1994).

- Configuración inside-out o de fuera hacia dentro (Figura 12-F): Tras la formación del giga-sello, la pipeta se retira de la célula quedando adherida una porción de la membrana. Gracias a esta configuración se pueden llegar a evaluar las variaciones en los estados conformacionales de los canales iónicos de la membrana y estudiar el efecto de determinados factores sobre la cara intracelular de estos canales (Wulf and Pless, 2016).

4.5.2 Protocolo de la técnica de patch-clamp

La configuración de whole-cell o de célula entera es una de las que más se ha empleado gracias a que se pueden utilizar en configuración de voltaje y corriente y a que pueden evaluar parámetros tanto extra como intracelulares y características propias de la membrana sin las limitaciones principales de las técnicas intracelulares clásicas (Pardillo Díaz, 2017).

Debido a esto, y a que ha sido la configuración presenciada por el autor de esta memoria durante colaboraciones con el grupo CTS-562, Unidad de Neurobiología, este apartado se centrará en la configuración whole-cell.

Instrumental necesario

Para llevar a cabo registros electrofisiológicos mediante la técnica de patch-clamp es imprescindible contar con un equipamiento mínimo (Figura 13), que incluye (González Rueda, 2013):

Mesa antivibratoria	Microscopio de infrarrojos
Micromanipulador	Amplificador de señal eléctrica
Interfaz de datos	Ordenador o sistema de registro
Software de grabación	Cámara y pantalla de visualización
Bomba de perfusión	Fuente de gas carbógeno

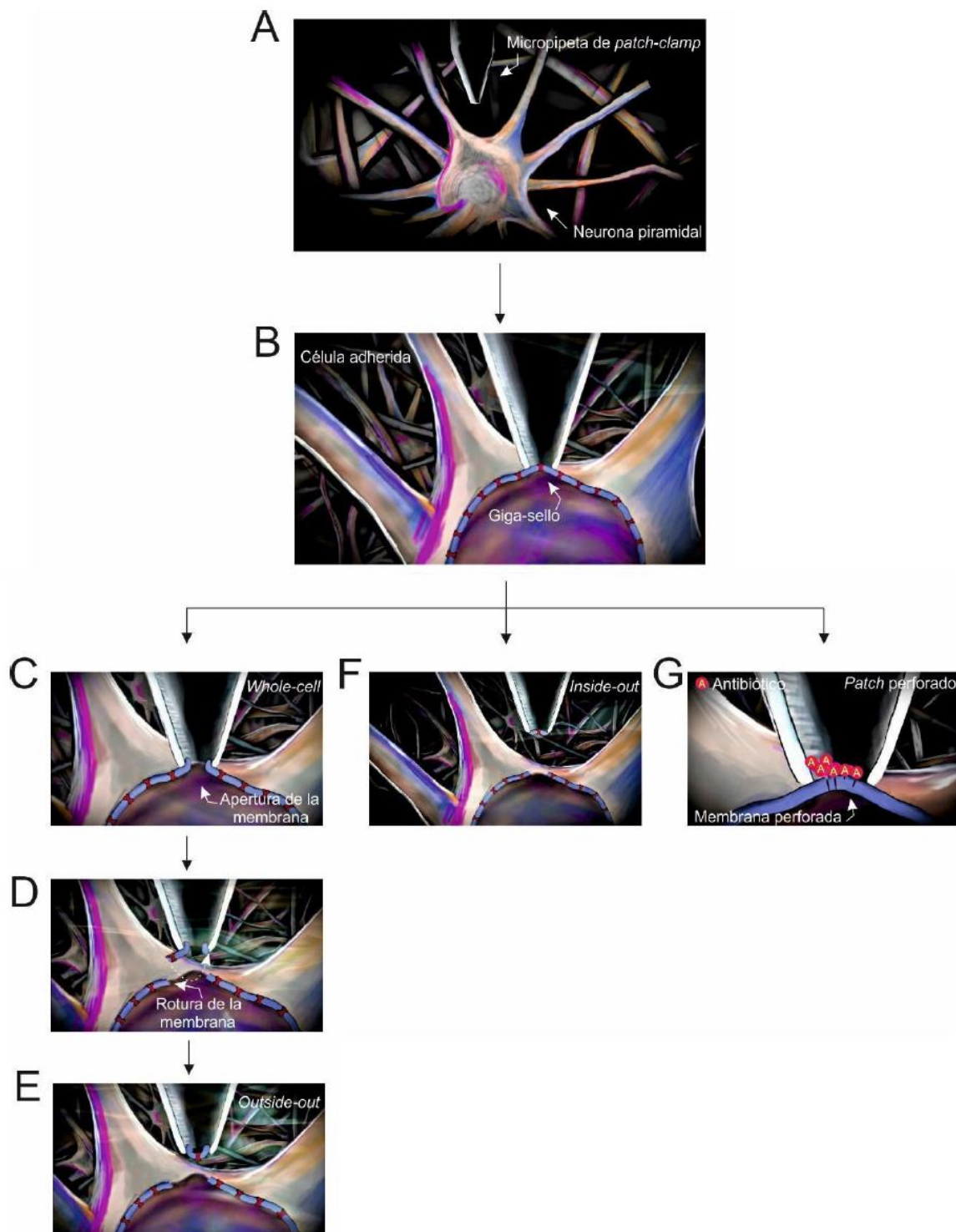


Figura 12: Esquematación de las diferentes configuraciones empleadas en la técnica de patch-clamp.

A: aproximación de la pipeta a una célula apropiada B: configuración Cell-attached. Adhesión de la pipeta a la célula y formación del "giga-sello". C: Configuración whole-cell o célula entera. D: Rotura de la membrana y separación previo a la configuración outside-out o de fuera hacia dentro. E: Configuración outside-out o de fuera hacia dentro. F: Configuración inside-out o de fuera hacia dentro. G: Configuración patch perforado por antibióticos en célula entera (Tomada de Pardillo Díaz, 2017; modificado de Torres and Carrascal, 2015).

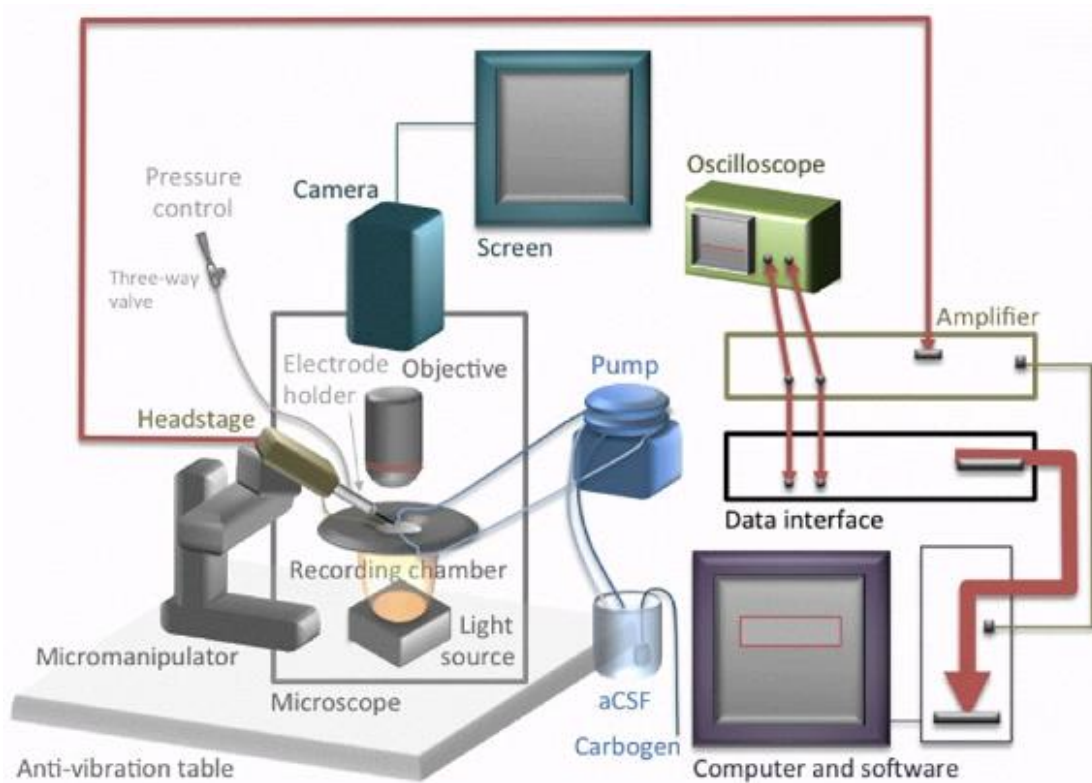


Figura 13: Esquema del material necesario. Instrumental empleado en la técnica de patch-clamp en su configuración whole-cell. La flecha roja indica la dirección que sigue la señal eléctrica (González Rueda, 2013).

Soluciones

En primer lugar, deben prepararse diferentes soluciones, tanto para la preparación de las muestras como para el propio registro. Cada laboratorio puede establecer sus propias soluciones. A continuación se expone una posibilidad

Preparación del líquido cefalorraquídeo artificial:

- Composición: NaCl 126 mM, NaHCO₃ 26,4 mM, glucosa 10 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 2 mM, y NaH₂PO₄ 1,25 mM.
- Preparación: Añadir todos los solutos en agua bidestilada mientras se mantiene agitación. Se suele preparar 1L de solución, que debe ser conservada a una temperatura de unos 4°C. Controlar que el pH se encuentre en unos valores de entre 7,2 y 7,3, si fuese necesario ajustar pH con HCl o KOH. Antes de grabar, se introduce la solución en un recipiente con hielo y se burbujea con gas carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) (González Rueda, 2013).

Preparación del líquido intracelular

- Composición: gluconato de Cs 117 mM, HEPES 20 mM, EGTA 0,4 mM, NaCl 2,8 mM, cloruro de tetraetilamonio (TEA) 5 mM,
- Preparación: Se comienza preparando una solución de gluconato de Cs de 117 mM mezclando 4,62 g de ácido D-glucónico y con 3,54 g de CsOH. Se agrega agua bidestilada hasta 90 ml y se deja equilibrar durante unos 30 min. Añadir los ingredientes sólidos (HEPES, EGTA, NaCl, cloruro de tetraetilamonio). Adicionar agua bidestilada hasta los 97 ml. Ajustar el pH de la solución con CsOH al 50% hasta un pH de 7,2 - 7,3. Con la ayuda de un osmómetro, verificar la osmolaridad corrigiéndola si fuese necesario con agua bidestilada hasta los 280 - 285 mOsm. Preparar alícuotas de 1000 μ l y conservarlas a -20 °C o temperaturas inferiores. Durante el proceso de elaboración, se debe mantener todo el instrumental y la solución en frío con la ayuda de hielo (Segev et al., 2016).

Preparación del tejido sujeto a registro

Aunque se puedan emplear células provenientes de líneas celulares, por lo general se suele emplear tejido ex-vivo, como por ejemplo rodajas de cerebro de un grosor micrométrico. Para conseguir las rodajas, se emplea un vibratomo (Figura 14-A). Por ser el mamífero de experimentación por excelencia, se suelen emplear modelos murinos en estas experimentaciones (Segev et al., 2016).

Se comienza anestesiando, sacrificando y perfundiendo al animal con el líquido cefalorraquídeo artificial para posteriormente extraerle el cerebro libre de restos de sangre. Se coloca el órgano en la cámara de corte del vibratomo sumergido en el líquido cefalorraquídeo artificial a una temperatura de entre 1 y 4°C. Se cortan rodajas transversales del cerebro (Figura 14-B) y las que presenten estructuras de interés, son transferidas a una cámara de incubación (Figura 14-C), donde permanecerán al menos 30 minutos a una temperatura de 32°C mientras se burbujea con gas carbógeno (Torres and Carrascal, 2014).



Figura 14: Instrumental para la preparación del tejido. A: instrumento vibratomo preparado para su funcionamiento. B: rodajas transversales de cerebro murino en la cámara de corte del vibratomo. C: colocación de las rodajas en la cámara de incubación. (Torres and Carrascal, 2014).

Preparación de la micropipeta

Las micropipetas de vidrio de borosilicato deben acabar en una punta con una abertura de entre 1 y 5 μ m. Debido a esto, la punta es verdaderamente frágil, por lo que deben prepararse a partir de un capilar cilíndrico de

1mm de diámetro exterior y unos 0'6mm de diámetro interior justo en el momento del registro (Pardillo Díaz, 2017). Para ello, se emplea un instrumento llamado puller (Figura 15), que puede ser vertical y horizontal. Este instrumento aplica un pulso de calor a través de una resistencia, y al estar el capilar en tensión, se estirará dejando preparadas dos micropipetas. Estas micropipetas se rellenan con la solución



Figura 15: Puller vertical. Instrumento empleado en la preparación de micropipetas (Pardillo Díaz, 2017)

intracelular de gluconato justo antes de ser colocadas en el soporte del electrodo (Segev et al., 2016). Los requisitos que deben cumplir las micropipetas para la configuración whole-cell es tener una punta firme y uniforme sin bordes cortantes, que la disminución de su diámetro sea uniforme y que la resistencia que generen sea de entre 3 y 5 M Ω para la aproximación de fijación de voltaje y de entre 5 y 7M Ω para la aproximación de fijación de corriente (Figura 16) (Pardillo Díaz, 2017).



Figura 16: Pipeta correcta. Imagen que establece la diferencia entre la punta de una micropipeta válida para formar parte del electrodo de la técnica y una que debería ser descartada (Modificada de Pardillo Díaz, 2017).

Registro de propiedades electrofisiológicas en la configuración whole-cell

Una vez seleccionada una rodaja que haya permanecido al menos 30 minutos en la cámara de incubación, se traslada a la cámara de registro. Esta cámara debe ser alimentada de líquido cefalorraquídeo artificial con una bomba a un flujo constante de 1 a 2 mL/min. Para evitar que la rodaja se mueva, se coloca una rejilla de nailon que encaja por presión en la cámara de registro (Torres and Carrascal, 2014). Con la ayuda del microscopio, se busca una célula apta para ser sometida a registro. Una vez localizada, se coloca la pipeta de vidrio en el soporte, se introduce en el baño manejándola con el micromanipulador y se mide la resistencia que presenta. Con el objetivo a una altura suficiente, se enfoca la punta. Tras sumergir la pipeta, se debe aplicar ligeramente presión positiva a través del sistema de control de presión y mantener dicha presión en la pipeta cerrando la válvula de tres vías que está acoplada al circuito. Acercar la pipeta a la rodaja moviendo la micropipeta con ayuda del micromanipulador y controlando la altura de la pipeta en la pantalla. Cuando la pipeta se encuentre cerca de la superficie del tejido, se disminuye la velocidad de movimiento del micromanipulador y se sitúa la punta de la micropipeta justo sobre la célula que se pretende registrar apreciando la formación de un hoyuelo en la célula. Establecer el modo de fijación de voltaje y corregir el desplazamiento del electrodo para que las corrientes medidas en ese punto se consideren como 0 pA. El software debe mostrar un pulso cuadrado previo a la prueba de sellado (Figura 18). La amplitud del pulso dependerá de la resistencia de la pipeta. Se libera la presión positiva para obtener el sello (González Rueda, 2013). Una vez que se haya formado un sello, se fija el voltaje en un valor negativo cercano al potencial de reposo esperado de la célula (-70 a -80 mV) y se corrige la capacitancia rápida. Para romper la membrana, se pueden aplicar pulsos de succión cortos y ligeros con una jeringa (o con la boca). Si la membrana no se rompe, se puede intentar aplicar una succión más fuerte o aplicar pulsos eléctricos breves a través de la pipeta si el amplificador tiene la capacidad para realizarlo (Segev et al., 2016). Una vez se establezca la configuración whole-cell y el interior celular y la pipeta sean un continuo, el pulso que antes era prácticamente plano pasa a una forma característica que puede apreciarse en la figura 18 (Torres and Carrascal, 2014).

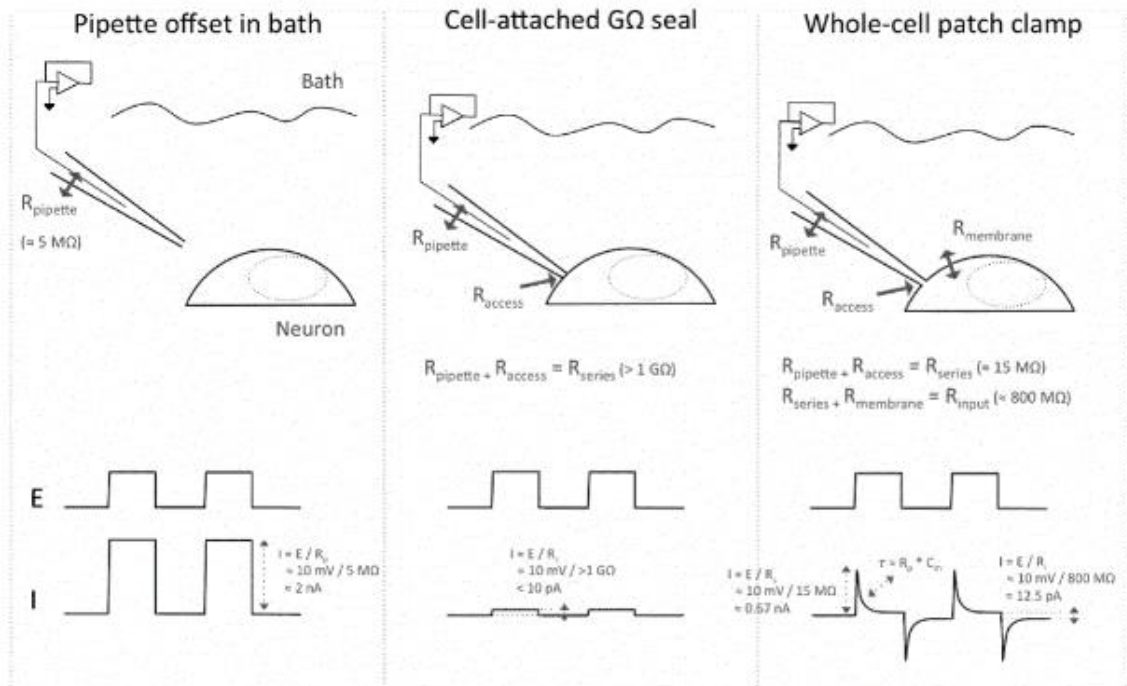


Figura 18: Evolución del pulso registrado. Fluctuaciones del pulso durante el proceso de formación del sello, en el que se aprecia lo que debe mostrar el registro osciloscópico al conseguir la configuración cell-attached y whole-cell (González Rueda, 2013).

La membrana de la célula actúa como un condensador, por lo que, cuando la pipeta acceda al interior celular, el sistema de registro debería mostrar una caída exponencial. Ese es el momento de comenzar a evaluar las propiedades electrofisiológicas (González Rueda, 2013).

Valores sujetos a registro en la configuración whole-cell

La aproximación de fijación de corriente en la técnica de patch-clamp es exclusiva de la configuración whole-cell, y se pueden evaluar:

- Potencial de membrana de reposo: se define como la diferencia de voltaje que se da entre las caras extra e intracelular de la membrana de la célula. Se puede medir observando el valor de potencial negativo que se registra al acceder a la célula (Manz et al., 2021).
- Resistencia a la entrada de corriente: determina la facilidad o dificultad con la que las corrientes iónicas fluyen a través de la membrana. Es una magnitud que cuantifica los cambios pasivos del potencial de membrana. Para evaluarla, se aplican a la célula pulsos de corriente hiperpolarizantes con una diferencia entre ellos de 10 pA. La resistencia se calcula matemáticamente a partir de la pendiente de la recta

que se genera al representar intensidad (pA) frente a voltaje (mV) (Torres and Carrascal, 2014).

- Constante de tiempo de membrana: por definición, se calcula como el tiempo que tarda en alcanzar el 63% del valor máximo de potencial al que puede llegar tras aplicar un pulso despolarizante. Determina el pulso temporal de las variaciones del potencial de membrana (Torres and Carrascal, 2014).
- Reobase: valor mínimo de intensidad que debe tener una corriente despolarizante aplicada a la célula para generar un potencial de acción (Manz et al., 2021). Para conocerlo, se deben aplicar pulsos sucesivos de 100 milisegundos aumentando la intensidad en 5pA por cada pulso (Torres and Carrascal, 2014).
- Frecuencia máxima y ganancia de disparo: intensidad del pulso de corriente despolarizante que genera la mayor frecuencia de disparo antes de que la neurona deje de generar dichos disparos. Para estudiarla se aplican pulsos de un segundo con pasos de entre 10 y 50 pA. Evalúa la capacidad de la neurona de generar pulsos repetitivos. La ganancia, se calcula matemáticamente como la pendiente de la recta que se obtiene al representar la frecuencia (PA/seg) frente a la corriente (pA) (Torres and Carrascal, 2014).

Mediante la aproximación de fijación de voltaje en la configuración whole-cell, se puede evaluar la intensidad de las corrientes generadas por eventos sinápticos mediados por neurotransmisores (Manz et al., 2021). Bloqueando todos los receptores de neurotransmisores salvo el sometido a estudio, se pueden registrar transitorios de corrientes que provienen de la unión del neurotransmisor a su receptor (Torres and Carrascal, 2014).

4.5.3 Avances de la técnica de patch-clamp

Automatización de la técnica de patch-clamp

La electrofisiología de patch clamp tiene un gran potencial para proporcionar información compleja con un alto grado de resolución; sin embargo, una de las principales limitaciones de la técnica, es su dificultad de ejecución, lo que ha restringido su difusión (Anecchino and Schultz, 2018). La automatización ha sido posible gracias a un software que genera un movimiento gradual de la pipeta. Las células se detectan automáticamente mediante un aumento de la resistencia en la punta de la pipeta. Se

está estudiando la posibilidad de que los sistemas automatizados incorporen una guía de imágenes mediante el uso de microscopía multifotónica de fluorescencia. Otras mejoras incluyen el diseño de un algoritmo para evitar obstáculos antes de llegar a la célula objetivo. También se encuentran en desarrollo sistemas automatizados de pipetas múltiples para estudiar las conexiones sinápticas pinzando simultáneamente al menos dos células que se encuentren conectadas entre sí (Koos et al., 2021).

Técnica de patch-seq

La metodología de patch-seq combina los métodos de registro unicelular con el estudio transcriptómico. Proporciona una visión de las relaciones subyacentes entre la expresión génica y la función neuronal, como la diversidad de tipos de células, trayectorias de desarrollo, diferenciación y estado de actividad (Lipovsek et al., 2020). Los experimentos patch-seq comienzan con registros típicos de patch-clamp de neuronas individuales para caracterizar sus propiedades electrofisiológicas. Una vez registradas, el citosol se aspira en la pipeta de registro. El objetivo es recolectar el contenido celular manteniendo un sello eléctrico estable entre la pipeta y la membrana celular, evitando así la contaminación con la solución extracelular. Tras la recolección, el contenido celular se deposita en tubos individuales que contienen tampón y se procede a su secuenciación (Lipovsek et al., 2021).

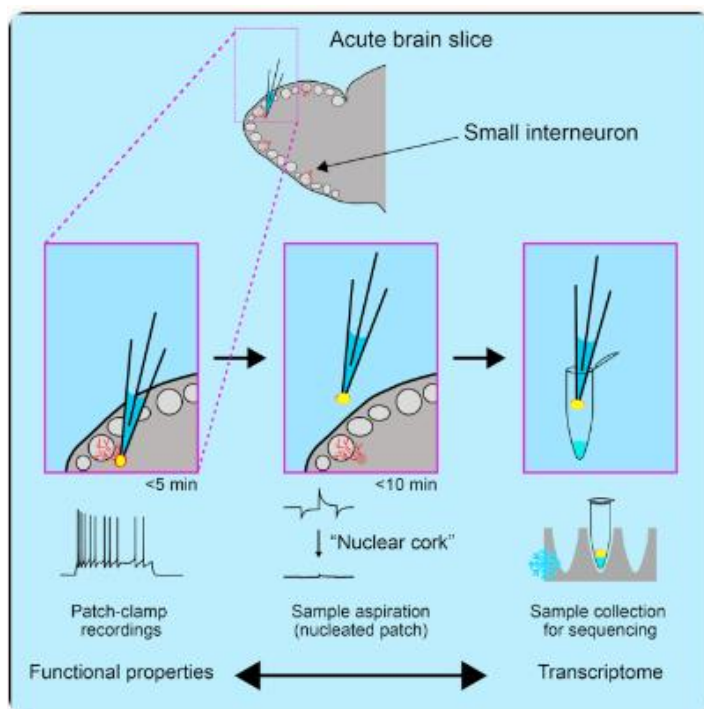


Figura 19: Patch-seq. Esquema de los pasos a seguir para realizar la metodología de patch-seq (Lipovsek et al., 2020)

5. CONCLUSIONES

1. El funcionamiento del sistema nervioso siempre ha supuesto una gran incógnita que muchos autores han intentado dilucidar, sobre todo desde que se le atribuyó al cerebro la función del pensamiento.
2. El desarrollo de las técnicas para el estudio de la fisiología neuronal basándose en las propiedades eléctricas ha supuesto un gran avance para llegar a comprender el funcionamiento de las neuronas, así como determinar características propias de patologías que pueden alterar esta función fisiológica.
3. En la actualidad, la metodología de patch-clamp es la técnica que ha conseguido un mayor grado de resolución en lo que a registro de propiedades electrofisiológicas de las células neuronales se refiere.
4. A pesar de que la técnica de patch-clamp consigue un alto grado de resolución y es capaz de registrar un gran número de parámetros, los investigadores continúan procurando mejoras como la automatización o acoplamientos a otras técnicas como la secuenciación del genoma para seguir indagando en el campo de la neurociencia.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcocer-Maldonado JL. El cerebro en el libro *De Humani Corporis Fabrica*, de Andrés Vesalio. *Acta Médica Grupo Ángeles* 2015;13:199–205.
- Alonso JR. El axón gigante del calamar. *Neurociencia Con José Ramón Alonso* 2015. Disponible en: <https://jralonso.es/2015/12/01/el-axon-gigante-del-calamar/>
- Álvarez Cordero R. Los misterios del cerebro humano. *Revista de La Facultad de Medicina*. vol.56 no.5 Ciudad de México (México) 2013.
- Anecchino LA, Schultz SR. Progress in automating patch clamp cellular physiology. *Brain and Neuroscience Advances* 2018;2. <https://doi.org/10.1177/2398212818776561>.
- Bock O. Cajal, Golgi, Nansen, Schäfer and the Neuron Doctrine. *Endeavour* 2013;37:228–34. <https://doi.org/10.1016/J.ENDEAVOUR.2013.06.006>.

- Campohermoso Rodríguez OF, Soliz Soliz R. Herófilo y Erasítrato, Padres de la Anatomía. Campohermoso O, Soliz R, Campohermoso O Herófilo y Erasítrato, Padres de La Anatomía Cuad Hosp Clín 2009;54:137-140 2009:137–40.
- Charroo Portilla O, Cantalapiedra Luque2 Alis, Torres Quiala M, Fernandez Ortega M, Fuentes Prats RA, García Pérez A, et al. Neurotransmisores | Charroo Portilla | Revista Información Científica. Revista Información Científica 2006;52.
- Choi JS, Lee HJ, Rajaraman S, Kim DH. Recent advances in three-dimensional microelectrode array technologies for in vitro and in vivo cardiac and neuronal interfaces. Biosensors and Bioelectronics 2021;171:112687. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112687>.
- Clay JR. Axonal excitability revisited. Progress in Biophysics and Molecular Biology 2005;88:59–90. <https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2003.12.004>.
- Di Credico A, Gaggi G, Izzicupo P, Ferri L, Bonanni L, Iannetti G, et al. Real-Time Monitoring of Levetiracetam Effect on the Electrophysiology of an Heterogenous Human iPSC-Derived Neuronal Cell Culture Using Microelectrode Array Technology. Biosensors 2021, Vol 11, Page 450 2021;11:450. <https://doi.org/10.3390/BIOS11110450>.
- Escobar Ferreyra A. Bioelectricidad y potencial de membrana. DocPayer 2017:40–3. <https://docplayer.es/21091934-Bioelectricidad-y-potencial-de-membrana.html> (accessed June 2, 2022).
- García Sacristán A. Otto Loewi: one hundred years of confirmation of chemical neurotransmission. Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia 2021:135–9. <https://doi.org/10.53519/ANALESRANF.2021.87.02.03>.
- Gómez Rodríguez D, Fajardo Puig D. Fundamentos de la técnica patch-clamp. Departamento de fisiología. Universidad Complutense de Madrid: 2018.
- González Rueda A. Whole Cell Patch Clamp Protocol. University of Cambridge 2013. Disponible en: <https://axolbio.com/publications/whole-cell-patch-clamp-protocol/>

- Guillery RW. Relating the neuron doctrine to the cell theory. Should contemporary knowledge change our view of the neuron doctrine? *Brain Research Reviews* 2007;55:411–21. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2007.01.005>.
- Koos K, Oláh G, Balassa T, Mihut N, Rózsa M, Ozsvár A, et al. Automatic deep learning-driven label-free image-guided patch clamp system. *Nature Communications* 2021;12. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-21291-4>.
- Kotsias BA. El axón gigante de calamar. Facultad de medicina. Universidad de Buenos Aires: 2006.
- Krouchev NI, Rattay F, Sawan M, Vinet A. From Squid to Mammals with the HH Model through the Nav Channels' Half-Activation-Voltage Parameter. *PLoS ONE* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0143570>.
- Leech CA, Holz GG. Application of Patch Clamp Methods to the Study of Calcium Currents and Calcium Channels. *Methods in Cell Biology* 1994;40:135–51. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61113-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61113-9).
- Lemus-Aguilar I, Bargas J, Tecuapetla F, Galárraga E, Carrillo-Reid L. Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 2006;27:82–92.
- Lipovsek M, Bardy C, Cadwell CR, Hadley K, Kobak D, Tripathy SJ. Patch-seq: Past, Present, and Future. *The Journal of Neuroscience* 2021;41. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1653-20.2020>.
- Lipovsek M, Browne L, Grubb MS. Protocol for Patch-Seq of Small Interneurons. *STAR Protocols* 2020;1. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2020.100146>.
- Manz KM, Siemann JK, McMahon DG, Grueter BA. Patch-clamp and multi-electrode array electrophysiological analysis in acute mouse brain slices. *STAR Protocols* 2021;2. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2021.100442>.
- Mariño J, Schummers J, Sur M. Combinación de nuevas técnicas electrofisiológicas y de imagen en el estudio de la función de la corteza visual primaria. *Revisiónes En Neurociencia* 2003;36:944–50.

- Mejía Merino WR. Medir unidades individuales: su importancia en la neuroelectrofisiología y otras consideraciones. *Revista Hondureña de Neurociencias* 1998;2:58–65.
- Van Middendorp JJ, Sanchez GM, Burridge AL. The Edwin Smith papyrus: A clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *European Spine Journal* 2010;19:1815–23. <https://doi.org/10.1007/S00586-010-1523-6/TABLES/1>.
- Moreno V, Ramírez ME, de la Oliva C, Moreno E. Biografía de Luigi Galvani 2019. <https://www.buscabiografias.com/biografia/verDetalle/4575/Luigi%20Galvani> (accessed April 6, 2022).
- Müller-Putz GR. *Electroencephalography*. vol. 168. Elsevier; 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63934-9.00018-4>.
- Noguchi A, Ikegaya Y, Matsumoto N. In Vivo Whole-Cell Patch-Clamp Methods: Recent Technical Progress and Future Perspectives. *Sensors* 2021, Vol 21, Page 1448 2021;21:1448. <https://doi.org/10.3390/S21041448>.
- Novo C, Chacón Guitiérrez L, Barradas Bribiesca JA. Mapeo Electroencefalográfico y Neurofeedback. 2010, Page 371-412 Chapter: XIII ReserchGate
- Obien MEJ, Deligkaris K, Bullmann T, Bakkum DJ, Frey U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in Neuroscience* 2015;9:423. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2014.00423/BIBTEX>.
- Pardillo Díaz, R. (2017). Efectos del estrés oxidativo sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales de la corteza motora. (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Piccolino M. Luigi Galvani's path to animal electricity. *Comptes Rendus Biologies* 2006;329:303–18. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2006.03.002>.
- Piccolino M. Luigi Galvani and animal electricity: two centuries after the foundation of electrophysiology. *Trends in Neurosciences* 1997;20:443–8. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01101-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01101-6).

- Ramos-Argüelles F, Morales G, Egozcue S, Pabón RM, Alonso MT. Técnicas básicas de electroencefalografía: principios y aplicaciones clínicas. *An Sist Sanit Navar* 2009;32:69–82.
- Romero Reverón R. Erasistratus de Ceos (310-250 A.C.). Pionero de los Estudios Anatómicos. *Int J Morphol* 2008;26 (4):823–4.
- Sánchez López J, Gómez González JM. Clasificador de Disparos Neuronales Contenidos en Registros Extracelulares. (Tesis Doctoral Inédita). Facultad de ingeniería, Universidad autónoma de Mexico, 2014.
- Sánchez Silva DJ. Andrés Vesalio y Leonardo Da Vinci: dos artistas viendo al hombre durante el renacimiento. *Revista Electrónica de PortalesMédicos.com*; 2008.
- Segev A, Garcia-Oscos F, Kourrich S. Whole-cell Patch-clamp Recordings in Brain Slices. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 2016;2016:24–54. <https://doi.org/10.3791/54024>.
- Seyfarth EA. Julius Bernstein (1839-1917): Pioneer neurobiologist and biophysicist. *Biological Cybernetics* 2006;94:2–8. <https://doi.org/10.1007/S00422-005-0031-Y>.
- Torres Torrelo J, Carrascal Moreno L. Estudio de la fisiología neuronal mediante la técnica patch-clamp. ISBN: 978-84-16326-03-7. Departamento de Fisiología. Universidad de Sevilla. 2014.
- Windhorst U, Johansson H. *Modern Techniques in Neuroscience Research*. vol. 1. 7ª. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-58552-4>.
- Wulf M, Pless SA. Patch Clamp Fluorometry in Outside-Out Patches for Ligand-Gated Ion Channels. *Biophysical Journal* 2016;110:602a. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2015.11.3215>.