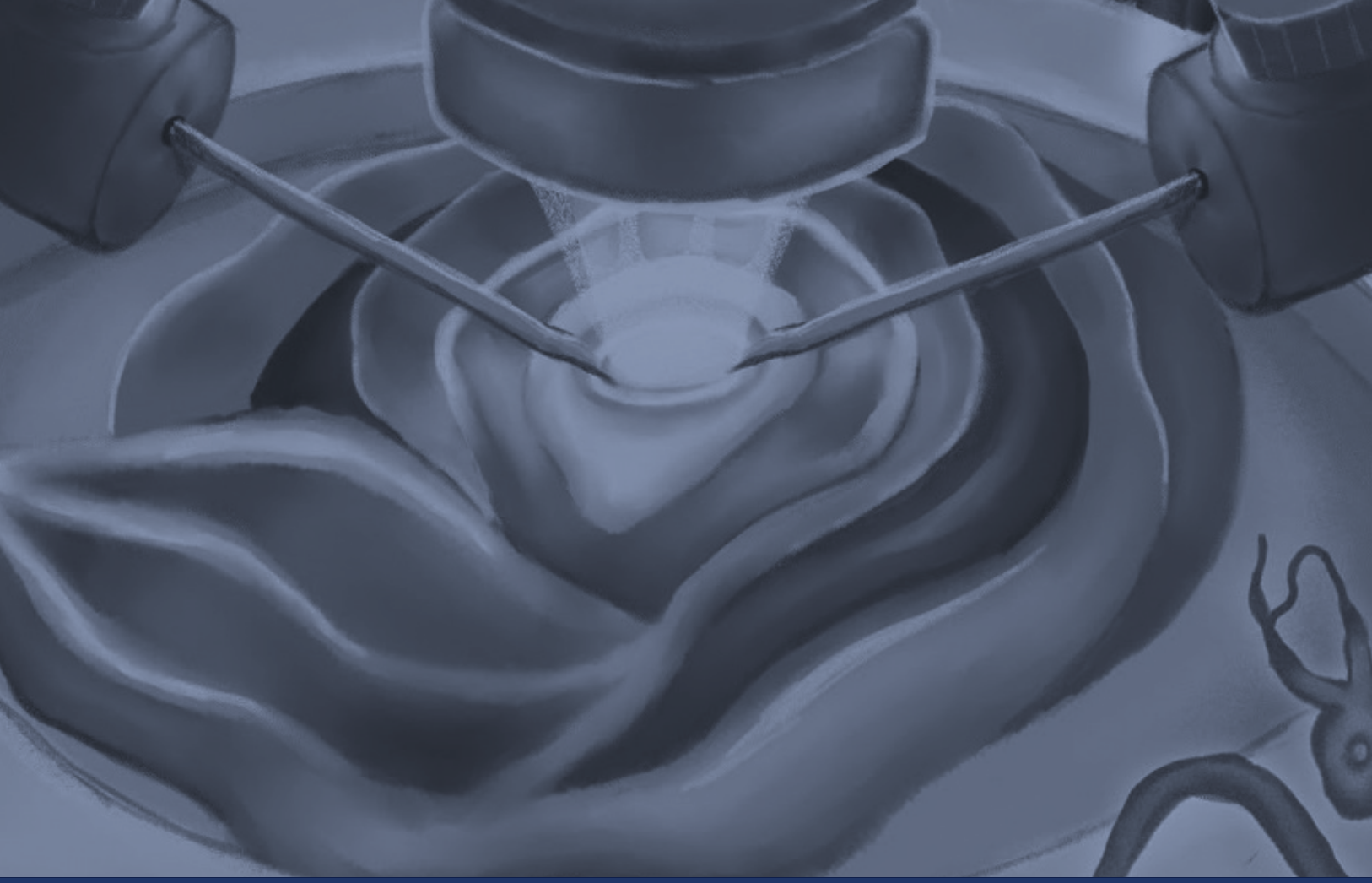


Portafolio

Registro electrofisiológico mediante patch clamp: una herramienta para explorar el lenguaje de las neuronas

Monserrat Armenta Resendiz

Registro electrofisiológico mediante patch clamp: una herramienta para explorar el lenguaje de las neuronas

Monserrat Armenta Resendiz[1]

https://doi.org/10.25009/rmuv.v26i1.11

[1]Investigadora adscrita al Instituto de Ciencias de la Salud. Departamento de Adicciones. correo: marmenta@uv.mx

Uno de los progresos más significativos en la historia de la neurociencia actual y de la fisiología celular es el método del "*patch-clamp*" que se refiere a la técnica de fijación en parche de membrana. Aunque esta técnica fue creada en la década de 1970 por dos biofísicos alemanes Bert Sakmann y Erwin Neher, quienes recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1991 por dicho aporte, tiene sus fundamentos desde los primeros estudios sobre la electrofisiología realizados por Luigi Galvani en el siglo XVIII, como su clásico experimento del movimiento de las ancas de rana al estimular los nervios con electricidad, estos experimentos inspiraron a toda una generación de científicos y artistas como Mary Shelley para la creación de su famosísima novela *Frankenstein*. Más adelante, en la década de 1950 Alan Hodgkin y Andrew Huxley establecieron un modelo a partir de ecuaciones diferenciales y lograron describir cómo se inician y transmiten los potenciales de acción en las neuronas, gracias a sus experimentos con el axón gigante del calamar. Con estas bases Sakmann y Neher propusieron esta técnica y desde ese momento, se ha vuelto una herramienta fundamental para entender la actividad de los canales iónicos y las células excitables como las neuronas y las células musculares (esqueléticas, lisas y cardiacas). La versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación en múltiples campos, desde la farmacología hasta la medicina traslacional. Este portafolio pretende hacer una breve descripción de su aplicación para conocer la actividad de las neuronas corticales.

¿Qué son los canales iónicos y las células excitables?

Los canales iónicos son proteínas incrustadas en la membrana celular que permiten el paso de iones, los cuales son moléculas con carga eléctrica, ya sea positiva (cationes) o negativa (aniones), como el sodio, el potasio, el cloruro y el calcio. Este flujo de iones permite que las células modifiquen su carga eléctrica, pasando de un potencial de membrana en reposo de aproximadamente –70 mV, es decir, un estado de electronegatividad, a un estado de excitación. Durante este proceso, los canales iónicos de sodio se abren y permiten la entrada de este ion a la célula, lo que provoca la despolarización de la membrana (disminución de la carga eléctrica negativa, ya que el sodio posee carga positiva). Este cambio lleva al potencial de membrana a valores positivos, generando así un potencial de acción. Las células excitables son aquellas que presentan un potencial de membrana en reposo electronegativo y tienen la capacidad de generar potenciales de acción.

¿Qué es el *patch clamp* y cómo funciona?

El principio del *patch-clamp* consiste en registrar las corrientes eléctricas generadas por el movimiento de iones a través de los canales de la membrana, utilizando una micropipeta de borosilicato, que es un vidrio especial, llena con una solución fisiológica. Cuando la punta de la pipeta hace contacto con la membrana y se aplica una ligera succión, se forma un sello hermético de alta resistencia que aísla eléctricamente el parche. A partir de ese punto, la técnica puede tener diferentes modalidades como: registrar corrientes de canales individuales *(single-channel recording*), romper la membrana bajo la pipeta para obtener acceso al interior de la célula (*whole-cell recording*) o exponer la cara interna o externa del canal mediante las configuraciones i*nside-out y outside-out*.

La técnica requiere equipamiento especializado, lo principal es un microscopio óptico con contraste diferencial o infrarrojo, micromanipuladores de alta precisión, un amplificador, un Digidata o digitalizadores de alta resolución y bajo ruido y soluciones fisiológicas



Figura 1. Microscopio óptico con contraste diferencial o infrarrojo

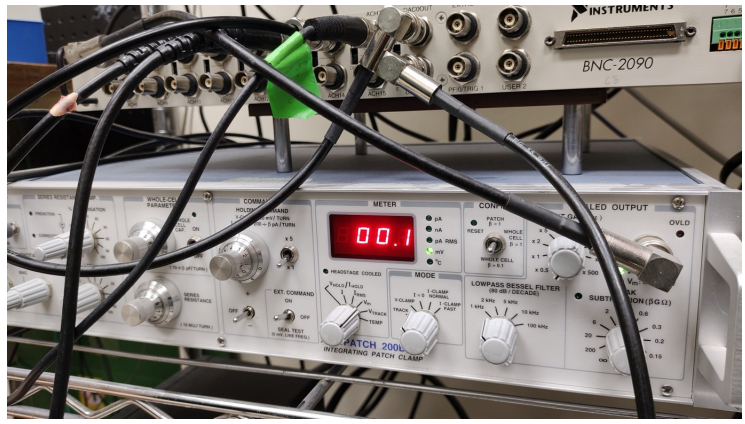


Figura 2. Amplificador y digitalizador de bajo ruido (Digidata)

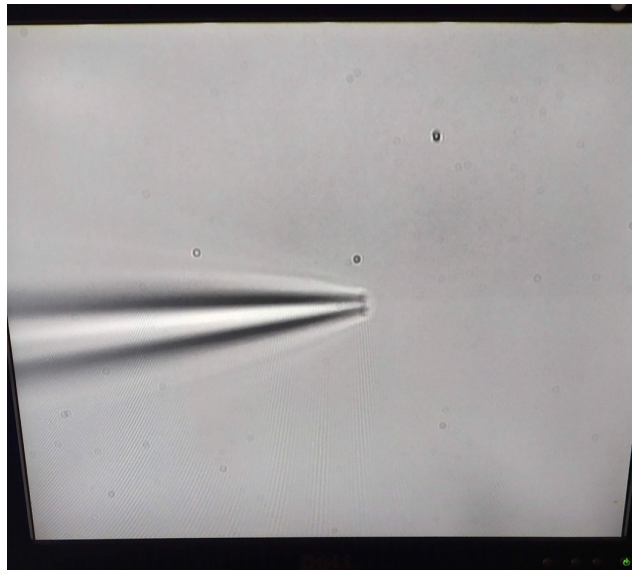


Figura 3. Estructura de la pipeta de borosilicato vista bajo el microscopio mediante luz infrarroja de contraste.

cuidadosamente formuladas algunas pueden ser consideradas líquido cefalorraquídeo artificial. Las micropipetas (resistencia 3–10 MΩ) se fabrican a partir de capilares de borosilicato y se llenan con una solución interna que imita la composición citoplasmática.

El protocolo básico consiste en:

- Preparación celular (cultivo, rebanadas de cerebro u otra clase de tejidos).
- Identificación de las células mediante contraste diferencial o infrarrojo.
- Posicionamiento de la pipeta sobre la membrana.
- Formación del sello gigohm o *gigaseal* mediante succión suave y acceso a la célula completa (opcional, rompiendo la membrana bajo la pipeta). Registro y análisis mediante software especializado.

En la corteza prefrontal medial (CPFm), esta técnica se aplica para estudiar las propiedades eléctricas de dos tipos neuronales fundamentales. Por un lado, las neuronas principales que son neuronas piramidales, excitadoras y glutamatérgicas, localizadas principalmente en las capas II/III y V; y por otro lado las interneuronas GABAérgicas, inhibidoras, con morfologías y patrones de disparo diversos que se encargan de controlar el balance entre la excitación y la inhibición. Los registros de célula completa en neuronas han permitido describir sus propiedades pasivas, la excitabilidad intrínseca y actividad espontánea y evocada que refleja la integración sináptica que subyace a procesos como la atención, la memoria de trabajo, la inhibición, etc. Esta técnica sin duda es indispensable para entender la fisiología celular, sin embargo sus limitaciones pueden deberse a que es una técnica *ex vivo* fundamentalmente, sin embargo, el uso combinado de *patch-clamp* con otras técnicas de manipulación genética como la optogénetica, animales CRE-dependientes, el uso de herramientas quimiogenéticas como los DREADDS (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) han permitido hacer manipulaciones más específicas y tener la posibilidad de estudiar los mecanismos que subyacen a la actividad neuonal de manera más avanzada.

Figura 4.
Página siguiente: Obtención de rebanadas coronales de cerebro de rata, se puede observar en verde la corteza prefrontal medial que fue previamente infectadas con un vector viral conjugado con la proteína verde fluorescente. Estos cortes fueron realizados con un vibratomo y líquido cefalorraquídeo artificial con baja concentración de Calcio (Ca2+) y alta de Magnesio (Mg2+) para inhibir la actividad sináptica.



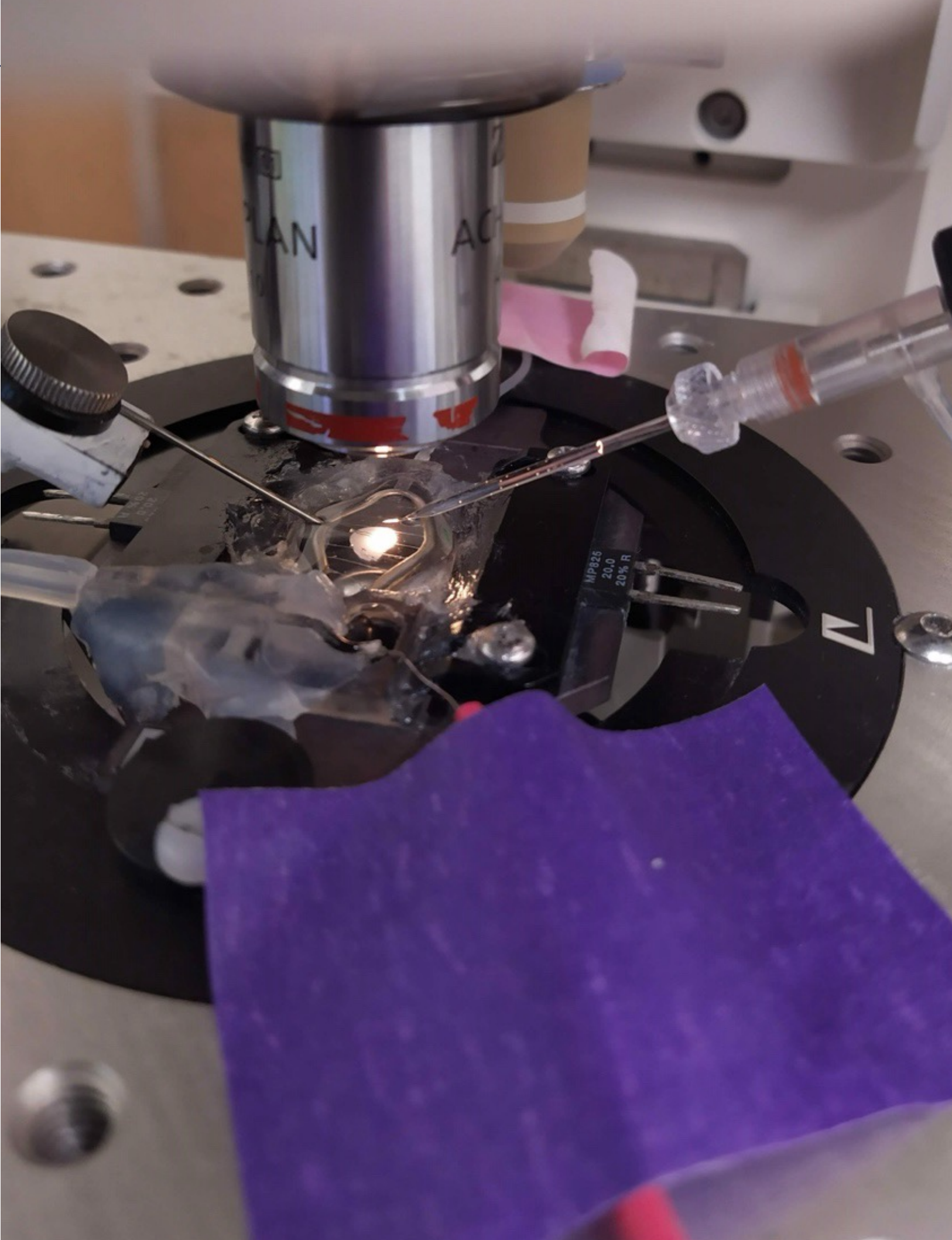

MP825
20,0
20% R

Figura 5. Página anterior. Se coloca la rebanada de cerebro en la cámara de registro, donde se hace pasar un flujo continuo de líquido cefalorraquídeo artificial que puede ir acompañado de diferentes fármacos o sustancias experimentales. En esta fotografía se aprecia el electrodo de estimulación (izquierda) y el electrodo de registro (derecha).

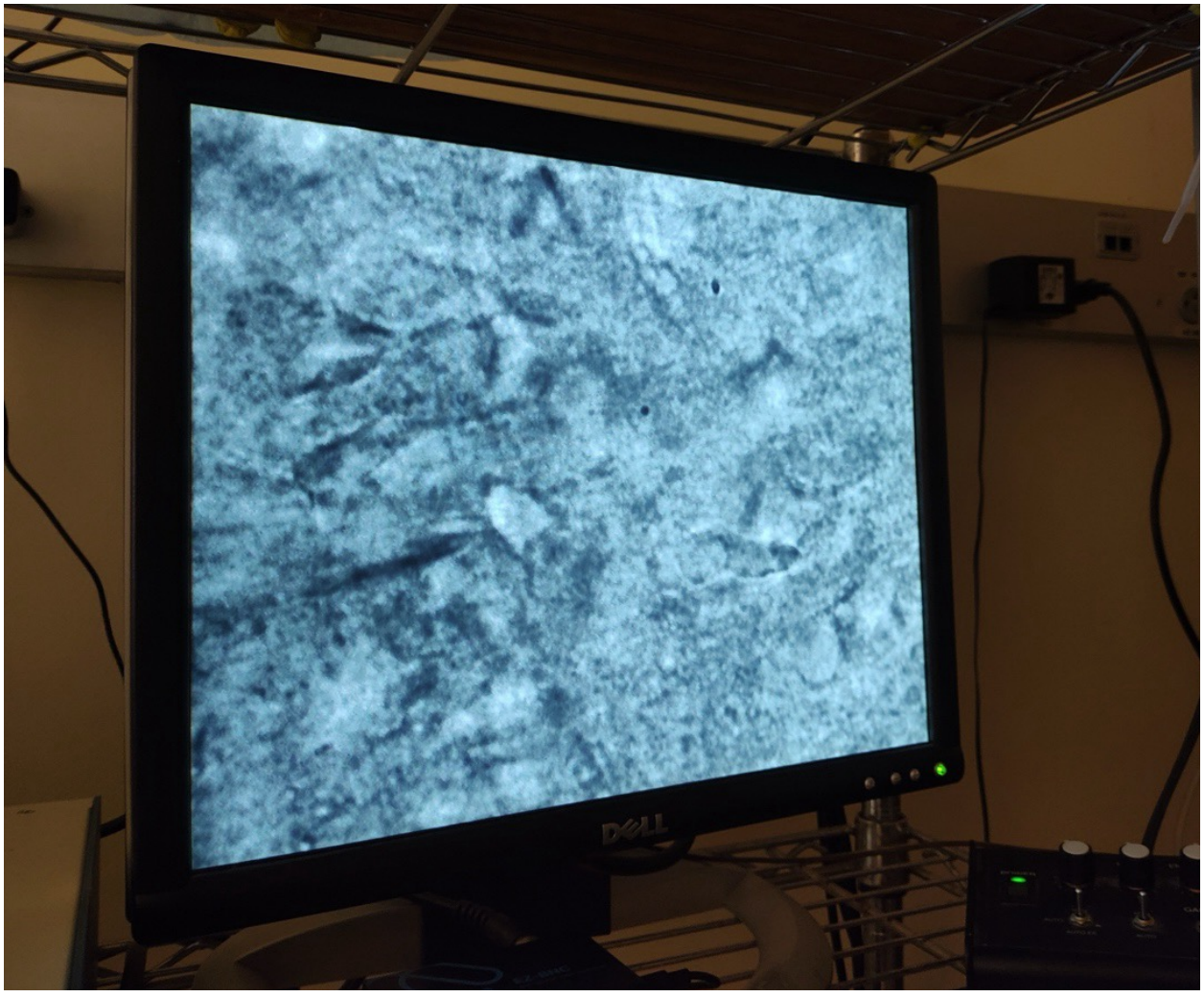


Figura 6. Identificación de las neuronas con luz infrarroja de contraste o mediante fluorescencia.

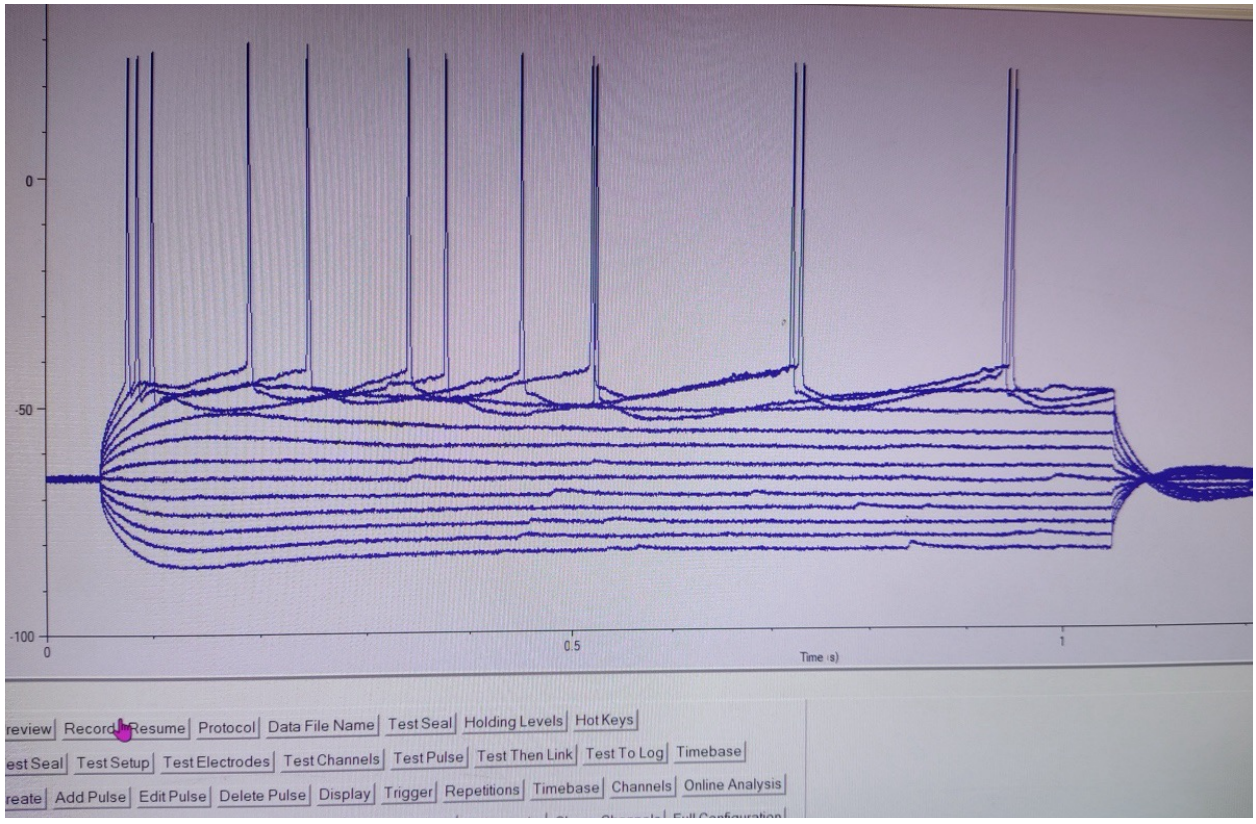


Figura 7. Registro y análisis de rágafas de disparo mediante software especializado.

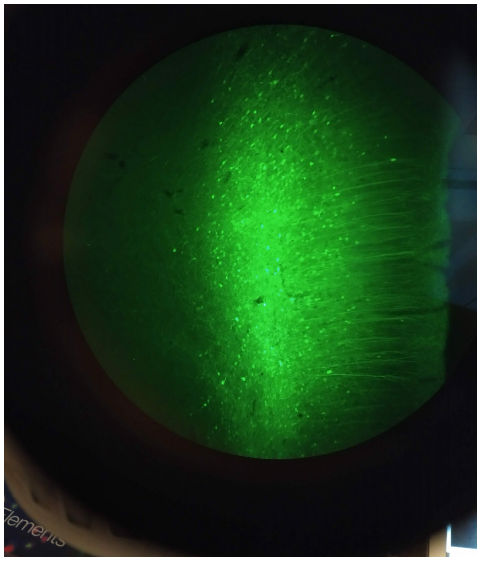


Figura 8. Identificación de células piramidales utilizando un vector AAV-CaMKII con GFP conjugado para marcar células excitadoras con proteína verde fluorescente.

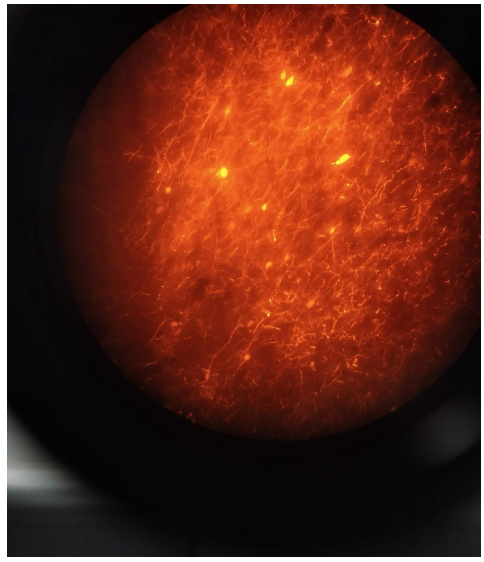


Figura 9. Identificación de interneuronas GABAérgicas con la infección de pAAV-hSyn-mCherry en cepa de ratas transgénicas PV-Cre dependientes, que expresan la enzima Cre recombinasa específicamente en neuronas que producen parvalbúmina (PV).

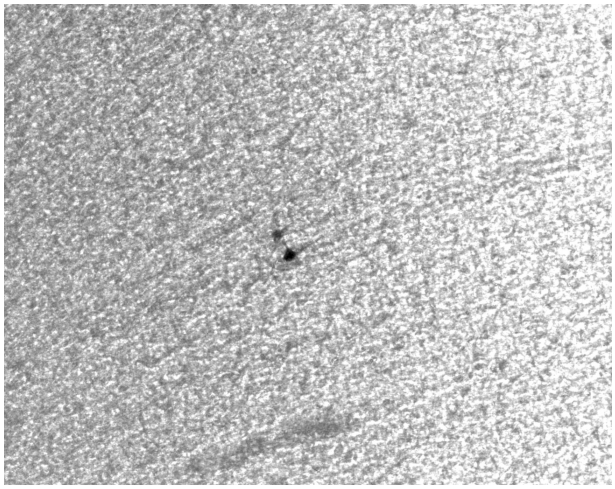


Figura 10. Marcaje de células individuales registradas utilizando un electrodo de registro lleno de una solución interna que contiene biocitina que es un compuesto químico que se ha utilizado como colorante histológico para teñir células.

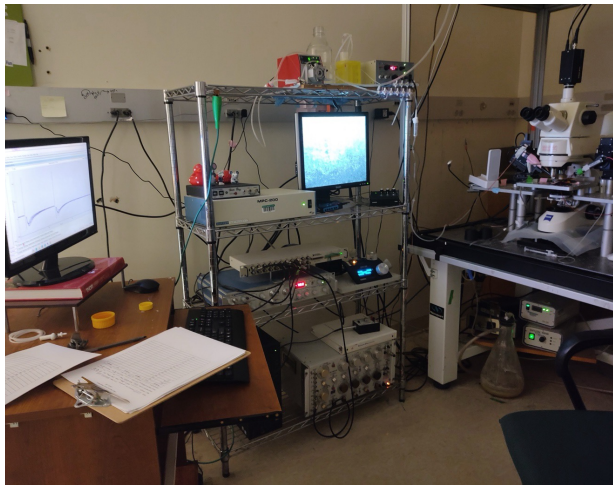


Figura 11. Set up de registro completo, microscopio invertido con DIC (differential interference contrast), micromanipuladores, amplificador, digidata, estimulador, sistema de perfusión con bomba de flujo, filtro de señal, software de control y análisis, mesa antivibración o flotante, calentador de solución y cámara de Faraday para reducir ruidos eléctricos.

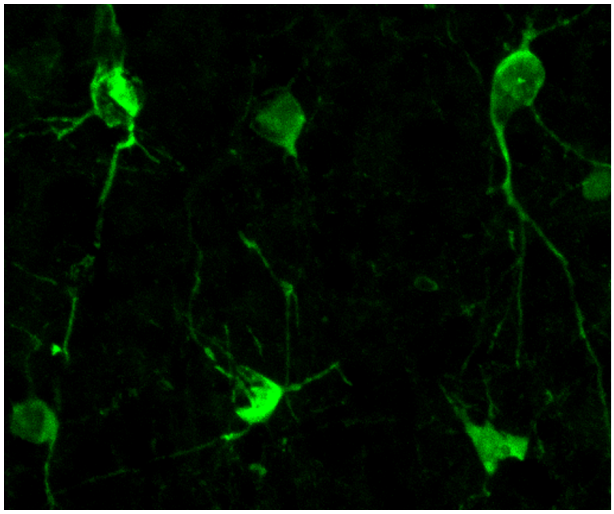


Figura 12. Fotografía obtenida con microscopio confocal de células de la región CPFm infectadas con un vector viral que contiene información para la expresión de DREADDs inhibidores hM4D(Gi) cre-dependientes expresados en interneuronas parvalbúmina positiva de cepa de ratas PV-Cre.

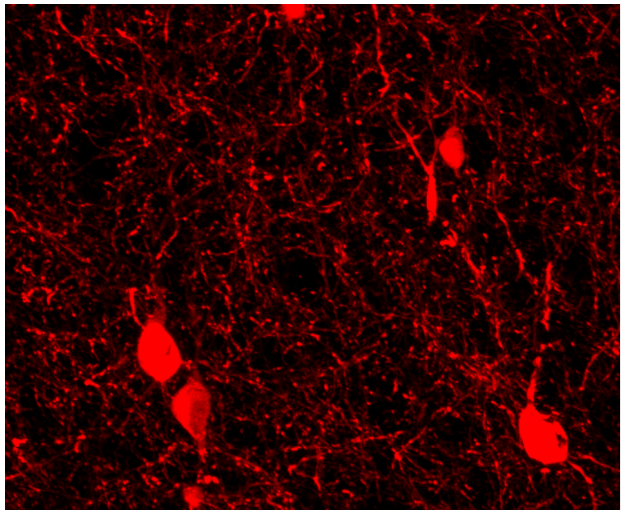


Figura 13. Fotografía obtenida con microscopio confocal de células de la región CPFm infectadas con un vector viral AAV tdTomato Cre-dependiente expresados en interneuronas parvalbúmina positiva de cepa de ratas PV-Cre.

Referencias

Brackenbury, W. J.(2021). Patch clamp electrophysiology: Methods and protocols. Bioelectricity, 3(2), 154–155. https://doi.org/10.1089/bioe.2021.0015

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Archiv, 391(2), 85–100. https://doi.org/10.1007/BF00656997

Neher, E., & Sakmann, B. (1991). The patch-clamp technique. Nobel Prize Lectures in Physiology or Medicine. Recuperado de https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1991/summary



Figura 14. Monserrat Armenta Reséndiz y el set up de registro del laboratorio de electrofisiología utilizado para sus investigaciones postdoctorales.