



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE REGISTROS  
ELECTROFISIOLÓGICOS CON REBANADAS DE  
CEREBRO.**

**T R A B A J O  
M O N O G R Á F I C O D E  
A C T U A L I Z A C I Ó N .**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

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

**MARÍA DEL CARMEN GARCÍA PÉREZ**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**MÉXICO D. F. 2009**

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ.**

**VOCAL: MARTHA LETICIA JIMÉNEZ PARDO.**

**SECRETARIO: ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO.**

**SUPLENTE 1: MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO.**

**SUPLENTE 2: CLAUDIA IVONNE ARAIZA SALDAÑA.**

**SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA. EDIFICIO A 1/E. ANEXO. DEPARTAMENTO DE FARMACIA. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR: DRA. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ \_\_\_\_\_**

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. LUZ MARÍA GARCÍA HERNÁNDEZ \_\_\_\_\_**

**SUSTENTANTE: MARÍA DEL CARMEN GARCÍA PÉREZ. \_\_\_\_\_**

## **AGRADECIMIENTOS:**

**Se agradece el apoyo al programa  
PAL-PAIP; clave 6390-21 de la  
Facultad de Química. UNAM**

## AGRADECIMIENTOS

GRACIAS:

*Al inigualable gran genio del universo, Dios, por darme la oportunidad de aprender en éste mundo, por iluminar mi vida con enormes estrellas, por durante todos estos años enseñarme a aprender a vivir la vida y luchar hasta alcanzar los objetivos que deseo.*

*A ti papá, por creer en mi desde que un día empecé a soñar con estudiar ésta carrera, porque jamás dejaste que me diera por vencida, por guiarme a lo largo de estos años. Siempre has sido una de mis dos más grandes fuentes de inspiración y fuerza, sin ti el objetivo logrado no tendría ningún sentido. Eres el mayor pilar de mi vida y mi gran admiración. Te quiero mucho.*

*A ti mamá, porque me has dedicado con paciencia, sabiduría y un inmenso amor los mejores días de tu vida, porque en ti siempre encuentro consuelo y un gran aliento para seguir luchando y llegar hasta donde me lo he propuesto, por alentarme a lo largo de este sueño, eres mi otra fuente de inspiración y fuerza. Te quiero mucho.*

*A mis padres, porque sin ellos dos mi vida tendría otro significado, y quizá uno de mis más grandes sueños no estaría hoy consumado. Gracias por ser mis guías, mis guardianes, por darme vida, sonrisas, sueños y tanta felicidad. Soy lo que ahora ven gracias a ustedes. Los amo con todo mi corazón.*

*A mi súper hermana y manager Clara, por aguantarme, por seguir mis loqueras y apoyarme, por estar siempre a mi lado. Quiero que sientas que el objetivo logrado también es tuyo, me has ayudado mucho, pero sobretodo has confiado en esto que hoy ya está hecho. Te quiero muchísimo.*

*A mi gran hermano y maestro Cris, ya que sin tu ayuda y tus consejos no estaría donde hoy me encuentro. Lo logrado aquí es también gracias a ti. Por hacerme ver que hay que luchar por más negro que se vea el panorama, pero sobretodo por estar a mi lado siempre. Te quiero mucho.*

*A mi amigo y cuñado Gilberto, por compartir con nosotros momentos difíciles y de dicha, por brindarme confianza y una sonrisa de apoyo y por pertenecer a esta familia.*

*A Haydée Jiménez Pérez, por ser mi mejor amiga, mi hermana, mi gran apoyo, pero sobretodo por enseñarme a ver que la vida tiene muchas tonalidades, porque me enseñaste a valorar cada día, y cada situación que se me puso enfrente, por enseñarme a luchar y aferrarme a lo que tanto quiero y sueño. Eres un gran ejemplo para mi vida. Te quiero.*

Doctora Elia Brosla Naranjo Rodríguez, por recibirme en su laboratorio desde mucho antes de entrar a la carrera, por ser mi maestra, por apoyarme en este proyecto y dedicarme el tiempo necesario para llevarlo a término, pero sobretodo por la confianza que me ha dado.

Doctora Luz María García Hernández, por sus valiosos comentarios a ésta tesis, con los cuales se enriqueció este trabajo, por su apoyo y su entrañable amistad.

A los honorables miembros del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A Margarita, Luz María, Claudia y Sara, porque ustedes me han enseñado a salir adelante en los momentos en que creí que ya no podía, porque con sus enseñanzas y experiencias me enseñaron a valorar la vida y a disfrutar todo lo que me rodea, por todos los momentos de felicidad y todas las sonrisas que me brindaron y que espero seguir viendo muchísimo tiempo más.

Un especial agradecimiento a Lizeth, Alejandra Lizbeth, Eva Carmina y a todos mis amigos que han estado a mi lado a lo largo de este trayecto de mi vida, hicieron tan placentera esta etapa, todos ustedes han sido y seguirán siendo muy especiales para mí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios del país, por abrirme sus puertas, por brindarme un lugar para soñar, para reír, para aprender y para madurar, en ella he pasado los mejores años de mi vida y he conocido a mis mejores amigos.

A la mejor y mi más querida Facultad de Química, porque en ti me he formado como profesionalista y por hacerme vivir ésta gran experiencia.



---

---

**INDICE**

<b>Capítulos</b>	<b>Páginas</b>
Índice	1
Lista de abreviaturas	3
Lista de figuras	4
Lista de tablas	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. GENERALIDADES	8
<b>2.1 Organización del sistema nervioso</b>	8
2.1.1 El cerebro humano	10
2.1.2 Hemisferios cerebrales	10
2.1.3 La neurona	15
<b>2.2 Preparación y selección de rebanadas de cerebro.</b>	21
2.2.1 Antecedentes históricos	22
2.2.2 Edad y especie de animales usados	29
2.2.3 Pre-tratamiento del animal	30
2.2.4 Métodos para la obtención de las rebanadas	30
2.2.5 Soluciones de pre-incubación	35
2.2.6 Soluciones para incubación	35
2.2.7 Temperaturas de incubación	36
<b>2.3 Técnicas de registro</b>	37
2.3.1 Registro intracelular	37
2.3.2 Técnica de registro Current Clamp	39
2.3.3 Técnica de registro Voltage Clamp	43
2.3.4 Métodos de cable axial	44
2.3.5 Métodos Gap	44
2.3.6 Pinzas con microelectrodos	45
2.3.7 Técnica de registro Patch Clamp	45
2.3.8 Técnica de registro con electrodo sharp	51
<b>2.4 Registro extracelular</b>	51
2.4.1 Unidad única de registro	52
2.4.2 Unidad múltiple de registro	53
2.4.3 Potenciales de campo	53
2.4.4 Amperometría	53
<b>2.5 Electrodo de metal</b>	53
2.5.1 Requerimientos electrónicos	54
2.5.2 Electrodo de estimulación	54
2.5.3 Electrodo de registro	55
2.5.4 Mecanismos de inyección de carga	56
2.5.5 Fabricación de los electrodos	57
2.5.6 Calibración del electrodo	58

2.5.7 Otro tipo de electrodos	59
2.5.8 Electrodo de penetración	64
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	67
4. METODOLOGÍA	68
5. RESULTADOS	69
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	73
7. CONCLUSIONES	77
8. GLOSARIO	78
9. BIBLIOGRAFÍA	81

## ABREVIATURAS

A: Adrenalina.

Ca<sup>2+</sup>: ión Calcio.

Cl<sup>-</sup>: ión Cloro

E: Voltaje de grabación

EPSPs: Potencial postsináptico excitador. \*

G: Conductancia

GSA: area de superficie geométrica

IPSPs: Potencial postsináptico inhibitorio. \*

K<sup>+</sup>: ión Potasio.

LCRA: Líquido cefalorraquídeo artificial

mV. milivoltios.

Na<sup>+</sup>: ión Sodio.

PEDOT: polietilendioxitiofeno

pMEAs: arreglos de multielectrodos planos. \*

SN: Sistema Nervioso

SNA: Sistema Nervioso Autónomo.

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

V: voltaje

VCcCC: Voltaje-clamp-controlled current clamp. \*

\*: Por sus siglas en inglés.

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Esquema 1: Divisiones del SNC.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 1: Divisiones del sistema nervioso.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 2: Comparación del cerebro de rata y del humano.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3: Partes de una neurona.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 4: Tipos de neuronas.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 5: Henry McIlwain.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6: McIlwain recording chamber.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 7: Técnica de preparación de rebanadas de cerebro.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 8: Aparatos usados en el registro intracelular.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 9: Fotografía de una cámara de registro de rebanadas de cerebro.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 10: Técnica Patch-Clamp.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11: Técnica Whole-cell Patch-Clamp.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 12: Técnica Patch-Clamp en sus diferentes configuraciones.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 13: Formas de onda utilizadas en la estimulación neuronal.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 14: Construcción de un electrodo de fibra de carbono.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 15: Esquema de fabricación.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 16: Micrografía óptica de la preparación.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 17: Electrodo pMEAs.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 18: Multi-arreglo de 12 electrodos lineales 1-D.....</b>	<b>64</b>

**Figura 19: Microfotografía de una matriz de 24 electrodos de alambre.....65**

**Figura 20: Arreglo de electrodos en 3-D.....66**

**Figura 21: Arreglo de multielectrodos (MEAs) modelo MEA60 200 3-D.....66**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1: Subdivisiones del cerebro de roedores.....13**

**Tabla 2: Tipos y funciones de las células gliales.....18**

**Tabla 3: Ventajas y desventajas de la preparación de rebanadas de cerebro....22**

**Tabla 4: Escasa actividad de las neuronas.....26**

**Tabla 5: Usos de rebanadas de cerebro de diferentes regiones.....27**

**Tabla 6: Selección de preparación de rebanadas de cerebro.....29**

**Tabla 7 Soluciones para la preparación e incubación de las rebanadas.....36**

### 1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento e implementación de la técnica para la preparación de rebanadas de cerebro es una de las más importantes referencias en el establecimiento de las neurociencias, ya que mantiene un considerable grado de funcionalidad del tejido al mismo tiempo que proporciona una excelente oportunidad experimental. Este recurso multidisciplinario, en conjunto con la versatilidad de la preparación ha permitido una amplia visión del funcionamiento celular y molecular del cerebro. La preparación de las rebanadas fue desarrollada por Henry McIlwain en 1950 **(3)** para estudios bioquímicos del cerebro; después de validar la preparación, McIlwain adoptó las técnicas electrofisiológicas las cuales se podían aplicar a rebanadas de tejidos, encontrando no solo que las rebanadas eran viables metabólicamente, sino que en ellas se podían realizar estudios de potenciales de membrana en neuronas en reposo. Desde entonces, existe una gran base de datos sobre la preparación de rebanadas de cerebro que son utilizadas en investigaciones neurofisiológicas para plantear los mecanismos sinápticos de los neurofármacos, obteniendo registros intra y/o extracelulares se ha establecido la confiabilidad de las respuestas a fin de hacer una comparación entre los efectos de diversos fármacos, toxinas o la manipulación del tejido en el medio ambiente. Esta preparación ha permitido estudiar con mayor detalle al cerebro utilizando un menor número de animales de los que se utilizan en modelos “In Vivo”, dado que es posible obtener varias rebanadas de un solo cerebro; por lo que éste tipo de preparación provee una herramienta muy poderosa para examinar los factores del comportamiento electrofisiológico de las neuronas. **(48)**

---

---

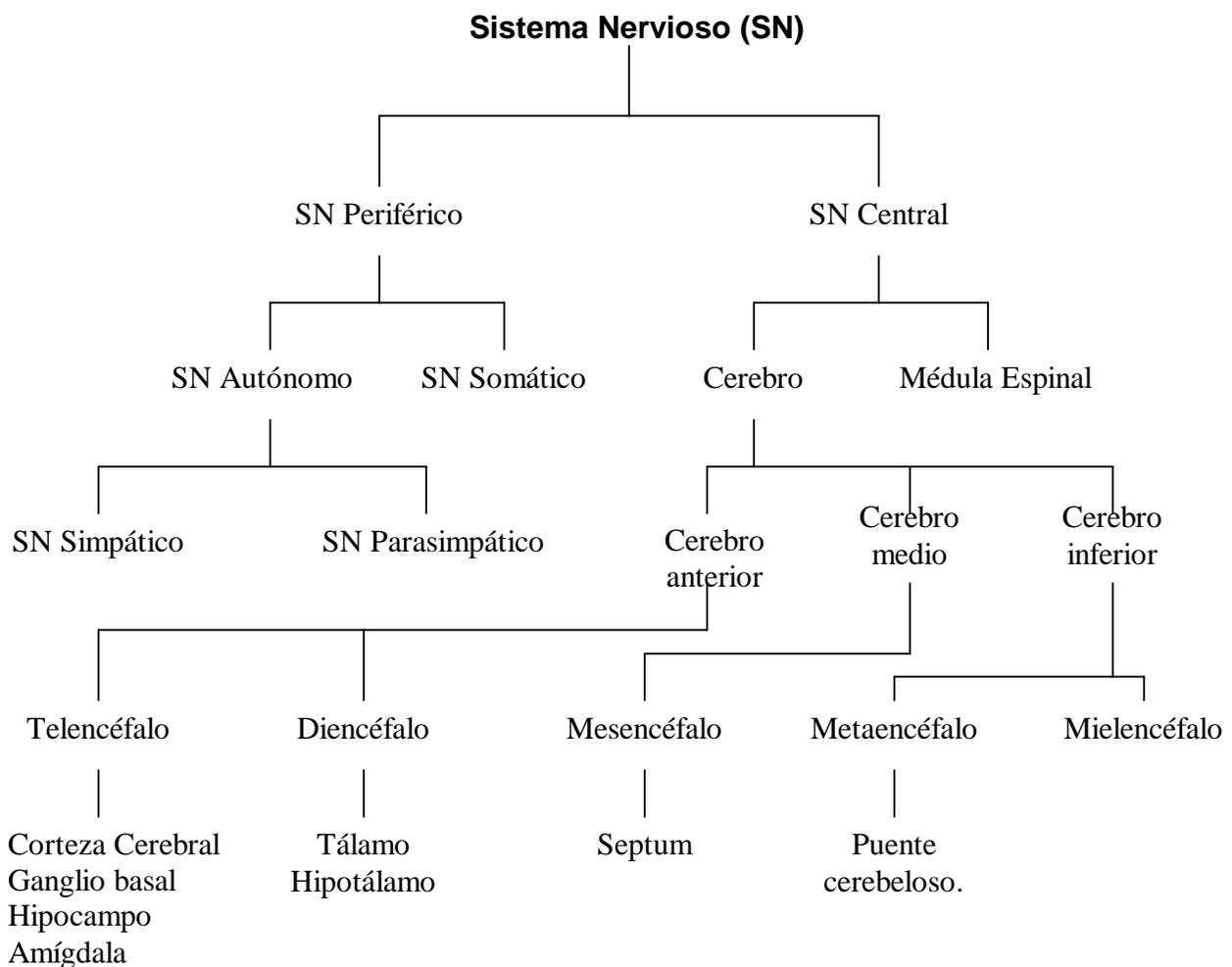
## 2. GENERALIDADES

### 2.1 ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso (SN) incluye el sistema nervioso central SNC (cerebro y médula espinal) y el sistema nervioso periférico (SNP) (que incluye todos los nervios fuera del SNC). **(Esquema 1) y (Fig. 1). (20)**

El SNP incluye las neuronas sensitivas, que conectan el encéfalo y la médula espinal con los receptores sensitivos, y las neuronas motoras, que conectan tanto el encéfalo y la médula espinal con los receptores sensitivos, así como las neuronas motoras, que conectan el encéfalo y la médula espinal con los músculos y las glándulas, éste puede clasificarse en a) sistema nervioso somático (SNS), el cual controla los músculos voluntarios tanto como los nervios espinales y craneales, y b) el sistema nervioso autónomo (SNA), el cual consiste de nervios autónomos y algunos nervios craneales que controlan la función de órganos y glándulas. A su vez, el SNA se clasifica en simpático, cuya función está implicada en el incremento en la velocidad del corazón y la presión sanguínea, estimula la secreción de adrenalina (A), y aumenta el flujo de sangre a los músculos esqueléticos, entre otras funciones, y parasimpático el cual actúa en momentos en que las reservas de energía pueden ser almacenadas para su uso posterior, por lo tanto, este sistema incrementa la salivación, la digestión, el almacenamiento de glucosa y otros nutrientes así como la disminución de la frecuencia cardiaca y la respiración. **(32)**

Por lo general, se considera que el SNC incluye siete partes básicas: la médula espinal, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el cerebelo, el mesencéfalo, diencéfalo y los hemisferios cerebrales. En conjunto, el bulbo raquídeo, la protuberancia y el mesencéfalo constituyen el tronco encefálico; el diencéfalo y los hemisferios cerebrales, el encéfalo anterior. Si bien ésta categorización del SNC es algo artificial (a menudo las neuronas atraviesan los límites de éstas subdivisiones y la mayoría de las funciones nerviosas dependen de más de uno de éstos componentes), la división del mismo en sus partes principales proporciona un marco de trabajo anatómico esencial para cualquier explicación de la función. (36)



Esquema 1: Divisiones del SNC. (36)

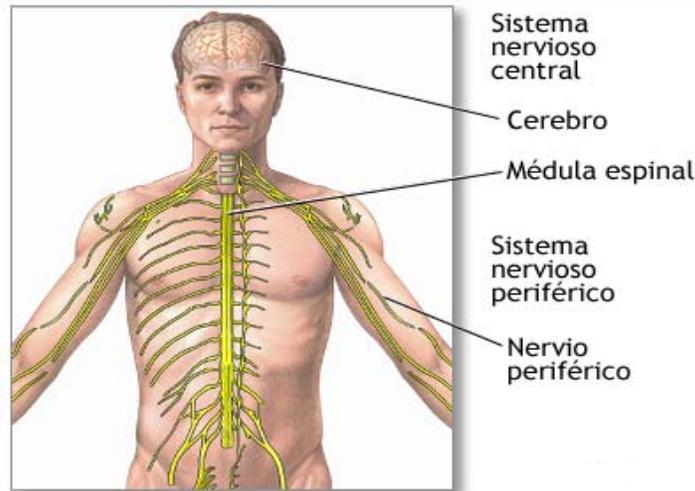


Fig. 1. Divisiones del sistema nervioso. (21)

### 2.1.0 EL CEREBRO.

La complejidad del cerebro es enorme y nuestros conocimientos son escasos, así tenemos que el cerebro humano es una estructura relativamente pequeña que pesa alrededor de 1400 g y constituye un 2% del peso corporal total; comúnmente, se lo considera el único órgano únicamente relacionado con el pensamiento, la memoria y la conciencia, aunque éstas son algunas de sus funciones más complejas. Consta de 3 subdivisiones básicas: los hemisferios cerebrales, el tronco del encéfalo y el cerebelo. (5)

### 2.1.2 Hemisferios cerebrales.

Los dos hemisferios cerebrales consisten en una corteza gris muy plegada (pallio), la sustancia blanca subyacente y un conjunto de masas neuronales de localización profunda denominados ganglios basales, están separados entre sí parcialmente por la *circunvolución interhemisférica*. Cada hemisferio cerebral se encuentra subdividido en lóbulos por diversas circunvoluciones. Los principales lóbulos del cerebro se denominan de acuerdo con los huesos craneales suprayacentes. La cresta de cada repliegue se denomina circunvolución (*gyrus*), sobre éstas el cerebro se divide en seis lóbulos: 1)

frontal, 2) temporal, 3) parietal, 4) occipital, 5) insular, y 6) límbico, aunque el insular y el límbico no son verdaderos lóbulos. **(5)**

**Lóbulo frontal:** Es el lóbulo cerebral de mayores dimensiones, y comprende alrededor de un tercio de la superficie hemisférica, en éste se hallan el área motora primaria y una región denominada *el área del habla de Broca*, región relacionada con los mecanismos motores de la formulación de la palabra. **(5)**

**Lóbulo parietal:** En éste se distinguen tres partes: 1) una circunvolución parietal ascendente, 2) el lóbulo parietal superior y 3) el lóbulo parietal inferior. El lóbulo parietal inferior representa un área cortical de asociación, en que convergen señales multisensoriales de las regiones parietales, temporales y occipitales adyacentes. **(5)**

**Lóbulo temporal:** Aquí se encuentran las circunvoluciones transversas de Heschl que constituyen la corteza auditiva primaria en el hombre. **(5)**

**Lóbulo occipital:** Aquí podemos encontrar la corteza visual primaria en donde se reciben los impulsos de la mitad temporal de la retina ipsilateral y la mitad nasal de la retina contralateral, y está relacionada con la percepción de la mitad contralateral del campo visual, aquí también, se producen las funciones de la visión binocular y la visión central. **(5)**

**Lóbulo de la ínsula:** Esta región cortical invaginada, es un área cortical triangular, cuyo ápice se orienta hacia delante y abajo, y se extiende en la fosa lateral. La ínsula está cubierta por las regiones operculares temporal, frontal y parietal. **(5)**

**Cara medial:** La estructura más sobresaliente de la cara medial es la masa comisural interhemisférica, el *cuerpo calloso*, ésta estructura compuesta por fibras mielínicas, conecta recíprocamente casi todas las regiones corticales de ambos hemisferios. Las distintas partes del cuerpo calloso se denominan *rostrum* (pico), *genu* (rodilla), *cuerpo* y

---

*splenium* (rodente). El cuerpo calloso desempeña una importante función en la transferencia interhemisférica de las discriminaciones adquiridas, experiencia sensorial y memoria. **(5)**

**Lóbulo límbico:** Comprende las circunvoluciones subcallosa, del cuerpo calloso y del hipocampo, así como los derivados corticales primitivos, la formación del hipocampo y la circunvolución dentada, los cuales en el curso del desarrollo se han invaginado dentro del lóbulo temporal. **(5)**

Las estructuras que componen el lóbulo límbico son de aparición temprana en la filogénesis, y las evidencias fisiológicas indican diferencias funcionales entre diversos componentes, aunque la mayor parte de ellos se relacionan con funciones viscerales y conductuales. **(5)**

**Sustancia blanca:** Se encuentra por debajo de la corteza cerebral y se propaga hasta los núcleos subcorticales y el sistema ventricular, y forma el centro medular del hemisferio. La inervación del cerebro está dada por las fibras mielínicas de la sustancia blanca que son de tres tipos: 1) fibras de proyección que conducen los impulsos desde la corteza y hacia ésta, 2) fibras de asociación que interconectan diversas regiones corticales del mismo hemisferio y 3) fibras comisurales que interconectan las regiones corticales correspondientes de ambos hemisferios. **(5)**

### **Tronco del encéfalo.**

Es una estructura nerviosa que se encuentra en la fosa cerebral posterior, por delante del cerebelo, las estructuras que lo conforman son: el bulbo, la protuberancia, el mesencéfalo y parte del hipotálamo. Es la ruta de comunicación entre el cerebro anterior, la médula espinal y los nervios periféricos. Controla varias funciones como la respiración, regulación del ritmo cardiaco y aspectos primarios de la localización del sonido. **(5)**

---

---

**Cerebelo.**

El cerebelo (o parte posterior del encéfalo) está situado en la parte posterior de la cabeza. Tiene como función controlar los movimientos musculares voluntarios y mantener la postura, la estabilidad y el equilibrio. **(5)**

Por otro lado, el SN de roedores se divide en central, periférico y autónomo al igual que el humano. **(Fig. 2)** El SNC consiste en el cerebro y la médula espinal. El sistema periférico está constituido de todos los nervios somáticos mielinizados, y el sistema autónomo está compuesto por los nervios no mielinizados. **(6)**

El cerebro está compuesto por las siguientes divisiones: **(Tabla 1)**

Divisiones del cerebro	Constituidas por:
1: Proencéfalo	
Riencéfalo	Bulbo olfatorio, cuerpo amigdoileo
Telencéfalo	Hemisferios cerebrales
Diencefalo	Hipotálamo, tálamo, epitálamo
2: Mesencéfalo	Colínculo y cerebro en cruz
3: Romboencéfalo	
Metencéfalo	Cerebelo y puente cerebeloso
Mielencéfalo	Médula oblongada

**Tabla 1. Subdivisiones del cerebro de roedores (4) (6)**

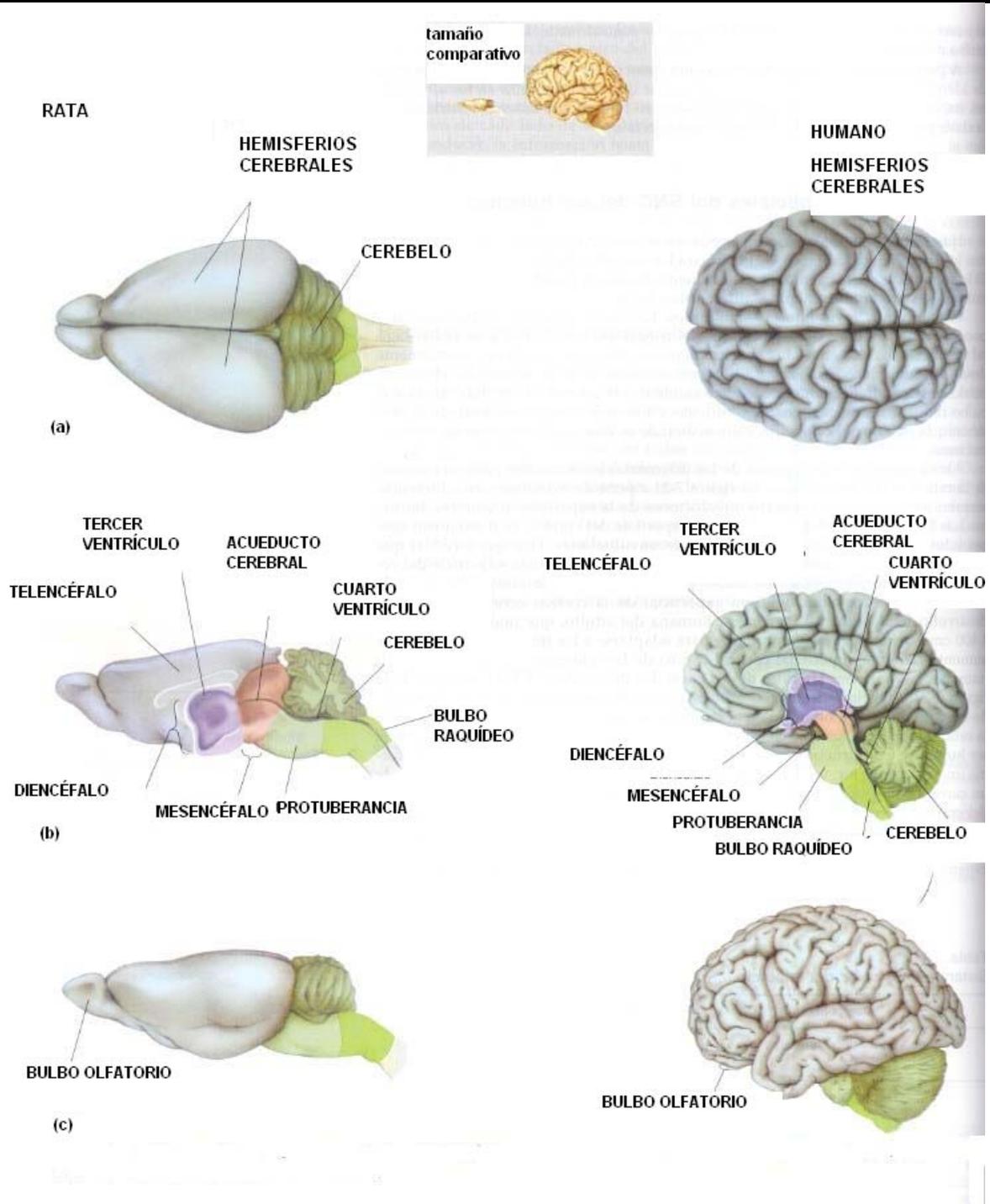


Fig. 2. Comparación del cerebro de rata y el del humano. a) Visión dorsal b) visión sagital media c) visión lateral (23)

### 2.1.3 LA NEURONA.

Tal vez la razón principal de por qué la neurociencia es un campo tan interesante se relaciona con la gran cantidad de preguntas acerca del cerebro humano que aún no se han contestado.

El neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal, realizó un estudio con el microscopio óptico del tejido nervioso teñido con sales argénticas ( $\text{AgNO}_3$ ), con el cual argumentó, de modo persuasivo, que las células nerviosas eran entidades separadas y que se comunicaban entre sí por medio de contactos especializados denominados sinápsis. **(37)** El advenimiento de la microscopía electrónica biológica en la década de los 50's estableció, por último, más allá de cualquier duda, que las células nerviosas son, en efecto, unidades funcionalmente independientes. **(36)**

Se calcula que el cerebro contiene alrededor 100,000 millones de neuronas, éstas constituyen dos tipos de células primarias: células nerviosas llamadas neuronas y células de apoyo llamadas células gliales. La principal función de las neuronas es transmitir la información en forma de señales eléctricas a lo largo de grandes distancias, por el contrario, las células de sostén (gliales), no son capaces de producir señalamiento eléctrico. Las neuronas se denominan de acuerdo al órgano o tejido que inervan, para indicarles las funciones a realizar, así por ejemplo las neuronas sensoriales son sensibles al estímulo del entorno, convierte el estímulo físico transmitiendo la información a circuitos de interneuronas las cuales son células nerviosas formando un complejo de interacción de circuitos neuronales los cuales son responsables de las sensaciones, el conocimiento, la memoria y la toma de decisiones. **(36)**

En la mayoría de los aspectos, la estructura de las neuronas se asemeja a la de otras células. Por lo tanto, cada célula nerviosa tiene un cuerpo celular que contiene un

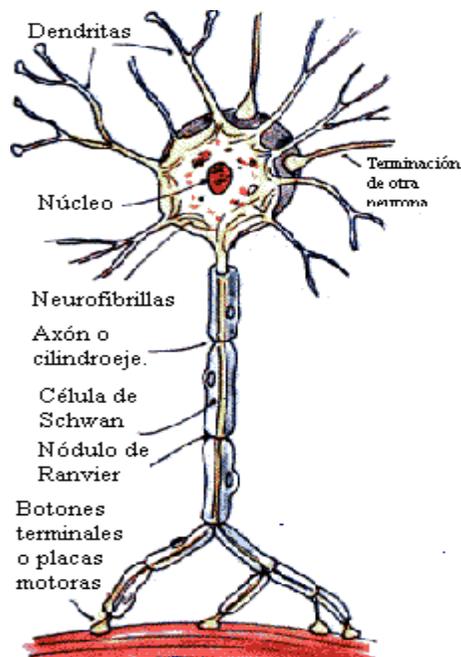
---

---

---

núcleo, el retículo endoplásmico, los ribosomas, el aparato de Golgi, las mitocondrias y otros organelos que son esenciales para la función de todas las células. **(Fig. 3)** Sin embargo su estructura y tamaño varían de acuerdo a sus funciones específicas, lo que las hace altamente especializadas para la comunicación intercelular **(Fig. 4)**. **(22)(36)**

La característica morfológica más sobresaliente es la elaboración de las dendritas (también denominada ramas dendríticas o prolongaciones dendríticas) que surgen del cuerpo celular de la neurona, éstas (junto con el cuerpo celular) proporcionan sitios para los contactos sinápticos que realizan las terminaciones de las otras células nerviosas y, por lo tanto, se las puede considerar especializadas en recibir información. **(36)**



**Fig. 3. Partes de una neurona. (22)**

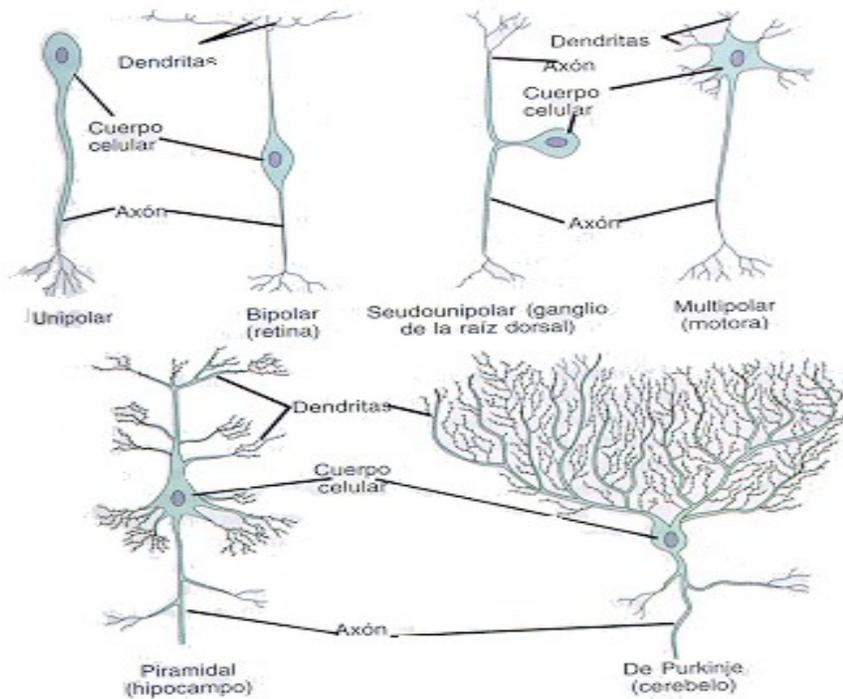


Fig. 4. Tipos de neuronas. (17)

La información que proviene de las aferencias que llegan a las dendritas es “leída” en el origen del axón, porción de la célula nerviosa especializada en la conducción de señales. El axón es una extensión única del cuerpo celular de la neurona que puede viajar algunos cientos de micrómetros o mucho más, según el tipo de neurona y del tamaño de la especie. La mayoría de las células nerviosas del encéfalo humano tiene axones cuya longitud es sólo de unos pocos milímetros y algunas no poseen axones en absoluto, las cuales transmiten la información localmente. El mecanismo axónico que transmite las señales sobre estas distancias se llama potencial de acción, una onda eléctrica autorregenerada que se propaga desde su punto de iniciación en el cuerpo celular (denominado como axónico) hasta la terminación del axón. **(36)** Por lo tanto las terminaciones axónicas están altamente especializadas para transmitir esta información a las células blanco, las cuales incluyen otras neuronas en el encéfalo y en todo el cuerpo.

Estas se denominan sinápticas (o botones terminales) y los contactos que hacen con las células blanco son las sinápsis químicas, otro tipo de contacto que hay se denomina sinápsis eléctricas. Las células que les dan soporte vital, son las llamadas células gliales, tienen una importancia significativa en la función de las neuronas ya que proveen a las neuronas de soporte físico, mantienen el entorno químico de las neuronas y dan función inmunológica. Existen 4 tipos de células gliales cuyas funciones son muy particulares.

**(5)(36) (Tabla 2)**

CÉLULA.	FUNCIÓN.
Astrocitos	Da soporte estructural Mantiene el entorno iónico y químico Almacena nutrientes para dar energía a las neuronas Realiza fagocitosis
Microglia	Realiza fagocitosis Proporciona funciones del sistema inmune
Células de Schwann	Forma una vaina de mielina en un solo axón del SNP. Libera factores de crecimiento cuando la neurona está dañada. Proporciona un canal para orientar los axones hacia el blanco
Oligodendrogalia	Forma múltiples vainas de mielina en el SNC Inhibe la regeneración de los axones en neuronas dañadas

**Tabla 2. Tipos y funciones de las células gliales. (5)**

Las células de la glía son más abundantes que las células nerviosas del encéfalo y las superan en número, tal vez por una relación 3:1, por lo general son más pequeñas que las neuronas y carecen de axones y dendritas. De hecho, la glía abarca diversos tipos celulares con funciones diferentes por completo; su denominador común es simplemente que no conducen señales nerviosas; por ejemplo, muchos fisiólogos sospechan que las células gliales participan en el remodelado neuronal. **(36)**

### **Transmisión eléctrica dentro de una neurona.**

El principal objetivo del encéfalo es adquirir, coordinar y diseminar la información acerca del organismo y su medio ambiente. Para realizar ésta tarea, las neuronas han desarrollado un recurso sofisticado que genera señales eléctricas. La transmisión de la información dentro de una neurona es un proceso eléctrico y depende de la naturaleza semipermeable de la membrana celular. Cuando la carga normal eléctrica de una neurona es perturbada por la llegada de señales de otras células, se alcanza un umbral que inicia la señal eléctrica (potencial de acción) que transmite el mensaje a lo largo de todo el axón hacia las terminales del mismo. **(32)**

Todas las neuronas tienen una diferencia en la carga eléctrica dentro y fuera de la célula, a esto se le llama potencial de membrana en reposo; el interior de la neurona es más negativo que el exterior, y un voltímetro nos dice que ésta diferencia es de aproximadamente  $-70$  milivolts (mV) manteniendo a la neurona polarizada en su estado de reposo. La selectiva permeabilidad de la membrana y la distribución desigual de iones dentro y fuera de la célula es responsable del potencial de membrana. Esto quiere decir que cuando la célula está en reposo, hay mayor cantidad de partículas negativas dentro de la célula y más cargas positivas fuera de la célula. Cuando el potencial de membrana está en reposo, varios tipos de estímulos que perturban la membrana pueden abrir

canales iónicos momentáneamente, causando pequeños cambios en la distribución de los iones, provocando diferencias en el potencial eléctrico llamados potenciales locales; éstos tienen un gran significado dentro de la psicofarmacología, ya que cuando los fármacos ó neurotransmisores se enlazan con algún receptor en particular, esto puede desencadenar la apertura momentánea de canales iónicos específicos causando un efecto inhibitor ó excitador. Dado que los neurotransmisores actúan en la membrana postsináptica, los efectos son llamados **potencial postsináptico excitador (EPSPs)** y **potencial postsináptico inhibitor (IPSPs)**. (32)

Las neuronas no funcionan de manera aislada, están organizadas en conjuntos denominados circuitos que procedan tipos específicos de información. Las conexiones nerviosas se realizan típicamente en una maraña densa de terminaciones axónicas, dendritas, sinápsis y prolongaciones de células gliales que en conjunto se denominan neuropilo (el sufijo *pilo* viene de la palabra griega *pilos*, que significa “sentido”). Las células nerviosas que transmiten información hacia el SNC (médula espinal y encéfalo) son las neuronas aferentes; las células nerviosas que transmiten la información desde el encéfalo o la médula espinal son las neuronas eferentes; por otro lado, las células nerviosas que solo participan en los aspectos locales de un circuito se llaman interneuronas. Estas tres clases: neuronas aferentes, neuronas eferentes e interneuronas son los componentes de todos los circuitos nerviosos. El potencial de acción depende en esencia, del potencial eléctrico en reposo a través de la membrana neuronal. Cada vez que los iones fluyen a través de las membranas celulares se produce una diferencia en el potencial eléctrico. Estos flujos de iones se desarrollan cuando las membranas son permeables a una o más especies de iones, y cuando existe un gradiente electroquímico que favorece el flujo de iones. En reposo un potencial de membrana negativo (el potencial de reposo) es el

---

resultado de un flujo neto de Potasio ( $K^+$ ) a través de las membranas neuronales que son predominantemente permeables al  $K^+$ . Un potencial de acción se desarrolla cuando un aumento transitorio en la permeabilidad al sodio ( $Na^+$ ) permite un flujo neto de  $Na^+$  a través de una membrana que ahora es predominantemente permeable al  $Na^+$ . La elevación efímera en la permeabilidad de la membrana al  $Na^+$  es seguida por una elevación transitoria en la permeabilidad de la membrana al  $K^+$  que repolariza la membrana neuronal y produce una hiperpolarización breve del potencial de acción. Cuando éstos cambios activos de la permeabilidad ceden, el potencial de membrana regresa a su nivel de reposo debido a la permeabilidad elevada de la membrana al  $K^+$ . **(32)**

## 2.2 PREPARACIÓN Y SELECCIÓN DE REBANADAS DE CEREBRO.

Las preparaciones de rebanadas de cerebro se han hecho muy populares entre los neurobiólogos, porque en éstas se pueden hacer estudios del SNC de mamíferos y el fenómeno sináptico. Las rebanadas de hipocampo, bulbo olfatorio, neocorteza, hipotálamo, núcleo caudado y la amígdala son las áreas del cerebro más utilizadas. Este tipo de preparaciones son una excelente herramienta para el estudio de la neurofisiología, dado que las propiedades de la membrana pueden ser estudiadas usando registro intracelular, incluyendo el estudio de canales iónicos y neurotransmisores, el estudio de la actividad sináptica puede ser realizada por registros extracelulares y estímulos específicos. En la actualidad este tipo de preparación es usada como un sistema para el estudio del metabolismo del cerebro y su farmacología en el SNC y como un modelo de estudio de numerosas situaciones patológicas. **(11)(43)**

Las rebanadas de cerebro presentan ventajas y desventajas en el estudio del SNC, las cuales se ilustran en la siguiente tabla: **(Tabla 3). (43)**

---

---

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Rápida preparación, usando animales relativamente baratos,(ratón, rata, cobayo)	Presentan falta de ciertos productos normalmente existentes en el cerebro intacto.
Estabilidad de la preparación.	Ciertas superficies de la rebanada son dañadas por la acción del rebanado.
Control sobre las condiciones de la preparación.	Los efectos de la decapitación en la viabilidad de la rebanada no están bien comprendidos.
Visualización directa de las características estructurales de la rebanada, en donde son puestos los electrodos de registro y de estimulación.	
El espacio extracelular es accesible al medio de perfusión que contiene (iones, neurotransmisores y fármacos).	
Las rebanadas mantienen la integridad estructural, a diferencia de los cultivos celulares o tejido homogenizado.	

Tabla 3: Ventajas y desventajas de la preparación de rebanadas de cerebro. (43)

### 2.2.1 Antecedentes históricos.

La relación entre la actividad eléctrica de neuronas individuales en el cerebro y su comportamiento en los sistemas neuronales sigue siendo una de las preguntas más inquietantes para la neurociencia, aunque el rol del comportamiento de las neuronas incluye funciones sensoriales, motoras y neurosecretoras, el paso explícito que regula la función de las neuronas es el comportamiento electrofisiológico que conduce a la generación de los potenciales de acción. (49)

La preparación de rebanadas de cerebro fue usada inicialmente por Warburg y colaboradores en 1920 que realizaron estudios sobre la respiración de las rebanadas, posteriormente, no fue sino hasta 1939 el año en que Quastel siguió los estudios

realizados por Warburg, y expresó que las condiciones de incubación podrían ser eventualmente encontradas para poder garantizar un estado óptimo del tejido. **(41)**

Henry Mcllwain **(Fig. 5)** nació el 12 de Diciembre de 1912 en Newcastle-upon-Tyne. **(3)** Fue uno de los pioneros en desarrollar técnicas para estudiar el metabolismo cerebral en relación con la actividad eléctrica de rebanadas de cerebro. Su mayor contribución fue el descubrimiento de técnicas “In Vitro” para relacionar los mecanismos moleculares con la función cerebral, en particular sobre la energía cerebral y la actividad eléctrica sináptica evidenciando la actividad eléctrica y metabólica de las neuronas, dando como resultado que podían ser estudiadas en rebanadas de cerebro.**(2)** La era de la preparación de rebanadas de cerebro realmente inició cuando Choh Luh Li y Mcllwain (1957) publicaron un artículo en el cual las rebanadas de cobayo y la neocorteza de gato presentaban resistencia a los potenciales de membrana aplicados. En ésta investigación también desarrolló la primer cámara de registro (Mcllwain recording chamber). **(Fig. 6). (8)**

Henry Mcllwain publicó cerca de 250 artículos científicos, sus libros incluyen *Biochemistry and the Central Nervous System (1955)*, *Practical Neurochemistry (1962)*, y *Chemical Exploration of the Brain (1963)* y su versión tardíamente editada de *Practical Neurochemistry (1975)*. **(3)**

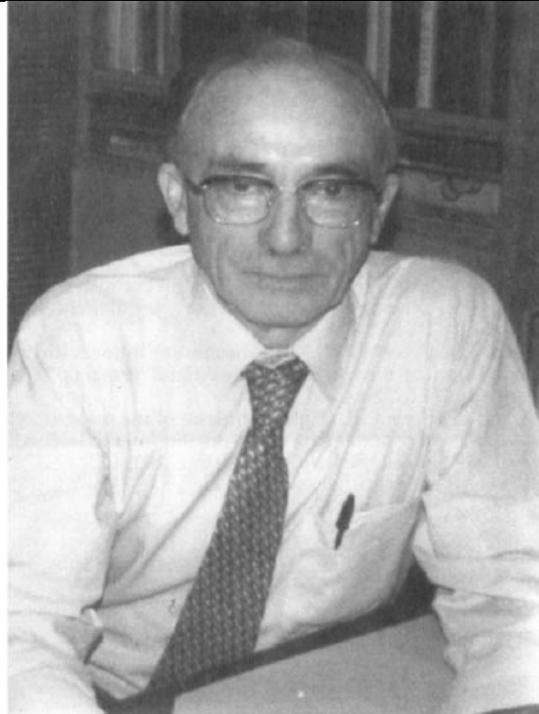


Fig. 5. Henry McIlwain 1912-1992. (3)

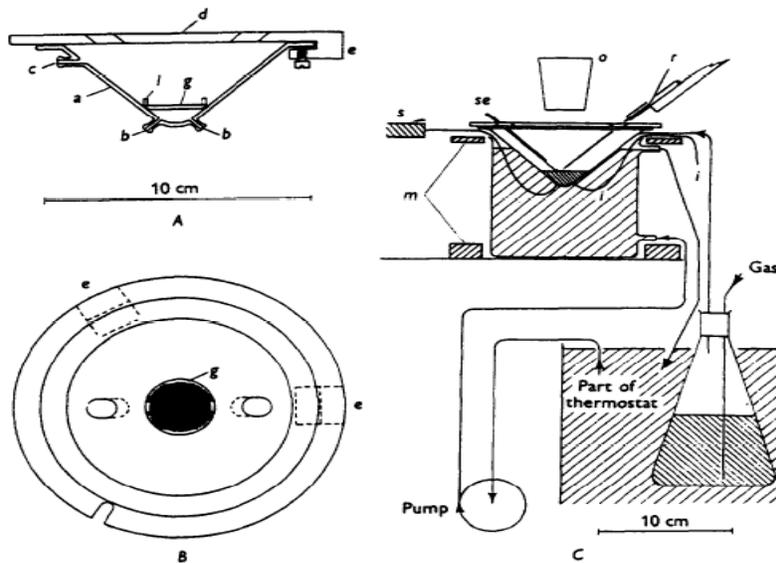


Fig. 6. McIlwain recording chamber. (A) Visto desde arriba. (B) plano (C) aparato ensamblado. (8)

Otros estudios realizados en la década de 1950 ejecutados por Amassian (1953), Hubel (1957) y Mountcastle (1957), aportaron la herramienta de elección usada para registros celulares, el microelectrodo de metal (45), el cual medía los potenciales de

acción mediante la detección de pequeñas señales eléctricas que ocurrían en el exterior de la neurona como resultado de inducir un flujo de corriente cuando la neurona “disparaba” un potencial de acción. Más tarde en 1968 David Robinson escribió una revisión de la tecnología de los uni-electrodos en donde puntualizó una gran discrepancia entre el número de neuronas que se encontraban presentes cerca del microelectrodo de registro y el número de neuronas que realmente se detectaban, así que hizo un cálculo matemático para estimar cuantas neuronas realmente podían ser detectadas, sin embargo, él observó que en la práctica realmente esa estimación no era del todo cierta, ya que sólo pocas neuronas podían ser detectadas, su resultado ha sido avalado por estudios recientes que demuestran el número de neuronas que son realmente detectadas en cada método de ensayo. **(Tabla 4). (45)**

Posteriormente, en 1979 Garthwaite, en 1981 Froetscher y en 1982 Misgeld, todos determinaron el espesor de las rebanadas y las regiones de las rebanadas que podían ser consideradas tejido muerto, también empezaron a realizar estudios para saber que regiones del cerebro podían ser estudiadas y las respuestas que presentaban. **(29)** Desde que se realizaron éste tipo de estudios se han encontrado las regiones del cerebro que pueden ser estudiadas en rebanadas de cerebro **(Tabla 5).**

Área del cerebro	Método utilizado	Pruebas de actividad
Núcleo del pez cebra HVC	Registro extracelular con estimulación antidrómica.	Las neuronas proyectan un ruido desde el núcleo.
Área CA1 de hipocampo de rata	Comparación de los registros intracelulares y extracelulares.	Se observó de 10 a 100 veces menor número de neuronas en base a la densidad neuronal.
Área CA1 de hipocampo de rata	Unidad sencilla.	65% de neuronas activas
Neocorteza de rata	Registro de neuronas por patch-clamp por selección ciega de neuronas.	Alrededor de 10 veces menor a lo medido con blind patch vs. Método single unit (unidad única)
Neocorteza auditiva primaria	Registro de neuronas por patch-clamp	Un promedio de 1 espiga/ célula en respuesta a un tono
Bulbo olfatorio de rata	Registro por Patch-Clamp	Una medición de 10 a 50 veces menor con blind patch vs. Método extracelular de la unidad única
Neocorteza motora primaria de conejo	Registro extracelular con estimulación antidrómica	75% de las neuronas en silencio
Neocorteza primaria somatosensorial de conejo	Registro extracelular con estimulación antidrómica	La mayoría de las neuronas no se observan con estimulación sensorial
Neocorteza primaria visual de gato	Arreglo de microelectrodos	10 veces menos neuronas observadas
Neocorteza de mono	Comparación de registros con anatomía conocida	Hay menos neuronas observadas con registros extracelulares que las esperadas con campos de potencial extracelulares
Neocorteza de humano	Cálculo teórico	Células muy activas 1 de cada 100

Tabla 4. Aquí se muestra la escasa actividad de las neuronas. (45)

Región de la rebanada	Fenómeno	Autor y año
Tallo cerebral	Metabolismo de monoaminas y liberación de éstas. Electrofisiología de la membrana. Efectos del pH en la electrofisiología de la membrana.	Elks. (1979)  Hendersen. (1982)  Fukada y Loeschke. (1977)
Cerebelo	Propiedades electrobiológicas de la membrana y la dendrita.	Llinas y Sugimori. (1980)
Núcleo coclear	Membrana y transmisión electrofisiológica.	Oertel. (1983), Hirsch y Oertel. (1984)
Hipocampo	Ruta de estimulación y circuito. Identificación y acción de neurotransmisores.  Electrofisiología de la membrana. Electrofisiología de la transmisión sináptica. Electrofisiología dendrítica. Acciones de anoxia e hipoglicemia.  Regulación de la síntesis proteica. Epilepsia. Potencialización de largo plazo.	Skrede y Westgaard. (1971)  Malthe-Sorensen. (1979) Corradetti. (1983) Langmoen. (1981) Dingledine y Lagmoen. (1980) Brown. (1983)  Turner. (1983) Lipton. (1982) Kass. (1982) Cox. (1982) Lipton y Heimbach. (1978) Traub y Wong. (1983) Lynch. (1983)
Hipotálamo	Liberación y metabolismo de monoaminas. Electrofisiología de la membrana y liberación de hormonas.	Hyatt. (1984)  Hatton. (1984)
Neocorteza	Respuesta metabólica a estimulación intensa. Liberación de neurotransmisores. Electrofisiología neuronal. Síntesis proteica.	Mcllwain (1975)  Potashner. (1978) Connors. (1982) Dunlop. (1975)
Bulbo Olfatorio	Identificación de neurotransmisores.	Bradford. (1976) Bower. (1984)
Estriado	Liberación de neurotransmisores y metabolismo.	Milner y Wurtman. (1984)

**Tabla 5. Usos de rebanadas de cerebro de diferentes regiones. Fenómeno seleccionado estudiado con rebanadas de cerebro. (41)**

Los estudios del comportamiento neuronal en el cerebro, realizados en rebanadas reflejan respuestas electrofisiológicas y farmacológicas similares a las del SN intacto. La gran calidad en la preparación del tejido es importante para optimizar la viabilidad de la rebanada. Se debe de estar familiarizado con la anatomía externa del cerebro para una rápida localización de la región de interés. **(49)**

### Variación en el espesor de las rebanadas de cerebro.

Hay una extensa variación de preparación de rebanadas que han sido descubiertas para registros "In Vitro". Aunque las rebanas "gruesas" (500 $\mu$ m) son frecuentemente usadas, recientemente se implementó el uso de rebanadas "delgadas" (150-350  $\mu$ m) ya que permiten una guía visual de los registros. Cada preparación tiene sus ventajas y sus desventajas, cada una debe ser usada de acuerdo al contexto de interés. **(49)**

- Preparación de rebanada "gruesa": Este tipo de preparaciones han sido ampliamente usadas para responder preguntas que requieren estimulación eléctrica para determinar rutas de entrada, análisis de actividad de redes neuronales o manipulaciones farmacológicas. Muchas conexiones locales de neuronas pueden ser mantenidas con éste tipo de preparación. Por lo tanto este tipo de rebanadas son utilizadas para examinar propiedades intrínsecas de la membrana y efectos de fármacos en células relativamente intactas y para estudiar circuitos sinápticos locales. **(49)**
- Preparación de rebanada "delgada": Este tipo de preparación permite a las neuronas ser visualizadas en una gran magnificación mediante el uso de un microscopio en la técnica de registro Patch-Clamp. Estas rebanadas son hechas prácticamente de animales muy jóvenes (4 semanas de edad). El objetivo del microscopio ocupa bastante área de trabajo de la rebanada, por lo que limita el

número de electrodos que pueden ser fácilmente usados en un experimento. La salud de las células usualmente es muy buena, aunque su calidad va mejorando en la profundidad de la rebanada. La rebanada “delgada” puede ser usada en estudios de las propiedades intrínsecas de la membrana de las neuronas y en las técnicas donde se realizan parches para realizar los experimentos. Recientes avances señalan el uso de microscopia infrarroja como una técnica de visualización que permite explorar la profundidad de la rebanada y ha incrementado el uso de éste tipo de preparación. **(49)**

En la siguiente tabla **(Tabla 6) (4)** se muestra el tipo de preparación utilizada de acuerdo a la técnica empleada, los usos y consideraciones prácticas.

<b>Técnica</b>	<b>Preparación</b>	<b>Usos</b>	<b>Consideraciones prácticas</b>
Whole-cell patch	Rebanada gruesa (500µM)	Propiedades intrínsecas, análisis sináptico, estudios farmacológicos.	Conjunto de neuronas compactas, se preservan varias conexiones locales de neuronas.
Whole-cell patch	Rebanada delgada (150-350µM)	Propiedades intrínsecas, análisis sináptico, estudios farmacológicos y de canales iónicos.	Conjunto de neuronas difusas, aprovechada por ser una guía visual.
Intracelular	Rebanada gruesa (500µM)	Potencial evocado endógenamente, propiedades intrínsecas, estudios farmacológicos.	Gran conjunto de neuronas compactas.
Intracelular	Rebanada delgada (150-350µM)	No se emplea	

**Tabla 6. Selección de preparación de rebanadas de cerebro. (4)**

### 2.2.2 Edad y especie de animales utilizados.

En general, los roedores son los animales de elección para la preparación de rebanadas de cerebro, las ratas y los cobayos son los animales más indicados para éste tipo de estudios. **(43)** En algunos casos, las edades son elegidas deliberadamente para estudios en particular. En general, los cerebros de animales jóvenes tienen una mayor facilidad en el momento de la disección, y las rebanadas sobreviven mejor que las rebanadas de animales adultos. **(30)**

### 2.2.3 Pre-tratamiento del animal.

Hay investigadores que tratan al animal antes de remover el cerebro, ya que reduce el daño a la rebanada causado por la decapitación y la disección del cerebro. Esto ha sido recientemente descubierto y está siendo muy popular a pesar de los inconvenientes que puede plantear. Hay dos importantes tratamientos: el primero usa una perfusión transcardial de modo que el cerebro queda libre de sangre cuando ocurre la decapitación; el otro tratamiento es el uso de un anestésico como el éter o el pentobarbital. **(30)**.

### 2.2.4 Métodos para la obtención de rebanadas.

Aquí se pueden tener dos variables. La primera de ellas es decidir si se mantiene o no la región de interés dentro del bloque cerebral antes de hacer las rebanas, o bien aislar primero la región de interés y después rebanarla. La segunda variable es el equipo usado para rebanar. Hay cuatro equipos utilizados actualmente para éste propósito: Vibratome, Vibroslice, McIlwain/Stoelting chooper y la rebanadora Farqhar. El Vibratome es el más difícil de usar y requiere de mayor tiempo, aunque es el que más se usa ya que suele ser el más gentil con el tejido. En algunos casos se llegan a hacer las rebanadas manualmente. **(49)**.

Cada método tiene sus ventajas y desventajas y el investigador debe determinar el método más apropiado para su experimento.

### Preparación de rebanadas de animales jóvenes.

Para algunas técnicas, se prefiere el uso de rebanadas de cerebro, procedentes de animales jóvenes (2-4 semanas de edad), por dos razones: La primera es que el tejido de animales jóvenes es más resistente al traumatismo en el que se ve sometido al momento de hacer la preparación en comparación con el tejido adulto. Además, de que no se aumenta el margen de error en cada paso de preparación de rebanadas procedentes de este tipo de animales. La segunda es que es más fácil observar células individuales, quizá porque la mielinización no está completa en ratas jóvenes. El uso de éste tipo de tejido permite una mejor visualización de las células, y por ejemplo en el caso de la técnica patch clamp, permite hacer y colocar el parche a una mayor profundidad, en el caso de querer colocarlo en el soma, la dendrita, o el axón de la neurona de interés, antes de la decapitación, la rata es anestesiada usualmente con un anestésico volátil como halotano o isoflurano, los anestésicos volátiles son preferentemente usados en vez de los anestésicos inyectables como el pentobarbital, ya que este tipo forman una capa difusa alrededor del tejido cerebral alterando la función neuronal. La consistencia es una de las reglas más importantes al momento de querer obtener rebanadas saludables, ésta no sólo es vital para encontrar un conjunto de parámetros o procedimientos que funcionen bien, sino que también lo es para reducir la variabilidad entre experimentos. Día a día la variabilidad en la preparación de rebanadas resulta en una variabilidad en la calidad de los datos registrados. Por lo que para mantener la consistencia y evitar tanta variabilidad entre los datos obtenidos se necesitan controlar una serie de variables tales como: (1) el tiempo en el que es removido el cerebro del animal y es puesto en una cámara con líquido

cefalorraquídeo artificial (LCRA) oxigenado, (2) el tiempo en que cada hemisferio es puesto en el equipo para hacer las rebanadas, (3) el tiempo en el que se obtiene la primera rebanada viable, (4) el tiempo cuando la última rebanada es obtenida, (5) el número de rebanadas y (6) el grosor de las rebanadas. Es recomendable obtener el cerebro en un tiempo estimado de 30-45 segundos, los pasos para obtener el cerebro son los siguientes: el cráneo se corta con un par de tijeras pequeñas, a lo largo de la línea media de éste, la piamadre, duramadre y el aracnoides se eliminan con tijeras para corte fino, después se levanta suavemente el cerebro de la cavidad craneal, cortando cuidadosamente los nervios craneales. **(33)**

### Preparación de rebanadas de animales adultos.

La preparación de rebanadas de cerebro de animales adultos requiere especial atención a los pequeños detalles con respecto a las soluciones y a la disección, una dificultad evidente es que el cráneo de los animales adultos es mucho más grueso y puede ser mucho más difícil de quitar, y al hacerlo se pueden generar astillas de cráneo lo cual puede afectar la viabilidad de la rebanada, aunado con que el cerebro de un animal adulto es menos resistente, incluso un sutil error en cualquiera de las fases del proceso de disección puede afectar dramáticamente la capacidad de obtener una alta calidad en los registros de neuronas sanas.**(33)**

Sin embargo, el tiempo de vida de las rebanadas es corto, por lo que se han establecido métodos de preparación de rebanadas para lograr un mayor tiempo de vida. Por lo que se ha implementado recientemente la técnica llamada “organotypic slice cultures” que inicialmente se adoptó para determinar que propiedades del tejido podrían ser usadas para poder preservarlo, y si ese era el caso, el tejido podría comportarse como una preparación “fresca”. Los requerimientos para utilizar ésta técnica son muy básicos:

---

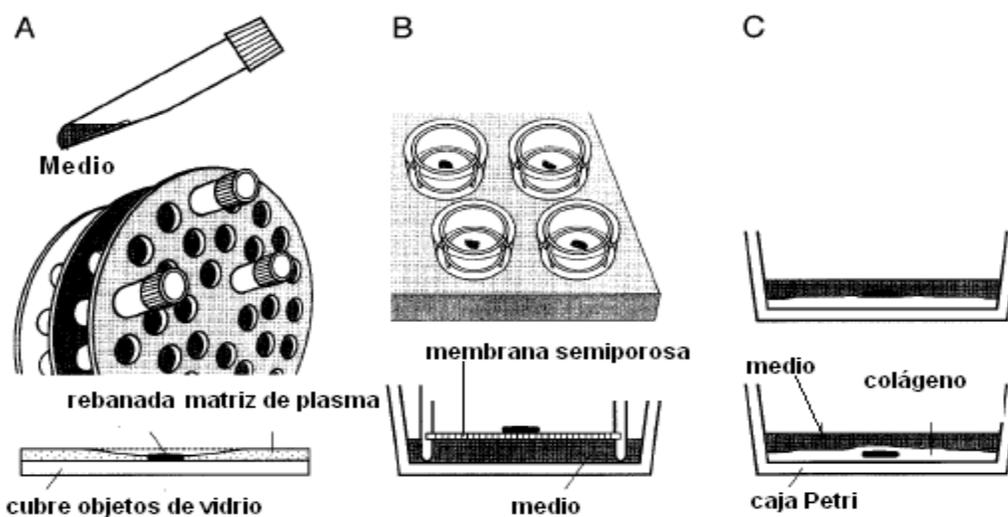
---

mantenimiento estéril a una temperatura estable de 30°C, el tejido tiene que estar puesto en un sustrato, con un medio de crecimiento y oxigenación suficiente, las demandas de formulación del medio son realmente modestas y varias composiciones dan buenos resultados. Muchos investigadores trabajan con medios que contienen 25% de suero de caballo, 50% de medio sintético como medio basal o medio mínimo esencial, y 25% de solución de sales balanceadas y enriquecidas con glucosa a una concentración de 5.6 mM. **(13)**

El paso inicial de la preparación de las rebanadas es muy similar a los otros métodos, después de remover el tejido es cortado en rebanadas de un grosor de 100-400µm para después lavarlas con soluciones de sales para permitir que los tejidos eliminen sustancias tóxicas como aminoácidos excitadores (ácido glutámico y ácido aspártico). El siguiente paso implica colocar las rebanadas en un medio para cultivo por tiempos prolongados, después el tejido es colocado en un tubo con una matriz de plasma o de colágeno sometiendo a una rotación continua, la oxigenación en ésta etapa está garantizada gracias a que la rotación permite un cambio de oxígeno en la interfaz líquido-gas, **(13)** ésta técnica fue introducida por Hogue en 1947. **(47)** En una variante de ésta técnica, las rebanadas son puestas en una interfase de aire-medio con una membrana semiporosa, ésta técnica fue introducida por Yamamoto en 1989, y puesta en gran práctica por Stoppini en 1991, donde en su estudio concluyó que este tipo de técnica facilita el estudio de conectividad sináptica y plasticidad observada en el hipocampo. **(41)**, **(47)** Otra variante más, es cuando el tejido es puesto en platos de plástico recubiertos de colágeno o en una caja Petri que tiene un fondo permeable al gas incrustado en tres capas de colágeno que adoptan medidas especiales para facilitar la oxigenación. **(Fig. 7.) (13)** Este tipo de técnicas mantiene la citoarquitectura de la célula, lo que permite la

---

visualización de la diferenciación celular, la principal diferencia de éste tipo de técnicas es el espesor final de la rebanada y su tiempo de vida, independientemente de que el espesor del tejido depende del origen anatómico de los tejidos y la edad del animal usado. Este tipo de técnicas resultan útiles ya que ofrecen una amplia perspectiva a las necesidades del investigador, en donde se pueden obtener tejidos para aquellos experimentos que requieren acceso óptico a las neuronas para observar individualmente células nerviosas, secciones de tejido para estudios morfológicos ó para estudios bioquímicos que requieren grandes cantidades de tejido. También, éstas técnicas se adaptan bien a estudios a corto plazo y tienen ventajas en experimentos en donde se implantan electrodos de estimulación crónica ó electrodos de registro. (13)



**Fig. 7. Técnica de preparación de rebanadas de cerebro. A) Las rebanadas son puestas en el tubo, en una matriz de plasma sobre un cubre objetos de vidrio, sometido a lisis durante la primer semana, debido a la liberación de sustancias proteolíticas provenientes del tejido. Durante la lenta rotación (diez revoluciones por hora) el tejido está cubierto por medio durante la mitad del ciclo, lo que resulta en una continua alternación de alimentación y aireación. B) En la interfase el tejido es puesto sobre una membrana semiporosa, en la parte inferior se encuentra el medio, donde la mitad del tejido está inmerso en éste y la otra tiene libre acceso al oxígeno, C) Los tejidos cultivados en cajas Petri se colocan ya sea directamente sobre la capa de colágeno ó incrustados en las capas, dado que la oxigenación es limitada los tejidos se cultivan por pocos días ó bien se preparan rebanadas muy delgadas. (13)**

---

---

*PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.*

*2.2.5 Solución de pre-incubación.*

La preparación de las rebanadas produce un significativo daño como resultado de la combinación de isquemia antes del rebanado y trauma durante el rebanado, ambos son inevitables usando ésta técnica.

Las soluciones dentro de las cuales el cerebro es aislado y donde las rebanadas son inicialmente puestas están hechas de diferentes composiciones. En algunos casos, estos son los mismos buffers usados a lo largo del experimento, pero en otros casos, son buffers especiales de pre-incubación diseñados para prevenir el daño a la rebanada que ocurre durante éste periodo. Son dos los buffers más usados en éste paso: el que tiene NaCl y sacarosa, y el buffer diseñado para prevenir la toxicidad del Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Otro buffer de pre-incubación es el que incluye grandes cantidades de dextran, adicionado para incrementar la presión osmótica coloidal. **(38)**.

*2.2.6 Soluciones para la incubación.*

Aquí se usan las soluciones llamadas Líquido Cefaloraquídeo Artificial (LCRA) ó también comúnmente llamadas Ringer. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es el parámetro que más varía, en un rango de 0.5-2.5 mM. Sin embargo, algunos investigadores también recurren al dextran y otros antioxidantes en el buffer. Se incluye en éstas soluciones una combinación de 95%  $\text{O}_2$ / 5%  $\text{CO}_2$  con el objetivo de satisfacer la demanda de oxígeno por parte de las células. Acerca de éstas soluciones se han realizado diversos estudios que evalúan la viabilidad de la rebanada, la neuroprotección de la rebanada, comparando las cinco soluciones más usadas en ésta sección (**Tabla 7**), donde demuestran que las soluciones con gran osmolaridad, con una concentración baja o nula de  $\text{Ca}^{2+}$ , y ácido kinurénico son neuroprotectivas durante la preparación y la incubación de la rebanada,

dilucidando el posible mecanismo de neuroprotección mediado por el bloqueo del edema citotóxico influenciado por el  $\text{Ca}^{2+}$  durante el rebanado. **(38)**

	Solución 1	Solución 2	Solución 3	Solución 4	Solución 5
	mM	mM	mM	mM	mM
NaCl	124	124	124	124	124
KCl	3	3	3	3	3
MgCl	2	2	2	2	20
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
$\text{NaH}_2\text{CO}_3$	26	26	26	26	26
Dextrosa	10	10	10	10	10
Sacarosa	-	200	-	200	200
$\text{CaCl}_2$	2	2	0	0	0.5
Acido Kinurénico	-	-	1	1	1

**Tabla 7. Soluciones usadas para la preparación e incubación de las rebanadas. (38)**

### 2.2.7 Temperaturas de incubación

Hay una variación de temperaturas que pueden ser usadas, desde temperaturas de 21-23°C a rangos intermedios de temperaturas fisiológicas (36°C). Esta es una de las áreas más controversiales por la dificultad del balance entre la viabilidad y la facilidad de la experimentación, las cuales son óptimas a bajas temperaturas, y las propiedades fisiológicas reales, las cuales probablemente son óptimas a 35-36°C. **(49)**.

---

---

Características de neuronas muertas o no saludables y características de neuronas saludables.

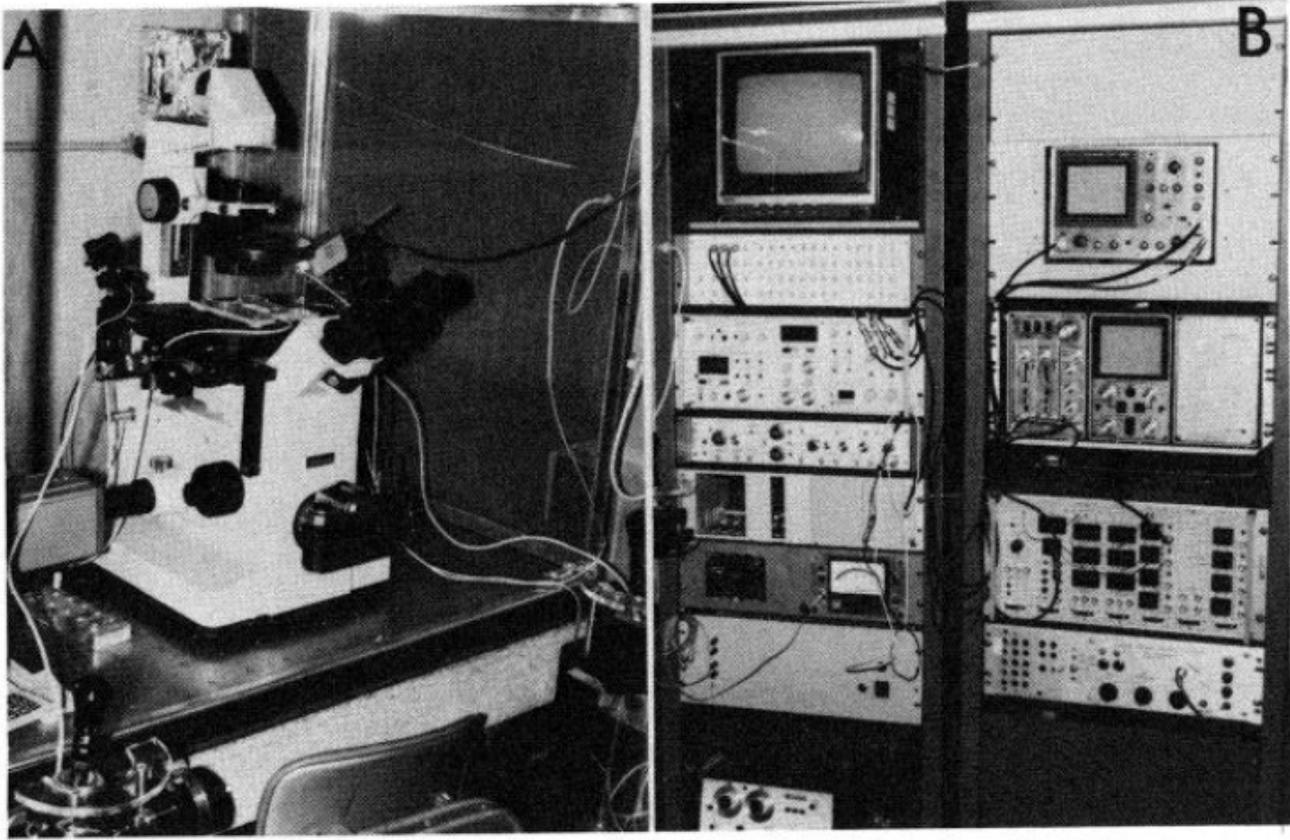
Numerosas neuronas muertas están siempre presentes en los primeros 25µm debajo de la superficie del cerebro, éstas suelen tener una característica apariencia hinchada, en muchos casos todo lo que se puede discernir es un gran núcleo y un predominante nucleolo, con el tiempo éstas células muertas suelen volverse “invisibles”. Las neuronas que no suelen estar saludables, se diferencian de las muertas porque todavía se pueden distinguir sus estructuras dendríticas. En cambio en las neuronas saludables no es visible el núcleo, mientras que la membrana de la célula se distingue lisa y brillante. **(33)**.

## **2.3 TÉCNICAS DE REGISTRO.**

### **2.3.1 *Registro intracelular.***

La técnica de registro intracelular involucra medición de voltaje (V) y/o corriente a través de la membrana celular, se utiliza cuando se requiere obtener información acerca del funcionamiento de neuronas individuales y las propiedades de la membrana, el significado funcional de las neuronas es examinado con técnicas intracelulares estudiando la respuesta de las neuronas durante la estimulación sensorial.**(27)**

Los aparatos para el registro intracelular son los amplificadores, osciloscopios, amplificador de audio, estimuladores y micromanipuladores. **(Fig. 8 y 9) (27)**



**Fig. 8. Aparatos usados en el registro intracelular. (A) Microscopio utilizado como cámara de registro. (B) Fotografía de instrumentos electrónicos utilizados en el registro intracelular, de arriba hacia abajo: amplificador, fuente de poder. En el panel derecho se encuentran; osciloscopio análogo, osciloscopio digital, y un estimulador. (27)**

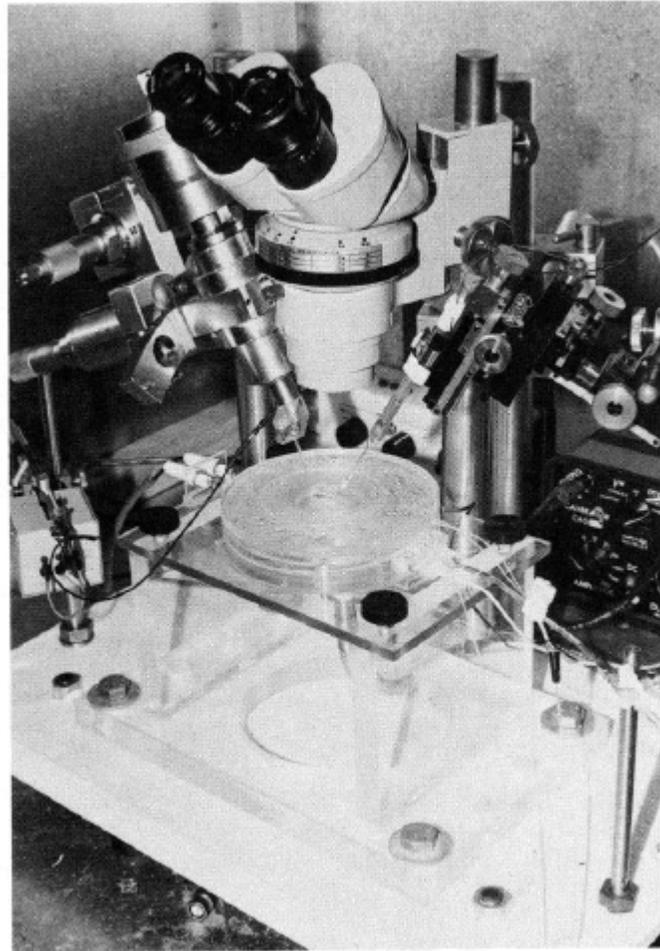


Fig. 9. Fotografía de una cámara de registro de rebanadas de cerebro. (27)

Hay muchas técnicas de registro intracelular y éstas son:

### 2.3.2 Técnica de Registro Current Clamp (o control de corriente).

“Mediciones del cambio del potencial de membrana cuando se inyecta una corriente constante dentro de la célula a través de un electrodo de registro”. (18)

Tradicionalmente, el registro que se hace para medir cambios en el potencial de membrana de una neurona es el registro intracelular. Los cambios en el V que yacen en la excitabilidad neuronal como potenciales de acción, post-potenciales y post-potenciales sinápticos pueden determinarse con técnicas intracelulares. Los cambios en el voltaje de la membrana asociados con estos eventos son estudiados con la técnica current clamp,

donde el investigador aplica una cantidad de corriente conocida y la medición en los cambios del potencial de membrana (y la forma de la onda) es en respuesta a ésta corriente. Los cambios en el potencial de membrana pueden ser generados por corrientes intrínsecas y extrínsecas. Las corrientes extrínsecas son corrientes de conocida amplitud y duración, aplicadas por el experimentador con ayuda de un electrodo intracelular con el fin de imitar las corrientes producidas por las aportaciones sinápticas. Current clamp significa que la corriente aplicada a través del electrodo intracelular va sujeta a un valor constante que propone el experimentador. Esto no significa que la corriente que fluye a través de la membrana es fijada en un valor constante. **(16)**

### Registro del potencial de membrana.

Un electrodo intracelular (o una pipeta que parcha) es conectado a la unidad amplificadora que es una entrada de voltaje que registra el V que pasa a través de la punta de la pipeta. **(16)**

### Inyección de corriente a través del electrodo intracelular.

El circuito de inyección de corriente es conectado a un nodo de entrada, la corriente es pasada a través del electrodo dentro de la célula. Cuando el electrodo de registro es llenado con KCl, una corriente que expresa iones  $K^+$  dentro de la célula despolariza la membrana, por otro lado una corriente que expresa iones  $Cl^-$  dentro del interior de la célula hiperpolariza la membrana. **(16)**

La fuente de corriente también puede ser usada para inyectar pulsos de corriente de corta duración. **(16)**

---

---

### Medición del potencial de membrana cuando la corriente es pasada a través del electrodo.

La corriente inyectada provoca una caída del V a través de la resistencia de la pipeta. Por lo cual es difícil separar el potencial que se encuentra en la punta del electrodo del potencial total. En éste caso se utiliza un circuito de compensación que elimina la medición del potencial que se encuentra en la pipeta.

Usualmente, se desea que los valores de potencial de membrana sean dados por una inyección de corriente vía el electrodo de registro y que sean controlados manualmente por una corriente forzosamente necesaria para mantener un potencial constante, sin embargo ésta técnica está asociada a algunas desventajas, por lo que fue creada una modificación:

- Un electrodo de corriente sencillo y un amplificador de voltaje fueron modificados para compensar cambios pequeños en el potencial de membrana sin afectar las respuestas del voltaje. Básicamente se incorporó al circuito de retroalimentación de V, filtros que amplificaron la respuesta y permitieron la inyección de pulsos de corriente dentro de las células. Así durante el registro son controlados los potenciales de membrana, con lo que es posible monitorear la resistencia de la célula ó la relación de corriente/voltaje. **(50)**.

Ésta nueva técnica de registro ha sido designada como “voltaje-clamp-controlled current clamp” (VCcCC) y su rendimiento fue probado realizando registros intracelulares usando neuronas neocorticales “*In Vitro*” usando microelectrodos convencionales o electrodos de control en parche. Esta técnica se llevo a cabo utilizando un electrodo discontinuo y un amplificador, éste es modificado de tal forma que los cambios lentos en el potencial de membrana son compensados por el módulo voltage-clamp sin afectar las respuestas más rápidas como los potenciales de campo o potenciales sinápticos. La

inyección de corriente fue posible hacerla gracias a la combinación del módulo voltage-clamp con el amplificador. **(50)**

Se modificó un electrodo sencillo en el amplificador voltage-clamp basado en la inyección de corriente discontinua. El diseño electrónico de un sistema de tiempo compartido puede ser fácilmente alterado por la incorporación de un filtro que es seleccionable por medio de constantes de tiempo en el circuito de retroalimentación de voltage-clamp. Esta modificación permite la medición de los potenciales por medio de la técnica current-clamp y éstos pueden ser controlados con una precisión comparable a los registros realizados en el modo normal de voltage-clamp. De esto se infiere que los protocolos usados para la metodología current-clamp pueden ser utilizados cuando los registros sean realizados por medio de la técnica VCcCC. Además, los resultados obtenidos por medio de los registros VCcCC pueden ser controlados mediante el uso de métodos estándares (por ejemplo los registros en modo puente). **(50)**

Es importante tomar algunas precauciones antes de realizar ésta técnica:

- Cuando se utiliza una alta resistencia para registros en microelectrodos intracelulares, los electrodos deben ser elegidos cuidadosamente de acuerdo a los criterios del material. La polarización y la rectificación de los electrodos no permite la sintonización precisa en el modo normal voltage-clamp. El ajuste exacto del amplificador en el modo voltage-clamp es obligatorio para la aplicación de la técnica VCcCC.
- Durante el registro patch-clamp el electrodo no debe mostrar diferencias significativas de voltaje.

---

---

### 2.3.3 Técnica de registro Voltage Clamp (o control de voltaje).

“Medición de la corriente iónica a través de la membrana celular cuando el potencial de membrana es puesto a un valor constante”. **(18)**

El concepto voltage-clamp fue introducido por Kenneth Cole y George Marmount en 1940 quienes descubrieron que con ayuda de dos electrodos y un circuito de retroalimentación, se coloca el potencial de membrana celular a la medida que el experimentador desee; más tarde en 1952 Alan Hodgkin y Andrew Huxley continuaron con éstos experimentos para poder dilucidar el impacto del flujo iónico que cruzaba la membrana. **(25)** La técnica voltage-clamp es un método para registrar la corriente que fluye a través de la membrana celular donde el potencial de membrana es mantenido como un valor constante por el experimentador. En contraste con la técnica de current clamp, voltage clamp no imita un proceso encontrado naturalmente. Sin embargo existen varias razones para realizar éste tipo de técnica:

- Cuando se estudian los canales regulados por voltage, la técnica voltage clamp permite controlar la variable voltage la cual determina si los canales se abren o se cierran.
- En contraste el potencial de membrana se mantiene constante, por lo cual el experimentador está seguro de que la corriente que fluye a través de la membrana es linealmente proporcional a la conductancia  $g$  ( $g= 1/R$ ). Por ejemplo, la conductancia  $g_{Na}$  del número total (N) de canales de Na regulados por V presentes en la membrana, los canales regulados por V del  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  son bloqueados por agentes farmacológicos y la corriente que pasa a través de la membrana registrada con la técnica voltaje clamp, es proporcional a  $g_{Na}$ . **(16)**

Hay una variedad de métodos de voltage-clamp, la elección del método depende del tamaño y la forma de la preparación que se investigue. En general todos los métodos tienen un amplificador de retroalimentación que recibe una señal de V del electrodo de registro (E') y compara esto con un comando de potencial. La diferencia entre estas señales se amplifica y se aplica a la membrana como una corriente a través de un electrodo (I), la corriente (I) puede ser registrada como un V a través de un resistor en serie con un electrodo de corriente, ó a través de una resistencia de solución externa. **(15)**

A continuación se describen los métodos de voltage-clamp.

### 2.3.4 Métodos de cable axial. (Axial wire methods).

Estos métodos son aplicables a las grandes preparaciones como axones de los calamares gigantes, las larvas y fibras musculares de la Myxicola gigante. El V interno y la corriente de los electrodos están formados por alambres insertados longitudinalmente en el centro de la preparación, aunque a veces una medición del potencial de membrana es hecha con un microelectrodo. El método ofrece una pinza muy rápida de acceso a la resistencia y es combinado con un método de control de la solución interna de la perfusión. **(15)**

### 2.3.5 Métodos Gap. (Gap methods).

El método se utiliza por ejemplo para axones mielinizados, y fibras musculares de vertebrados. La preparación corre a lo largo de una serie de piscinas con solución separadas por aire, de sacarosa o de vaselina de alta resistencia eléctrica. Al final las piscinas suelen contener solución intracelular. Estas permiten la medición del potencial de membrana y la liberación de corriente. **(15)**

### 2.3.6 Pinzas con microelectrodos. (Microelectrode clamps)

En éstas técnicas se utilizan microelectrodos tanto para medir el potencial de membrana como para dar corriente. El método puede ser utilizado para suprimir el espacio entre las células cuando estas son esféricas o en forma de cilindros. Un caso especial de ésta técnica es el electrodo de tres pinzas que fue desarrollado para su uso en los extremos de las fibras musculares. Por otro lado, dos electrodos con pinzas pueden insertarse en células grandes ya que estas toleran bien dos electrodos intracelulares. Las células demasiado pequeñas pueden ser demasiado frágiles para permitir la inserción de dos electrodos sin causar daños, éste tipo de métodos se han aplicado para estudiar las conductancias cinéticas de la membrana en el centro de las neuronas, y para analizar más rápidamente las corrientes sinápticas en el SNC. **(15)**

### 2.3.7 Técnica de registro Patch Clamp (ó control en parche).

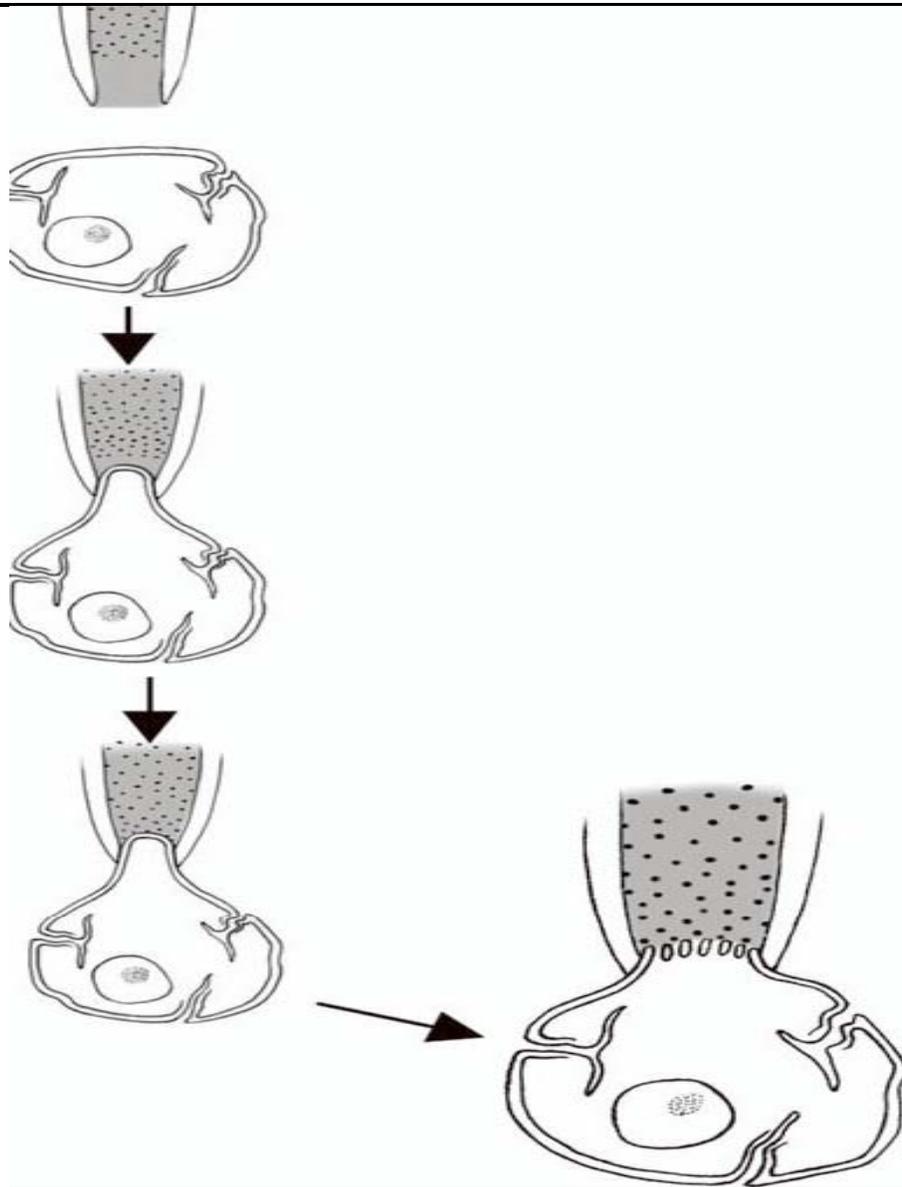
“Mediciones de voltaje o corriente a través de canales iónicos usando una micropipeta”. **(18)**

Esta técnica fue introducida por Erwin Neher y Bert Sakmann a mediados de los 70's, facilitando los registros de las corrientes que pasan a través de los canales iónicos en las células vivas, dando promoción a la capacidad de estudiar la función de la membrana excitable de células como las neuronas. A principio de la década de 1980 la técnica evolucionó para permitir el registro de las corrientes transmitidas a través de los canales iónicos de toda la membrana a través de un pequeño parche en la membrana con ayuda de una succión generada en la punta de una pipeta por una suave presión negativa. **(42)**

La técnica patch clamp es una variación de la técnica voltage clamp. Esta técnica se basa en una idea muy simple. Se utiliza una pipeta de vidrio con un orificio muy

---

pequeño para lograr un contacto estrecho con un área muy pequeña, o parche, de la membrana celular. Después de succionar con suavidad a través de la pipeta, la conexión entre la pipeta y la membrana se torna tan fuerte que ningún ión puede pasarse entre ambos. **(Fig. 10)** De éste modo todos los iones que pasan cuando se abre un único canal iónico deben ingresar a la pipeta. La corriente eléctrica resultante, aunque pequeña, puede ser medida con un amplificador electrónico ultrasensible conectado a la pipeta. Sobre la base de las características geométricas de la zona implicada, ésta disposición por lo general se denomina método en control de parche con fijación a la célula. Como sucede con el método convencional de control de V, el método de control en parche permite el registro experimental del potencial de membrana para caracterizar la dependencia de voltaje de las corrientes de la membrana. Si bien la capacidad para registrar las corrientes que fluyen a través de canales iónicos es una ventaja importante del método de control en parche con fijación a la célula. Se ha observado que algunas modificaciones técnicas menores ofrecen muchas ventajas, Por ejemplo, si se secciona el parche de la membrana en el interior de la pipeta y el citoplasma de la célula. Esta preparación permite efectuar mediciones de potenciales eléctricos y corrientes desde toda la célula y se denomina método de célula completa. La preparación de célula completa también permite el intercambio por difusión entre la pipeta y el citoplasma lo que produce una forma útil de inyectar sustancias en el interior de la célula. **(42)**



**Fig. 10. Técnica Patch-Clamp. El contacto estrecho entre la pipeta y la membrana solo permite que pasen los iones a través de la pipeta, y después por los canales iónicos. (42)**

Otras dos variantes del método de control en parche se originan en el hallazgo de que una vez formado un sello ajustado entre la membrana y la pipeta de vidrio, pequeños trozos de membrana pueden ser separados de la célula sin interrumpir el sello, esto proporciona una preparación que está libre de las complicaciones implicadas con la manipulación del resto de la célula. Si se separa simplemente la pipeta que se utiliza en la preparación con fijación a la célula, se produce una pequeña vesícula de membrana que

queda fijada a la pipeta. Al exponer la punta de la pipeta al aire, la vesícula se abre para dar un pequeño parche de membrana con exposición al exterior, de la que previamente era su superficie intracelular. Esta disposición, denominada preparación con el interior del parche hacia fuera (whole-cell patch-clamp), (**Fig. 11**) permite la medición de las corrientes de canal único con el beneficio agregado de hacer posible el cambio del medio al cual está expuesta la superficie intracelular. Por lo tanto, la preparación con el interior hacia afuera es particularmente útil cuando se estudia la influencia de los reguladores intracelulares sobre la función de los canales iónicos. (**36**)

Como alternativa, si se prepara la pipeta mientras se encuentra en la preparación de célula completa, se produce un parche de membrana que tiene su superficie extracelular expuesta. Esta disposición, denominada preparación con el exterior hacia afuera, (**Fig. 12**) es óptima para estudiar cómo la actividad de los canales es influida por las señales extracelulares, como los neurotransmisores. Esta gama de configuraciones posibles convierte el método de control en parche en una técnica asombrosamente versátil para los estudios de la función de los canales iónicos. (**36**)

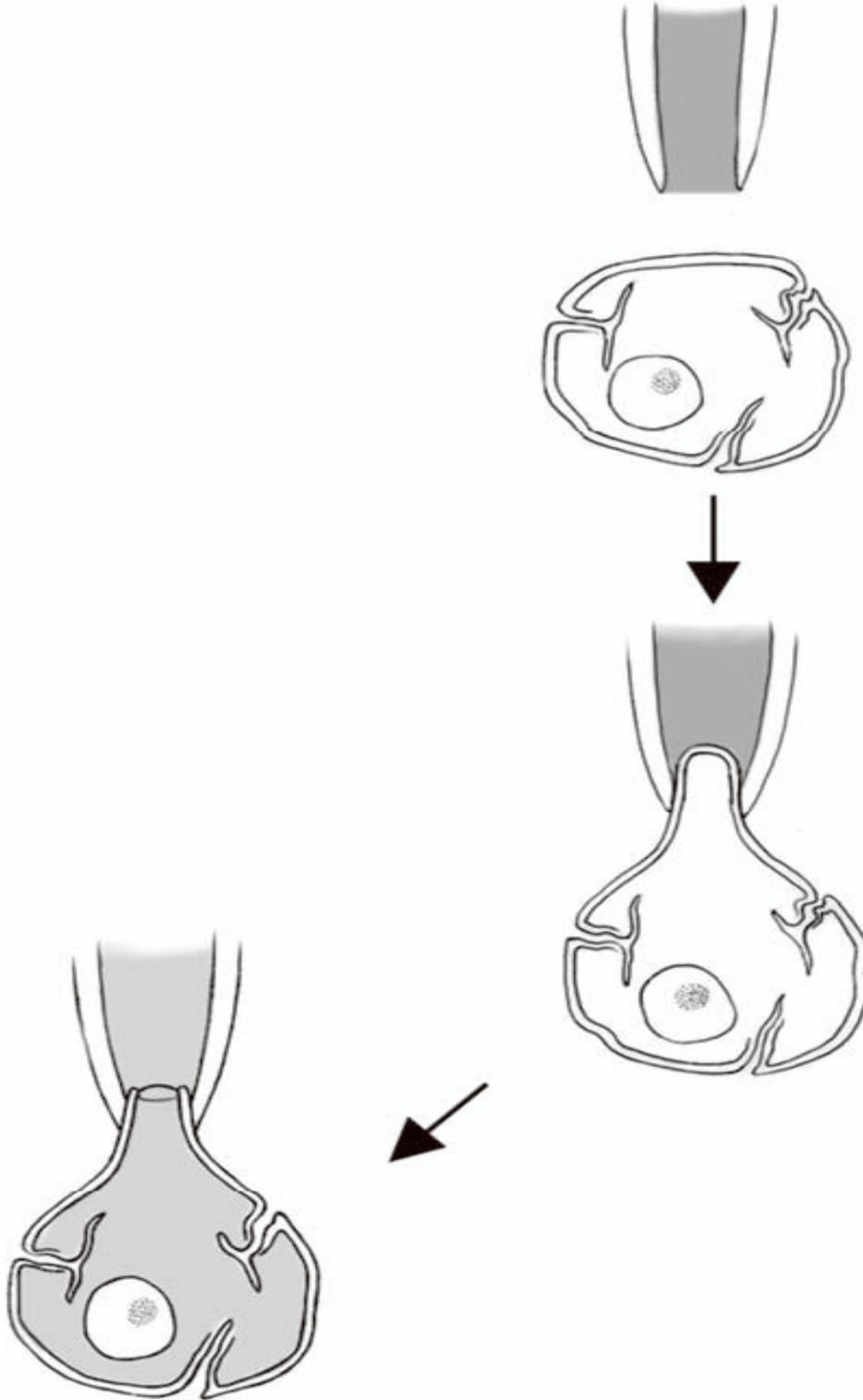


Fig. 11. Técnica Whole-cell Patch-Clamp. El acceso físico y eléctrico a la célula se obtiene por la formación de una vesícula con su posterior ruptura abriendo así la membrana. (42)

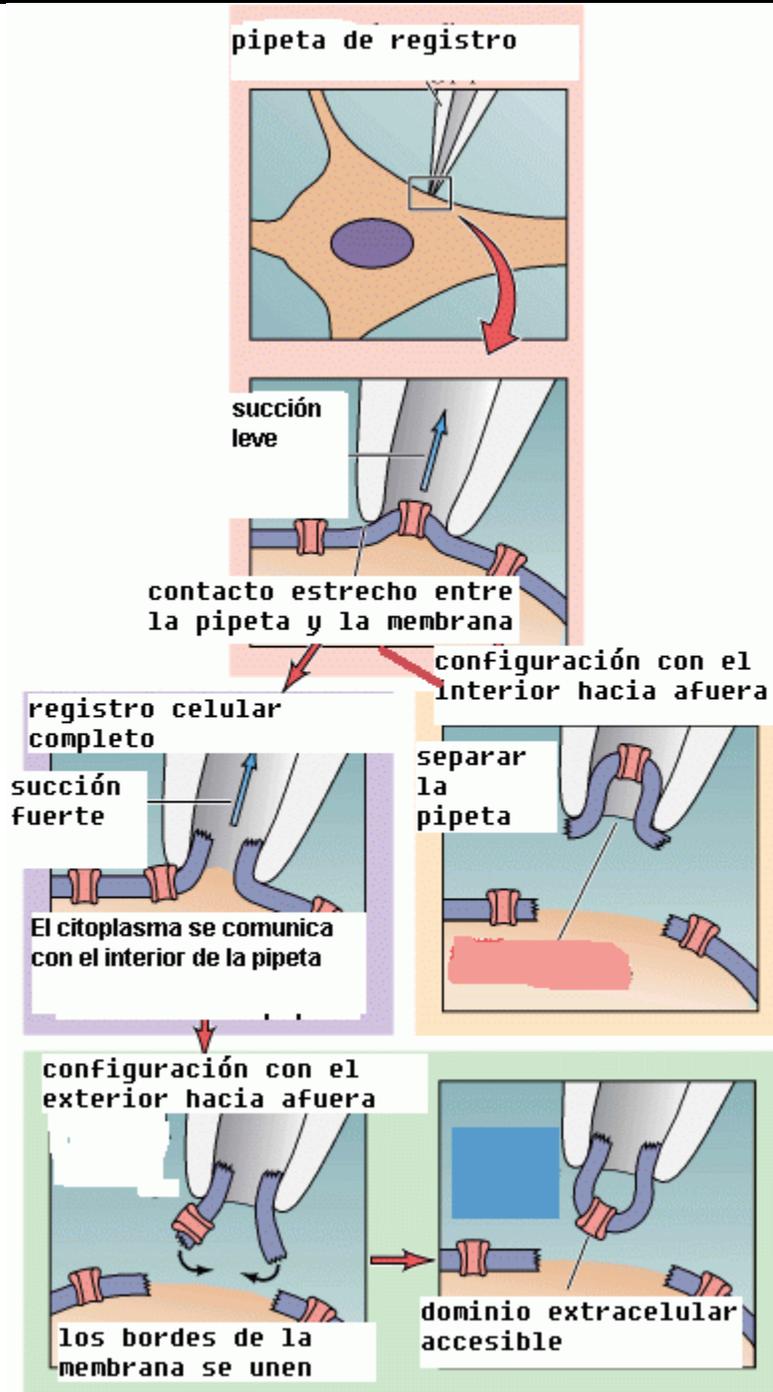


Fig. 12. Técnica Patch-Clamp en sus diferentes configuraciones. (7)

Algunas aplicaciones de la técnica de Patch-clamp es el estudio de las propiedades de los canales iónicos y la descarga neural. (28)

La gran ventaja de la técnica Patch-Clamp en la fisiología celular es que se realiza un análisis real y sensible de la actividad eléctrica de la membrana celular a un nivel molecular. **(9)**

#### 2.3.8 Técnica de registro con electrodo sharp.

“Se realizan mediciones del potencial dentro de la membrana celular usando un electrodo sharp el cual es una micropipeta de vidrio con un pequeño poro”. **(18)**

#### 2.4 Registro extracelular.

Los registros extracelulares involucran mediciones fuera de la célula, incluyen registros de células y fibras nerviosas; (44) son hechos para obtener información acerca de la actividad de neuronas sencillas (unidad única de registro), la actividad de muchas células simultáneamente (unidad múltiple de registro), o la actividad sincrónica de muchas células al mismo tiempo (potenciales de campo). Los registros extracelulares tienen grandes ventajas sobre las técnicas intracelulares que resulta ser una técnica con mayor dificultad de ejecutarse y una menor estabilidad. Por otro lado, la principal desventaja de la unidad única de registro es que solo pueden ser estudiadas aquellas neuronas que presenten un potencial de acción, y por lo tanto los registros extracelulares son obviamente menos usados en el estudio de aquellas células que son “silenciosas” la mayor parte del tiempo (células que no presentan potenciales de acción).**(49)**

La unidad múltiple de registro es aplicada comúnmente cuando la cuestión de interés involucra una población de neuronas, éste tipo de registro se enfoca en la actividad de múltiples neuronas simultáneamente y puede ser usado para describir las influencias inhibitoras y excitadoras en una población de neuronas. Las mediciones del potencial de campo revela la actividad de muchas neuronas al mismo tiempo (actividad sincrónica). El potencial de campo presenta una mejor resolución en aquellas estructuras como células laminares, paquetes de gran densidad y el hipocampo. Como con todas las técnicas extracelulares, el potencial de membrana no puede ser medido con registros de campo. A pesar de las limitaciones que dan los registros extracelulares, estas son muy usados para examinar los comportamientos de “fuego” y para determinar la viabilidad de la rebanada. Existen algunas técnicas de registro extracelular, las cuales son:

### 2.4.1 Unidad única de registro.(*Single-unit recording*)

“Registra la actividad eléctrica de una sola neurona con una pequeña punta del electrodo”.

**(18)**

Desde su perfeccionamiento en los años 50's el método de la unidad única de registro se ha utilizado para obtener una riqueza de datos sobre las estructuras del SNC. Los microelectrodos en registros extracelulares han sido utilizados para asignar el posible desempeño de las neuronas con el fin de responder a preguntas fundamentales como la excitabilidad de las dendritas del SNC, y más recientemente se han utilizado para dilucidar el comportamiento de los patrones del SNC y extrapolarlo al comportamiento del organismo en su conjunto y como una técnica de rastreo de patrones de conectividad dentro del SNC. Sin embargo, el método de unidad única de registro es la técnica de elección para el estudio de las respuestas de las neuronas sensoriales a estímulos y su

comportamiento relacionado con los disparos en momentos de alerta así como en situaciones de movimiento. **(24)**

#### 2.4.2 Unidad múltiple de registro. (Multi-unit recording)

“Registra la actividad eléctrica generada por varias neuronas”. **(18)** La frase “multi-unit recording” se ha utilizado para la medición de la actividad neuronal en una variedad de escalas, que abarca tanto un promedio de mediciones de actividad de muchos miles (a veces millones de neuronas así como la medición de los potenciales de acción. Las mediciones pueden ser eléctricas (corriente o potencial), magnéticos, ópticos (utilizando tintes sensibles al V). **(20)**.

#### 2.4.3 Potenciales de campo.

“Registra el potencial de campo que es generado por la actividad de muchas células”. **(18)**

#### 2.4.4 Amperometría.

“Registro de los cambios en la composición química de los componentes oxidados de una muestra biológica utilizando un electrodo de carbono. **(18)**

Por otro lado, necesitamos saber que tipo de características deben tener los electrodos que se usan tanto para registros intracelulares como extracelulares.

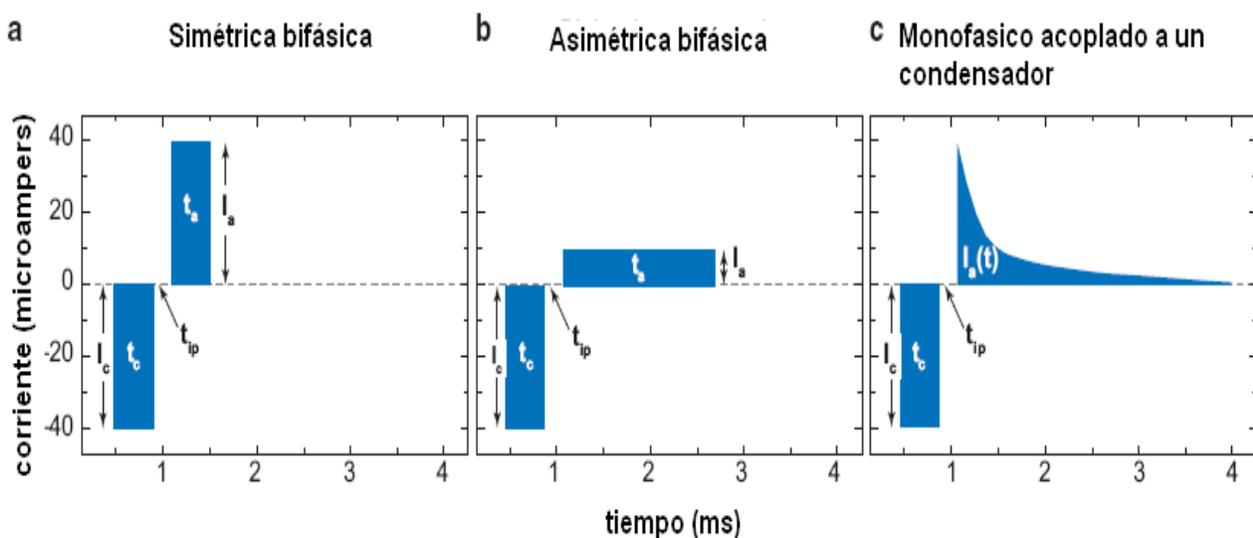
### **2.5 ELECTRODOS DE METAL.**

El uso de microelectrodos de metal para registros de tejido nervioso ha sido muy generalizado, ya que es uno de los principales instrumentos de los investigadores interesados en la organización del sistema nervioso a nivel celular. **(39)**

Los electrodos que son utilizados en éste tipo de técnica se pueden agrupar en dos tipos: electrodos de estimulación y electrodos de registro. Analizaremos a detalle éstas dos clasificaciones.

### 2.5.1 Requerimientos electrónicos.

2.5.2 Electrodos de estimulación. La estimulación eléctrica inicia como una respuesta funcional por la despolarización de la membrana de células excitables. La despolarización es definida como el flujo de corriente iónica entre dos o más electrodos, en donde por lo menos uno de ellos está cerca del tejido en estudio. En la mayoría de las aplicaciones neuronales la estimulación eléctrica se aplica como una serie de pulsos de corriente bifásica. **(Fig.13.) (7)**



**Fig. 13. Formas de onda utilizadas en la estimulación neuronal. Los parámetros varían ampliamente dependiendo de la aplicación y el tamaño del electrodo. (7)**

Cada pulso presenta fases catódicas y anódicas con amplitudes y duraciones que se traducen en una carga total neta de cero. Una corriente catódica es reducida en el electrodo de estimulación con la dirección del flujo de electrones desde el electrodo hacia el tejido. El ánodo indica una corriente oxidante con el flujo de electrones en la dirección opuesta. Por razones fisiológicas la fase que más se utiliza es la catódica, aunque los pulsos de la fase anódica parecen activar de manera más eficaz algunos elementos neurales. El uso de un ligero desequilibrio en la carga entre el ánodo y el cátodo ha sido

propuesto como una manera de compensación para la irreversibilidad en los procesos de inyección de carga. La importancia de una carga equilibrada ha sido propuesta para evitar daños a los electrodos y al tejido circundante, el objetivo fundamental de éste equilibrio es mantener el potencial del electrodo dentro de un rango que no induzca la oxidación irreversible y aquellas reacciones que degradan al electrodo y dañan el tejido, o limitar de algún modo la carga que puede ser entregada en un pulso de estimulación. En general los electrodos utilizados en la estimulación neuronal se pueden dividir en dos categorías: Macroelectrodos que exhiben un umbral con carga y fase altas y umbrales con densidad de carga baja, y microelectrodos que presentan el comportamiento opuesto, proporcionan umbrales de carga y fase bajas y umbrales de alta densidad de carga. Una ventaja evidente de los microelectrodos es que mejora la selectividad y la resolución espacial de las respuestas funcionales. Los macroelectrodos dado que poseen niveles de carga y fase altos pueden inducir daño tisular. Se debe conocer la contribución de la fase, la carga y la densidad de carga en la estimulación inducida para poder predecir si ésta puede ser perjudicial para el tejido. (7)

2.5.3 Electrodos de registro. La actividad de las neuronas se registra como un potencial extracelular, o potencial de acción, éstos se registran con microelectrodos implantados cerca de las neuronas y registrados por una única unidad de registro, el microelectrodo GSA (área de superficie geométrica) no debe de ser mayor de aproximadamente 2000-4000 $\mu\text{m}^2$ . Se ha utilizado una gran gama de materiales para la fabricación de electrodos de registro, éstos incluyen acero inoxidable, tungsteno, platino, aleaciones de platino-iridio, óxido de iridio, nitruro de titanio y PEDOT (polietilendioxitiofeno). La distancia entre la neurona y el electrodo, y el tamaño de cada uno siempre afectan la calidad del registro, sin

embargo, muchos otros factores que incluyen la impedancia del electrodo y el grosor pueden variar y afectar la calidad del registro. (7)

2.5.4 Mecanismos de inyección de carga. Los electrodos son conductores metálicos y las reacciones que ocurren en la interfase electrodo/tejido son esenciales para mediar la transmisión del flujo de electrones desde el electrodo hacia el tejido. Estas reacciones pueden ser capacitivas, que involucran la carga y descarga del electrodo, o faradaicas en donde se limitan a la reducción u oxidación de las especies en la superficie del electrodo. (7)

Hay otras condiciones que se deben contemplar: temperatura y tamaño del electrodo.

Temperatura. La conductividad iónica de un electrolito y las constantes de velocidad en ambas reacciones dependen de la temperatura además de que la permeabilidad de los poros del electrodo también se ve involucrada. (7)

Tamaño del electrodo. La geometría y el área afectan la capacidad de inyección de carga, debido a que la uniformidad en la distribución de la carga afectan las reacciones que se llevan a cabo en el electrodo. (7)

Propiedades de los electrodos de metal.

En el caso de los electrodos de carbono es importante distinguir dos clases de propiedades:

- Las propiedades que se derivan de la estructura interior y de los efectos de superficie tales como: la terminación del electrodo y la modificación de la superficie.
- Las propiedades electrónicas tales como: la conductividad eléctrica y la dureza.

Acerca de las propiedades eléctricas podemos señalar que la resistividad de los distintos materiales de carbono utilizados en la electroquímica muestra una amplia gama de resistividad dependiendo de las condiciones de preparación. Dado que la resistencia de un

---

---

electrodo de carbono es igual al producto de la resistividad y espesor dividida por el área de la sección transversal del material de carbono, se observa que la resistencia es una función fuertemente asociada a la geometría del mismo. **(31)**

#### 2.5.5 Fabricación de electrodos.

Una variedad de materiales pueden ser utilizados para fabricar electrodos. Las fibras de carbono son a menudo utilizadas debido a su resistencia cuando son expuestas a tejido biológico y son atractivos para su utilización debido a su pequeño tamaño. La adecuada fabricación de los electrodos es esencial para reducir al mínimo las corrientes residuales. Para preparar un electrodo de carbono **(Fig. 14.)** se utiliza una sola fibra de carbono la cual se inserta dentro de un capilar de vidrio, esto se hace mediante una pequeña succión en un extremo del capilar para tirar de la fibra en el otro extremo. El capilar es entonces colocado en un “extractor” donde el capilar es jalado y cortado a un diámetro ligeramente más grande que la propia fibra, las puntas se endurecen con “epoxi” para obtener un sello entre el vidrio y la fibra. **(26)**

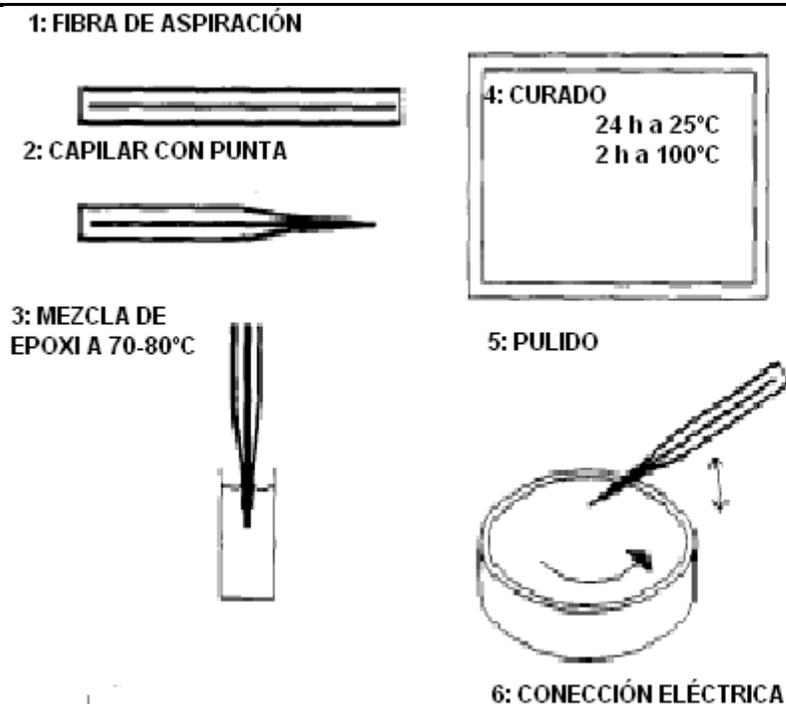


Fig. 14. Construcción de un electrodo de fibra de carbono. (26)

En éste punto la fibra de carbono sobresale del vidrio por lo cual éste se somete al “pulido” para obtener una superficie elíptica, de un ángulo aproximadamente de 25-45°. Para realizar la conexión eléctrica con la fibra de carbono se inyecta grafito coloidal dentro del capilar.

Los electrodos de referencia más comúnmente utilizados son los de Ag/AgCl ó los electrodos de calomel. (26)

#### 2.5.6 Calibración del electrodo.

La calibración de los electrodos proporciona una manera de relacionar la concentración de las especies detectadas y determinar el tiempo de respuesta del electrodo. La calibración del electrodo antes de realizar el experimento se utiliza para conocer si el electrodo es apropiado en cuanto a su sensibilidad y tiempo de respuesta; las

calibraciones deben hacerse con los posibles componentes que pueden interferir así como con la sustancia de interés para determinar la selectividad de la medición. **(26)**

Se estima que después de la calibración, la sensibilidad del electrodo dura aproximadamente 2.5 h durante su uso en el experimento. Los tiempos de respuesta de los electrodos aumentaran con el tiempo de exposición al tejido. **(26)**

#### 2.5.7 Otro tipo de electrodos.

La dificultad experimental que representa el registro de la actividad de varias neuronas simultáneamente puede ser resuelto si se generan progresos en la comprensión del comportamiento de la red neuronal. Estos progresos en muchas preparaciones resultan ser difíciles e imposibles, por ejemplo, las técnicas ópticas que incluyen tintes sensibles al voltaje muestran una solución elegante en cuanto a la imagen de grupos de neuronas, pero sufren deficiencias en el campo de resolución y en la relación señal/ruido. Diseños extracelulares tales como los multielectrodos de metal fabricados con silicio pueden tener una buena resolución temporal, pero su construcción sólo se realiza en dos dimensiones geométricas. Se ha diseñado un dispositivo para realizar éste tipo de estudios pero en invertebrados (por ejemplo el grillo) dado que este tipo de organismos tiene menos neuronas que los vertebrados, sin embargo, ofrece un modelo para el estudio de la codificación neuronal. **(Figs. 15 y 16) (46)**

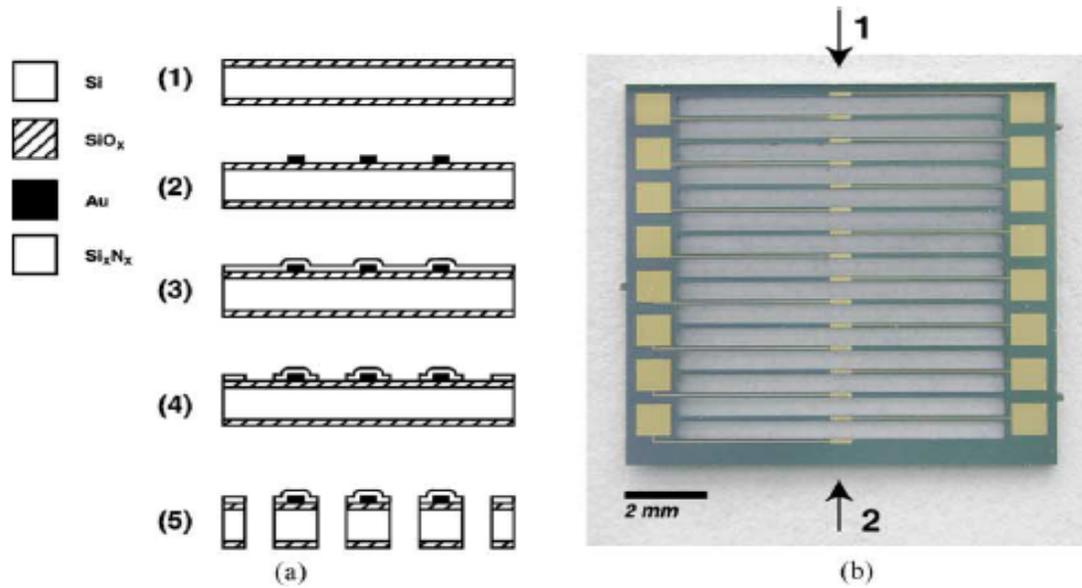


Fig. 15. a) Esquema de fabricación. Se observa la sección transversal que está hecha por puentes señalados por las flechas 1 y 2. b) pasos de fabricación. 1: baño térmico con óxido de silicio, 2: Evaporación y baño de oro, 3: Aislamiento con nitruro de silicio, 4:interconexión a través del nitruro de silicio con los lugares de registro. (46)

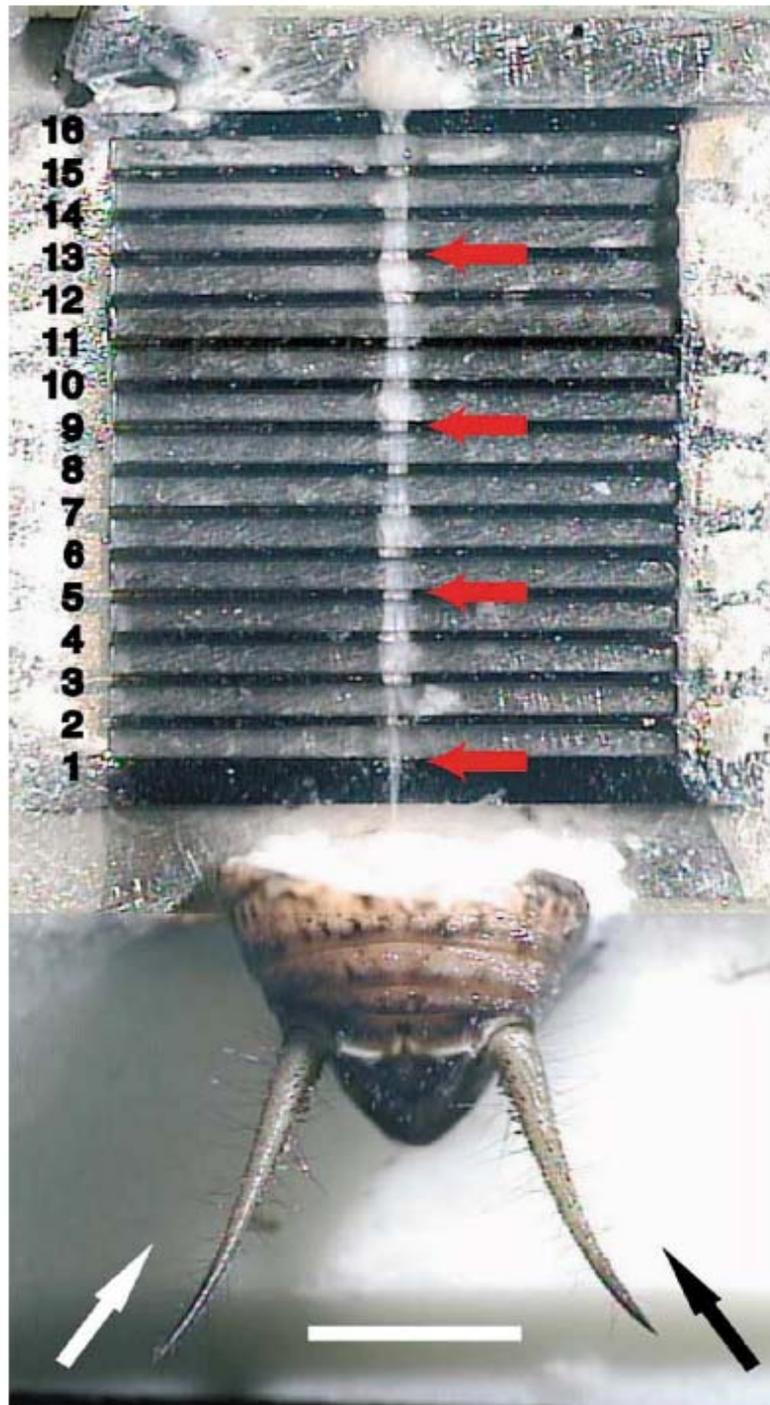


Fig. 16. Micrografía óptica de la preparación. Las flechas blancas y negras representan las direcciones de estimulación, mientras que las flechas rojas indican los lugares de registro. (46)

Los arreglos de multielectrodos planos (pMEAs) presentan una tecnología actualmente disponible para registrar simultáneamente múltiples neuronas “In Vitro”. La distribución de los pMEAs capta mediante la dinámica espacio-tiempo la actividad neuronal, mientras que su conductor transparente permite la visualización microscópica de la posición relativa de los tejidos con respecto a los electrodos. Estos electrodos pueden ser utilizados para el registro y la estimulación proporcionando así la liberación de electrodos externos. El bajo costo de fabricación de éstos electrodos junto con la adquisición de un avanzado hardware para la adquisición de señales y el almacenamiento de datos, ha llevado a varios grupos de investigadores a desarrollar sus propios pMEAs, además, de que se cuentan con dos casas comerciales que fabrican éste tipo de electrodos como el MEA60 de la compañía alemana Reutlingen, y el modelo MED64 de la compañía estadounidense Panasonic. Las ventajas que ofrecen los pMEAs más tradicionales como los de fibra de vidrio o los de alambre está limitados al diseño y a la adquisición de datos, estas limitaciones crean una desventaja en la resolución espacial del muestreo y la cobertura del área, por lo que para resolver éstas desventajas se han desarrollado pMEAs (**Fig. 17.**) que pueden tener una alta densidad de carga, éstos electrodos están puestos sobre un sustrato de vidrio con un aislamiento de nitruro de silicio y revestido con oro. **(14)**

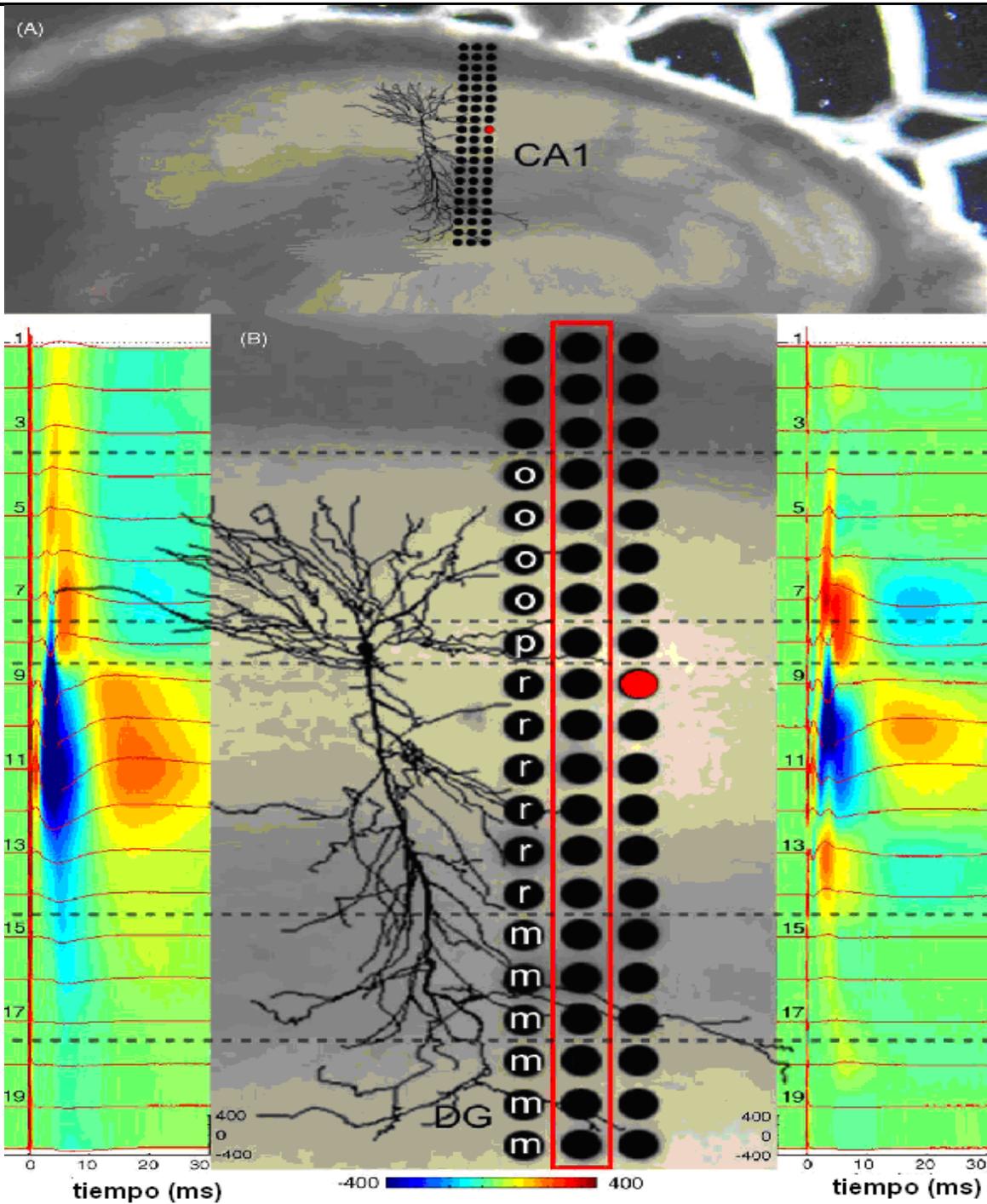


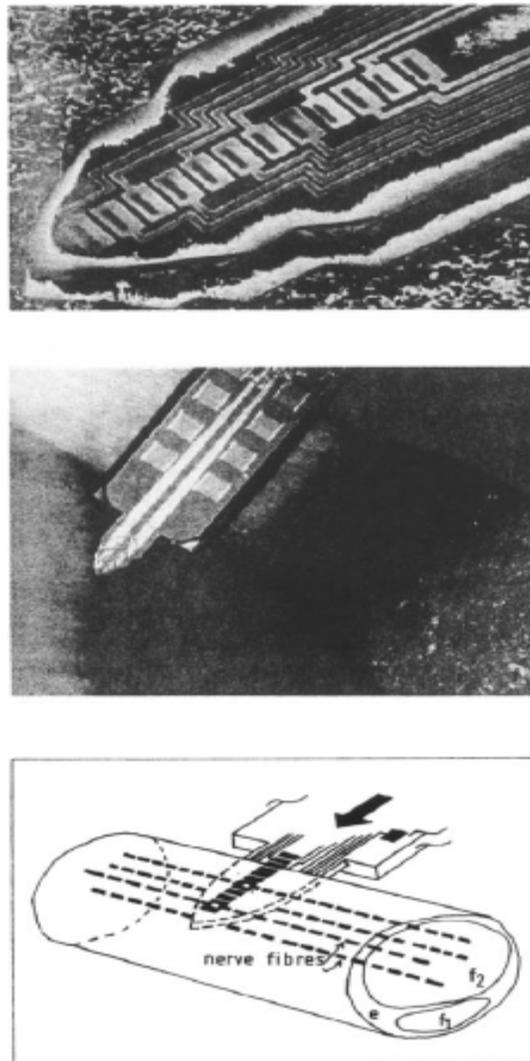
Fig. 17. Electrodo PMEAs A) microfotografía de una rebanada de hipocampo con un electrodo cMEA colocado en las células piramidales para ilustrar el alcance espacial de las células y los electrodos. B) Ampliación del electrodo en la región CA1 y su respuesta con 50 electrodos marcados en rojo. (14)

2.5.8 Electrodos de penetración.

*Multielectrodos (microelectrodos) lineales 2-D y 3-D.*

“Los multielectrodos lineales” están referidos a arreglos en una dimensión montados en/sobre una aguja o incorporados a una superficie de vidrio o silicón. La aguja es un eje hueco de metal en el que se hace una perforación lateral por donde pasan los cables.

**(Fig. 18.) (40)**

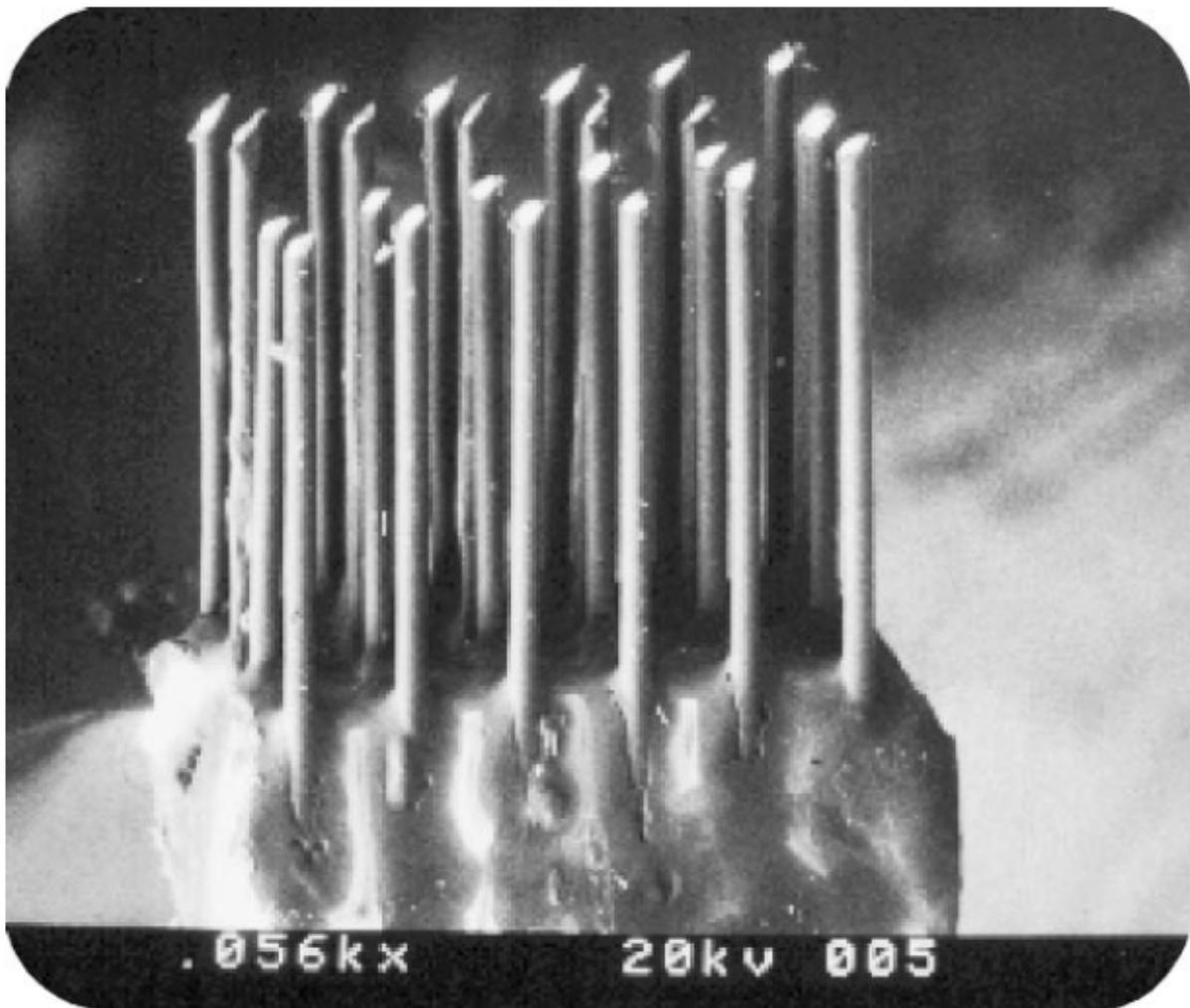


**Fig. 18. Multi-arreglo de 12 electrodos lineales 1-D. El diseño lineal permite la inserción de éste electrodo sobre un tejido. (40)**

---

---

Arreglos en 2-D consisten de electrodos puestos en el mismo plano, ordenados como un conjunto de cables (**Fig. 19.**) (40) Cuando la matriz está compuesta por electrodos de diferentes longitudes de tal manera que sus puntas ya no están en el mismo plano entonces éstas estructuras se les llama 3-D, porque la penetración de esas estructuras ofrecen una mejor selectividad de espacio (**Fig. 20.**) (40) (son los electrodos conocidos como MEAs) (**Fig. 21.**). (19)



**Fig. 19. Microfotografía de una matriz de 24 electrodos de alambre. (40)**

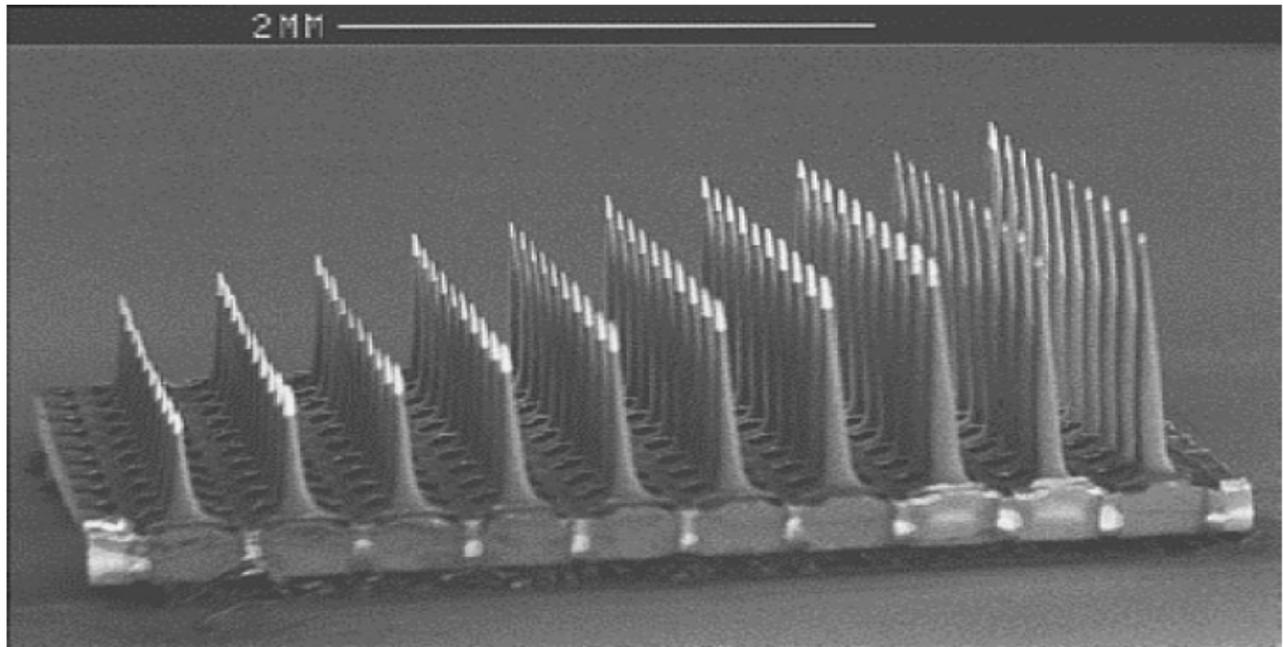


Fig. 20. Arreglo de electrodos en 3-D. (40)

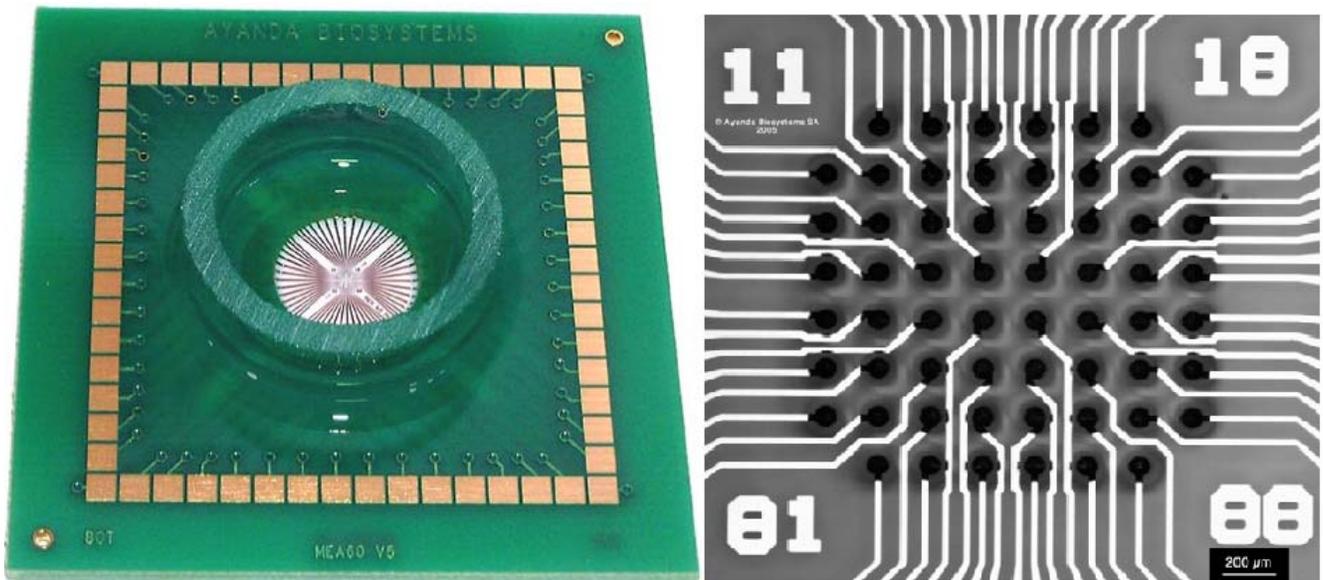


Fig. 21. Arreglo de multielectrodos (MEAs) modelo MEA60 200 3-D. (19)

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Esta técnica se empezó a estudiar en el año de 1920, se puede decir que es una técnica que ha tenido varias modificaciones, desde su comienzo hasta la fecha, por lo que es necesario saber que modificaciones y avances se han hecho a lo largo del tiempo para lograr comprender que implicaciones ha tenido en el estudio del SNC y sus aplicaciones.

### **3. OBJETIVOS**

- Búsqueda de información exhaustiva y actualizada de la existencia de la metodología electrofisiológica para obtener registros electrofisiológicos con rebanadas de cerebro.
- Recopilar información bibliográfica existente de tipo fisiológico, farmacológico, neurofarmacológico, neuroquímico y clínico del uso de las técnicas para obtener registros electrofisiológicos con rebanadas de cerebro.

---

---

## 4. METODOLOGÍA

Se realizó una revisión exhaustiva y actualizada de la bibliografía que proporcione información acerca de la metodología para la obtención de registros electrofisiológicos con rebanadas de cerebro.

Para la búsqueda de la información se utilizaron los siguientes recursos:

- Bibliotecas: Biblioteca de la Facultad de Química, Biblioteca de la Facultad de Medicina, Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Biblioteca de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central.
- Hemerotecas: Hemeroteca Facultad de Química, Hemeroteca del Instituto de Química.
- Revistas Electrónicas: Disponibles en las bases de datos de la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM.
- Buscador de Internet: Google, base de datos PUBMED, SCOPUS.

Una vez encontrada la información, se recopiló, se leyó, se clasificó, se resumió y se analizó, para posteriormente discutir los resultados y concluir. Durante la revisión de la información, también se buscaron las imágenes que apoyan e ilustran el texto.

## 5. RESULTADOS.

Con base a la investigación bibliográfica realizada, se encontraron los siguientes resultados:

En el año de 1920 Warburg realizó la preparación de rebanadas de cerebro para el estudio de la respiración del tejido. **(29)**

Estos mismos estudios fueron retomados por Quastel en 1939 quien expresó que las condiciones de incubación podrían ser eventualmente encontradas para poder garantizar un estado óptimo del tejido. **(29)**

En el año de 1957 McIlwain y Choh Luh Li desarrollaron un estudio en el cual las rebanadas de cerebro de cobayo y las de neocorteza de gato presentaban resistencia a los potenciales de membrana aplicados. En ésta investigación también se desarrolló la primer cámara de registro (McIlwain recording chamber). **(8)**

Otros estudios realizados en la década de 1950 ejecutados por Amassian (1953), Hubel (1957) y Mountcastle (1957), aportaron la herramienta de elección usada para grabaciones celulares, el electrodo de metal. **(45)**

En 1968 David Robinson escribió una revisión de la tecnología de los uni-electrodos en donde puntualizó que en el trabajo práctico, pocas neuronas podían ser detectadas. **(45)**

En el año de 1979 Gartwaite, en 1981 Froetscher y en 1982 Misgeld, todos ellos determinaron el espesor y/o grosor de las rebanadas y las regiones de las rebanadas que podían ser consideradas como tejido muerto, también empezaron a realizar estudios para conocer las regiones del cerebro que podían ser estudiadas y las respuestas que presentaban.

Encontrándose así que se han realizado muchos estudios en regiones diversas del cerebro, tales como el hipocampo, hipotálamo y neocorteza entre otros, por lo que éstos estudios del comportamiento neuronal en el cerebro realizados en rebanadas, reflejan respuestas electrofisiológicas y farmacológicas similares a las del sistema nervioso intacto.

Dentro del ámbito del grosor de las rebanadas de cerebro, se puede señalar que son dos las variaciones que más se utilizan hoy en día, en éstas encontramos las llamadas “rebanadas gruesas” y las “rebanadas delgadas”, siendo su uso muy amplio y diverso, teniendo cada una sus ventajas para los distintos requerimientos del investigador.

Ahora bien, si se habla de la elección de animales y la edad óptima, se encontró que los animales más usados son el ratón, la rata y los cobayos; por otro lado la edad puede variar dependiendo de los requerimientos del experimentador, ya que las rebanadas de animales jóvenes (2 a 4 semanas de edad) son más resistentes al trauma producido al momento de hacer la preparación del tejido, y en ellas es más fácil observar células individuales; teniendo en cuenta que la metodología para obtener rebanadas de animales adultos tiende a ser más difícil debido a los cuidados que se tienen que observar.

Dentro de los materiales que hay para la obtención y mantenimiento de las rebanadas se tiene que hay soluciones donde inicialmente el cerebro es aislado y muchas veces éstas mismas soluciones son usadas a lo largo de todo el experimento; éstas son muy útiles para la neuroprotección de la rebanada durante su preparación y uso ya que disminuyen la actividad enzimática y dan al cerebro la suficiente firmeza para cortarlo en rebanadas; además el tejido se tiene que oxigenar con una mezcla de  $O_2$  y  $CO_2$  al 95% y 5%, respectivamente, con el objetivo de satisfacer la demanda de oxígeno por parte de las células.

Dentro de las técnicas de registro para obtener registros electrofisiológicos con rebanadas de cerebro hay que señalar que se tienen dos grandes clasificaciones:

Los registros intracelulares en los cuales se mide la corriente y/o  $V$  a través de la membrana celular. Este tipo de registros se obtiene mediante diversas técnicas tales como:

Current-clamp que mide el cambio de potencial de membrana cuando se inyecta una corriente constante dentro de la célula, esto significa que el investigador propone el valor de la corriente aplicada y la respuesta que se observa y se mide el cambio del potencial de membrana (y la forma de onda), como respuesta a ésta corriente aplicada. Sin embargo, la corriente que es inyectada constantemente a la célula no es siempre la misma que fluye a través de la membrana, es decir no se puede fijar como constante la corriente que fluye a través de la membrana, por lo que se hizo una modificación a ésta técnica y así nació la técnica designada como:

Voltaje-clamp controlled-current clamp donde se incorporó al circuito de retroalimentación, filtros que amplificaron la respuesta y permitieron la inyección de pulsos de corriente dentro de las células, por lo que durante el registro es posible controlar los potenciales de membrana, pudiendo así monitorear la resistencia de la membrana y ahora sí poder tener conocimiento de la relación corriente/voltaje. **(47)**

En contraste con éstas técnicas, existe otra técnica llamada Voltage-clamp la cual no imita el proceso natural de las corrientes eléctricas que fluyen a través de la célula, ésta técnica es más bien una herramienta que se usa cuando se desea estudiar por ejemplo los canales regulados por  $V$ , ya que precisamente el  $V$  es el que determina si los canales se abren o se cierran.**(14)**

En la década de los 70's Neher y Sackman introdujeron una nueva técnica denominada Patch-clamp que en los años 80's evolucionó para permitir el registro de las corrientes transmitidas por canales iónicos de toda la membrana a través del uso de un pequeño parche. A éste tipo de técnica se le hacen una pequeña serie de modificaciones para lograr distintas configuraciones de tipo de registro según sean las necesidades del experimento. **(40)**

La otra clasificación son los registros extracelulares donde se involucran mediciones hechas fuera de la célula, dentro de éste tipo de técnicas de registro existen modificaciones dependiendo de lo que se necesite del experimento, así tenemos que:

La técnica de unidad única de registro, perfeccionada alrededor de los años 50's, ésta técnica permite registrar la actividad eléctrica de una sola neurona, dentro de sus aplicaciones más importantes han sido el estudio de las estructuras del SNC, la excitabilidad de las dendritas y más recientemente se ha utilizado para dilucidar el comportamiento de los patrones del SNC y como un patrón de rastreo de conectividad dentro de éste sistema. **(23)**

Otra técnica utilizada ha sido la unidad múltiple de registro, la cual se ha utilizado para la medición de la actividad neuronal en muchas escalas, ya que ésta técnica permite el registro del promedio de la actividad de miles y a veces de millones de neuronas, así como la medición de los potenciales de acción. **(20)**

Por otro lado, todos éstos tipos de técnicas tienen en sus instrumentos un denominador común, que es el uso de los electrodos, en donde se encontró una gran variedad tanto de materiales como de tamaños, todos ellos hechos a la medida de los requerimientos y de la modernidad de la tecnología que ha sido una herramienta para el mejor entendimiento de éste tipo de estudios.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

AÑO	TÉCNICA	AUTOR	APLICACIÓN
1920	Estudio sobre la respiración de rebanadas de cerebro	Warburg (41)	Comparación del metabolismo de la energía basal, en rebanadas de cerebro vs. Cerebro intacto
1940	Registro intracelular	Cole y Marmount (25)	Introducción de la técnica Voltaje-clamp.
1957	Registro intracelular	Mcllwain (8)	Resistencia a los potenciales de membrana aplicados en rebanas de cerebro de cobayo.
1957	Uso de microelectrodos	Amassian, Hubel, Mountcastle. (45)	Aportación como herramienta del uso del microelectrodo de metal, para la obtención de registros celulares.
1970	Registro de corriente a través de la membrana.	Neher y Sakmann (42)	Introducción de la técnica Patch-clamp
1979	-----	Garthwaite (29)	Determinación del espesor de las rebanadas de cerebro.
2007	Revisión bibliográfica	Seongeunt (44)	La metodología de rebanadas de cerebro es una herramienta para estudiar los mecanismos de regeneración "In Vitro", y el estudio de los efectos farmacológicos como moduladores de la neurodegeneración.

---

---

<b>AÑO</b>	<b>TÉCNICA</b>	<b>AUTOR</b>	<b>APLICACIÓN</b>
1999		Teyler <b>(51)</b>	Uso de rebanadas de cerebro para el estudio de plasticidad sináptica.
2008	Uso de rebanadas de hipocampo	Fitzjohn <b>(12)</b>	Estas preparaciones proveen información que es útil para entender la etiología del Alzheimer y para implementar nuevas terapias para la demencia.
2005	Uso de rebanadas de hipocampo	Noraberg <b>(35)</b>	Uso de ésta técnica para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos, neurotoxicidad del VIH y daño traumático al cerebro.

Teniendo en cuenta los resultados encontrados, hay que señalar que prácticamente ésta técnica es reciente, ya que, la reunión de todos los elementos necesarios para hacer de ésta técnica tan versátil y utilizada, se ha hecho los últimos años.

Esto ha hecho que los avances encontrados sobre ésta técnica no puedan ser todos situados en una misma década, por ejemplo, para una técnica de registro, se pueden encontrar pequeñas modificaciones hechas, a los componentes del equipo utilizado, conforme pasan los años y la tecnología avanza.

Así tenemos que, el avance tecnológico está modificando los componentes electrónicos utilizados en todas las técnicas de registro ya que, en recientes años se cuenta con componentes electrónicos que disminuyen el número de aparatos requeridos para la técnica, como por ejemplo, se cuenta un software para computadora que facilita la

adquisición de datos, análisis de los mismos y el control y visualización de las variables involucradas en el estudio, **(18)** eliminando así el uso del osciloscopio, el cual solo permitía la visualización de la señal obtenida del registro.

También podemos encontrar avances tecnológicos en los electrodos usados, ya que ahora también se puede sustituir el uso de los microelectrodos por los biochips, que son arreglos de multielectrodos que pueden ser usados como electrodos de registro y como electrodos de estimulación, eliminando conexiones electrónicas, sustituyendo éstas por una configuración con el software utilizado por el experimentador. **(19)**

Se pudieron encontrar a lo largo de toda ésta investigación, pequeñas modificaciones técnicas con respecto a las técnicas de registro utilizadas, pero con respecto a la primera utilización como tal de la técnica hecha por McIlwain en 1957 mediante el uso de rebanadas de cerebro ha recibido pocos cambios hasta hoy, dado que ésta misma técnica es la que muchos aplicaron a distintas regiones anatómicas del cerebro para observar que respuestas obtenían.

En cuando a las aplicaciones de la técnica, se puede señalar que, se utiliza en numerosas investigaciones en el área clínica, dentro de las más recientes tenemos una gran cascada de aplicaciones sobre la preparación de rebanadas de hipocampo, donde se realizan estudios sobre trastornos neurodegenerativos tales como el Alzheimer, epilepsia, daños traumáticos al cerebro, así como la plasticidad sináptica y la memoria. **(12) (35) (44) (51)**

Sin duda alguna, hay que señalar que toda la información está dirigida a la investigación, dado que su aplicación en docencia, resultaría ser muy costosa por el equipo que se utiliza, dentro de la cual también se van haciendo modificaciones a las técnicas y a los materiales por ejemplo los electrodos que se utilizan en la misma.

---

---

## 7. CONCLUSIONES

Se ha hecho una larga cadena de investigaciones, para poder obtener técnicas muy precisas que respondan como actúa el cerebro a distintos niveles.

Así tenemos que este tipo de estudios se han empezado a implementar desde los años 20's, y su evolución desde esa época ha permitido no solo el descubrimiento y entendimiento de cómo funciona el cerebro, sino también el desarrollo de nuevas tecnologías que se han ido desarrollando conforme las exigencias experimentales lo han requerido.

El uso de la preparación de rebanadas de cerebro se ha hecho muy popular entre los científicos que estudian el comportamiento del SNC, dado que en ellas se puede hacer un estudio profundo sobre las estructuras de éste sistema y su comportamiento en conjunto, y también para el estudio de numerosas situaciones patológicas. **(11) (43)**

Todas las técnicas para la obtención de registros electrofisiológicos utilizando rebanadas de cerebro, ofrecen una amplia gama de diversas opciones de estudios.

Este tipo de técnicas sin duda resulta una herramienta muy valiosa en la actualidad. Estas técnicas permiten el estudio de enfermedades del cerebro (neurodegenerativas).

Con éste trabajo se da a conocer la existencia sobre el entorno de investigación que alberga estas metodologías, la difusión que tiene y a quienes va dirigido, con el fin de que aquellos investigadores que apliquen éstas técnicas conozcan más sobre las mismas.

## 8. GLOSARIO

**Capacidad de inyección de carga:** Cantidad de carga por unidad de GSA entregados en la principal fase de un pulso de estimulación. **(7)**

**Conductancia (g):** Es el recíproco de la resistencia eléctrica y es la medida de la habilidad de conducir la electricidad; en membranas celulares o canales iónicos, es la medida a la permeabilidad de una o más especies iónicas. **(34)**

**Current clamp:** Mediciones del cambio del potencial de membrana cuando se inyecta una corriente constante dentro de la célula a través de un electrodo de grabación. **(18)**

**Electrofisiología:** Es el estudio de las propiedades eléctricas de células y tejidos. Esto involucra mediciones en el cambio de voltaje o en el flujo de corriente eléctrica y los potenciales de acción, en las neuronas. **(18)**

**Espiga extracelular:** El tiempo que varía el potencial que es registrado en un solo lugar sin el potencial extracelular de una neurona sencilla durante uno de éstos potenciales de acción. **(24)**

**Hiperpolarización:** Un incremento en la magnitud del potencial de membrana, que tiende a reducir la excitabilidad. **(34)**

**Patch clamp:** Mediciones de voltaje o corriente a través de canales iónicos usando una micropipeta. **(18)**

**Potencial al equilibrio:** Potencial de membrana, en el cual no hay un flujo neto de iones dentro o fuera de la célula. **(34)**

**Potencial de acción:** Potencial eléctrico breve que se propaga a lo largo del axón ó fibra muscular. También se le conoce como impulso. **(34)**

**Potencial de campo extracelular:** Cuando una neurona sufre una descarga (es decir, genera un potencial de acción) es objeto de un aumento en la conductividad de las regiones más excitables de su membrana por ejemplo el axón y/o el soma. **(24)**

**Potencial postsináptico excitador:** Despolarización de la membrana postsináptica de una neurona, producida por un transmisor excitador liberado de terminales presinápticas. **(34)**

**Potencial postsináptico inhibitor:** Cambio en el potencial (usualmente hiperpolarización) producido por un transmisor inhibitor liberado de una terminal postsináptica. **(34)**

**Potencialización a largo plazo (LTP):** Incremento en el potencial sináptico, que dura horas o más; producido por una activación sináptica previa. **(34)**

**Reacción Faradaica:** reacción electroquímica donde las especies son oxidadas ó reducidas. **(7)**

**Rebanadas de cerebro:** El término “rebanadas de cerebro” (brain slices), ha sido referido a secciones de regiones del cerebro que son mantenidas por algunas horas, para cualquier estudio electrofisiológico ó bioquímico. **(10)**

**Registro extracelular:** Los registros extracelulares involucran mediciones fuera de la célula, incluyen registros de células y fibras nerviosas. **(18)**

**Registro intracelular:** La técnica de registro intracelular involucra medición de voltaje y/o corriente a través de la membrana celular. **(27)**

**Unidad única:** Una sencilla descarga neuronal, los picos de éstos son claramente discriminados ó aislados por un microelectrodo de grabación. **(24)**

**Voltage clamp:** Medición de la corriente iónica a través de la membrana celular cuando el potencial de membrana es puesto a un valor constante. **(18)**

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams R. In vivo electrochemical measurements in the CNS. *Prog. In Neurobio.* 35, 297-311, 1990.
- 2) Andersen P. Brain slices- a neurobiological tool of increasing usefulness. *TINS.* 53-56, 1981.
- 3) Bachelard H. In Memoriam: Henry Mcllwain 1912-1992. *J. Neurochem.* 60 (1), 388-390, 1993.
- 4) Baker H.J. The Laboratory Rat: Biology and Diseases. Cap. 8: Nervous System. Primera Edición. Ed. Academic Press Inc. EUA. 1979 pp. 95-98.
- 5) Carpenter BM., A.B, M.D. Neuroanatomía Fundamentos. Cap 2: Anatomía macroscópica del encéfalo. Cuarta Edición 1994 Edit. Médica Panamericana. pp 36-67
- 6) Chiassen B.R. Laboratory anatomy of the white rat. Cap. 7: The Nervous System. Quinta Edición. Ed. Mc Graw-Hill. 1994 pp. 92-102.
- 7) Cogan S. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu. Rev. Biomed Eng.* 10, 275-309, 2008.
- 8) Collingridge G.L. The brain slice preparation: a tribute to the pioneer Henry Mcllwain. *J. Neuro Meth.* 59, 5-9, 1995.
- 9) D'Ambrosio R. Patch-Clamp Analysis: Advanced techniques. Cap.6: Perforated Patch-Clamp Technique. Ed. Humana Press. 1995 pp. 195-216.
- 10) Digledine R. Neuropharmacology. Cap. 12: Brain slices. Ed. Plenum Press. 1984 pp.1409-1410.

- 11) Dunwiddie T., Mueller A. The use of brain slices in central nervous system pharmacology. *Fed. Proc.* 12, 2891-2898, 1983.
  - 12) Fitzjohn S. The use of the hippocampal slice preparation in the study Alzheimer's disease. *Eur j. Pharmacol.* 585, 50-59, 2008.
  - 13) Gähwiler B.H., Capogna M. Organotypic slice cultures: A technique has come to age. *Trends Neurosci.* 20, 471-477, 1997.
  - 14) Gholmieh G., Soussou W. Custom-designed high-density conformal planar multielectrode arrays for brain slice electrophysiology. *J. Neuro Meth.* 152, 116-129, 2006.
  - 15) Halliwell J., Plant T. *Methods in molecular biology*. Cap. 2 Voltage Clamp Techniques. Ed. Academic Press. 1998 pp. 17-34.
  - 16) Hammond C. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Cap. 7: The voltage-gated channels of action potentials. Ed. Academic Press. 1996 pp. 117-187.
  - 17) <http://members.fortunecity.com/lili39/estneurona.htm>
  - 18) <http://www.adinstruments.com/applications/research/Extracellular-Recordings/>
  - 19) <http://www.ayanda-biosys.com>
  - 20) <http://www.gatsby.ucl.ac.uk/~maneesh/mung/research/tetrodes/vis-tetrodes.html>
  - 21) <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/SNC2004.jpg>
  - 22) <http://www.profesorenlinea.cl/imagenciencias/neurona006.jpg>
  - 23) <http://www.unav.es/tecnun/psicologia/basesbiologicas/default.html>
-

- 24)** Humphey D.R., Schmidt. Neurophysiological Techniques Applications to neural systems. Cap 1: Extracellular single-unit recording methods. Ed. Humana Press. 1991 pp. 1-64.
- 25)** Huxley A. From Overshoot to voltage clamp. *Trends Neurosci.* 25, 553-558, 2002.
- 26)** Kawagoe K., Zimmerman J. Principles of Voltametry and microelectrode surface states. *J. Neuro Meth.* 48, 225-240, 1993.
- 27)** Kitai S.T., Park M.R. Neurophysiological Techniques Basic Methods and concepts. Cap. 1: Intracellular electrophysiological Techniques. Ed. Humana Press. 1991 pp. 1-34.
- 28)** Li B.Y., Schild J.H. Patch-clamp electrophysiology in nodose ganglia of adult rat. *J. Neuro Meth.* 115, 157-167, 2002.
- 29)** Lipton P. General Neurochemical Techniques. Cap. 3 : Brain slices uses and abuses. Ed. Humana Press. 1986 pp. 69-115.
- 30)** Lipton P., Aitken P.G. Making the best of brain slices: comparing preparative methods. *J. Neuro Meth.* 59, 151-156, 1995.
- 31)** McCreery R. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chem. Rev.* 108, 2646-2687, 2008.
- 32)** Meyer S.J., Quenzer F.L. Psychopharmacology drugs, the brain, and behavior. Cap 2: Structure and Function of the Nervous System. Ed Sinaver Associates, Inc. 2005 pp 33-61

- 33) Moyer J., Brown T. Patch-Clamp Analysis: Advanced techniques. Cap.6: Visually guided Patch-clamp recordings in brain slices. Ed. Humana Press. 1995 pp. 169-227.
- 34) Nicholls J.G., Martin R.A., Wallace B.G. From Neuron to brain, Acellular and molecular approach to the function of the Nervous system. Ed, Sinaver Associates, Inc. USA 1992 pp. 717-728.
- 35) Noraberg J. Organotypic Hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Current drug targets –CNS & neurological disorders*. 4, 435-452, 2005.
- 36) Purves D., Augustine JG. Invitación a la neurociencia. Cap 1: Organización del sistema nervioso. Primera Edición 2003 Edit. Panamericana. pp.1-19
- 37) Ramón y Cajal S. New Ideas in the structure of the nervous system in man and vertebrates. Ed. The Mit Press. USA 1990 pp. 35-72.
- 38) Richardson B.G., Messer C. Effect of Composition of experimental solutions on Neuronal survival during rat brain slicing. *Exp. Neuro*. 131, 133-143, 1995.
- 39) Robinson D. The electrical properties of metal microelectrodes. *Proceedings of the ieee*, 56, 1065-1071, 1968
- 40) Rutten W. Selective electrical interfaces. *Annu. Rev. Biomed Eng*. 4, 407-452, 2002.
- 41) Ryuta K., Muramatsu R. A low-cost method for brain slice cultures. *J. Pharmacol Sci*. 104, 191-197, 2007.
-

- 42) Sarantopoulos C. Patch-Clamp Analysis: Advanced techniques. Cap.8: Perforated Patch-Clamp techniques. Ed. Humana Press. 1995 pp. 253-293.
- 43) Schurr A. Brain slice preparation in electrophysiology. *David Kopf Instruments*. 15, 1-5, 1986.
- 44) Seongeunt C. Brain Slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr. Neuro*. 15, 19-33, 2007.
- 45) Shoham S., O'Connor H., Segev R. How silent is the brain: is there a “dark matter” problem in neuroscience? *J. Comp Physiol A* 192: 777-784, 2006.
- 46) Spence A.J., Hoy R.R. A micromachined silicon multielectrode for multiunit recording. *J. Neuro Meth*. 126, 119-126, 2003.
- 47) Stoppini L., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neuro Meth*. 37, 173-182, 1991.
- 48) Stopps M., Allen N. Design and application of a novel brain slice system that permits independent electrophysiological recordings from multiple slices. *J. Neuro Meth*. 132, 137-148, 2004.
- 49) Suter K., Smith B., Dudek F. Electrophysiological Recording from Brain Slices *Methods: A Co. Meth. Enzymol*. 18 (2), 86-90, 1999
- 50) Sutor B., Grimm C., Polder R.H. Voltage-clamp-controlled current-clamp recordings from neurons: an electrophysiological technique enabling the detection of fast potential changes at preset holding potentials. *Eur j. Physiol*. 446, 133-141, 2003.
-

- 51) Teyler T. Use of brain slices to study Long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity. *A Co. Meth. Enzymol.* 18, 109-116, 1999.