

Tema 2

Procedimientos y métodos de investigación

1.-Proceso de ablación experimental

1.1.-La lesión cerebral

La ablación experimental consiste en destruir una parte del cerebro y observar a posteriori que efectos tiene sobre la conducta del organismo. Sin embargo, no se puede concluir en que un núcleo cerebral es el encargado de una función por el simple hecho de que su lesión interfiera en dicha función, pues ese núcleo puede formar parte de un circuito (esto implicaría que el núcleo lesionado interviene en la transmisión del impulso nervioso procedente de otro núcleo que es el verdadero encargado de producir una función). Ej: si lesionamos el núcleo geniculado lateral del tálamo la visión se verá perjudicada, pero no podemos concluir en que dicho núcleo es el encargado de la visión (al fin y al cabo tan solo es un núcleo talámico de relevo).

Para no caer en el error expuesto anteriormente existen dos procedimientos de lesión que se pueden emplear selectivamente. El primer procedimiento es la lesión estereotáxica consiste en introducir mediante cirugía estereotáxica una aguja cuya punta produce una descarga eléctrica que genera una lesión. La lesión que este método produce destruye tanto los somas como los axones que se hallan en la parte adyacente del electrodo, por lo que este método, al lesionar los axones adyacentes podría dañar los tractos y hacernos caer en el error anterior. El segundo procedimiento es la lesión excitoquímica, que consiste en inyectar un aminoácido excitador, que produce una excitación de los cuerpos neuronales que acaba por inutilizarlos. La lesión excitotóxica destruye el soma pero no los axones adyacentes, por lo que nos ayuda a no caer en el error.

También podemos equivocarnos al asumir que la lesión estereotáxica de un núcleo causa un fallo en una función debido a que la introducción del propio instrumento estereotáxico hasta el núcleo a lesionar también provoca ciertos daños. Esto se soluciona empleando a otro animal de la misma especie e introduciendo el instrumento estereotáxico hasta el mismo núcleo pero sin producir la lesión (falsa lesión).

El instrumento estereotáxico consiste en un aparato que fija la cabeza del sujeto y que tiene una aguja preparada para producir la lesión. Para llegar al núcleo específico que se desea lesionar se recurre a el atlas estereotáxico, que toma como referencia el punto llamado bregma (punto donde se cruzan la union sagital y coronal del craneo. En el instrumento se marcan las coordenadas tridimensionales compuestas por los tres ejes medial.lateral, dorsal-ventral y anterior-posterior.

1.2.-Técnicas histológicas

Las técnicas histológicas consisten en observar los cambios producidos en los tejidos cerebrales despues de la lesion, y se realizan en casi todos los casos cuando el animal está muerto (a excepción de la microscopia confocal con laser). En primer lugar se extrae el encéfalo del animal y se trata con **formol** o otro fijador neural. El objetivo del formol es eliminar las enzimas encargadas de la autólisis (autodisolución), y evitar que tenga lugar la descomposición de los tejidos. En segundo lugar se realiza la **perfusión**, que consiste en sustituir la sangre de los vasos por otro tipo de sustancia, normalmente alguna solución salina.

Una vez fijado el encéfalo se secciona en láminas. Para ello se emplea un micrótopo, que es un instrumento que permite cortar el encéfalo en láminas de entre 10 y 80 micrometros de ancho. Cuando las láminas son para microscopio electrónico se cortan con un espesor inferior a 1 nanómetro. Dichas láminas se ponen encima de una pláncia portaobjetos típicas de laboratorio.

Una vez en el portaobjetos de vidrio, las láminas pueden ser teñidas. Existen un montón de sustancias que pueden ser empleadas para la tinción de tejidos, pero la más común es el violeta de cresilo. Este tinte fue descubierto por Franz Nissl, y funciona adheriéndose a cuerpos que se hallan en el núcleo de las células (ARN, ADN y proteínas asociadas). Estos cuerpos son conocidos como sustancia de Nissl. El tinte permite la coloración solo de los somas y no de los axones por lo que no se colorean los tractos propios de la sustancia blanca. También hay que tener en cuenta que el violeta de cresilo tiñe a todas las células y no solo a las neuronas (por tanto tiñe también a las glías).

Una vez teñidas las láminas de cerebro se realiza la observación microscópica. El microscopio óptico tiene poca resolución por lo que para poder observar los detalles más pequeños es necesario que se emplee el microscopio electrónico. El **microscopio electrónico de transmisión** funciona haciendo que atraviese una corriente de electrones por la superficie de una lámina de carbono y se capta una foto o se escanea (proporciona una detallada imagen bidimensional). El **microscopio electrónico de barrido** permite observar una detallada imagen tridimensional. Hay otro tipo de microscopio conocido como microscopio confocal con láser que permite realizar observaciones de tejidos más gruesos que con el microscopio electrónico y que incluso se puede observar tejidos de organismos en vida.

1.3.-Marcado de conexiones neuronales

El procedimiento de marcado de conexiones neuronales busca detectar cuáles son tanto las aferencias como las eferencias de la estructura cerebral lesionada. En el caso de la detección de las conexiones eferentes se emplean sustancias que son absorbidas por las dendritas y el soma de la neurona y que se extienden hasta el axón (la inyección de estas sustancias se realiza mediante estereotaxia). Una de estas sustancias se llama PHA-L, y es producida por algunas legumbres. Después se emplean técnicas inmunocitoquímicas, que son técnicas que sacan provecho de las reacciones inmunológicas para la tinción. Después se observa hasta donde llegan los axones eferentes.

En cuanto a la detección de las conexiones aferentes se debe inyectar una sustancia llamada oro fluorado que es absorbido por el botón terminal y que viaja mediante transporte retrógrado hasta el soma neuronal. Después se emplean también técnicas inmunocitoquímicas para la tinción.

Hasta ahora se ha descrito el método de detectar las eferencias y aferencias monoaxónicas, pero existen métodos para detectar los circuitos eferentes y aferentes que van en serie (marcado transneuronal). En el caso del transporte retrógrado se emplea un virus de la pseudorabia (rabia del cerdo) que provoca que los axones se vayan contagiando los unos a los otros en serie hasta llegar al núcleo del que proceden. En el caso del transporte anterógrado se emplea un virus de la rabia simple que funciona de la misma manera pero en el sentido opuesto.

1.4.-Estudio del encéfalo humano en vivo

En la ablación experimental humana, la lesión se ha producido accidentalmente. Para el estudio de la lesión, a la gente no le gusta que le abran la cabeza cuando están vivos (al menos a la normal) por lo que se pueden emplear técnicas de visualización no invasivas.

La primera de estas técnicas que se descubrió fue la tomografía axial computerizada (TAC). Esta emplea los rayos X. Se introduce la cabeza del sujeto en un círculo que emite por un lado rayos X y que por el otro lado recoge la cantidad de radioactividad que se transmite (llega menos radioactividad cuanto más materia tiene que atravesar). Un ordenador representa visualmente estos datos.

Otra técnica es la resonancia magnética (RM). Esta técnica no emplea rayos X. Consiste en someter al cerebro a un campo magnético muy intenso lo que hace que los núcleos de algunos átomos de moléculas del organismo roten en una determinada dirección. En ese momento se pasa una onda de radiofrecuencia lo que hace que dichos átomos emitan ondas de radio las cuales son detectadas por un dispositivo especializado. Las imágenes de RM tienen mejor resolución que las del TAC y permiten distinguir la sustancia gris de la sustancia blanca.

La resonancia magnética permite distinguir los haces de fibra nerviosa si se emplea una pequeña

variante conocida como imágenes tensoriales de difusión (ITD). Estas imágenes se aprovechan de que las moléculas de agua giran de forma paralela a la dirección del haz de sustancia blanca al que pertenecen.

2.-Registro y estimulación de la actividad neural

2.1.-Registro de la actividad eléctrica neural

Consiste en registrar la actividad eléctrica de las neuronas del cerebro. Puede realizarse un registro crónico (implantando un electrodo permanente al sujeto) o agudo (registrando la actividad eléctrica durante la anestesia del animal).

Se puede registrar la actividad de neuronas individuales implantando microelectrodos, que son extremadamente pequeños (lo suficiente como para poder conectarse solo a una neurona). Se implantan en el encéfalo mediante cirugía estereotáxica y se conectan a un zócalo que se situará en la cabeza, adherida con cemento dental. El zócalo se conectará al ordenador que representará visualmente las ondas eléctricas. Debe tenerse en cuenta que dado que las señales de una sola neurona son muy débiles estas deberán ser amplificadas.

También se puede registrar la actividad eléctrica de un grupo grande de neuronas mediante un macroelectrodo. Estos suelen ser un alambre, un disco metálico pegados sobre el cuero cabelludo, tornillos... La actividad neural de cada dispositivo implantado se representa o en un polígrafo o en un ordenador. Cuando se registra en un polígrafo u ordenador la actividad eléctrica de todas las regiones del encéfalo se habla de electroencefalograma.

También se puede estudiar el campo magnético que genera la actividad neural. Cuando por un conductor atraviesa una corriente eléctrica se genera un campo magnético. En la corriente neural no es una excepción, solo que se genera un campo magnético tan débil que debe ser detectado mediante un dispositivo superconductor llamado SQUID.

2.2.-Registro de la actividad metabólica del cerebro

Es evidente que las regiones encefálicas que han sido activadas han tenido que consumir nutrientes para poder abrir y cerrar los canales y bombas iónicas que intervienen en la generación de los potenciales de acción. El objetivo de estas técnicas es observar que zonas se activan y cuáles no lo hacen cuando tiene lugar una determinada conducta.

La primera técnica se llama autorradiografía. En ella se inyecta 2-desoxiglucosa (2-DG) en el torrente sanguíneo para que alcance el encéfalo y las neuronas que necesitan nutrientes. La 2-DG es un compuesto radioactivo que es químicamente muy similar a la glucosa, por lo que las neuronas activas la captan, pero tiene la peculiaridad de que las células no consiguen metabolizarla, por lo que se queda almacenada dentro de la célula. Así, las células que más 2-DG contengan son las células que han intentado captar más alimento por que han tenido más actividad. Una vez inyectada la 2-DG se secciona el encéfalo del sujeto y se corta en láminas, y se hace una autorradiografía (se llama autorradiografía por que la misma radiación de la 2-DG es la que da la imagen sin necesidad de un aparato que emita rayos X). Las zonas de la autorradiografía más oscuras son las que han sido más activadas.

Otro método es la tomografía por emisión de positrones (TEP). Se inyecta al sujeto 2-DG, que se dirige a las neuronas con mayor necesidad de alimento, y una vez dentro de la neurona, la 2-DG se acaba descomponiendo con el tiempo y emite una partícula subatómica denominada positrones. Existe un dispositivo que es capaz de detectar dichos positrones y emitir una imagen. Esta imagen es capaz de detectar las diferencias de concentración de positrones, sin embargo presenta la desventaja de tener muy poca resolución.

La resonancia magnética funcional (RMF) sigue la misma lógica que la RM pero los ingenieros han diseñado un software que es capaz de detectar las concentraciones de oxígeno en los núcleos de las

células. Teniendo en cuenta que las neuronas necesitan oxígeno para vivir, y que necesitan más oxígeno cuanto más actividad presenten podemos deducir el grado de actividad de las neuronas atendiendo a su concentración. La RMF tiene una resolución muy buena.

2.3.-Estimulación de la actividad neural

2.3.1.-Estimulación eléctrica y química

Las neuronas pueden estimularse eléctrica o químicamente. Para estimularlas de forma eléctrica se hace pasar una corriente eléctrica a través de las neuronas que se desea estudiar. Para estimular químicamente a las neuronas deben introducirse sustancias excitadoras como el ácido cainico o el ácido glutámico (glutamato). Deben introducirse en dosis bajas por que en dosis altas podrían destruir las neuronas debido al exceso de excitación (recuérdese las lesiones excitotóxicas).

Estas sustancias se introducen en el organismo a través de una cánula insertada en el cráneo y sujeta con cemento dental. En el caso de la estimulación eléctrica, el electrodo estimula tanto los somas de las neuronas como los axones que pasan por la zona estimulada. Sin embargo, en la estimulación química con glutamato, solo se excitan los somas y las dendritas neuronales por que solo en esas partes se hallan los receptores glutamatérgicos, por lo que es imposible que se exciten los axones que están allí de paso.

2.3.2.-Fotoestimulación

Se ha descubierto que las membranas neuronales presentan ciertas proteínas que son sensibles a la luz. Las dos principales son la Rodopsina-canal-2 (ChR2) y la NpHR. La ChR2, cuando recibe luz azul provoca la apertura de canales iónicos de Na y Ca, y al abrirse estos canales entran iones de Na y Ca cargados positivamente, lo que produce una despolarización y por tanto la activación de la neurona. La NpHR, cuando recibe luz azul, provoca la apertura de canales iónicos de Cl, por lo que entran iones de Cl cargados negativamente en la membrana produciéndose una hiperpolarización y dificultando por tanto que se produzcan potenciales de acción.

Por tanto, siguiendo estos principios se puede provocar la activación o inhibición de las diferentes regiones cerebrales haciendo que incida luz sobre ellas, y de este modo estudiar como funcionan los circuitos cerebrales. Cuando la región a fotoestimular se halla en la corteza se hace un pequeño agujero en el cráneo y se proyecta luz. Cuando se halla en partes profundas del cerebro se introduce mediante cirugía estereotáxica una fibra óptica y se proyecta luz.

El último método de estimulación neuronal (no se incluye en la fotoestimulación) es el de estimulación magnética transcraneal (EMT). Para ello se utiliza una bobina electromagnética que estimula las neuronas de la corteza cerebral. El campo magnético genera corrientes eléctricas que pueden ser registradas.

4.-Métodos neuroquímicos

4.1.-Localización de neuronas productoras de neuroquímicos específicos

Para averiguar que neuronas producen una determinada sustancia neuroquímica (ya sea neurotransmisor o neuromodulador) pueden emplearse tres técnicas: 1) Detectar el neuroquímico en cuestión dentro de las neuronas; 2) Detectar la enzima encargada de la producción del neuroquímico; 3) Detectar el ARN mensajero encargado de la síntesis de la enzima.

Para detectar el neuroquímico dentro de las neuronas es necesario que el neuroquímico sea un péptido (proteína). Si es el caso se emplean métodos inmunocitoquímicos para que se tiña la sustancia neuroquímica.

En el caso de que la sustancia neuroquímica no sea un péptido se puede intentar observar si las neuronas contienen en su interior la enzima que se encarga de la síntesis del neuroquímico (para ello se debe saber que enzima se encarga de sintetizar el neuroquímico -normalmente se sabe cual es-). En

este caso también se emplean técnicas inmunocitoquímicas para teñir la enzima en cuestión.

El tercer método consiste en detectar la presencia de ARN mensajero (hibridación in situ). Cuando se sintetiza cualquier sustancia en una célula se realiza una copia de una sección de un cromosoma que contiene las características de la sustancia que se debe sintetizar, y esta copia (ARN mensajero) se desplaza hasta los ribosomas, que es donde se sintetizará la sustancia. El procedimiento consiste en introducir en la célula un fragmento de ARN radioactivo cuya ordenación de nucleótidos sea complementaria a la del fragmento de ARN mensajero encargado de la síntesis del neuroquímico. Una vez realizado esto se realiza una autorradiografía.

4.2.-Localización de receptores de neuroquímicos

Se puede llevar a cabo mediante dos procedimientos. El primero de ellos consiste en exponer el tejido cerebral que se quiere investigar al contacto con la sustancia neuroquímica (en este caso la sustancia debe ser radioactiva) para que se unan a sus receptores específicos. Una vez concluido este proceso se debe autorradiografiar la sección cerebral expuesta, y aquellas neuronas que presenten zonas blancas en la autorradiografía son aquellas en las que hay receptores del neuroquímico.

El segundo procedimiento consiste en emplear técnicas inmunocitoquímicas. Esto puede realizarse debido a que los receptores de los diferentes neuroquímicos son proteínas insertadas en la membrana neuronal y por tanto se pueden producir anticuerpos contra ellas.

5.-Métodos genéticos

Los métodos genéticos parten del supuesto de que la genética tiene influencias en como nace y se desarrolla nuestro cerebro. Uno de los métodos genéticos más comunes es el estudio de gemelos. En el caso de los gemelos homocigóticos, éstos comparten el total del genoma y en el caso de los gemelos dicigóticos comparten al menos el 50% del genoma. Si dos gemelos (sean homocigóticos o dicigóticos) presentan el mismo trastorno se dice que son concordantes y si solo lo padece uno se dice que son discordantes. Si es más habitual que se de concordancia en los gemelos homocigóticos que en los dicigóticos se concluye en que el trastorno tiene bases hereditarias (ej: la esquizofrenia).

Otro procedimiento empleado en investigación genética han sido los estudios sobre adopción. Se elige un sujeto que haya crecido con padres no biológicos y se comparan sus rasgos con los de sus padres biológicos. Gracias a estos estudios se puede estudiar la influencia del ambiente y la influencia de los genes.

También deben destacarse las mutaciones dirigidas. En este procedimiento se introducen en animales de laboratorio genes creados artificialmente que no producen ningún enzima productivo para el desarrollo celular. También pueden introducirse genes que provocan una sobreproducción de sustancias o una infraproducción.

El último procedimiento es el llamado oligonucleótidos antisentido. Consiste en introducir fragmentos de ADN o ARN que tienen una organización de nucleótidos inversa al del fragmento de ARN mensajero que se desea anular. Es parecido al procedimiento de hibridación in situ.