

---

## Capítulo 2: métodos y procedimientos de investigación

---

### MÉTODOS DE LESION Y REGISTRO ANATÓMICO

Como el sistema nervioso no se puede observar a simple vista los investigadores han diseñado ingeniosos métodos para observarlo que aportan información de diverso tipo. En función de cuál sea la pregunta de investigación los científicos escogerán uno u otro método. En ocasiones es la respuesta hallada a través de una metodología concreta la que provoca el replanteamiento de las preguntas, guiando el proceso de investigación. Veamos algunos de los principales métodos

#### Ablación experimental

La **ablación experimental o estudio de lesión** se basa en un principio muy simple. Una lesión es una herida. Como diferentes zonas del cerebro tienen diferentes funciones, provoquemos una lesión en determinada zona y observemos que sucede con respecto a la conducta, y de ese modo podremos inferir que función o funciones cumple la zona que hemos lesionado.

Conviene distinguir bien entre **función y conducta**. Una misma función puede participar en diversas conductas, así como en una misma conducta pueden confluír varias funciones. Por ejemplo, yo ahora estoy escribiendo en el ordenador (conducta) y estoy realizando entre otras, las funciones de reconocimiento de letras y comprensión del significado de las palabras, enfocando los ojos hacia el teclado o la pantalla y realizando movimientos precisos de las manos. Si tú eres algún compañero que está leyendo estos apuntes también necesitas activar la función de reconocer el significado de las palabras, aunque estés realizando otra conducta.

Por otra parte el hecho de que al lesionar una zona del encéfalo se vea perjudicada una determinada conducta no nos puede llevar alegremente a concluir que la zona X participa en la conducta Y. Puede ser que, de hecho, los circuitos que participan activamente en la conducta Y, se encuentren en otra parte y nuestra lesión en la zona X, interfiere en el funcionamiento normal de esa otra parte

¿Cómo realizamos lesiones cerebrales? Si la estructura que nos interesa ver esta cerca de la superficie, es sencillo; anestesiamos al animal, hacemos una incisión en el cráneo, cortamos la duramadre y ya tenemos al descubierto la corteza. Situamos una pipeta de vidrio encima del encéfalo y con una bomba de vacío unida a ella, succionamos el tejido.

Si la región es más interna el procedimiento es algo más complejo, vamos a verlo.

## Cirugía estereotáxica

La **cirugía estereotáxica** permite intervenir quirúrgicamente en zonas muy específicas y difíciles de tratar de otro modo. Debajo puede verse un aparato estereotáxico que consta de un mecanismo calibrado para que podamos desplazar el



dispositivo en los 3 ejes: anterior-posterior, dorsal-ventral, lateral-medial y una estructura para sujetar el cráneo del sujeto. Esta es muy firme pues necesitamos conseguir que esté lo más fijado posible, ya que perforaremos a partir de un **atlas estereotáxico**, consistente en una serie de dibujos del encéfalo con medidas que nos señalan unas coordenadas muy específicas, y cualquier movimiento podría significar pinchar en un mal sitio.

Una vez que fijamos el cráneo del sujeto, y tras obtener las coordenadas, procedemos a cortar el cuero cabelludo y así situar la cánula o el electrodo (lo que vamos a introducir) sobre el “meridiano cero” del cráneo, el punto de referencia sobre el que se miden las coordenadas: **bregma** (es el punto de unión de las suturas coronal y sagital, en los bebés está abierto y se llama fontanela). Tras esto sólo hay que trepanar en el punto establecido y hacer descender la cánula o electrodo (más abajo hablaremos de ellos) a través del tejido cerebral. Tras la cirugía, basta con sacar el instrumento, cerrar el cráneo y coser. Todo este procedimiento, se suele hacer con anestesia local, por lo que no es doloroso para el sujeto.

Hay que señalar por otro lado, que esta cirugía puede utilizarse con distintos fines: estimular partes del cerebro en pacientes en los que otros tratamientos no tienen ningún efecto, o para lesionar, y reducir, por ejemplo la metástasis de un tumor. La cirugía estereotáxica, no obstante suele realizarse en animales. Nos enseña muchísimas cosas sobre el comportamiento, y siempre que el fin justifique los medios es muy adecuado utilizarla (mirad el caso clínico de la página 32)

La lesión se produce haciendo pasar una corriente eléctrica a través de un electrodo cubierto de un barniz aislante en todas partes menos en la punta. Llevamos la punta del electrodo adonde haya que llevarla y hacemos pasar una **corriente de radiofrecuencias (RF)** a través del electrodo. La alta temperatura de la corriente destruye las células cercanas a la punta del electrodo (neuronas, glia, axones...todo)

Si queremos ser más precisos y destruir solo las neuronas, dejando los axones a salvo, realizaremos una **lesión excitotóxica**. En lugar de un electrodo insertaremos una cánula e inyectaremos en la región a lesionar un aminoácido excitador, el **ácido caínico**, que estimula los receptores de glutamato excitando las neuronas hasta destruirlas.

Para apreciar la diferencia entre ambos métodos tomemos este ejemplo. Unos investigadores descubrieron que la lesión mediante RF de una determinada zona del tronco encefálico abolía el sueño REM, creyeron por tanto que esa región participaba en esta fase del sueño, pero investigaciones posteriores descubrieron que lo relevante del circuito, eran los axones en este caso, ya que cuando se destruían las neuronas de la zona mediante inyección de ácido caínico, el sueño REM permanecía intacto.

Incluso hay métodos que son específicos para lesionar un tipo determinado de neuronas, sin afectar a otros tipos. Los biólogos han ideado métodos para incorporar sustancias tóxicas a los anticuerpos. Como sabemos algunos anticuerpos se unen a determinadas proteínas que están en la superficie de determinadas células. Cuando los anticuerpos alcanzan estas proteínas, las sustancias tóxicas destruirán a la célula portadora.

Cuando se inserta un electrodo o una cánula en el encéfalo, además de la región que pretendemos lesionar se causan daños adicionales en los lugares en donde se atraviesa el encéfalo ¿Cómo sabemos entonces si la conducta alterada que observamos es debida a la lesión en la zona pretendida o en algún lugar situado más arriba? Como procedimiento control, similar al grupo con placebo de los estudios clínicos, intervenimos a un grupo de animales provocándoles una **lesión falsa**: hacemos lo mismo que haríamos para producir la lesión excepto activar el dispositivo de lesión o iniciar la infusión. De este modo si la conducta de animales con lesión es diferente a la del grupo de referencia con lesión falsa, podemos concluir que la lesión es la causa de la alteración.

### Métodos histológicos

Supongamos que ya hemos examinado la conducta del animal. Debemos entonces sacrificar al animal humanitariamente para estudiar a fondo el tejido (además debemos verificar la localización exacta de la lesión ya los cerebros no son como artículos de serie, cada uno es único y pese a seguir coordenadas precisas podemos errar)

Procederemos en tres fases:

#### **1. Fijación y obtención de cortes histológicos**

Lo primero que hacemos es extraer la sangre del tejido, ya que así se maneja mejor. A este procedimiento lo llamamos **perfusión**. Una vez sacrificado el animal se abren los vasos sanguíneos para que se vacíen de sangre que se reemplaza por una solución salina. Se extrae el encéfalo y se coloca en un recipiente que contiene **fijador**,

normalmente **formol**. El fijador evita que las *enzimas autolíticas*, así como las bacterias y mohos destruyan y descompongan el tejido

Una vez fijado el encéfalo lo situamos en una especie de maquina cortadora de embutidos, llamada **micrótono** que corta el encéfalo en finas láminas que llamamos *secciones* (normalmente el aparato incluye un accesorio que congela el encéfalo, ya que así se secciona más fácilmente)

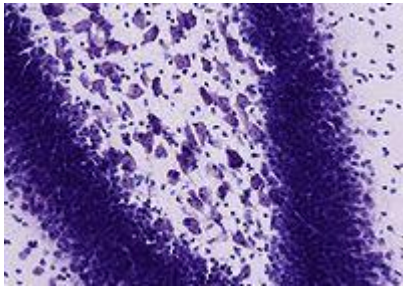
Las secciones así obtenidas se montan sobre un portaobjetos de vidrio, se tiñen (ahora veremos cómo y por qué), se cubren con un líquido llamado *medio de montaje* y se las tapa con una lámina de cristal muy fina (el cubreobjetos)

## 2. Métodos histológicos de marcado

### Tinción

Si dejamos el encéfalo sin teñir y lo observamos al microscopio, se podrán ver los contornos de las masas celulares grandes y poco más. La tinción es una solución ingeniosa, que nos permite ver más y mejor. A finales del siglo pasado, Franz Nissl, un neurólogo alemán, descubrió que un tinte, llamado azul de metileno, podía teñir los somas celulares del tejido cerebral. Determinado material formado por ARN y ADN localizados en el núcleo y (en forma de gránulos) en el citoplasma de la célula, capta muy bien el tinte, de forma que el bueno de Franz pudo ver muy bien esta sustancia, que en su honor, se llamó sustancia de Nissl.

Aquí vemos los cuerpos de Nissl



Aparte del azul de metileno se pueden usar otros tintes para teñir las células (tanto somas neuronales como células gliales son teñidas por el tinte, en cambio los axones no lo absorben bien). Uno de los más utilizados es el violeta de crésilo

### Marcado de conexiones neuronales

Supongamos que no nos interesa marcar los somas neuronales, sino los axones. Vamos a ver los procedimientos de marcado axonal a partir de un experimento. Realizando cirugía estereotáxica a un grupo de ratas hembra (a las que se añadió un grupo control con lesión falsa) un equipo de investigadores descubrió que la lesión en el núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM) afectaba a la conducta reproductora de las hembras, que rehuían la copula. Ya que la conducta reproductora es muy compleja e integra percepciones visuales, táctiles y olfativas a los investigadores les interesaba observar qué papel juega el HVM en la conducta de apareamiento, para ello necesitaban averiguar que estructuras envían sus axones al HVM y a que estructuras los envía este a su vez.

Para identificar las rutas que parten del HVM hacia los músculos (**marcado de axones eferentes**) necesitamos seguir un **método de marcado anterógrado**. Estos métodos emplean sustancias que son captadas por las dendritas o los somas y transportadas a lo largo del axón hasta los botones terminales. Por ejemplo podemos

inyectar mediante cirugía estereotáxica **PHAL** (una proteína que se encuentra en las judías) que es captada por las dendritas y transportada atravesando el soma y los axones hasta los botones terminales. En pocos días toda la ruta está “rellena” con PHAL. Para ver las moléculas de PHAL, se sacrifica al animal, se cortan las secciones del encéfalo que nos interesan, se les aplica un **método de marcado inmunocitoquímico** y se examinan al microscopio.

Los métodos inmunocitoquímicos sacan provecho de las reacciones inmunitarias. Como sabemos los anticuerpos son segregados por los leucocitos o se sitúan en su superficie. Su tarea consiste en unirse al antígeno presente en la superficie del microorganismo invasor y destruirlo. Pues bien, los biólogos moleculares han ideado métodos de producción de anticuerpos capaces de unirse a cualquier péptido o proteína, las moléculas de estos anticuerpos están unidas a su vez a moléculas de colorante (unos tiñen de color marrón y otros son fluorescentes cuando los examinamos con luz de una determinada longitud de onda)

Cuando los investigadores pudieron observar las moléculas de PHAL marcadas mediante procedimiento inmunocitoquímico, descubrieron que los axones que partían del HVM desembocaban en la sustancia gris periacueductal (SGPA). Si comprobamos que provocando una lesión en la SPGA afectamos también a la conducta reproductora de las hembras, podemos seguir con el procedimiento hasta llegar a las neuronas motoras cuya actividad es necesaria para copular (los investigadores lo han hecho, mostraremos algunos de sus resultados en el capítulo 5).

La primera parte de la historia está resuelta, pero ¿Qué sucede con las estructuras que envían **aferencias** al HVM? Para averiguarlo, necesitamos emplear un método de **marcado retrogrado** (retrogrado significa “que se mueve hacia atrás”) Hay sustancias que siguen el trayecto contrario al visto anteriormente: son absorbidas por los botones terminales y transportadas de vuelta al soma celular. Una de estas sustancias es el **oro fluorado**, que como sucedía con los métodos de marcado anterógrado vistos anteriormente identifica el primer eslabón de la cadena, pero en sentido contrario. En el caso de las ratitas hembra, el HVM recibe aferencias de la amígdala medial.

Los métodos vistos hasta ahora identifican como hemos dicho el primer eslabón de la cadena, pero existen métodos más sofisticados que nos permiten identificar series de conexiones sinápticas. Se llaman métodos **transneurales**. El método transneuronal de marcado **anterograde** es el **virus del herpes simple**, para el marcado transneuronal **retrogrado** se emplea el virus de la **seudorrabia**. Si se inyectan estos virus infectan las neuronas y posteriormente la infección se va extendiendo a través de las conexiones sinápticas.

Cuanto más espere el investigador más se habrá extendido la infección. Después tras sacrificar al animal y seccionar su encéfalo se emplean técnicas inmunocitoquímicas para marcar una proteína producida por el virus.

Inyectando el virus de la seudorrabia en los músculos que controlan la postura de apareamiento de la rata hembra, se localizó la trayectoria (hacia “arriba”) desde los nervios motores hasta la neuronas motoras de la médula espinal, la formación reticular del bulbo hasta la SPGA y por último desde allí hasta el HVM de las ratas hembra.

De modo que vemos como combinando los diferentes métodos de marcado podemos obtener una imagen general de los circuitos neuronales

### 3. Observación al microscopio

Por supuesto, por muy teñidas que estén, no podemos ver neuronas a simple vista, para observarlas necesitamos un microscopio.

Para entender cómo funciona un microscopio óptico (o una lente o espejo o nuestro propio ojo) necesitamos conocer algunas propiedades de las ondas electromagnéticas como la luz. Si alguien tiene curiosidad y ganas puede echar un vistazo a este link

[http://www.quimicaweb.net/grupo\\_trabajo\\_ccnn\\_2/tema5/index.htm](http://www.quimicaweb.net/grupo_trabajo_ccnn_2/tema5/index.htm)

El microscopio óptico tiene una capacidad de resolución (claridad de la imagen) limitada. Más allá de los 1500 aumentos no añade detalles. Sin embargo los microscopios electrónicos tienen mucha mayor resolución.

El microscopio electrónico funciona de manera análoga al óptico solo que no está limitado por la longitud de onda de la luz visible, por lo que puede aumentar mucho más la imagen [http://www.youtube.com/watch?v=fgnkdgHXK\\_Y](http://www.youtube.com/watch?v=fgnkdgHXK_Y)

El **microscopio electrónico de transmisión** hace pasar un haz de electrones a través del tejido. Los electrones que propagan su vibración en forma de ondas atraviesan el tejido, después las ondas pasan a través de las lentes magnéticas proyectando una imagen del tejido en una pantalla fluorescente, que puede fotografiarse o escanearse en la pantalla de un ordenador. Revela detalles extremadamente pequeños, aumentando la imagen hasta un millón de veces

En el **microscopio de barrido electrónico** el haz de electrones no atraviesa el tejido sino que se va desplazando de un lado a otro. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen de TV o una imagen digital

El **microscopio confocal con laser**, no requiere que el tejido se corte en secciones finas, sino que permite examinar detalles de secciones gruesas e incluso examinar las capas superiores de un cerebro en vivo. Un rayo laser es un rayo de luz de una determinada longitud de onda (de un color determinado). Si enfocamos la luz laser a una determinada profundidad del tejido que previamente hemos marcado con tinte fluorescente, la luz del laser desencadena la fluorescencia del tejido, como cuando las

olas (que al fin y al cabo eso es la luz, una onda) del mar chocan contra una roca y rebotan, formando otra ola de vuelta al mar. Luego hacemos pasar esta luz fluorescente “rebotada” a través de una abertura que la proyecta en un detector que a su vez proyecta ese puntito de luz al ordenador que forma una imagen. Moviendo la abertura por donde pasa la luz podemos formarnos una imagen completa tridimensional del tejido.

### Observación del cerebro humano en vivo

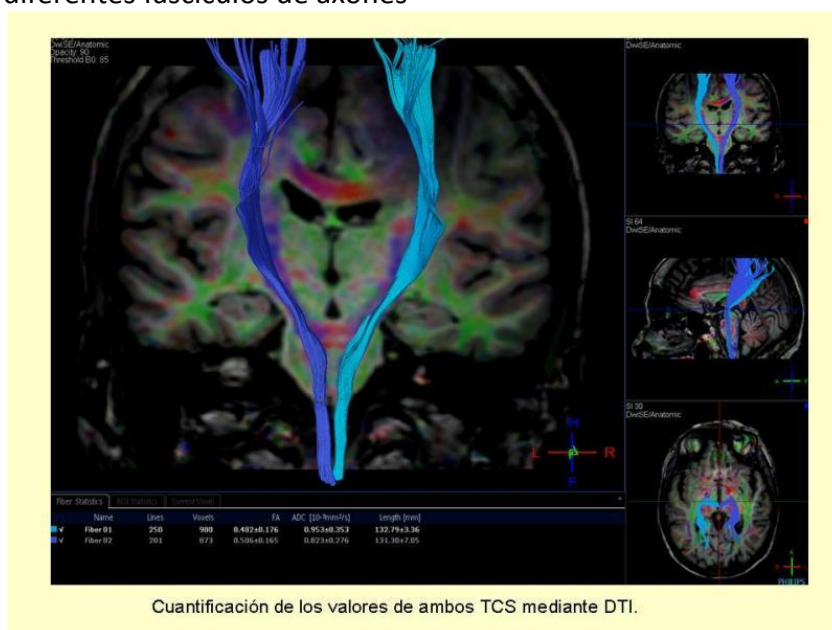
Obviamente no vamos a someter a un ser humano a cirugía estereotáxica para provocarle una lesión y observar lo que ocurre. Antiguamente solo se podía observar un encéfalo humano lesionado, una vez el paciente había muerto, y tenían que darse una serie de circunstancias: que el médico sobreviviera al paciente, que ninguno de los dos se hubiera trasladado a otra ciudad, que la familia diera permiso para observar el encéfalo...

Actualmente existen procedimientos para obtener imágenes del cerebro humano en vivo

En este video (es corto) se explica el funcionamiento de la tomografía axial computerizada **TAC**: <http://www.youtube.com/watch?v=VmH6ilCi1q8> (las imágenes del tac se limitan generalmente al plano horizontal)

Aquí tenéis otro video cortito de la resonancia magnética nuclear **RM** <http://www.youtube.com/watch?v=ZCiZiyembdQ> (las imágenes por RM tienen mejor resolución y también pueden obtenerse en los planos sagitales o frontales)

Una versión especial de la RM llamada **ITD** (imágenes tensoriales de difusión) nos permite ver los fascículos de fibras más pequeños, ya que el movimiento de las partículas de agua en las fibras de sustancia blanca no es aleatorio sino que se mueven en paralelo a los axones que constituyen las fibras. Mediante esta RM especial se detecta el movimiento de estas moléculas de agua. El ordenador añade colores para distinguir los diferentes fascículos de axones





## RÉGISTRO Y ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEURAL

### REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTROMAGNÉTICA

Las neuronas se comunican entre sí mediante fenómenos electroquímicos que constituyen los potenciales de acción, y los potenciales presinápticos y postsinápticos como vimos el año pasado en psicobiología. Los fenómenos eléctricos pueden ser registrados para medir la actividad cerebral, tanto mediante registros **crónicos** (un largo periodo de tiempo después de que el animal se haya recuperado de la intervención) como mediante registros **agudos** (en este caso el registro se efectúa estando el animal anestesiado y se limita al registro de las vías sensoriales pues las conductas de un animal anestesiado son, cuanto menos, limitadas)

#### Registro con microelectrodos

Actualmente es posible construir electrodos con una punta tan fina (**microelectrodos**) que son capaces de registrar la actividad eléctrica de una **neurona individual**.

Imaginemos que somos investigadores y descubrimos que los agentes químicos que afectan a las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas afectan también al sueño REM. Nos planteamos entonces si la actividad de estas neuronas variará durante el sueño.

Queremos hacer un registro crónico, por lo que realizamos al animal cirugía estereotáxica y le insertamos un conjunto de finísimos cablecitos unidos en un manojo, aislados completamente excepto en la punta; luego conectamos este manojo de cables a unos pequeños zócalos de conexión eléctrica pegados al cráneo con cemento dental (una pasta que ha resultado útil para estos menesteres). Cuando el animal se ha recuperado de la anestesia se le puede “conectar” al sistema de registro (los animales son bastante indiferentes al zócalo sobre su cabeza y se comportan normalmente, incluso cuando se implantan dispositivos más complejos, con tornillos que permiten a los investigadores desplazar los electrodos por el encéfalo)

Como podemos imaginar la señal eléctrica de neuronas individuales es extremadamente débil y debe amplificarse. Una vez amplificada se registra en un **osciloscopio** y se almacena en la memoria de un ordenador para analizarla más tarde.

Bien, ¿Qué sucede con las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas durante el sueño REM? Resulta que la actividad de estas neuronas inhibe el sueño REM. Dicho en otros términos, el sueño REM no se presentará hasta que la actividad de descarga de estas neuronas haya caído casi a cero.



## Registro con macroelectrodos

A veces no nos interesa registrar la actividad de neuronas individuales, sino de áreas más grandes, conformadas por decenas de miles, e incluso millones de células individuales. Insertamos entonces un **macroelectrodo**, que puede ser un alambre no afilado, una especie de tornillo e incluso un disco de metal. A veces no necesitamos insertar nada. Se pueden pegar al cuero cabelludo del paciente (y luego tienes durante días el pelo lleno de “pegamento”, es difícilísimo de quitar, lo sé por experiencia...) discos de metal untados con una pasta especial que conduce la electricidad. Las señales de ingentes cantidades de neuronas atraviesan entonces las meninges, el cráneo y el cuero cabelludo antes de alcanzar los electrodos. Las señales son amplificadas y enviadas a un **polígrafo** (que es como la célebre “maquina de la verdad” que usan los polis de las películas americanas en los interrogatorios), manecillas con grandes voltímetros van registrando la actividad eléctrica en un papel (si bien a información se presenta habitualmente también en la pantalla de un ordenador). A este registro de la actividad eléctrica del cerebro se le llama **electroencefalograma**. Como curiosidad decir que también se puede registrar la actividad eléctrica del corazón, estaríamos entonces ante un electrocardiograma.

El electroencefalograma puede utilizarse para el diagnóstico de la epilepsia, para estudiar la fisiología del sueño (cuando hablemos de ello os contaré un interesante y curioso caso: el mío propio) o para supervisar el estado del encéfalo en intervenciones que, en principio pueden dañarlo (mirad el caso clínico de la página 51)

## Magnetoencefalografía

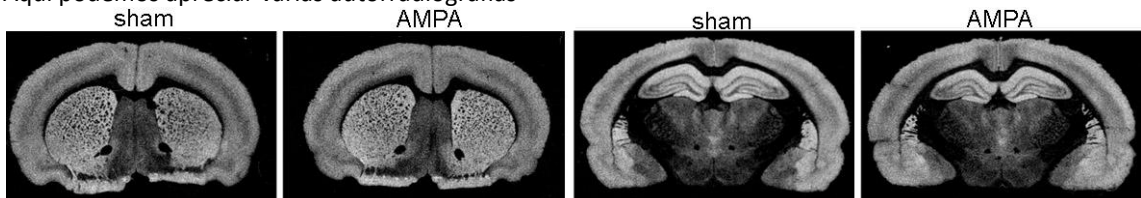
Cuando una corriente eléctrica fluye a través de un conductor induce un campo magnético (para recordar muy someramente lo que es un campo magnético podéis seguir este breve enlace: <http://educacion.practicopedia.com/como-actuan-los-campos-magneticos-2387>)

Los campos magnéticos generados por los potenciales de acción o postsinápticos son muy pequeños, pero los ingenieros han ideado unos dispositivos de exótico nombre para poder detectarlos: los dispositivos superconductores de interferencias cuánticas, **SQUID** para los amigos. Los **neuromagnetómetros** contienen varios de estos SQUID, dispuestos de manera que el ordenador pueda examinar su emisión y calcular el origen de las señales magnéticas que recibe para “colorear” la zona en la imagen que se forma en la pantalla. En la clínica la magnetoencefalografía se usa para detectar, por ejemplo, focos epilépticos. En la experimentación se usa para ver qué zonas cerebrales se activan cuando se realizan determinadas tareas.

## REGISTRO DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA Y SINÁPTICA

Ya sabemos que cuando una neurona está activa, aparte de aumentar su actividad eléctrica lo hace también su actividad metabólica, sobretodo a consecuencia de las bombas iónicas. La actividad metabólica se puede detectar inyectando **2-dexosiglucosa (2-DG)** radioactiva en el torrente sanguíneo del animal. Como la 2-DG se parece a la glucosa (el combustible de la célula) es transportada al interior de las células, de forma que las células más activas, presentan más concentración de 2DG. Como la 2DG no puede ser “quemada” (no se metaboliza) se queda en el interior de la célula, de modo que el investigador secciona el encéfalo del animal lo cubre con emulsión fotográfica y semanas después revela las secciones como si de películas fotográficas se tratase. A este procedimiento se le llama **autoradiografía**. Las zonas más radioactivas, con más 2DG, se ven como puntos más oscuros

Aquí podemos apreciar varias autorradiografías



Por otra parte, cuando las neuronas son estimuladas, determinados genes del núcleo, llamados *genes de expresión temprana*, se activan y producen proteínas específicas. Una de estas proteínas es la **proteína FOS**.

Si os acordáis de las ratitas hembra de antes, veíamos que cuando inyectamos oro fluorado en el HVM descubrimos que este recibía aferencias de la amígdala medial. Pues bien, si dejamos a las ratitas que se apareen antes de sacrificarlas (muerte, pero antes un poco de yuyu, como dice el chiste, por dios...pobres animalillos, en fin, todo sea por la ciencia, al menos morirán después de catarlo...) y seguimos después un procedimiento para teñir la proteína FOS, vemos que en la amígdala medial aparecen puntos negros, de modo que todo indica que se activa con la cópula.

Veamos ahora las técnicas de **neuroimagen funcional**. La tomografía por emisión de positrones (**TEP**), consiste en inyectar dosis, inocuas, por supuesto, de D2G radioactiva en sujetos humanos. Se les coloca luego en un artilugio parecido al de un TAC y, cuando estas moléculas radiactivas se desintegran comienzan a emitir positrones que el equipo de TEP detecta. Luego el ordenador (que sería de nosotros sin los ordenadores...) detecta las zonas con más emisión y nos las presenta en la pantalla.

Como, entre otras rarezas, me gusta la física y leo cuanta divulgación cae en mis manos, sin entender ni papa la mayor parte de las veces, no puedo resistirme a contaros aunque no venga a cuento que el positrón es la partícula gemela del electrón (los físicos lo llaman antipartícula) y es igualito, completamente indistinguible de su

“hermano” excepto en que su carga es contraria (el electrón está cargado negativamente, el positrón positivamente). Si un electrón y un positrón se encuentran se aniquilarán, sin remedio y sin ni siquiera saludarse (la física de partículas es muy, pero que muy extraña....)

En fin, esto no tenía nada que ver. Volviendo con el TEP, resulta que la 2DG que se utiliza con sujetos humanos se desintegra muy deprisa, tiene por tanto que producirse en el lugar donde se administra. Para ello utilizan un acelerador de partículas con nombre de superhéroe: el Ciclotrón. El ciclotrón es sumamente caro y manejarlo no debe ser fácil, por lo que se requieren expertos. El principal inconveniente del TEP es pues, el coste.

Además la resolución espacial no es muy buena y las imágenes se ven borrosas. La resolución temporal tampoco es muy buena, pudiendo escapársele al investigador aquellos eventos cerebrales que suceden muy rápido. Para lo que sí es muy bueno el TEP es para detectar la concentración de determinadas sustancias químicas en diferentes regiones del cerebro (lo veremos luego).

Otra técnica funcional de neuroimagen es la **resonancia magnética funcional (RMf)**: es una variante de la RM que permite detectar variaciones metabólicas indirectamente al captar los niveles de oxígeno en los vasos sanguíneos del cerebro, ya que cuanto más activa sea una región mayor aporte de oxígeno presentará. Lo llaman exploración **BOLD** (blood oxygen level-dependent) y tiene una resolución mucho mayor que la TEP.

## **ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEURAL**

En ocasiones nos puede interesar modificar la actividad de determinada zona del cerebro para comprobar que cambios ocurren. Volvamos con nuestras ratitas hembra. Las ratas que tienen déficit de hormonas sexuales femeninas no muestran interés por la cópula, pero como hemos visto, las lesiones en el HVM afectan también a la conducta sexual ¿Qué sucederá si activamos esta zona, se compensará de alguna manera la falta de hormonas?

### **Estimulación eléctrica y química**

Podemos activar las neuronas eléctricamente. Para ello pasamos una corriente eléctrica a través de un cable insertado en el encéfalo. También podemos estimularlas químicamente inyectando sustancias excitadoras a través de una cánula. Incluso podemos fijar permanentemente al cráneo una cánula guía a través de la cual insertaremos otra cánula más estrecha: mediante este dispositivo se pueden inyectar diversas sustancias en el encéfalo y comprobar el comportamiento del animal en diferentes ocasiones.

La estimulación química, aunque más complicada que la eléctrica, se restringe a las neuronas y no afecta a los axones que atraviesan la región, de manera que ofrece más seguridades a la hora de investigar. No obstante, las garantías de que estamos estimulando los grupos neuronales que nos interesan no son totales puesto que las sustancias químicas excitadoras pueden afectar a todas las neuronas de la región por la que se difunden: ya sean excitadoras, inhibitorias, de proyección etc...

Como curiosidad decir que lo que en pequeñas dosis estimula, en grandes dosis puede matar: es el caso del ácido cálcico del que hablábamos atrás. En soluciones diluidas estimula las neuronas, en grandes dosis las destruye (lo mismo sucede con las drogas de abuso....)

En cuanto a nuestras ya conocidas ratitas, en efecto, la estimulación del HVM sustituye la acción de las hormonas sexuales femeninas de modo que parece probable que las hormonas sexuales actúen en esta región, mas adelante veremos cómo se puede comprobar esta hipótesis

### Fotoestimulación

Los investigadores han descubierto un ingenioso método para activar o desactivar tipos específicos de neuronas en regiones concretas del encéfalo.

Resulta que las algas verdes y determinado tipo de bacterias tienen proteínas fotosensibles que abren canales iónicos. En el caso de las algas verdes, la proteína *rodopsina canal-2 (ChR2)* abre un canal iónico asociado ante la incidencia de luz azul, permitiendo el paso de iones de sodio y calcio (que como sabemos son positivos y despolarizan la célula). La proteína de la bacteria, que responde al nombre, rebuscado a más no poder, de *natronomonas pharaonis halorhodopsin (NpRH)* controla por su parte un transportador que ingresa cloruro (recordemos que es un ion negativo, hiperpolarizante) dentro de la célula cuando es activado por una luz azul.

Podemos introducir ChR2 o NpCR en neuronas incorporando los genes que las codifican al genoma de virus inocuos. Es más, rizando el rizo, los genes se pueden modificar de manera que las proteínas fotosensibles se expresen solo en tipos específicos de neuronas.

Bien, ya solo nos queda hacer penetrar la luz en el cerebro. Si la zona que queremos observar esta cerca de la superficie podemos taladrar un pequeño orificio en el cráneo y adherir sobre el diodos emisores de luz (DEL) que son dispositivos electrónicos, que emiten luz, una especie de minibombillitas. Si queremos observar neuronas más profundas, insertaremos fibra óptica (una especie de cables que transmiten luz) por medio de cirugía estereotáxica

Y como durante todo el capítulo hemos visto sufrir a las ratas y para no hacer quedar a los científicos como sádicos torturadores, quiero comentar que se ha intentado insertar genes de ChR2 en las células ganglionares retinianas de ratones ciegos, que carecían de fotorreceptores. Los resultados fueron esperanzadores: aunque

la visión es un proceso muchísimo más complejo que la simple detección de luz, las células ganglionares de estos ratoncillos se hicieron sensibles a la luz, lo que abre caminos para tratar determinados casos de ceguera.

### Estimulación magnética transcraneal

Es una técnica bastante nueva, además de no invasiva. Podéis ver cómo funciona aquí: <http://www.youtube.com/watch?v=MUXMJfLhFsA&feature=related> y si queréis ver al bueno de Punset a punto de ser estimulado mediante esta técnica (bastante asustado, por cierto...) os recomiendo pinchar este enlace:

<http://www.youtube.com/watch?v=L6SpNMzobdo&feature=related>

## MÉTODOS NEUROQUÍMICOS

Si lo que queremos es averiguar la localización de neuronas que tengan un receptor o neurotransmisor determinado o estimar la cantidad de neurotransmisores y neuromoduladores segregados en regiones concretas del encéfalo nos valdremos de estos métodos.

Spongamos que nos interesa localizar un determinado **neurotransmisor**. Tenemos tres posibles caminos: **localizar la sustancia misma**, **localizar las enzimas que la fabrican** o **localizar el ARN mensajero que da la orden de fabricarlas**.

Si la sustancia es una proteína o un péptido nos servimos de los métodos inmunocitoquímicos que hemos explicado antes: asociamos un anticuerpo con tinte fluorescente incorporado a la proteína en cuestión y luego lo examinamos al microscopio con luz de una determinada longitud de onda.

Ahora bien, puede que la sustancia que nos interesa no sea un péptido ni una proteína. Cuando un grupo surtido de granjeros que habían estado expuestos a un tipo de insecticidas empezaron a experimentar terribles y vividas pesadillas, los investigadores se dieron cuenta de que pasaba algo raro...En efecto, el insecticida frenaba la destrucción de la acetilcolina, al inhibir la acción de las encimas que se encargan de destruir la que sobra tras ser liberada por los botones terminales. Al no ser destruida había más acetilcolina circulando por ahí de la que debería haber en condiciones normales. A los investigadores les interesaba hallar este neurotransmisor y ver si tenía que ver con el sueño REM. Aunque la acetilcolina no es una proteína, la enzima que la produce (colina acetiltransferasa o ChAT) sí que lo es y se puede localizar mediante métodos inmunocitoquímicos. Como se puede deducir en las células donde haya Chat, habrá acetilcolina. Parece ser que en efecto hay neuronas colinérgicas en los circuitos neurales que controlan el sueño REM.

Existe un último método. Ya sabemos que las "cartas" que llevan los ARN mensajeros, contienen las "instrucciones" para fabricar proteínas, entre ellas las enzimas. La técnica de **hibridación in situ** consiste en sintetizar un segmento radiactivo con la secuencia de nucleótidos complementaria al ARN mensajero que queremos

interceptar. Esta cadena complementaria se acopla al ARN que contiene el código para fabricar la proteína que nos interesa. Las células donde se realice este acople son células productoras de la proteína que queremos localizar. Utilizando la técnica de autorradiografía que vimos anteriormente podemos ver el ARN radiactivo que hemos introducido como “espía”.

Si lo que nos interesa, es localizar un determinado **receptor** el procedimiento es distinto. El primer método consiste en exponer una sección del encéfalo a un **ligando radioactivo** (por ejemplo: morfina radiactiva que se une a los receptores de opioides) y posteriormente se usan métodos autorradiográficos para localizar los ligandos. El segundo método consiste en aplicar la **inmunocitoquímica**, ya que los receptores son proteínas.

Si recordáis a nuestras ya famosas ratitas, la última vez que las vimos habíamos comprobado que estimulando eléctrica o químicamente el HVM se conseguía reactivar la conducta de apareamiento en ratas estériles. Nos preguntábamos si las hormonas sexuales tendrían receptores en el HVM. Pues bien, con cualquiera de estos métodos podemos localizar los receptores, que efectivamente existen.

Y, por último para **estimar la cantidad** de sustancias químicas que segrega el cerebro en una determinada zona utilizamos un método llamado **microdiálisis** que consiste en implantar un pequeño tubo, con una membrana semi-impermeable acoplada. A través del tubo se inyecta una solución salina que capta moléculas del líquido extracelular, las cuales pasan a través de la membrana gracias a la difusión. Posteriormente analizamos la composición del líquido extracelular.

En los seres humanos no se utiliza este método, salvo en casos excepcionales, ya que implica cirugía cerebral, pero podemos utilizar el **TEP**, que es capaz de estimar la concentración de sustancias químicas en el cerebro. En la figura de la página 63 aparecen las imágenes TEP del señor B, el paciente cuyo caso se expone como presentación del capítulo. Este joven tuvo la desgracia de consumir una nueva heroína sintética que le destrozó las neuronas dopaminérgicas provocándole síntomas tipo párkinson muy severos. Cuando los médicos consiguieron trasplantar al señor B células fetales secretoras de dopamina, el paciente mejoró drásticamente y su actividad dopaminérgica aumentó, como se aprecia en el TEP. Por desgracia, los efectos fueron temporales.

## MÉTODOS GENÉTICOS

### Estudios con gemelos

En este trabajo tan detectivesco de observar la fisiología de la conducta se utiliza también la investigación genética. Un método muy eficaz para evaluar la influencia genética de un determinado rasgo consiste en comparar el **índice de concordancia** para ese rasgo en pares de gemelos monocigóticos y dicigóticos. Los gemelos monocigóticos son desde el punto de vista genético, clones, ya que comparten el 100% del genoma. Está claro, por tanto, que si un trastorno (o cualquier rasgo) tiene una

base genética fuerte, el grado de concordancia, es decir de presencia del trastorno, será mayor entre gemelos monocigóticos que entre gemelos dicigóticos que solo comparten de media el 50% de los genes.

### Estudios de adopción

Aquí la lógica consiste en comparar personas que fueron entregadas en adopción en etapas muy tempranas con sus padres biológicos y con sus padres adoptivos. Aunque los rasgos están influidos por la herencia, por el ambiente y en la inmensa mayoría de los casos, por una combinación de ambos en distintos grados, podemos encontrar que para un determinado rasgo, los hijos se parecen mucho a sus padres biológicos y no a los adoptivos. Antes de concluir la base genética de ese rasgo tenemos que examinar los factores perinatales (por ejemplo, la desnutrición de la madre biológica o si es drogadicta...) que pueden influir también en la presencia del rasgo.

### Mutaciones dirigidas

Los impresionantes avances en el campo de la genética molecular han hecho posible que se puedan insertar genes transformados (llamados también genes *knockout*), en los cromosomas de un ratón, de manera que ese gen no pueda producir una proteína o enzima esencial. Los investigadores pueden incluso producir knockout condicionales, de modo que el gen se exprese normalmente durante el desarrollo, y, posteriormente, deje de hacerlo tras la ingestión de una droga. Aparte de suprimir también se pueden insertar genes en el genoma del ratón dando lugar a un aumento en la producción de proteínas o a la producción de proteínas nuevas. No tiene nada que ver, pero supongo que en eso consisten los famosos alimentos transgénicos.

### Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son cadenas modificadas de ADN o de ARN que se unen por complementariedad a una molécula específica de ARN mensajero, bloqueándolo e impidiéndole que envíe las instrucciones para fabricar su proteína. Es un método similar a la hibridación in situ, que se usaba para localizar determinadas proteínas.

Bueno, aquí termina el capítulo, y me gustaría expresar por mi parte, el más sincero agradecimiento a todas esas ratas y ratones que han hecho posible descubrimientos de los que nos beneficiamos todos.