



Inclusión de una célula nerviosa en un circuito electrónico de estimulación y medida¹

Daniel Radesca²

¹Monografía vinculada a la conferencia del Dr. Gustavo Brum sobre "Técnicas ópticas aplicadas al estudio de procesos electrofisiológicos. Nuevos desarrollos" del 19 de mayo del 2009.

²Email: danielradesca@hotmail.com

Resumen

Para comprender las propiedades eléctricas de la membrana celular es necesario definir el concepto de potencial de membrana en reposo. Este último se logra gracias a una serie de potenciales iónicos de difusión y de equilibrio que pueden desencadenar en la célula nerviosa un "desequilibrio" eléctrico fisiológico denominado potencial de acción.

Para comprender mejor dichos eventos se propone la comparación de la célula nerviosa con un circuito eléctrico llamado circuito equivalente. Éste compara a la membrana de se intenta comprender las bases electrofisiológicas la célula con una resistencia y una batería dispuestas en serie y unidas en paralelo a un condensador.

Para entender las bases electrofisiológicas, a través de una búsqueda bibliográfica sistemática, se estudia los métodos básicos de estimulación y medida como lo son el Voltage Clamp y el Patch Clamp, pilares fundamentales para lograr comprender el funcionamiento neuronal.

1. Introducción

A finales del siglo XIX, Ringer [3] observó que era posible mantener latiendo durante mucho tiempo un corazón de rana en una solución que contenía sodio, potasio y calcio en proporciones determinadas. Hablamos de células que tienen características especiales. Se trataba del primer indicio de la existencia de un control eléctrico a nivel celular mediado por iones, para los que existía una permeabilidad selectiva a través de la membrana plasmática. Dicho mecanismo se vería años después reflejado eléctricamente como una respuesta estereotipada denominada potencial de acción. [1]

El objetivo de este trabajo no es ahondar en el mecanismo específico, sino poder comprender estructuralmente y funcionalmente el desencadenamiento de señales eléctricas y como son registradas experimentalmente.

Evaluaremos varios aspectos del circuito equivalente y eventualmente nos centraremos en desarrollar sucintamente una técnica de medida denominada “Patch Clamp”, técnica utilizada por primera vez por Neher y Sakmann en 1976 y que les merecería el premio Nobel en el año 1992. [9]

2. Propiedades eléctricas de la membrana celular

En 1925 Gorter y Grendel [11] describen como estructura de las membranas celulares una bicapa lipídica, encargada de separar el medio intracelular del extracelular. Desde entonces ha habido un gran número de descubrimientos que transforman a las membranas biológicas en sistemas sumamente complejos.

Es así que para comprender mejor su funcionamiento se han utilizado modelos de comportamiento eléctrico.

2.1 Potencial de membrana en reposo

En la membrana plasmática de las células excitables existe una diferencia de potencial eléctrico determinado por la distribución asimétrica de los distintos iones. Esta separación de cargas eléctricas a través de la membrana celular crea en torno a la neurona una nube de iones positivos y negativos esparcidos en la superficie interna y externa de la célula. Así en reposo podemos encontrar más cargas positivas en el exterior y por lo tanto menos cargas positivas en el interior. De esta forma el interior celular es negativo y extracelularmente hablamos de un medio positivo en reposo. [1]

Lógicamente esta separación de cargas es mantenida por la bicapa lipídica que es impermeable a los iones. Esta diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana se denomina potencial de membrana (V_m) siendo:

$$V_m = V_e - V_i$$

en donde V_i es el potencial intracelular y V_e el potencial extracelular. Por convención $V_e = 0$, resultando el V_i en reposo negativo y rondando los -70 mV. [2]

De los cuatro iones más importantes, el Na^+ y el Cl^- son aquellos que se encuentran más concentrados a nivel extracelular, y el K^+ y otros aniones orgánicos (A^-) más concentrados dentro de la célula. Esta diferencia está determinada por un segundo componente básico de la membrana celular: los canales iónicos. Estas son proteínas distribuidas en mosaico a lo largo y ancho de la membrana, y son las que permiten el pasaje de iones. [1]

2.2 Potencial de difusión

Esta asimetría iónica crea a través de los canales iónicos un potencial de difusión y de mantenimiento. El mismo será a expensas de un mecanismo pasivo y otro activo. [10]

El mecanismo pasivo es el equilibrio Donnan a través de canales iónicos no voltaje dependientes, en donde un ión no difusible como los A^- obliga a la distribución de los otros para lograr la electroneutralidad. Estos iones son el potasio y el cloro. [1]

El mecanismo activo se trata de un canal capaz de sacar al medio extracelular tres iones sodio e ingresar, de la misma forma a contracorriente, dos iones potasio. Es un mecanismo que gasta energía celular en forma de ATP y es el encargado principal de provocar la asimetría iónica. [1]

2.3 Potencial de equilibrio

Los iones se mueven a través de la membrana según un gradiente de concentración y un gradiente eléctrico. Cuando dicho movimiento llega al equilibrio (el flujo neto de iones es cero) hablamos de que llegó a un potencial de equilibrio del ión ($E_{ión}$). Esto se consigue aplicando la ecuación de Nerst para el ión. (4)

Considerando el potencial de equilibrio de cada ion, el potencial de reposo de la membrana puede ser representado matemáticamente como una modificación de la ecuación de Nerst, surgiendo así la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$V_m = \frac{R T}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{ext} + P_{Na} [Na^+]_{ext} + P_{Cl} [Cl^-]_{int}}{P_K [K^+]_{int} + P_{Na} [Na^+]_{int} + P_{Cl} [Cl^-]_{ext}}$$

en la que R es la constante de los gases, T la temperatura en grados Kelvin, F la constante de Faraday y P la permeabilidad del ión a nivel intra o extracelular. [4]

En condiciones de reposo la permeabilidad del K^+ supera ampliamente la de los demás iones, y por lo tanto el potencial de reposo estaría cercano al potencial de equilibrio de este ión. [1]

2.4 Potencial de acción

Cada vez que hay un flujo neto de cationes y de aniones hacia dentro o fuera de la célula, se altera la separación de carga a través de la membrana en reposo, con lo que se altera la polarización de ésta. Una reducción de la separación de carga, que da lugar a un potencial de membrana menos negativo, recibe el nombre de despolarización. Por lo que un aumento de la separación se denomina hiperpolarización. [1]

Todos aquellos potenciales que hablamos anteriormente que no provocan la apertura de canales iónicas voltaje dependiente, recibe el nombre de potenciales electrotonicos.

Sin embargo, cuando la despolarización se aproxima a un nivel crítico, denominado umbral, la célula responde activamente con la apertura de los canales de iones sensibles al voltaje, produciendo una respuesta “todo o nada”, estereotipada denominada potencial de acción. [6]

3. Circuito equivalente

La ecuación de Goldman tiene un valor limitado, ya que no puede emplearse para determinar la rapidez con la que varía el potencial de membrana en respuesta a un cambio de la permeabilidad. Además, no es adecuada para determinar la magnitud de las corrientes individuales de sodio, potasio y cloro. [1]

Esta información puede obtenerse con un sencillo modelo matemático derivado de los circuitos eléctricos. Dentro de este modelo surge el denominado circuito equivalente (Fig. 1), en donde todas las propiedades funcionales importantes de la neurona están representadas.

3.1 Resistencia y batería

Los iones difunden constantemente a través de la membrana por canales no voltaje dependiente. Estos le ofrecen cierta dificultad en el pasaje, comportándose como resistencias. Si consideramos que dicho canal esta inmerso en una diferencia de potencial químico, podríamos representarlo como una resistencia que se encuentra dispuesta en serie con una batería. [3]

Si no hubiera ningún gradiente de concentración utilizaríamos la ley de Ohm para valorar la intensidad de forma que:

$$I = Vg$$

en donde g es la conductancia de la membrana (recíproco de la resistencia) para dicho ión. La conductancia de membrana en reposo ronda los 40 nS. [4]

Sin embargo, la fuerza química representada como batería tiene una fuerza electromotora expresada por el potencial de Nerst para el ión. Es así que definimos el término de fuerza de arrastre electroquímico como la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del ión; de esta forma llegamos a ver representada a la ley de Ohm ahora como:

$$I_{\text{ión}} = g_{\text{ión}} (V_m - E_{\text{ión}})$$

siendo $(V_m - E_{\text{ión}})$ la fuerza de arrastre electroquímica, fuerza que determina la dirección del flujo de la corriente iónica. [1]

3.2 Generador de corriente

Dado que flujos de sodio, potasio y cloro a través de canales no voltaje dependiente llegarían al equilibrio, esto provocaría que los gradientes para cada ión sean cero.

Por lo tanto para completar más exactamente el circuito equivalente es necesario que exista un mecanismo que restablezca estos gradientes, y éste es la bomba de sodio-potasio. Se encarga de extraer tres iones sodio e ingresar dos de potasio, permitiendo mantener la batería cargada. Esto lleva al consumo de energía celular en forma de moléculas de ATP. [2]

3.3 Capacitor

Dado que el medio extracelular como el intracelular son buenos conductores de corriente, a la vez que se encuentran separados por una bicapa lipídica, esto puede ser representado como un capacitor eléctrico. Este capacitor presenta una fuga ya que existe corriente a través de los canales no voltaje dependiente, dejando pasar cargas de un lado y otro de la membrana. [1]

Cuando conectamos este capacitor a la batería provocamos un movimiento de cargas desde el extremo positivo de la batería hacia una de las placas del capacitor, acumulándose y provocando que se desplacen las cargas positivas del otro lado por magnetismo. A esto llamamos corriente capacitiva. [1]

La capacitancia de la membrana (C_m) es del orden de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ para todas las células, ya que depende del área de las placas, la separación entre ellas y la constante dieléctrica de las membranas, elementos poco variables. [4]

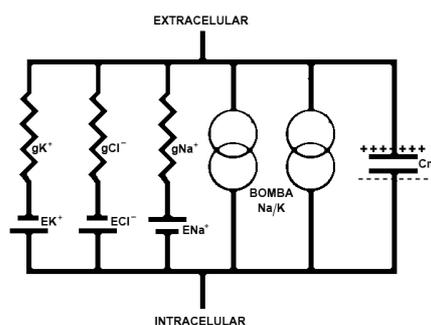


Figura 1. Esquema de circuito equivalente.

Se pueden observar las resistencias de los principales iones, la bomba sodio-potasio y el condensador.

4. Voltage Clamp

En la técnica de Voltage Clamp, el potencial de membrana se mantiene constante, a la vez que se mide la corriente a través de la membrana requerida para mantener ese nuevo voltaje. [7]

El verdadero interés del investigador no radica en conocer la corriente transmembrana sino que está interesado principalmente en la conductancia de membrana, siendo ésta directamente proporcional a la actividad de los canales iónicos. [4]

Se mide la intensidad ya que el investigador no tiene forma directa de medir la conductancia. Al lograr mantener el potencial de membrana constante, el investigador consigue que la corriente sea linealmente proporcional a la conductancia estudiada. [5]

La utilidad del voltage clamp se encuentra principalmente en el hecho que permite la separación de la corriente iónica de la corriente capacitiva. Además permite obtener mejor información del comportamiento de los canales, especialmente los procesos de apertura y cierre según el potencial de membrana establecido. [7]

4.1 El Voltage Clamp ideal

El voltage clamp ideal consiste simplemente en una batería, un switch, un cable, la célula y un amperímetro como se ve en la figura 2.

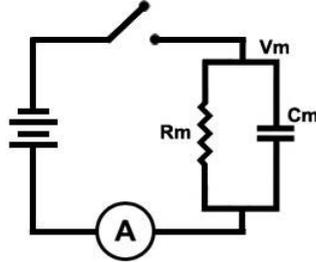


Figura 2. Circuito de Voltage Clamp ideal.

Notar que el circuito de la célula se encuentra simplificado y no se muestra la bomba sodio-potasio ni los potenciales eléctricos de cada ión.

Partiendo de la base que el cable tiene cero resistencia, cuando el switch se cierra, el potencial de membrana pasa instantáneamente a ser igual al voltaje de la batería. [5] Esto genera un impulso de corriente que carga el capacitor de la membrana, seguido por una corriente de mantenimiento a través de la resistencia de la membrana.

4.2 Voltage Clamp real

Existen muchas razones por las cuales el voltage clamp real sería muy inferior al ideal, entre las que se encuentra la resistencia del instrumental.

La primera solución a dicho problema es el voltage clamp de dos electrodos y luego la versión de un electrodo que evolucionaría al Patch Clamp. [7]

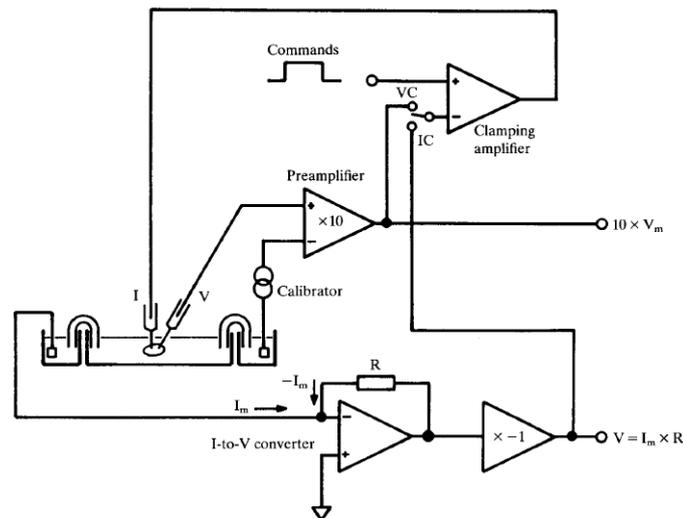


Figura 3. Circuito de Voltage Clamp de dos electrodos.

Notar las dos micropipetas introducidas en la célula y el switch que permite cambiar de voltage clamp a current clamp o clamp de corriente.

La célula es penetrada por dos microelectrodos insertos en micropipetas, en donde uno se encarga de registrar el voltaje y el otro introduce la corriente. [5]

Las micropipetas y los microelectrodos son cuidadosamente realizados para disminuir sus resistencias (5-10 M Ω para los de voltaje y 1-2 M Ω para corriente) y para generar poco daño en la célula. Un preamplificador registra el potencial de membrana y el amplificador diferencial del clamp ingresa corriente para controlar este potencial. [5]

4.3 Corriente capacitiva, corriente de fuga y corriente resistiva

Con la técnica de voltage clamp si se despolariza la membrana de forma tal que sea 10 mV más despolarizado, se logra observar este fenómeno. [1]

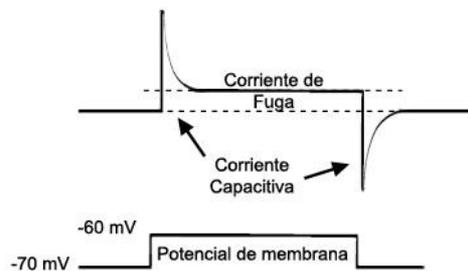


Figura 4. Respuesta iónica de la célula frente a una despolarización de 10 mV.

Una pequeña corriente saliente (más positiva) que disminuye sin llegar a cero se mantiene constante mientras se mantenga despolarizada la membrana. Al volver al potencial de membrana original observamos previamente una rápida corriente entrante.

Las corrientes entrantes y salientes corresponden a las corrientes capacitivas, y a la corriente que se mantiene constante es la corriente de fuga; ésta causada por la permanencia de canales abiertos que permiten el paso de iones. [13]

Si obligamos a la célula a mantenerse despolarizada por encima de su potencial umbral observaremos que se distorsiona totalmente la anterior gráfica. Aumenta las corrientes capacitivas y de fuga, a la vez que corrientes entrantes de sodio y corrientes salientes de potasio aparecen debido a canales voltaje dependiente. Las corrientes a través de estos últimos canales se denominan corrientes resistivas. [1]

4.4 Cambio del potencial de membrana en respuesta a un pulso de corriente

Dado que la resistencia y la capacitancia de la membrana están en paralelo, el voltaje a través de cada elemento siempre es el mismo, y es igual al potencial de membrana (V_m). [2]

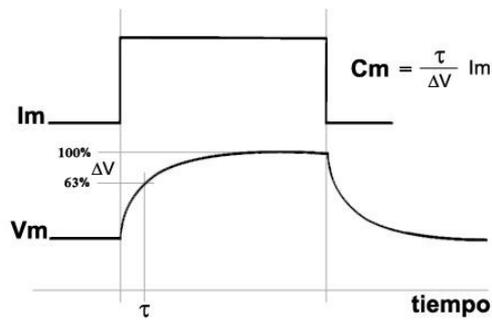


Figura 5. Esquema del comportamiento del potencial de membrana frente a un pulso fijo de corriente. Observar el tiempo necesario para alcanzar el 100% del potencial de membrana, tiempo necesario para la carga del condensador.

Para conocer la capacitancia de la membrana necesitamos realizar un pulso de corriente de intensidad conocida y durante el proceso de carga del capacitor conocer la constante de tiempo de 63% para el voltaje (tau). Aplicando la ley de Ohm para obtener la resistencia, y sabiendo que

$$R_m = C_m \tau$$

es posible deducir claramente la capacitancia de la membrana. [1]

5. Patch Clamp

Desde la introducción de la técnica de patch clamp en 1976 por Neher y Sakmann, dicha técnica pasó a ser llamada muy frecuentemente “el voltage clamp de un sector de la membrana”. Neher y Sakmann aplicaron esta técnica para registrar por primera vez una corriente de un ión en pico amperes a través de un canal celular dispuesto en una membrana. De todas las variantes, nos enfatizaremos en un tipo específico de patch clamp, el CAP (Cell Attached Patch). [12]

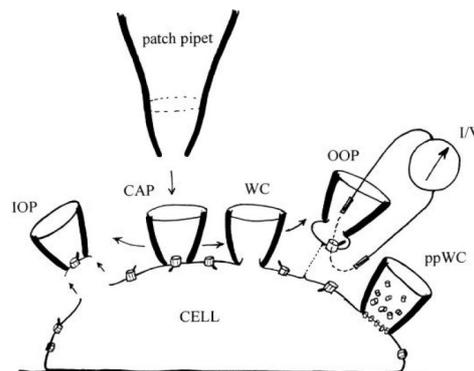


Figura 6. Diferentes posibilidades de colocar la micropipeta contra la membrana celular. El amplificador de medida del patch clamp y los electrodos se encuentra uno dentro de la pipeta y otro electrodo esta en la solución o baño. Pueden medir corriente o voltaje a través de la membrana.

CAP (Cell Attached Patch): Unión a la membrana con giga-sealing (giga ohm).

IOP (Inside Out Patch): CAP que fue arrancado de la membrana.

WC (Whole cell): Ruptura del CAP.

OOP (Outside Out Patch): Vesícula retirada de la célula como un WC.

ppWC (Permeabilized Patch Whole Cell): Pipeta con moléculas formadoras de poros.

5.1 Cell Attached Patch (CAP)

Permite la medida directa de la actividad individual de los canales de membrana. Una micropipeta sella el sector de la membrana generando una resistencia mayor de $10\text{ G}\Omega$ y registra la corriente que fluye a través de la membrana en la punta de la pipeta. Es de gran importancia un buen selle de la micropipeta con la membrana celular, y esto se consigue generando cierta succión de la membrana con una micropipeta especialmente pulida al calor.

Si la resistencia del sellado es infinita, no debe de discurrir corriente a través de ella permitiendo fidelidad de resultados. Necesariamente la óptica a utilizar debe magnificar por encima de los 300 o 400 aumentos y debe de estar equipada por algún tipo de potenciador de contraste (Nomarski o Hoffman). [5]

El micromaipulador debe permitir movimientos finos y suaves de dos micras por segundo al menos.

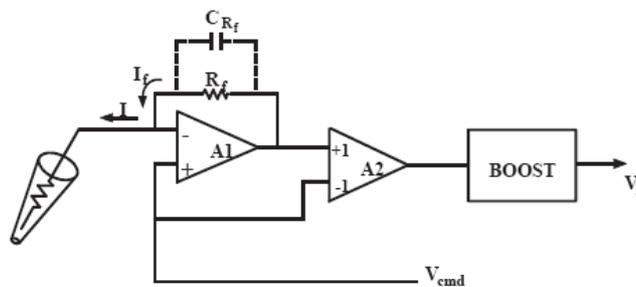


Figura 7. Circuito de Patch Clamp.

Notar la resistencia generada en la micropipeta. El “boost” aumenta la ganancia de alta frecuencia para compensar el ancho de banda pequeño del resistor.

El concepto básico detrás del diseño del patch clamp es sencillo (Fig. 7). Se fabrica un sensible convertor de corriente a voltaje usando un resistor de megaohm (R_f) y un amplificador operacional (A1). [5]

La pipeta se conecta al negativo y el comando de voltaje es conectado al positivo. En el momento en que el amplificador operacional tiene una gran ganancia, es forzado a seguir al potencial del input positivo. [5]

Toda la corriente que fluye por la micropipeta también fluye por R_f . Esta corriente es proporcional voltaje a través de R_f el cual es medido en el output del amplificador diferencial (A2). El amplificador operacional A1 esta configurado como un convertor corriente-voltaje. [8]

El amplificador diferencial resta el pulso de voltaje (V_{cmd}) del output de A1 para generar un voltaje que es proporcional al voltaje a través de R_f y que potencia la corriente I_f . El circuito boost aumenta la ganancia de alta frecuencia para compensar el bajo ancho de banda del resistor. [5]

En un principio, el patch clamp es equivalente a un voltage clamp convencional de dos electrodos, en donde el output del circuito esta conectado nuevamente al input de la pipeta.

Inclusive en la práctica se comporta mejor. El sistema de patch clamp es más simple ya que toda la ganancia esta en una sola etapa de un amplificador operacional. El capacitor (CRf) garantiza la estabilidad. [5]

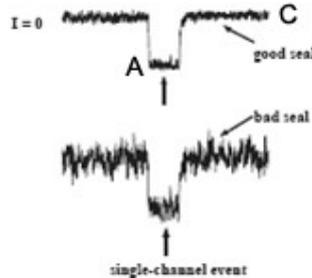


Figura 8. Registro de un canal por Patch Clamp.
Notar el pasaje del estado cerrado (C) al abierto (A).

Una de las tantas opciones que nos permite el patch clamp es registrar el momento en el que un canal esta abierto o cerrado, así como la presencia de ruido debido a un sellado malo. [12] Esto puede ser registrado de forma espontánea (sin ningún estímulo del investigador) o de manera provocada, en la que el experimentador puede variar el potencial de membrana u otras variables.

Conclusiones

Basados en conocimiento bioquímico y fisiológico, y con la ayuda de un sencillo modelo matemático derivado de los circuitos eléctricos, surge el denominado circuito equivalente. Este modelo permite comprender las propiedades funcionales más importantes de la neurona y consigue evaluar a la célula nerviosa desde varios puntos de vista. Es posible medir la respuesta de la célula frente a estímulos eléctricos que nosotros le realizamos como simplemente medir su estado bioeléctrico basal. Esto le ha permitido a la ciencia avanzar en la comprensión de su funcionamiento influyendo directamente en la práctica médica.

Agradecimientos

Prof. Gustavo Brum

Prof. Agdo. Franco Simini

Referencias

1. Eric R. Kandel, J. Schwartz and T. Jessell. Principios de Neurociencia Cuarta edición.
2. Goldman D.E. Potential , impedance and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 27, 37-60, 1943
3. Canales Iónicos. Publicado en www.fisionet.org en octubre de 2006
4. Ingeniería Biomédica perspectivas desde el Uruguay. Compilado de Franco Simini 2006
5. http://www.axon.com/manuals/Axon_Guide.pdf. Leído el 10-6-09

6. <http://academicearth.org/courses/introduction-to-biomedical-engineering>. Leído el 20-6-09
7. James V. Halliwell, Tim D. Plant, Jon Robbins and Nick B. Standen. Voltage clamp techniques. *J.Physiol* 228: 37-77, 1992.
8. David Ogden and Peter Stanfield. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording.
9. Ypey and DeFelice. The patch-clamp technique: a theoretical and practical
10. Introduction using simple electrical equivalent circuits. *BTOL-Channels* 1999
11. Prof. Dr. Erwin Neher. Pharmacology of synaptic transmission: An electrophysiologist's view. Discurso Leído en la sesión del día 30 de abril de 2009 para su Toma de Posesión como Académico de Honor.
12. Areles Molleman. Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology. Copyright 2003 John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 0-471-48685-X
13. Horowitz, P., Hill, W. The Art of Electronics. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 198