

# PSICOLOGÍA FISIOLÓGICA

## TEMA 2.

## MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS DE INVESTIGACIÓN

*Cari Blanco Rodríguez*

**Caso:** Julio 1982. Consulta de Neurología. Llegan jóvenes (de 20 a 30 años) con síntomas de parálisis, habla inteligible, salivación constante, ojos siempre abiertos, mirada fija... en los casos más graves. En común, todos eran consumidores de una droga nueva, un opiode sintético relacionado con la petidina (Demerol). Esta droga estaba contaminada con un producto químico que daña las neuronas dopaminérgicas y provoca los síntomas neurológicos. Al ser éstos parecidos a los del Parkinson, se trató a los pacientes con l-dopa (levodopa), y éstos mejoraron; pero la mejoría fue temporal (el fármaco dejó de ser eficaz)

El trasplante de neuronas fetales, método neuroquirúrgico experimental para tratar el Parkinson, ha resultado hasta cierto punto prometedor. Los síntomas de esta enfermedad o a los efectos tóxicos del MPTP, se deben a la falta de dopamina en el núcleo caudado y en el putamen. No se puede inducir el desarrollo de nuevas neuronas dopaminérgicas en el encéfalo, pero si injertar neuronas secretoras de dopamina en dicha zona; si sobreviven y secretan dopamina, tal vez remitan los síntomas. Las neuronas implantadas deben estar indemnes, ser resistentes y no desencadenar reacción inmunitaria; siendo lo más razonable obtenerlas de fetos humanos abortados (o en un futuro de cultivos de hemocitoblastos -células madre- estimulados para convertirse en neuronas secretoras de dopamina).

Uno de los afectados se sometió a este trasplante. Antes de la intervención se le inyectó l-dopa radioactiva (precursora de dopamina). Posteriormente, con un equipo de TEP se obtuvieron datos de los positrones que emitía, en formas de partículas radioactivas.

Semanas más tarde, con un instrumento estereotáxico se le inyectaron al paciente neuronas dopaminérgicas extraídas de la sustancia negra de varios fetos abortados, en el núcleo caudado y el putamen. La operación fue un éxito, el paciente recuperó gran parte del control motor. Un año más tarde se le volvió a inyectar l-dopa radioactiva y comprobaron que las células habían sobrevivido y estaban segregando dopamina.

Lamentablemente, los efectos terapéuticos del trasplante suelen ser temporales, y con el tiempo, es frecuente que existan graves efectos colaterales.

El estudio de la Fisiología de la Conducta implica muchas disciplinas (Fisiología, Neuroanatomía, Bioquímica, Psicología, Endocrinología e Histología). Llevar a cabo un proyecto de investigación en Neurociencia comportamental requiere dominar muchas técnicas experimentales. Los investigadores disponen de una enorme y sorprendente variedad de métodos de investigación; de los que vamos a ver los más utilizados e importantes.

### 1. ABLACIÓN EXPERIMENTAL

**Ablación experimental:** Extirpación o destrucción de una parte del encéfalo de un animal de laboratorio. Se supone que las funciones que ya no pueden realizarse son las que dicha región controlaba previamente.

En la mayoría de los casos esta técnica no implica extraer el tejido cerebral; se destruye y se deja en su sitio.

La ablación experimental es el más antiguo de los métodos utilizados en Neurociencia y se utiliza frecuentemente en nuestros días.

## • EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS COMPORTAMENTALES DEL DAÑO CEREBRAL

**Estudio de lesión:** Experimento en el que se daña una parte del encéfalo y después se observa la conducta del animal. Sinónimo de ablación experimental. Se fundamenta en que la función de un área cerebral puede deducirse basándose en las conductas que el animal no puede realizar tras de destruir dicha área. El objetivo es saber cuales son las funciones que cumplen las diferentes regiones cerebrales, y luego entender como se combinan estas funciones para dar lugar a determinadas conductas.

La distinción entre función cerebral y conducta es importante. Los circuitos que hay en el encéfalo realizan funciones, no conductas. Ninguna región cerebral o circuito neural es el único responsable de una conducta: cada región desempeña una o más funciones, que contribuye a la ejecución de la conducta (ej, el acto de leer implica funciones que requieren controlar los movimientos oculares, enfocar la lente, comprender el significado de las palabras...)

La tarea del investigador es comprender cuales son las funciones que se necesitan para llevar a cabo una conducta específica, y determinar cuales son los circuitos de neuronas cerebrales responsables de cada una de esas funciones

La interpretación de los datos de los estudios de lesión es complicada debido a que todas las regiones del cerebro están conectadas entre sí. (ej, sabemos que la lesión de una estructura "X" altera una determinada conducta; no podemos concluir forzosamente que los circuitos neuronales localizados en dicha estructura cumplen una función esencial en esa conducta, ya que puede darse el caso que la función que nos interesa la realicen circuitos neurales que se localizan en otra parte del encéfalo y que la lesión de la estructura "X" tan solo interfiera en el normal funcionamiento de los circuitos neurales de la estructura "Y").

## • REALIZACIÓN DE LESIONES CEREBRALES

Destruir una parte del encéfalo situada justo debajo del cráneo es fácil: se anestesia al animal, incisión en el cuero cabelludo, se extrae una parte del cráneo y se corta la duramadre, dejando al descubierto la corteza. Luego, se puede utilizar un dispositivo de succión para aspirar el tejido cerebral, y para extirparlo se sitúa una pipeta de vidrio sobre la superficie del encéfalo y se succiona el tejido con una bomba de vacío unida a la pipeta.

Quando queremos destruir zonas más profundas (lesiones cerebrales de regiones subcorticales), por lo general se hace pasar una corriente eléctrica a través de un electrodo de acero inoxidable que, salvo en la punta, está cubierto por un barniz aislante eléctrico. Se guía el electrodo siguiendo un método estereotáxico de modo que su extremo llegue al lugar adecuado. Luego se recurre a un instrumento para producir la lesión que produce una corriente de **radiofrecuencias** (RF) -corriente alterna de frecuencia muy elevada-. Al pasarla corriente a través del tejido cerebral, produce una alta temperatura que destruye las células cercanas a la punta del electrodo, incluyendo los somas neurales y los axones de las neuronas que atraviesan la región.

Un método más selectivo de lesión es inyectar a través de una cánula un aminoácido (Aa) excitador como el ácido clínico (estimula los receptores glutamatérgicos) que destruye las neuronas estimulándolas hasta destruirlas. A este tipo de lesiones se les llama excitotóxicas.

**Lesión excitotóxica:** Lesión cerebral producida por la lesión en el cerebro de un aminoácido excitador. **El Aa destruye los somas celulares vecinos, pero no los alrededores.** Esta selectividad permite determinar si los efectos comportamentales de la destrucción se deben a la muerte de las neuronas que allí se localizan o a la lesión de los axones que pasan cerca.

Existen métodos más específicos para marcar y lesionar neuronas. Biólogos moleculares han ideado procedimientos para incorporar **sustancias químicas tóxicas a los anticuerpos** (Ac), los cuales al unirse a determinadas proteínas que se encuentran solo en ciertos tipos de neuronas del cerebro, hacen que las sustancias químicas tóxicas destruyan las células a las que están unidas las proteínas.

En lesiones subcorticales mediante corriente de RF a través de un electrodo o por infusión de una sustancia química con una cánula, siempre se causan daños adicionales en el encéfalo. Por ello no debemos limitarnos a comparar la conducta de los animales lesionados con la de animales de referencia sanos. La causa de alguna de las alteraciones comportamentales puede ser por un daño fortuito de una región cerebral situada por encima de la lesión. Para evitar esta situación se produce una lesión falsa, en la que a los animales de referencia se les hace el mismo proceso quirúrgico que al animal de estudio excepto activar el dispositivo de lesión e iniciar la infusión. Si la conducta de los animales con lesión cerebral es diferente a la de los animales de referencia con lesión falsa, se concluye que las lesiones son la causa de las alteraciones comportamentales (la lesión falsa tiene la misma finalidad que un tratamiento placebo en estudios farmacológicos).

**Lesión falsa:** Procedimiento placebo que reproduce todas las etapas para producir una lesión cerebral, excepto la que en realidad la provoca.

La mayoría de las veces se producen lesiones permanentes, pero a veces resulta provechoso impedir temporalmente la actividad de una determinada región del encéfalo. Para ello, lo más sencillo es inyectar un anestésico local o un fármaco llamado **muscimol** en el lugar adecuado del encéfalo. El anestésico bloquea los potenciales de acción en los axones que entran o salen de esa región y es eficaz para producir una lesión temporal (lesión reversible). El muscimol, que estimula los receptores GABA (principal neurotransmisor inhibitor en el encéfalo), inactiva una región del encéfalo al inhibir las neuronas allí localizadas.

## • **CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA**

**Cirugía estereotáxica:** cirugía cerebral que utiliza instrumental estereotáxico para situar un electrodo o cánula en una posición específica del encéfalo. Stereotaxis significa "disposición sólida" y se refiere a la capacidad de localizar objetos en el espacio. El aparato estereotáxico consta de un soporte que inmoviliza la cabeza del animal y un brazo que desplaza el electrodo o cánula en los tres ejes espaciales a lo largo de distancias cuantificables.

Para ello es necesario conocer el atlas estereotáxico. No existen dos encéfalos iguales en una misma especie pero existen semejanzas para predecir la localización de una estructura cerebral concreta respecto a las características externas de la cabeza.

El cráneo se compone de huesos que crecen juntos y forman suturas (puntos de unión). En los recién nacidos hay un punto blando donde se unen las suturas sagital y coronal, llamado fontanela. Cuando esta abertura se cierra, la unión se denomina bregma.

**Bregma:** unión de las suturas sagital y coronal del cráneo. Se suele utilizar como punto de referencia en cirugía estereotáxica.

**Atlas estereotáxico:** Recopilación de esquemas de secciones del encéfalo de un determinado animal, con medidas que proporcionan coordenadas para la cirugía estereotáxica. Incluye fotografías o esquemas que corresponden a secciones frontales, tomadas a diferentes distancias rostrales y caudales a bregma.

Cada página del atlas estereotáxico está identificada conforme a la distancia de la sección anterior o posterior respecto al bregma, y la cuadrícula de cada página indica las coordenadas de las estructuras cerebrales en el plano ventral a la parte superior del cráneo y lateral a la línea media...

Localizando una estructura neural (que no se puede ver en el animal de experimentación) en una de las páginas del atlas estereotáxico, se puede determinar su localización respecto al bregma (que sí se puede ver). Hay que tener en cuenta que debido a la edad, y variaciones en la cepa de los animales, la localización que proporcionan los atlas es solo aproximada, por lo que siempre hay que probar con una nueva serie de coordenadas, seccionar y teñir el encéfalo, comprobar la localización exacta de la lesión, corregir los valores y volver a intentarlo.

## Instrumento estereotáxico

**Dispositivo que permite a un cirujano situar un electrodo o una cánula en una parte concreta del encéfalo.**

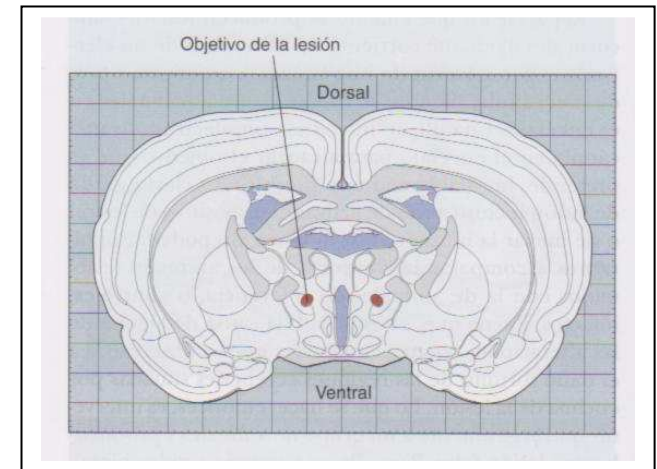
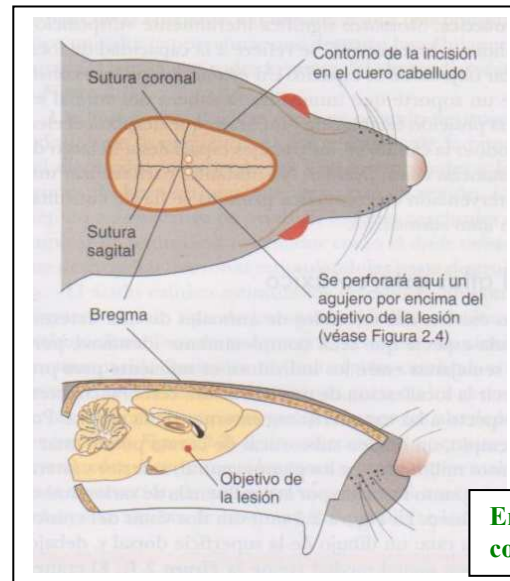
Funciona siguiendo unos principios sencillos. Incluye un soporte para la cabeza que mantiene el cráneo del animal en la ubicación adecuada, un soporte para el electrodo y un mecanismo de graduación por el que se mueve este último soporte en distancias ponderadas a lo largo de los tres ejes espaciales: anterior-posterior, dorsal-ventral y lateral-medial.

Se utilizan diferentes tipos de soportes de cabeza según la especie.

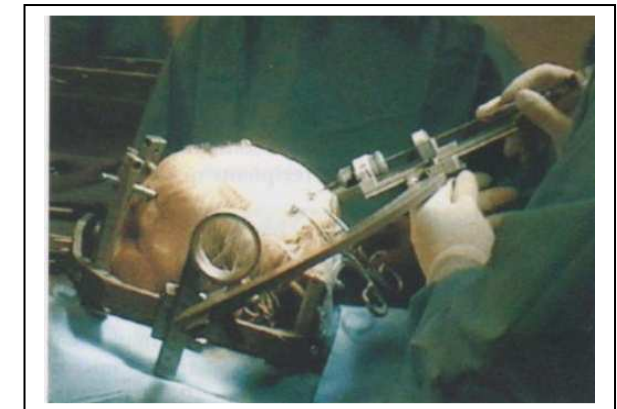
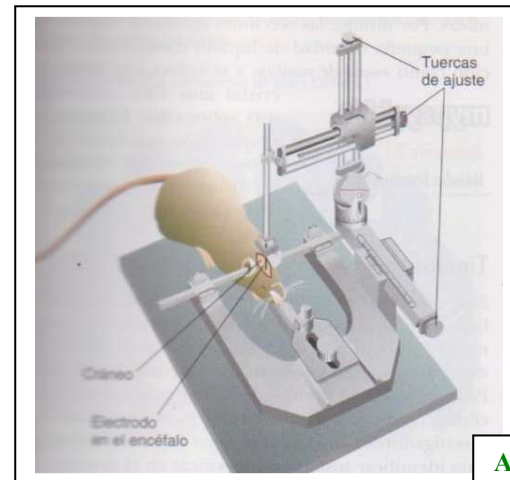
Una vez obtenido las coordenadas estereotáxicas a partir de un atlas estereotáxico, se anestesia al animal, se le coloca el instrumento y se hace una incisión en el cuero cabelludo. Se localiza el bregma, se marcan los números apropiados en el aparato de estereotaxia, se taladra el cráneo y se introduce el dispositivo en el encéfalo hasta las coordenadas correctas.

Esta cirugía no solo tiene un fin lesivo. Los electrodos en el encéfalo pueden destruir o estimular neuronas; además se pueden inyectar fármacos que estimulen neuronas o bloqueen receptores específicos. También se pueden implantar cánulas o electrodos permanentes.

Los neurocirujanos, en ocasiones efectúan lesiones subcorticales -por ejemplo, para reducir los síntomas del Parkinson-. Para ello se valen de múltiples puntos de referencia y verifican la localización del electrodo (u otro dispositivo) insertado en el encéfalo mediante RM o registrando las actividades de las neuronas en esta región antes de producir la lesión cerebral.



**Encéfalo y cráneo de una ratona, así como su atlas estereotáxico, con el objetivo de la lesión señalado.**



**Aparato y cirugía estereotáxica en una ratona y un humano.**

## • MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Después de la lesión cerebral y posterior observación de la conducta, hay que seccionar y teñir el tejido cerebral para localizar el lugar de la lesión con el microscopio. A menudo, las lesiones cerebrales yerran su objetivo, por lo que hay que verificar la localización exacta del daño cerebral después de examinar el comportamiento del animal. Para ello es necesario mediante métodos histológicos, seccionar, teñir y examinar el encéfalo

### Fijación y obtención de cortes histológicos

Para estudiar el tejido como era en el momento de la muerte del organismo, se han de destruir las enzimas autolíticas, o de lo contrario éstas convertirán al tejido en una masa deformable. Para evitar la descomposición del tejido por la acción de las bacterias o mohos. Por ello se sumerge el tejido neural en un **fijador**. El más utilizado es el **formol** (solución acuosa del gas formaldehído), que detiene la autólisis, endurece el tejido y elimina los microorganismos que pudieran destruirlo. Antes de fijar el encéfalo, se suele **perfundir** (se extrae la sangre y se sustituye por otro líquido, tal como una solución salina o un fijador); al no contener sangre el encéfalo del animal, se obtienen mejores resultados histológicos.

El animal cuyo encéfalo va a ser estudiado se sacrifica humanitariamente mediante una sobredosis de anestésico general.

Una vez fijado, se secciona con un **micrótopo** en delgadas láminas y se tiñen diversas estructuras celulares para examinar su estructura. Las secciones (cortes de tejido cerebral) que se preparan para estudiarlas al microscopio óptico suelen tener un espesor de 10 a 80  $\mu\text{m}$ , y para el microscopio electrónico menos de 1  $\mu\text{m}$ .

Un micrótopo consta de tres partes (cuchilla, plataforma para el tejido y mecanismo para que avance la cuchilla). La plataforma suele incluir un accesorio que congela el encéfalo, dándole dureza para poder cortarlo mejor. Una vez cortadas, las secciones se montan sobre un portaobjetos de vidrio, el cual se sumerge en diversas soluciones químicas para su tinción. Por último, las secciones teñidas se cubren con una pequeña cantidad de líquido transparente (medio de montaje) y se le coloca una lámina de cristal (cubreobjetos) sobre ellas. El medio de preparación mantiene fijo el cubreobjetos.

### Tinción

Al microscopio una sección cerebral sin teñir muestra los contornos de algunas masas celulares grandes y los fascículos de fibras más destacados, pero no los detalles más finos. Por ello, la neuroanatomía microscópica requiere tinciones histológicas específicas. Para verificar una lesión cerebral se utiliza una de las más simples: la tinción de los somas celulares.

Franz **Nissl** (neurólogo alemán), a finales del siglo pasado descubrió el azul de metileno, con el que se podía teñir los somas celulares del tejido cerebral.

El material que capta el tinte (**sustancia de Nissl**) está formado por ARN; ADN y proteínas asociadas localizadas en el núcleo y dispersas en forma de gránulos, por el citoplasma. Además del **azul de metileno**, existen más tintes con el mismo propósito, el más utilizado es el **violeta de cresilo**.

*\* Los tintes no se desarrollaron con fines histológicos, en principio se fabricaron para teñir telas.*

El descubrimiento de las tinciones de somas celulares hizo posible identificar masas nucleares en el encéfalo. La tinción no tiñe selectivamente los somas celulares neuronales: todas las células, ya sean neuronas o neuroglia, se tiñen por igual. El investigador debe determinar cual es cual, en función de su tamaño, forma y localización. Los fascículos de fibra tienen un aspecto más claro porque no absorben el tinte.

## Microscopía electrónica

El **microscopio óptico** tiene escasa capacidad de resolución espacial para apreciar pequeños detalles, ya que, debido a la propia naturaleza de la luz, una magnificación o aumento mayor de aproximadamente 1.500 no añade ningún detalle.

Para estructuras anatómicas pequeñas como las vesículas sinápticas y detalles de orgánulos celulares se necesita un **microscopio electrónico de transmisión**. **Hace pasar un haz de electrones enfocado de un lado a otro de una lámina fina del tejido a examinar** y el haz de electrones proyecta una imagen del tejido en una pantalla fluorescente, que puede fotografiarse o escanearse mediante un ordenador. Las microfotografías electrónicas aportan información sobre detalles estructurales del orden de unas pocas decenas de nanómetros.

Un **microscopio electrónico de barrido** proporciona **menos amplificación** que el electrónico de transmisión estándar, el cual transmite el haz de electrones a través del tejido. En cambio, **muestra los objetos en tres dimensiones**. Para ello, el microscopio **explora el tejido mediante un haz de electrones que se desplaza**, un detector recibe la información del haz y un ordenador produce una imagen tridimensional muy detallada.

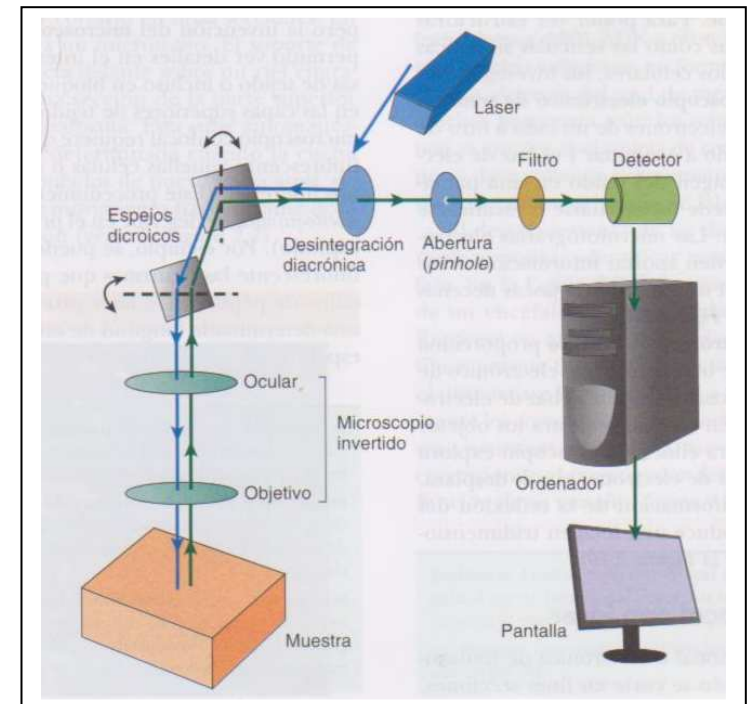
## Microscopio confocal con láser

La microscopía convencional o electrónica de transmisión requiere que el tejido se corte en finas secciones.

**El microscopio confocal con láser aporta imágenes de "láminas" de alta resolución de diversas profundidades de una sección gruesa de tejido que contiene moléculas fluorescentes, mediante la exploración del tejido con la luz de un rayo láser.**

Este microscopio permitió ver detalles en el interior de secciones gruesas de tejido o incluso en bloques de tejido en cultivo o en las capas superiores de **tejido** de un cerebro **vivo**. Este microscopio requiere que se tiñan con un tinte fluorescente las células o partes de ellas que nos interesen. Este procedimiento se denomina inmunocitoquímica.

Ejemplo, marcamos con un tinte fluorescente las neuronas que producen un tipo específico de péptido. Un láser produce un rayo de luz con una determinada longitud de onda que se refleja en un espejo dicroico (transmite la luz de ciertas longitudes de onda y refleja las de otra). Las lentes del microscopio enfocan la luz láser en una determinada profundidad en el tejido. Esta luz desencadena la fluorescencia en el tejido, que atraviesa las lentes y se transmite a través del espejo dicroico a una abertura (pinhole). Esta abertura bloquea la luz extraña causada por la dispersión dentro del tejido, y la luz que atraviesa la abertura se mide mediante un detector. Dos espejos móviles hacen que la luz láser explore el tejido, proporcionando a un ordenador la información para crear una imagen de una sección de tejido localizada a una profundidad determinada dentro de la muestra. Si se realizan múltiples exploraciones mientras se mueve la localización de la abertura, se puede obtener un cúmulo de imágenes de secciones a través del tejido (puede ser tejido vivo).



## • MARCADO DE CONEXIONES NEURALES

Experimento: Nos interesa saber cuales son los mecanismos neurales que controlan la conducta reproductora, y estudiar la fisiología de la conducta sexual de ratas hembra. A partir de una buena documentación, se le practica la cirugía estereotáxica a dos grupos de ratas hembra. Al grupo experimental se le lesiona el núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM), y a las del grupo de referencia se le practica una lesión falsa. Tras la recuperación, se les empareja con los machos. Las ratas del grupo de referencia responden positivamente al cortejo; las hembras con lesión en el HVM rechazan la copulación. Mediante técnicas histológicas se confirma que el HVM de los animales de experimentación estaba destruido. Los resultados de este experimento indican que las neuronas del HVM parecen intervenir en las funciones requeridas para la conducta de cópula de las hembras (estas lesiones no afectan a la conducta de apareamiento de los machos).

Se pueden estudiar también el sistema de estructuras cerebrales que participan en la conducta de apareamiento de las hembras. El HVM no opera solo, recibe aferencias de ciertas estructuras y envía eferencias a otras. La cópula requiere integrar percepciones visuales, táctiles y olfativas, además de organizar los movimientos en respuesta a los de la pareja. Se necesita que todo el sistema sea activado por las neuronas sexuales. Nos preguntamos entonces cual es la función aquí del HVM. Para dar una respuesta hay que conocer más acerca de las conexiones del HVM con el resto del encéfalo (qué estructuras envían su axones al HVM y a que estructuras las envía éste); así se podrá investigar la función de estas estructuras y el carácter de sus interacciones.

Para investigar las conexiones del HVM no podemos utilizar métodos histológicos que tiñen todas las neuronas. Para ello se han desarrollado métodos de gran precisión que resaltan neuronas específicas.

### Marcado de axones eferentes

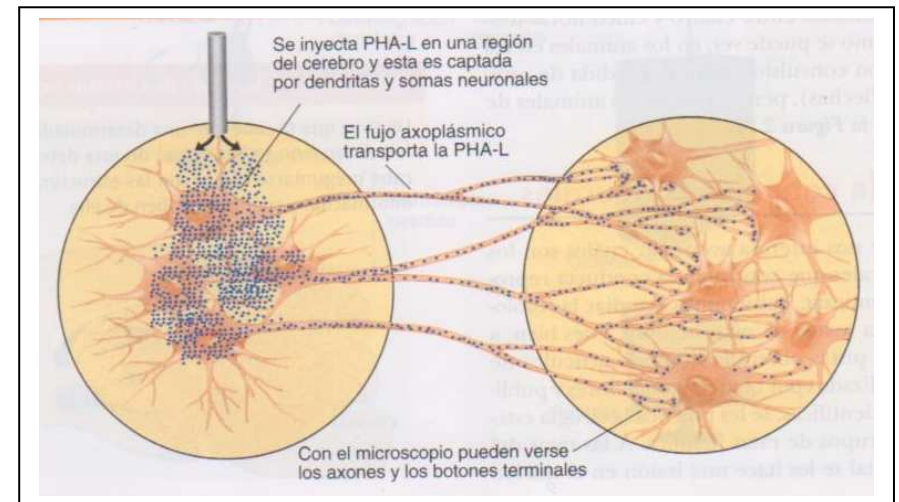
Para que el HVM afecte a la conducta, las neuronas de este núcleo tienen que enviar axones a zonas del encéfalo en las que haya neuronas que medien los movimientos musculares. Probablemente la vía no sea directa y las neuronas del HVM afecten a neuronas localizadas en otras estructuras, las cuales a su vez influyen en las de otras estructuras, hasta que las neuronas motoras sean estimuladas. Nuestro objetivo es marcar los axones eferentes de dicha estructura.

Método de marcado anterógrado: (hacia delante) **Método histológico que marca los axones y botones terminales de neuronas cuyos somas celulares se encuentran en una determinada región.** Es decir, emplea sustancias que son captadas por las dendritas o los somas celulares y las transportan a lo largo del axón hasta los botones terminales.

Existen diferentes métodos para marcar las vías que siguen los axones eferentes.

Ej, para descubrir el destino de axones eferentes localizados dentro del HVM, podemos inyectar una minúscula cantidad de PHA-L dentro del núcleo.

**PHA-L: Proteína que se encuentra en las judías, utilizada como marcador anterógrado.** La absorben las dendritas y la transportan atravesando el soma hasta el axón, por donde viajan mediante transporte axoplásmico rápido hasta los botones terminales. En pocos días, las células están repletas de moléculas de PHA-L en su totalidad: dendritas, soma, axón y todas sus ramificaciones y los botones terminales.



Luego se sacrifica al animal, se secciona el encéfalo y se acoplan las secciones sobre el portaobjetos. Para poder ver las moléculas de PHA-L al microscopio, se aplica un método inmunocitoquímico especial.

**Método inmunocitoquímico:** Método histológico que utiliza anticuerpos (AC) radioactivos o AC ligados a una molécula teñida para indicar la existencia de determinadas proteínas de péptidos.

Los métodos inmunocitoquímicos sacan provecho de las reacciones inmunitarias. El sistema inmunitario produce Ac en respuesta a los antígenos (Ag). Los Ag son proteínas (o péptidos), como las que se encuentran en la superficie de las bacterias o virus. Los Ac (también son proteínas) son producidos por los leucocitos para destruir microorganismos invasores, o bien se sitúan sobre su superficie y, al igual que los receptores de los neurotransmisores se localizan sobre la membrana de las neuronas. Cuando los Ag presentes en la superficie del microorganismo invasor entran en contacto con los Ac que los reconocen, estos desencadenan el ataque de los leucocitos sobre el invasor.

Biólogos moleculares han puesto a punto métodos de producción de Ac para cualquier péptido o proteína. Las moléculas de los Ac están unidas a distintos tipos de moléculas de colorantes, algunos de los cuales reaccionan con otras sustancias y tiñen el tejido de color marrón, mientras que otros son fluorescentes. Para determinar en que parte del encéfalo se localiza el péptido o la proteína (el Ag), se sumergen secciones frescas de tejido cerebral en una solución que contiene las moléculas de Ac/colorante, y los Ac se unen a su Ag. Al microscopio (bajo una luz de una determinada longitud de onda, en el caso de tintes fluorescentes) se pueden ver las partes del encéfalo (incluso neuronas individuales) que contienen el Ag.

Si seguimos con la función del estudio de la función del HVM en la conducta sexual de las hembras, tendremos que averiguar cuales son las estructuras que reciben información de las neuronas del HVM, entre ellas la sustancia gris periacueductal (SGPA), y ver que sucede cuando se lesiona cada una de ellas. El daño de alguna de ellas igual también altera la conducta sexual de las ratas. Se inyecta PHA-L en dichas estructuras y se observa hacia donde se dirigen sus axones. Finalmente se descubrirá la vía principal que va desde el HVM hasta las neuronas motoras cuya actividad es necesaria para copular.

## **Marcado de axones aferentes**

Debemos también saber que ocurre con los circuitos que se encuentran "antes" del HVM. ¿Interviene de algún modo el HVM en el análisis de la información sensorial (visión, olor o contacto con el macho)? O tal vez los efectos activadores de las hormonas sexuales de la hembra sobre su conducta actúan a través del HVM, o de neuronas cuyos axones establecen sinapsis allí. Para averiguar cuales son las regiones del encéfalo que forman parte de los componentes de la "corriente superior" de los circuitos neurales se debe determinar cuales son las aferencias que recibe el HVM -sus conexiones aferentes-.

**Método de marcado retrógrado:** (hacia atrás) Método histológico que marca los somas celulares a los que pertenecen los botones terminales de los axones que establecen sinapsis con las células de una determinada región. Es decir, emplean sustancias que son captadas por los botones terminales y transportadas de vuelta a lo largo de los axones hacia los somas celulares. El método es similar al anterior.

Inyectamos en el HVM una pequeña cantidad de **oro fluorado** (tinción que sirve como marcador retrógrado. Lo absorben los botones terminales y lo transportan de forma axoplasmica retrógrada de vuelta al soma celular). Días después se sacrifica al animal, se secciona su encéfalo y mediante una luz con una adecuada longitud de onda (las moléculas de oro fluorado emiten fluorescencia) se examina. Así se descubre que la amígdala medial es una de las regiones que aportan aferencias al HVM.



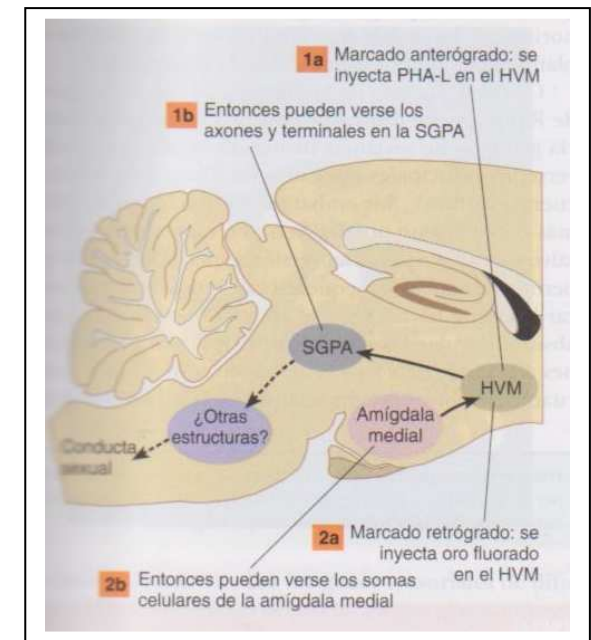
Los métodos anterógrado y retrógrado descritos identifican un solo eslabón de una cadena de neuronas (neuronas cuyos axones entran o salen de una región cerebral determinada), mientras que los **métodos de marcado transneuronal identifican las cadenas de neuronas que establecen conexiones sinápticas** (una serie de dos, tres o más neuronas que forman conexiones sinápticas en serie una con otra).

El **método de marcado transneuronal retrógrado** más eficaz emplea un **virus de la pseudorrabia** (forma debilitada del virus del herpes del cerdo) (originalmente se concibió como vacuna) **utilizado para el marcado transneuronal retrógrado. Marca una serie de neuronas que están interconectadas mediante sinapsis**.

Para el **marcado transneuronal anterógrado**, se utiliza una variedad del **virus del herpes simple**, que se inyecta directamente en una región cerebral, es captado por las neuronas del lugar y las infecta. Luego se extiende a través de las neuronas infectadas, y finalmente es liberado, contagiando la infección a las neuronas con las que establece conexiones sinápticas.

Cuanto más espera el investigador tras inyectar el virus, mayor es la cantidad de neuronas que llegan a infectarse. Después de sacrificar al animal y seccionado su encéfalo, se aplican métodos inmunocitoquímicos para localizar una proteína producida por el virus.

La combinación de estos métodos permiten descubrir circuitos de neuronas interrelacionadas, contribuyendo a obtener un "diagrama de cableado neural" del encéfalo. Junto con otros métodos de investigación se puede tratar de descubrir las funciones de cada uno de los componentes de dicho circuito.



**Resultado de los métodos de marcado. Representación de una de las aferencias al HVM y una de sus eferencias, puestas de manifiesto por los métodos de marcado anterógrado y retrógrado.**

## • ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DEL CEREBRO HUMANO IN VIVO

Investigar las funciones del encéfalo en los animales nos lleva a sacar conclusiones sobre la evolución de varios sistemas neurales. Nuestro interés se centra en las funciones del encéfalo humano, pero es evidente que no se le puede pedir a un paciente que se someta a cirugía para investigarlo.

A veces, las enfermedades o accidentes dañan el encéfalo. Si se sabe donde se ha producido la lesión, se puede estudiar la conducta de esas personas e intentar hacer inferencias respecto a las lesiones producidas intencionalmente en animales. El problema es saber dónde se localiza la lesión.

Antiguamente se estudiaba la conducta tras una lesión cerebral sin saber exactamente su localización (salvo con una autopsia posterior). Esto hizo que el estudio de los efectos comportamentales del daño en regiones específicas del encéfalo humano progresara lentamente.

Los avances en las técnicas de rayos X y la tecnología con ordenadores, nos lleva a concebir métodos para estudiar la anatomía del cerebro in vivo.

**Tomografía Axial Computerizada (TAC):** Fue el primer método que se ideó con dicho fin. Es una técnica que se sirve de un ordenador para analizar los datos obtenidos mediante una exploración por rayos X y proporciona una imagen bidimensional de una "sección" del cuerpo.

Para la exploración TAC, se coloca la cabeza del paciente en un amplio cilindro de forma ovalada, que contiene un aparato de rayos X. Enfrente del paciente (al otro lado de la cabeza) hay un detector de rayos X. El haz de rayos pasa a través de la cabeza y el detector mide la cantidad de radioactividad que se transmite. Este haz explora la cabeza desde todos los ángulos y un ordenador convierte los valores en imágenes del cráneo y su contenido.

**Resonancia Magnética (RM):** Técnica con la que se pueden obtener imágenes precisas del interior del cuerpo. Implica la interacción entre ondas de radio y un intenso campo magnético.

Se parece al TAC pero no utiliza rayos X. En lugar de ello, hace pasar un campo magnético intenso a través de la cabeza del paciente. Cuando se coloca e cuerpo de un sujeto en un intenso campo magnético, los núcleos de algunos átomos de moléculas del organismo rotan siguiendo una determinada alineación. Si entonces se hace pasar una onda de radiofrecuencia a través del cuerpo, dichos núcleos emiten ondas de radio. Las diferentes moléculas emiten energía a diferentes frecuencias, de modo que el equipo de RM se ajusta para detectar la radiación procedente de los átomos de hidrógeno. Ya que la concentración de estos átomos en los distintos tejidos es diferente, el equipo puede utilizar la información para elaborar imágenes de secciones del encéfalo. A diferencia del TAC cuyas imágenes se limitan a un plano horizontal, las de RM pueden obtenerse también en un plano sagital o uno frontal. En la RM se puede distinguir entre las regiones de sustancia gris y blanca, de modo que pueden verse los principales fascículos de fibras (tales como el cuerpo calloso). Pero los fascículos de fibras más pequeños no pueden verse, salvo con una versión especial de la RM (que incluso puede marcar haces de fibras).

OBJETIVO DEL MÉTODO	MÉTODO	OBSERVACIONES
Destruir o inactivar regiones cerebrales específicas	Lesión por radiofrecuencia	Destruye todo el tejido cerebral próximo a la punta del electrodo
	Lesión excitotóxica; utiliza aminoácidos excitadores como el ácido caínico	Destruye solo los somas celulares próximos al extremo de la cánula; no afecta a los axones que atraviesan la región
	Lesión con 6-HD	Destruye las neuronas catecolaminérgicas próximas al extremo de la cánula
	Infusión de un anestésico local; criodo	Inactiva temporalmente regiones cerebrales específicas; el animal puede servir como su propio control
Situar electrodos o cánulas en una región específica dentro del cerebro	Cirugía estereotáxica	Consultar un atlas estereotáxico para determinar las coordenadas
Encontrar la sede de la lesión	Perfusión, fijación, sección del cerebro y tinción de las secciones	
Identificar los axones eferentes de una región determinada y los botones terminales de dichos axones	Método de marcado anterógrado, como el de PHA-L	
Identificar la localización de neuronas cuyos axones terminan en una región determinada	Método de marcado retrógrado, como el oro fluorado	
Identificar series de neuronas que están conectadas mediante sinapsis	Método de marcado transneuronal; utiliza el virus de la seudorrabia (para el marcado retrógrado) o el virus del herpes simple (para el marcado anterógrado)	
Identificar la localización de la lesión en el cerebro humano <i>in vivo</i>	Tomografía axial computarizada (TAC)	Muestra «láminas» del cerebro; utiliza rayos X
	Resonancia magnética	Muestra «láminas» del cerebro; imagen más detallada que la de TAC; utiliza un campo magnético y ondas de radio
Identificar la localización de haces de fibras en el cerebro humano <i>in vivo</i>	Imágenes tensoriales de difusión (ITD)	Muestra haces de axones mielínicos; se basa en la RM
Revelar detalles de las células en finas secciones de tejido	Microscopia confocal con láser	Puede utilizarse para ver «láminas» de tejido en el cerebro <i>in vivo</i> ; requiere que existan moléculas fluorescentes en el tejido

Por encima del cero absoluto, todas las moléculas se mueven en direcciones aleatorias debido a la agitación térmica (a mayor  $T^{\circ}$ , mayor movimiento aleatorio). **Imágenes Tensoriales de Difusión (ITD):** Método de neuroimagen que emplea una RM modificada para poner de manifiesto haces de axones mielínicos en el cerebro humano in vivo. Estas imágenes se benefician del hecho de que el movimiento de las moléculas de agua en los fascículos de sustancia blanca no es aleatorio sino que tiende a realizarse en una dirección paralela a la de los axones que constituyen dichos fascículos. La RM utiliza la información relativa al movimiento de las moléculas de agua para determinar la localización y orientación de los fascículos de axones de la sustancia blanca.

## 2. REGISTRO Y ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEURAL

También se puede estudiar el encéfalo mediante el registro o estimulación de la actividad de regiones específicas. Las funciones cerebrales implican la actividad de circuitos neuronales, así pues, las diferentes percepciones y respuestas comportamentales implican diferentes pautas de actividad cerebral. Se han elaborado métodos para registrar estas pautas o para producirlas de forma artificial.

### • REGISTRO DE LA ACTIVIDAD NEURAL

Los axones producen potenciales de acción y los botones terminales provocan potenciales postsinápticos en la membrana de las células con las que establecen sinapsis. Estos fenómenos eléctricos pueden registrarse y los cambios en la actividad eléctrica de una región concreta se pueden utilizar para determinar si dicha región participa en el control de dichas conductas. Por ejemplo, se pueden hacer registros durante la presentación de un estímulo, toma de decisiones o ejecución de una actividad motora.

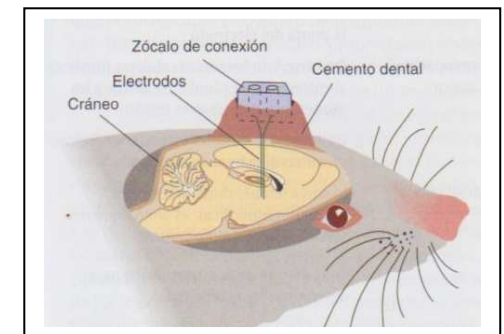
Los registros pueden realizarse **crónicamente** (durante un largo tiempo después que se haya recuperado el animal de la intervención) o **de forma aguda** (durante un corto periodo en el que el animal sigue anestesiado). Estos últimos, al realizarse bajo anestesia suelen limitarse al estudio de vías sensoriales, y rara vez se acompañan de observaciones comportamentales (son limitadas bajo anestesia).

### Registro con microelectrodos

Los agentes químicos que afectan a las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas también afectan al sueño REM. Si nos planteamos si la actividad de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas varía durante las diferentes fases del sueño, registraríamos con **microelectrodos** (electrodo muy fino utilizado generalmente para registrar la actividad de neuronas individuales) la actividad de dichas neuronas. Por lo general, esta técnica se denomina **registro de neuronas individuales o de unidades** (registro de la actividad eléctrica de una sola neurona o unidad).

Como se quiere registrar la actividad de neuronas individuales en un largo período de tiempo en animales no anestesiados, se elegirán electrodos que duren más. Para ello, se puede conseguir un juego de cables muy finos, unidos en un manajo, que están eléctricamente aislados (solo las puntas están sin recubrir).

Los electrodos se implantan en el encéfalo de los animales mediante cirugía estereotáxica, luego se conectan a unos zócalos de conexión eléctrica en miniatura y estos se fijan al cráneo del animal con una pasta (cemento dental). Cuando el animal se recupera de la cirugía, ya se le puede conectar al sistema de registro. Estos animales se comportan con normalidad si prestar atención a los zócalos de conexión eléctrica que tienen en la cabeza.



A veces se fijan dispositivos complejos al cráneo del animal cuando se implantan microelectrodos. Estos incluyen mecanismos de tornillos que permiten desplazar el electrodo (o su conjunto) al interior del encéfalo, de forma que pueda registrar diferentes partes de este mientras realiza las observaciones. Las señales eléctricas que detectan los electrodos son débiles y tienen que amplificarse. Los amplificadores permiten que estas señales puedan verse en un osciloscopio y almacenarse en la memoria de un ordenador.

Lo que se hace es registrar la actividad de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas durante diferentes fases del sueño, y con ello se aprecia que la frecuencia de descarga de estas neuronas decae casi hasta cero durante el sueño REM; lo que nos sugiere que tales neuronas tienen un efecto inhibitorio sobre dicho tipo de sueño. Es decir, el sueño REM no puede ocurrir hasta que esas neuronas dejan de descargar.

## Registro con macroelectrodos

Los macroelectrodos (de mayor tamaño que el microelectrodo) **los utilizamos cuando queremos registrar la actividad de una región global** (gran cantidad de neuronas) **del encéfalo. No detectan la actividad de neuronas individuales. Los registros obtenidos representan los potenciales postsinápticos de incluso millones de células del área donde se sitúa el electrodo.**

Los electrodos pueden consistir en alambres no afilados insertados en el encéfalo, tornillos fijados en el cráneo o incluso discos de metal pegados con una pasta especial que conduce la electricidad en el cuero cabelludo de humanos. Los registros, particularmente los tomados del cuero cabelludo, representan la actividad de muchas neuronas, cuyas señales eléctricas atraviesan las meninges, el cráneo y el cuero cabelludo antes de alcanzar los electrodos.

A veces, los neurocirujanos implantan macroelectrodos directamente en el interior del encéfalo humano para detectar el origen de una actividad eléctrica anómala que origina frecuentes convulsiones. Una vez detectada la fuente, se abre el cráneo y se extrae el foco de las convulsiones (en la mayoría de los casos tejido cicatrizal producido por un daño cerebral ocurrido años antes). Habitualmente la actividad eléctrica del encéfalo se registra mediante electrodos pegados al cuero cabelludo y se muestra en un polígrafo.

Los **polígrafos** contienen un mecanismo que hace avanzar una tira de papel sobre la que escriben una serie de plumillas. Éstas son básicamente manecillas de grandes voltímetros que se mueven arriba o abajo en respuesta a la señal eléctrica que les envían los amplificadores biológicos.

**Caso:** Una señora sufrió un ataque cardíaco como consecuencia de una arteriosclerosis (endurecimiento de las arterias); un trombo fue lo que provocó el ataque. Pasado un tiempo tuvo varios ataques isquémicos transitorios con síntomas neurológicos (entumecimiento del brazo derecho y dificultades para hablar). Mediante un angiograma, se apreció que su arteria carótida izquierda estaba casi obstruida, con lo cual debía someterse a intervención quirúrgica (endoarteriectomía carótida) para eliminar la placa obstructiva y restablecer el aporte sanguíneo. En la intervención se le colocaron electrodos en el cuero cabelludo para ser controlada mediante EEG. Se le practicó una incisión en el cuello dejando al descubierto su carótida interna, en el punto donde la carótida común se divide en interna y externa. Se colocó una cinta de plástico alrededor de la carótida común, y se pinzó para detener el flujo de sangre, pero había cierta lentitud en las ondas del EEG. Así que se optó por utilizar una sonda de derivación (mediante una incisión por encima y debajo de la obstrucción) para poder trabajar en la arteria lesionada sin para el flujo sanguíneo. A continuación se extirpó la masa amarillenta causante del problema, se cerró la incisión y se extrajo la sonda.

La mayoría de cirujanos prefieren pinzar la arteria ocluida mientras trabajan (el trabajo es más rápido y las complicaciones menos probables). Dado que hay conexión del aporte sanguíneo a cada uno de los hemisferios (mediante arterias comunicantes especiales), se suele poder sellar una de las carótidas durante algunos minutos sin causar daño. Pero a veces el flujo de un lado no es suficiente para abastecer al otro; el único modo de saberlo es mediante el EEG, ya que si el cerebro no está recibiendo el aporte sanguíneo suficiente, en el EEG se ven las características "ondas lentas". Fue lo que sucedió en este caso y debido a ello se optó por hacer una derivación. Sin ello, la intervención podría haber causado una apoplejía en lugar de prevenirla. La paciente se recuperó bien de la intervención.

Los electroencefalogramas (EEG) o "escritos de la electricidad de la cabeza" son los registros del potencial eléctrico cerebral obtenido mediante electrodos situados sobre el cuero cabelludo. Se pueden utilizar para el diagnóstico de la epilepsia o para estudiar las fases del sueño y vigilia, las cuales se asocian con patrones de actividad eléctrica característicos. Otra aplicación del EEG es supervisar el estado del encéfalo durante intervenciones que, en principio, pueden dañarlo.

## Magnetoencefalografía

Procedimiento que detecta grupo de neuronas activadas sincrónicamente gracias al campo magnético inducido por su actividad eléctrica. Utiliza un conjunto de elementos superconductores de interferencia cuántica o SQUID.

Cuando una corriente eléctrica fluye a través de un conductor, induce un campo magnético. Es decir, cuando los potenciales de acción se transmiten a lo largo de los axones o los potenciales postsinápticos se transmiten por las dendritas o se propagan de un lado a otro de la membrana somática de la neurona, también se producen campos magnéticos. Estos campos son muy pequeños, pero se han elaborado detectores superconductores (SQUID) capaces de detectar campos magnéticos de aproximadamente una milmillonésima parte del tamaño del campo magnético de la tierra.

La magnetoencefalografía se realiza mediante neuromagnetómetros (instrumentos que contienen varios SQUID dispuestos de manera que un ordenador pueda examinar su emisión y calcular el origen de señales determinadas en el encéfalo. Estos equipos pueden utilizarse en la práctica clínica, por ejemplo, para localizar el foco de crisis epilépticas y poder extirparlas quirúrgicamente; o bien en experimentos para cuantificar la actividad cerebral regional asociada a la percepción de diversos estímulos o a la ejecución de varias conductas o tareas cognitivas.

### • REGISTRO DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA Y SINÁPTICA DEL CEREBRO

Si la actividad neural de una región concreta del cerebro aumenta, el índice metabólico también lo hace, en gran medida como consecuencia del mayor funcionamiento de las bombas iónicas de la membrana de las células. Para estimar el aumento del índice metabólico se inyecta 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva (azúcar que penetra en las células junto con la glucosa pero que no se metaboliza) en el torrente circulatorio del animal. Dado que esta sustancia es similar a la glucosa (principal fuente de energía del encéfalo) es transportada al interior de las células. Las células más activas (consumen más glucosa) alcanzan la mayor concentración de 2-DG radioactiva. Como la 2-DG no puede ser metabolizada (la glucosa normal si) queda dentro de la célula. Luego se sacrifica al animal, se extrae su encéfalo, se secciona y se prepara para la autorradiografía.

Autorradiografía: procedimiento que localiza sustancias radioactivas en una sección de tejido. La radiación pone de manifiesto una emulsión fotográfica o un fragmento de película que recubre el tejido. Podría decirse que es como "escribir con la propia radiación".

Sobre un portaobjetos se monta una sección del encéfalo y se lleva a una habitación oscura, donde se cubre con una emulsión fotográfica. Semanas después, se revela la sección igual que una película fotográfica. Las moléculas de 2-DG radioactiva se ponen de manifiesto como puntos de gránulos plateados, ya que la radioactividad revela la emulsión, tal como lo harían los rayos X o la luz.

Las zonas más activas del encéfalo contienen el mayor grado de radioactividad, y esta se manifiesta en la emulsión revelada como puntos oscuros.

Otro método para identificar las regiones activas del encéfalo se beneficia del hecho de que cuando las neuronas son estimuladas (por ejemplo, por los botones terminales que establecen sinapsis con ellas) determinados genes del núcleo, a los que se les llama genes de expresión temprana, son activados y se producen proteínas específicas. Estas proteínas se unen a los cromosomas del núcleo y la presencia de estas proteínas nucleares indican que las neuronas acaban de ser activadas.

Una de estas proteínas nucleares producida durante la activación neural recibe el nombre de **Fos** (proteína que se produce en el núcleo de una neurona en respuesta a la estimulación sináptica).

Supongamos que queremos utilizar el método Fos para ver que neuronas se activan durante la actividad sexual de una rata hembra. Para ello, se instalan ratas hembras con machos y se les permite aparearse; luego se extrae el encéfalo de las ratas, se secciona y se sigue un procedimiento para teñir la proteína Fos. En la amígdala medial de una rata hembra que acaba de aparearse pueden observarse puntos oscuros, lo que indica la presencia de proteína Fos. Parece ser que estas neuronas se han activado debido a la cópula - quizá por la estimulación física de los genitales que han tenido las ratas- (si hacemos memoria, cuando se inyectó un marcado retrógrado -oro fluorado- en el HVM, se encontró que esta región recibe aferencias de la amígdala medial).

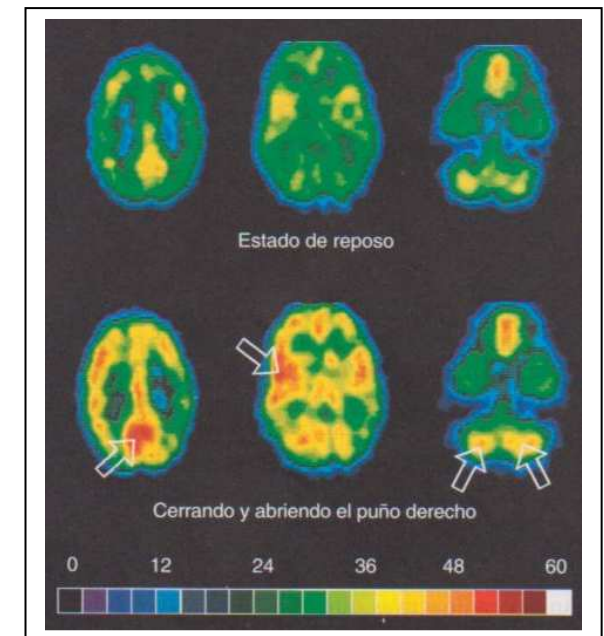
La actividad metabólica de regiones cerebrales específicas también puede estimarse en el cerebro humano utilizando **neuroimagen funcional** (método computarizado para detectar cambios químicos o metabólicos en regiones concretas del cerebro).

**Tomografía por emisión de positrones (TEP):** Método de neuroimagen funcional que revela la localización de un marcador radioactivo en un encéfalo vivo. Fue el primer método de neuroimagen inventado.

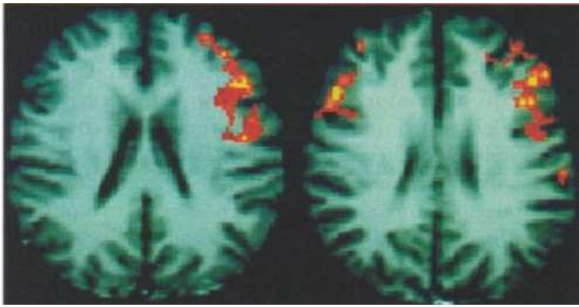
Primero se le inyecta al paciente 2-DG radioactiva (con el tiempo la sustancia se degrada y sale de las células. La dosis administrada a los humanos es inocua). Se coloca la cabeza en un aparato similar al TAC, y al descomponerse las moléculas radioactivas de 2-DG, emiten partículas subatómicas (positrones), que son detectadas por el equipo de TEP. El ordenador determina cuales son las regiones del encéfalo que han absorbido la sustancia radioactiva y crea una imagen de una sección del encéfalo, mostrando el nivel de actividad de diversas regiones de dicha sección.

Un inconveniente es su coste de funcionamiento. Por seguridad, las sustancias radioactivas utilizadas tienen una vida media muy corta -se descomponen y pierden su radioactividad rápidamente-. (la vida media de la 2-DG es de 110 minutos y la del agua radioactiva (también utilizada para obtener imágenes TEP) es de solo 2 minutos). Teniendo en cuenta su rápida descomposición, tienen que producirse en el lugar donde se van a utilizar, mediante un **acelerador de partículas** denominado **ciclotrón**. Por lo que al coste de la TEP hay que añadirle el del ciclotrón y los salarios del personal que se encarga de él.

Otro inconveniente es la relativamente baja resolución espacial de las imágenes (la imagen es borrosa). La resolución temporal también es baja porque han de obtenerse muestras de los positrones que va emitiendo el cerebro durante bastante tiempo, lo que implica que probablemente pasen desapercibidos acontecimientos rápidos, efímeros, que suceden en el cerebro.



En la fila superior de estas imágenes de TEP, sección horizontal, de encéfalos humanos pueden verse tras imágenes de una persona en reposo. En la fila inferior, las mismas personas mientras abrían y cerraban el puño derecho. Se observa una elevada absorción de 2-DG radioactiva en las regiones del cerebro encargadas de control del movimiento, lo que indica un alto grado de actividad metabólica en dichas áreas. Los colores indican diferentes índices de absorción.



En esta RMf del encéfalo humano se muestra un aumento localizado del promedio de la actividad de la actividad neural en varones (izquierda) y mujeres (derecha) mientras discernían si un par de palabras escritas rimaba.

Estas desventajas no se dan en la resonancia magnética funcional (RMf): Método de neuroimagen funcional. Es una modificación del procedimiento de RM que permite calcular el metabolismo regional en el encéfalo, por lo general detectando cambios en el nivel de oxígeno en sangre.

Es el método con mejor resolución temporal y espacial. La actividad cerebral se evalúa indirectamente al detectar los niveles de oxígeno en los vasos sanguíneos del encéfalo. El aumento de actividad de una región del encéfalo estimula el aporte sanguíneo a dicha región, lo que eleva el nivel de oxígeno en sangre local. El término técnico para referirse a este tipo de exploración es **BOLD** (*señal dependiente del nivel de oxígeno en sangre*).

La RMf tiene una resolución mayor que la TEP y la exploración se puede realizar mucho más rápida, por ello proporciona una información más acerca de la actividad en una región determinada del cerebro.

Pero la exploración con TEP ofrece algo que la RMf no puede: estima la concentración de determinadas sustancias químicas en diversas partes del encéfalo.

## • ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEURAL

A veces lo que queremos es cambiar artificialmente la actividad de ciertas regiones para observar qué efectos tienen esos cambios en la conducta del animal. Ejemplo, las ratas hembra copularán con ratas macho solo si ciertas hormonas sexuales femeninas están presentes, pero si se extirpan los ovarios de la rata, la pérdida de esas hormonas suprimirá su conducta sexual. Hemos visto que la lesión del HVM altera esa conducta. Tal vez si se activa el HVM se compensa la falta de hormonas sexuales femeninas y la rata vuelve a copular.

## Estimulación eléctrica y química

Las neuronas se pueden activar mediante estimulación eléctrica y química.

La estimulación eléctrica implica solamente pasar una corriente eléctrica a través de un cable insertado en el encéfalo.

La estimulación química se efectúa por lo general inyectando en el encéfalo una pequeña cantidad de un aminoácido (Aa) excitador como el ácido caínico o el ácido glutámico (glutamato). Este último es el principal neurotransmisor excitador que se encuentra en el encéfalo. Ambas sustancias estimulan los receptores glutamatergicos, activando así las neuronas en las que se localizan estos receptores.

Mediante un dispositivo permanente en el cráneo (cánula guía de metal en el encéfalo, sujeta al cráneo con cemento), se pueden inyectar sustancias en el encéfalo cuando queramos y así poder observar la conducta del animal (con libertad de movimientos) en repetidas ocasiones.

Inconveniente: Más compleja (se requieren cánulas, bombas, soluciones esterilizadas de Aa excitadores...) que la eléctrica.

Ventaja: Activa los somas celulares pero no los axones. Como solo los somas celulares (y sus dendritas) contienen receptores glutamatergicos, se puede estar seguro de que la inyección de un determinado Aa excitador en una determinada región del cerebro excita las células allí localizadas, pero no los axones que casualmente pasan por esa región. Es decir, los efectos de la estimulación química son más circunscritos que la eléctrica.

El ac. Clínico, que hemos visto antes como una neurotoxina, también puede utilizarse para estimular las neuronas (produce lesiones excitotóxicas al estimular las neuronas hasta destruirlas. Dosis altas de una solución concentrada destruyen las neuronas; dosis bajas de una solución diluida solo las estimula).

En el experimento que comentábamos, la estimulación del HVM sustituye la acción de las hormonas sexuales femeninas. Es decir, quizá las hormonas sexuales femeninas ejerzan sus efectos en dicho núcleo.

La estimulación de una región específica del cerebro con electricidad o sustancias químicas excitadoras afecta a muchos tipos diferentes de neuronas, y no es probable que el resultado sea similar a la actividad cerebral normal, que implica la activación y la inhibición coordinada de muchas neuronas diferentes. Lo ideal sería estimular o inhibir los grupos neuronales que nos interesan en una región dada del cerebro.

## Fotoestimulación

Los últimos avances están proporcionando los medios para estimular o inhibir tipos específicos de neuronas en regiones específicas del encéfalo. En muchos organismos (incluso unicelulares) han evolucionado **proteínas fotosensibles**. Una de ellas, la **rodopsina-canal-2 (ChR2)**, que se encuentra en las algas verdes, controla un canal iónico que, cuando se abre, permite el flujo a través de ella de iones de sodio, potasio y calcio.

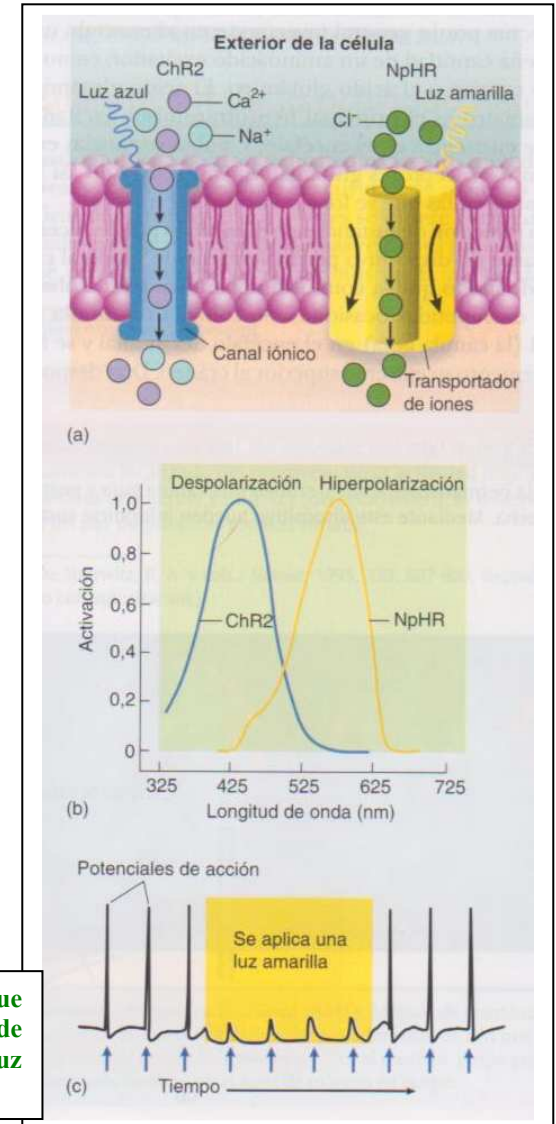
Cuando una luz azul incide en el canal iónico de ChR2 se abre, y la corriente de iones Na y Ca cargados positivamente despolariza la membrana. Otra proteína fotosensible, **Natronomonas pharaonis halorhodopsin (NpHR)**, se encuentra en una bacteria y controla un transportador que ingresa cloruro dentro de la célula cuando es activada por una luz amarilla. Esta entrada de iones cargados negativamente hiperpolariza la membrana. La acción de ambas proteínas fotosensibles comienza y termina muy rápidamente cuando se enciende y apaga una luz de longitud de onda apropiada.

**Se puede introducir ChRH2 y NpHR en neuronas incorporando los genes que las codifican al genoma de virus inocuos.** Luego se inyectan los virus en el cerebro, infectan a las neuronas y comienzan a expresarse las proteínas, que están insertadas en la membrana de la célula. Los genes se pueden modificar de manera que las proteínas se expresen solo en tipos específicos de neuronas. Así, se puede observar los efectos de activar o desactivar tipos específicos de neuronas en una región concreta del encéfalo.

Como ChR2 y la NpHR son activadas por la luz, es necesario que la luz penetre en el cerebro.

Si las neuronas que expresan estas proteínas fotosensibles se localizan en la corteza cerebral, se puede taladrar un pequeño orificio en el cráneo y adherir sobre él diodos emisores de luz (DEL). Para activar las proteínas fotosensibles en las membranas de neuronas situadas profundamente en el encéfalo, se pueden implantar fibras ópticas mediante cirugía estereotáxica, como si fueran electrodos o cánulas, y la luz se transmite mediante dichas fibras.

**Pueden insertarse proteínas fotosensibles en membranas neurales mediante virus con modificación genética. (a) la luz azul hace que los canales iónicos ChR2 despolaricen la membrana y la luz amarilla que los transportadores NpHR la hiperpolaricen. (b) efectos de diferentes longitudes de onda de luz sobre el potencial de membrana al actuar sobre las proteínas ChR2 o NpHR. (c) Los pulsos de luz azul (flechas azules) produjeron potenciales de acción; los de luz amarilla, los efectos inhibitorios de la hiperpolarización.**





Actualmente se estudia el posible uso clínico de las proteínas fotosensibles. **Bi** y su equipo utilizaron un virus para insertar genes de ChR2 en las células ganglionares de la retina de una cepa de ratones ciegos cuya retina carecía de fotorreceptores. Las células ganglionares de la retina son neuronas que reciben información de los fotorreceptores y transmiten esta información por el nervio óptico a los circuitos cerebrales implicados en la visión. Bi encontró que las células ganglionares se hacían sensibles a la luz: al estimular la retina con un destello de luz azul se registraban potenciales eléctricos en la corteza visual; la retina contiene muchos circuitos neurales que analizan la información procedente de los fotorreceptores antes de que ésta se envíe a través del nervio óptico a otras partes del cerebro, de modo que el simple hecho de hacer sensibles a la luz a las células ganglionares no garantiza que la ceguera causada por la falta de fotorreceptores restaure el diseño de la visión. Sin embargo, administrar selectivamente ChR2 y NpHR a tipos específicos de neuronas de la retina puede llevar finalmente al desarrollo de medios para tratar algunos tipos de ceguera. Otros posibles usos clínicos de las proteínas fotosensibles están relacionados con el tratamiento de enfermedades neurológicas como el Parkinson.

## Estimulación magnética transcranial

La actividad neural induce campos magnéticos que pueden detectarse mediante magnetoencefalografía. De modo parecido, pueden emplearse campos magnéticos para estimular neuronas induciendo corrientes eléctricas en el tejido cerebral.

**La estimulación magnética transcranial (EMT): estimulación de la corteza cerebral mediante campos magnéticos, que se producen aplicando pulsos eléctricos mediante una bobina electromagnética (generalmente en forma de ocho) situada cerca del cráneo (en la parte superior, de modo que el punto de cruce del ocho se localice justo encima de la región que se quiere estimular). Interfiere en la función de la región cerebral que se estimula. Es decir, induce actividad eléctrica en la corteza cerebral humana, que altera temporalmente el funcionamiento de los circuitos neurales que se localizan allí.**

Los efectos de la EMT son muy parecidos a los de la estimulación directa del encéfalo al descubierto. Ej, la estimulación de una región específica de la corteza visual de asociación altera la capacidad para detectar el movimiento de los estímulos visuales). La EMT, se ha utilizado para tratar síntomas de trastornos mentales como la depresión.

OBJETIVO DEL MÉTODO	MÉTODO	OBSERVACIONES
Registrar la actividad eléctrica de neuronas individuales	Microelectrodos de vidrio o de metal	Puede hacerse una implantación crónica de microelectrodos de metal para registrar la actividad neural del animal cuando se mueve
Registrar la actividad eléctrica de regiones del cerebro	Macroelectrodos de metal	En seres humanos, por lo general se adhieren al cuero cabelludo con una pasta especial
Registrar los campos magnéticos inducidos por la actividad neural	Magnetoencefalografía; utiliza un neuromagnetómetro que contiene una serie de SQUID	Puede determinar la localización de un grupo de neuronas que descargan sincronizadamente
Registrar la actividad metabólica de regiones del cerebro	Autorradiografía con 2-DG	Evalúa el consumo local de glucosa
	Medida de la proteína Fos	Identifica las neuronas que se han estimulado recientemente
	TEP con 2-DG	Evalúa la actividad metabólica regional del cerebro humano
Medir los neurotransmisores y neuromoduladores liberados por las neuronas	RM funcional	Evalúa la actividad metabólica regional del cerebro humano; mejor resolución espacial y temporal que la de TEP
	Microdiálisis	Puede analizarse una amplia variedad de sustancias
Determinar las sustancias neuroquímicas existentes en el cerebro humano <i>in vivo</i>	TEP	Puede localizar cualquier sustancia radioactiva en el cerebro humano
Estimular la actividad neural	Estimulación eléctrica	Estimula las neuronas cercanas a la punta del electrodo y los axones que atraviesan la región
	Estimulación química con un aminoácido excitador	Estimula solo las neuronas próximas a la punta de la cánula, no los axones que atraviesan la región
	Estimulación magnética transcranial	Estimula las neuronas de la corteza cerebral humana con una bobina electromagnética situada sobre la cabeza

### 3. MÉTODOS NEUROQUÍMICOS

A veces, en vez de la actividad metabólica de una región del encéfalo, nos interesa la localización de neuronas que tengan un tipo específico de receptores o que produzcan un tipo específico de neurotransmisores o neuromoduladores; o podríamos querer estimar la cantidad de sustancias químicas que segregan las neuronas de una región determinada del encéfalo en determinadas circunstancias.

Pues bien, **los métodos neuroquímicos pueden utilizarse para determinar la localización de una enorme variedad de sustancias químicas en el encéfalo. Con ellos se pueden identificar las neuronas que segregan un neurotransmisor o un neuromodulador determinado y aquellas que tienen receptores que responden a la presencia de estas sustancias.**

#### • DETECCIÓN DE NEURONAS QUE PRODUCEN SUSTANCIAS NEUROQUÍMICAS ESPACÍFICAS

Si sabemos que una sustancia química afecta a la conducta y queremos saber que circuitos neurales son los responsables de los efectos de la sustancia; lo vemos con un ejemplo: ciertos granjeros expuestos a determinados insecticidas (organofosfatos) tenían ensueños particularmente intensos y extraños, e incluso alucinaciones despiertos. Una posible explicación es que la sustancia estimula los circuitos neurales que controlan la fase REM del sueño (es donde ocurren principalmente los ensueños -que no son más que alucinaciones dormidos-). Los organofosfatos inhiben la acetilcolinesterasa (AChE). Las sustancias que inhiben la AChE son potentes agonistas colinérgicos. Al inhibir la AChE, frenan la rápida destrucción de ACh después de que haya sido liberada por los botones terminales, y así prolongan el tiempo durante el que se producen potenciales postsinápticos en la sinapsis colinérgicas.

Es decir, estas sustancias actúan a nivel de las sinapsis colinérgicas.

Existen tres métodos neuroquímicos que podemos utilizar para descubrir el lugar de acción de estas sustancias en el encéfalo:

Podemos buscar neuronas que contienen acetilcolina, buscar la enzima acetilcolinesterasa (presente en las membranas postsinápticas de las células que reciben aferencias sinápticas de las neuronas colinérgicas) o bien, buscar receptores de acetilcolina.

**Métodos** mediante los que localizamos sustancias neuroquímicas específicas, como los neurotransmisores y los neuromoduladores (ej, la acetilcolina).

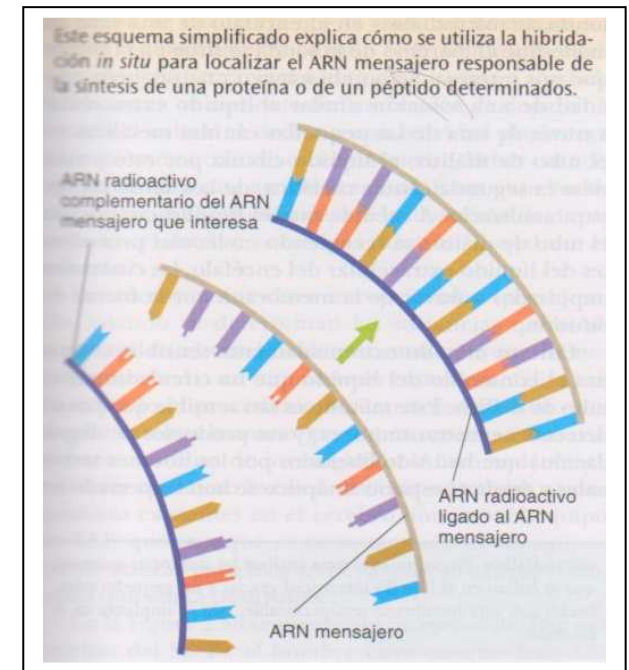
**Existen tres formas:** Localizar las sustancias mismas, localizar las enzimas que las sintetizan o localizar el ARN mensajero involucrado en su síntesis.

- Los péptidos (o las proteínas) pueden localizarse directamente por métodos inmunocitoquímicos (se exponen secciones de tejido cerebral a un Ac para el péptido, asociado a un tinte, y después se examina al microscopio las secciones utilizando una luz de una determinada longitud de onda). Esto podríamos hacerlo con la vasopresina (neurotransmisor peptídico). Pero la acetilcolina no es un péptido, así que no podemos utilizar métodos inmunocitoquímicos para localizar este neurotransmisor, pero sí para localizar la enzima que lo sintetiza.
- La síntesis de acetilcolina se logra gracias a la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Casi con toda seguridad, las neuronas que contienen esta enzima segregan ACh.
- Otra técnica indirecta de localizar una sustancia es la hibridación in situ: **producción de ARN complementario de un ARNm determinado con el fin de detectar el ARNm**. Todos los péptidos y proteínas (incluidas todas las enzimas) se sintetizan conforme a la información contenida en los cromosomas. Cuando se sintetiza una proteína concreta, se copia la información necesaria de un cromosoma en un segmento de ARNm, el cual sale del núcleo y se desplaza hasta los ribosomas, donde tiene lugar la síntesis de proteínas.

La fórmula (estructura química) de la proteína está codificada en términos de una secuencia específica de bases de nucleótidos que componen el ARN mensajero. En la mayoría de los casos se conoce este código, así que se puede sintetizar un segmento de ARN radioactivo que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia del ARNm. Las secciones de tejido cerebral se exponen al ARN radioactivo, que se adhiere a las moléculas del ARNm apropiado. Después se utiliza la autorradiografía para poder ver donde se localiza el ARNm y, por deducción, la de las células que producen la proteína cuya síntesis inicia el ARN.

Como hemos visto, los péptidos y las proteínas pueden localizarse directamente, mediante métodos inmunocitoquímicos: se expone un tejido a un Ac que está unido a una molécula que se hace fluorescente bajo una luz de una determinada longitud de onda. También puede detectarse otras sustancias mediante localización inmunocitoquímica de una enzima que se requiere para su síntesis.

Así mismo, los péptidos y las proteínas pueden localizarse por medio del método de hibridación *in situ*, el cual revela la presencia de ARN mensajero que dirige su síntesis.



## • LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES ESPECÍFICOS

Los neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas transfieren sus mensajes a las células sobre las que actúan uniéndose a receptores.

Procedimientos para localizar los receptores de sustancias neuroquímicas:

- 1) **Autorradiografía:** se exponen secciones de tejido cerebral a una solución que contiene un ligando radioactivo para un receptor específico. Después se enjuagan las secciones, quedando únicamente la radioactividad en las moléculas del ligando que se ha unido a sus receptores. Luego con métodos autorradiográficos se localiza el ligando radioactivo y, por lo tanto, los receptores (ej, se puede bañar una sección del encéfalo de una rata con una solución con morfina radioactiva, que se une a los receptores para los opiodes del encéfalo).
- 2) **Inmunocitoquímica:** los receptores son proteínas y, por lo tanto, se pueden producir Anticuerpos frente a ellos. Se exponen las secciones de tejido cerebral al Ac adecuado (marcado fluorescentemente) y se observan las secciones al microscopio con una luz de una determinada longitud de onda.

Es decir, mediante la autorradiografía se pone de manifiesto la distribución de un ligando radioactivo, al cual se ha expuesto el tejido; mediante la inmunocitoquímica se detecta la presencia de los receptores mismos, que son proteínas. Combinando métodos de tinción se pueden localizar neuronas que tienen un receptor determinado o un péptido determinado y que asimismo establecen conexiones con regiones determinadas del encéfalo.

Podemos aplicar el método de localización de receptores en el ejemplo que vimos antes: función del HVM en la conducta sexual de las ratas hembra. Las lesiones o extirpación del HVM abolen esta conducta; pero puede activarse estimulando el HVM eléctricamente o con Aa excitadores. Esto sugiere que las hormonas sexuales producidas por los ovarios actúan sobre las neuronas del HVM.

Podríamos hacer dos experimentos:

- Inyectar una pequeña cantidad de hormona sexual adecuada en el HVM de ratas hembra cuyos ovarios se han extirpado. Resultado: la hormona reactiva la conducta sexual del animal.
- Utilizar la autorradiografía para localizar los receptores de la hormona sexual. Para ello se expondrían secciones del encéfalo de la rata a la hormona radioactiva. Se enjuagarían y se efectuaría la autorradiografía. Resultado: encontraríamos radioactividad en el HVM. Si se comparan las secciones cerebrales de las ratas macho y hembra, se observa un mayor número de receptores hormonales en las hembras. También se podría recurrir a la inmunocitoquímica para localizar los receptores de las hormonas, obteniendo los mismos resultados.

## • ESTIMACIÓN DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS QUE SEGREGA EL ENCÉFALO

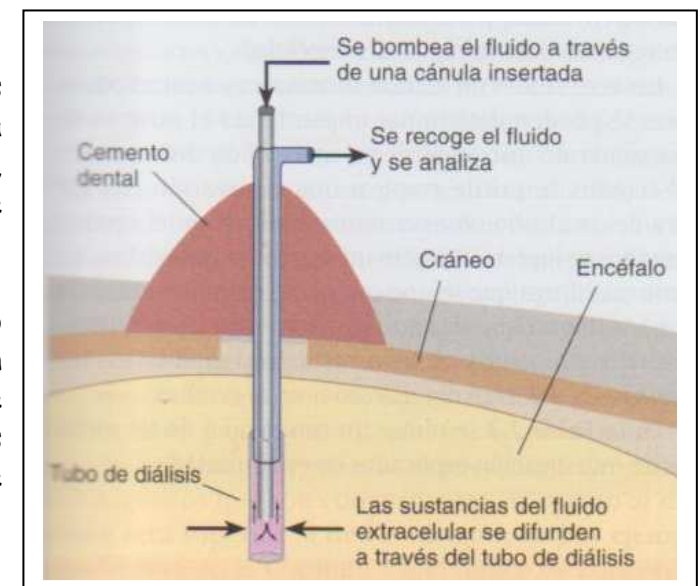
La cocaína, bloquea la reabsorción de la dopamina, lo que sugiere que la concentración extracelular de dopamina aumenta en ciertas regiones del encéfalo al consumirla. Para estimar la cantidad de dopamina en una región determinada del encéfalo, se utiliza la microdiálisis.

La estimación de las secreciones de neurotransmisores y neuromoduladores se puede realizar mediante la microdiálisis.

**Microdiálisis:** procedimiento para analizar las sustancias químicas que se hallan en el líquido intersticial gracias a un pequeño tubo hecho con una membrana semipermeable, que se implanta en el encéfalo.

Mediante la diálisis se separan sustancias con una membrana artificial que es permeable a unas moléculas y no a otras. Una sonda de microdiálisis consta de una pequeña cánula metálica con la que se introduce una solución en una sección del tubo de diálisis -fragmento de membrana artificial con forma de cilindro, sellada en su parte inferior-. Mediante una segunda cánula metálica se retira la solución después de que haya circulado a través de la bolsa.

Para colocar el extremo de la cánula en el lugar que nos interesa, se utiliza cirugía estereotáxica. Luego se bombea una solución similar al líquido extracelular a través de una de las pequeñas cánulas metálicas en el tubo de diálisis, el líquido circula por este y atraviesa la segunda cánula metálica, de la cual se recoge para analizarlo. A medida que el líquido circula por el tubo de diálisis va recogiendo moléculas procedentes del líquido extracelular del encéfalo, las cuales son impulsadas a través de la membrana por la fuerza de difusión. Luego se analiza el líquido que ha circulado por tubo de diálisis.



Es un método tan sensible que puede detectar neurotransmisores (y sus productos de degradación) que han sido liberados por los botones terminales y desde el espacio sináptico se han dispersado en el resto del líquido extracelular.

La cantidad de dopamina en el líquido extracelular del núcleo accumbens (en el prosencéfalo basal), aumenta al inyectar cocaína a la rata; y también cuando se inyecta cualquier droga adictiva, e incluso cuando el animal realiza una actividad placentera como comer, beber, tener relaciones sexuales. Todo esto indica que la liberación de dopamina en el núcleo accumbens juega un papel en el refuerzo.

En casos excepcionales (determinación de sustancias químicas en el cerebro de personas con una hemorragia cerebral o traumatismo craneoencefálico) se ha utilizado la microdiálisis en humanos, pero no con fines de investigación.

**Se puede emplear una exploración con TEP para llevar a cabo observaciones similares en el cerebro humano: se inyecta al sujeto un marcador radioactivo, tal como una droga que se une con un receptor determinado o una sustancia química que se incorpora a un neurotransmisor determinado, y posteriormente una exploración TEP revela la localización del marcador en el cerebro.**

El equipo de TEP, se utiliza para localizar cualquier sustancia radioactiva que emita positrones. Es caro, pero es un medio no lesivo de estudiar sustancias neuroquímicas en cerebros humanos (leer el caso del inicio del tema).

OBJETIVO DEL MÉTODO	MÉTODO	OBSERVACIONES
Estimar los neurotransmisores o neuromoduladores liberados por las neuronas	Microdiálisis	Puede analizarse una amplia serie de sustancias
Identificar las neuronas que producen un neurotransmisor o neuromodulador determinado	Localización mediante inmunocitoquímica de un péptido o una proteína	Requiere un anticuerpo específico
	Localización mediante inmunocitoquímica de la enzima responsable de la síntesis de una sustancia	Útil si la sustancia no es un péptido o una proteína
Métodos genéticos	Estudios con gemelos	Comparando el índice de concordancia de gemelos monocigóticos y dicigóticos puede estimarse si un rasgo se hereda
	Mutaciones dirigidas	Inactivación, inserción o aumento de la expresión de un gen
	Oligonucleótidos «antisentido»	Se unen al ARN mensajero; impiden la síntesis de proteína

## 4. MÉTODOS GENÉTICOS OK

Toda conducta está determinada por interacciones entre el cerebro y el entorno. Muchas características comportamentales (talento, variables de personalidad, trastornos mentales) parecen "venir de familia", sugiriendo que el factor genético puede ser importante en el desarrollo de diferencias fisiológicas que, en última instancia son responsables de dichas características.

A veces, la relación genética es clara (un gen defectuoso interfiere en el desarrollo cerebral, y una anomalía neurológica provoca alteraciones comportamentales), en otros casos, la relación entre herencia y conducta es más sutil, y para evidenciarla han de emplearse métodos genéticos especiales.

**Dado que los genes dirigen el desarrollo de un organismo, los métodos genéticos son útiles en los estudios de la fisiología de la conducta.**

### • ESTUDIOS CON GEMELOS

Para evaluar la influencia de la herencia en un rasgo concreto, es eficaz comparar el índice de concordancia de este rasgo en pares de gemelos monocigóticos y dicigóticos.

Los gemelos **monocigóticos** (univitelinos) tienen un genotipo idéntico (sus cromosomas y genes que contienen son iguales).

Los gemelos **dicigóticos** (bivitelinos) tienen una semejanza genética en torno al 50%.

Se estudian historias clínicas para identificar pares de gemelos en los que al menos uno de ellos tenga el rasgo (ej, diagnóstico de un determinado trastorno mental). Si ambos gemelos lo padecen se dice que son concordantes, si solo uno ha recibido el diagnóstico son discordantes.

**Si un trastorno tiene una base genética, el porcentaje de gemelos monocigóticos que son concordantes en cuanto al diagnóstico será superior al de los dicigóticos.** (ej, el índice de concordancia para la esquizofrenia en gemelos es al menos cuatro veces mayor en los monocigóticos que en los dicigóticos; dato que prueba que la esquizofrenia es un rasgo hereditario). En estudios con gemelos se ha encontrado que los factores genéticos influyen en muchas características individuales (personalidad, obesidad, incidencia de alcoholismo, trastornos mentales...).

### • ESTUDIOS SOBRE ADOPCIÓN

Es otro método para evaluar el carácter hereditario de un rasgo de comportamiento concreto. Se compara a individuos adoptados durante la infancia con sus padres biológicos y adoptivos. Los rasgos de comportamiento están influidos por factores genéticos, ambientales y una interacción entre ambos.

Los factores ambientales son tanto de tipo social como biológico (ej, factores prenatales ambientales: salud de la madre; factores postnatales ambientales: dieta del niño, atención médica, entorno social).

Si se adopta un niño, los factores genéticos estarán asociados a los padres biológicos, los factores ambientales prenatales con la madre biológica, y la gran parte de los ambientales postnatales con los padres adoptivos.

Estos estudios requieren conocer la identidad de los padres biológicos y adoptivos para evaluar los rasgos comportamentales.

**Si los individuos estudiados se parecen a sus padres biológicos el rasgo probablemente esté influido por factores genéticos.** Para asegurarse, se han de descartar posibles diferencias en el entorno prenatal de los niños adoptados.

Si los niños se parecen a sus padres adoptivos, se concluye que el rasgo está influido por factores ambientales. Si hay semejanzas con los dos, probablemente el rasgo estará influenciado tanto genética como ambientalmente.

## • MUTACIONES DIRIGIDAS

Consisten en la alteración de un gen "gen Knockout" (gen suprimido) en el laboratorio y su inserción en los cromosomas de un ratón. Estos genes mutados son defectuosos (no pueden producir una proteína que sea funcional).

Las mutaciones dirigidas permiten a los neurocientíficos estudiar los efectos de la falta de una proteína concreta (ej, una enzima, o una proteína estructural o un receptor) sobre las características fisiológicas y comportamentales de un animal.

En ocasiones el objetivo de la mutación es una enzima que controla una reacción química específica (ej, la falta de una enzima determinada interfiere en el aprendizaje, lo que sugiere que la enzima es, en parte, responsable de los cambios en la estructura de sinapsis necesarios para el aprendizaje).

En otros casos el objetivo de la mutación es una proteína que por sí sola desempeña una importante función en la célula (ej, un tipo concreto de receptor para los opioides interviene en los efectos reforzantes y analgésicos de estos). Los investigadores pueden incluso producir knockouts condicionales que provocan que los genes del animal dejen de expresar un determinado gen cuando se le suministra una determinada droga, lo que permite que el gen objetivo o sobre el que se actúa se exprese normalmente durante el desarrollo del animal y posteriormente sea suprimido. **Los investigadores pueden asimismo valerse de métodos de ingeniería genética para insertar genes en el ADN del ratón, genes que pueden dar lugar a un aumento de la producción de proteínas que se encuentran normalmente en la especie "huésped" o pueden producir proteínas completamente nuevas.**

## • OLIGONUCLEÓTIDOS "ANTISENTIDO"

Otro método genético implica la producción de moléculas que **bloquean la producción de proteínas** codificadas por determinados genes mediante la inyección de oligonucleótidos "antisentido" (o de hebra complementaria).

**El tipo más frecuente de oligonucleótidos "antisentido" son cadenas modificadas de ADN o de ARN que se unirán con moléculas específicas de ARN mensajero e impiden que produzcan su proteína.** Una vez bloqueadas las moléculas de ARNm, son destruidas por enzimas que hay en la célula. El término "antisentido" se refiere a que los oligonucleótidos sintéticos contienen una secuencia de bases complementarias a las que contiene un gen determinado o molécula de ARNm (este método se parece al utilizado en la hibridación in situ).

---