



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**SISTEMA DE CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL
DE EXOCITOSIS SOMÁTICA EN NEURONAS
GRANDES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO MECATRÓNICO

P R E S E N T A

IRVING ELYASIB SANTIAGO CATZIM

DIRECTOR DE TESIS

ING. BRUNO E. MÉNDEZ AMBROSIO



ÍNDICE

RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 Fundamentos Biológicos	2
1.1.1 Neurona	2
1.1.2 Membrana plasmática: estructura y componentes	5
1.1.2.1 Fosfolípidos	5
1.1.2.2 Proteínas	6
1.1.2.3 Bombas iónicas	7
1.1.2.4 Canales iónicos	8
1.1.3 Potenciales Neuronales	9
1.1.3.1 Potencial de membrana y de reposo	9
1.1.3.2 Potencial de equilibrio y Ecuación de Nernst	10
1.1.3.3 Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz	10
1.1.4 Analogía eléctrica de la neurona	11
1.1.5 Potencial de acción	13
1.1.6 Serotonina	14
1.1.6.1 Neuroanatomía del sistema serotoninérgico	14
1.1.6.2 Funciones del sistema serotoninérgico	16
1.1.7 Neurona de Retzius de la sanguijuela	18
1.1.7.1 Neuroanatomía de la sanguijuela	18
1.1.7.2 Uso de la sanguijuela como preparación	19
1.1.7.3 Fisiología de las neuronas de Retzius	20
1.1.8 Comunicación extrasináptica	21
1.1.8.1 Exocitosis y endocitosis	21
1.1.8.2 Evidencia indirecta de secreción somática de serotonina	22
1.1.8.3 Evidencia directa de secreción somática de serotonina	22
1.1.8.4 Dependencia de la exocitosis somática a la frecuencia de la estimulación eléctrica	23
1.1.8.5 Dependencia de la exocitosis somática al calcio	24
1.2 Medición de la exocitosis somática	24
1.2.1 Técnicas de monitoreo de secreción somática	24
1.2.1.1 Amperometría	25
1.2.1.2 Microscopía de fluorescencia	25
1.2.1.3 Patch-Clamp	26
1.2.2 Whole-cell patch-clamp	27
1.2.2.1 Montaje para realizar patch-clamp	28
1.2.2.2 Amplificador de patch-clamp	30
1.2.2.3 Micropipetas, electrodo y soporte	31
1.2.2.4 Procedimientos experimentales	33
1.2.2.5 Circuito equivalente de una célula en whole-cell	34
1.2.2.6 Modelo simplificado de neurona en whole-cell	35
1.2.3 Cuantificación de secreción con whole-cell	37
1.2.3.1 Estimación por estimulación con ondas cuadradas	37

1.2.3.2	Estimación por estimulación con ruido	38
1.2.3.3	Estimación por estimulación con ondas senoidales	39
1.2.4	Principios matemáticos de la detección sensible a la fase	40
1.2.5	Modelo matemático de la neurona en whole-cell	42
1.2.5.1	Corriente del circuito ante excitación de voltaje senoidal	42
1.2.5.2	Corriente del circuito ante excitación de escalón de voltaje	44
2.	DESARROLLO	45
2.1	Modelado matemático del método para monitorear cambios capacitivos	45
2.1.1	Estimación del valor de los elementos eléctricos del sistema	45
2.1.2	Cuantificación de Cambios capacitivos	47
2.1.2.1	Determinación de los ángulos de fase	47
2.1.2.1.1	Simplificación de $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}$	49
2.1.2.2	Cálculo de la frecuencia óptima de estimulación	50
2.1.2.3	Factores de escala	51
2.1.2.4	Error por cambios en R_a	51
2.1.2.4.1	Magnitud del error	51
2.1.2.4.2	Corrección del error	54
2.2	Implementación del sistema de cuantificación	56
2.2.1	Estructura del sistema	56
2.2.2	Protocolo de estimulación	57
2.2.3	Programación	58
2.2.3.1	Entorno de desarrollo	58
2.2.3.2	Estructura general del programa	58
2.2.3.3	Módulo de creación de sello	59
2.2.3.3.1	Submódulo de monitoreo de sello	59
2.2.3.3.2	Submódulo de medición de ruido	61
2.2.3.4	Módulo de monitoreo de secreción	62
2.2.3.4.1	Submódulo de estimación de valores iniciales	62
2.2.3.4.2	Submódulo de cuantificación de cambios en los componentes	65
3.	MÉTODO	72
3.1	Simulaciones computacionales y eléctricas	72
3.1.1	Simulaciones computacionales	72
3.1.2	Simulaciones con el modelo eléctrico	73
3.2	Experimento	73
3.2.1	Equipo, material y soluciones	73
3.2.2	Procedimiento	74
4.	RESULTADOS	76
4.1	Resultados de las simulaciones	76
4.1.1	Simulaciones computacionales	76
4.1.2	Simulaciones con el modelo eléctrico	78
4.2	Resultados de los experimentos	79
4.3	Discusión de resultados	81
5.	CONCLUSIÓN	83
ANEXOS		85

Anexo A: Código en LabVIEW®	85
Anexo B: Código de la simulación en MATLAB®	97
REFERENCIAS	100

RESUMEN

Se desarrolló un sistema para la cuantificación de la fusión vesicular en tiempo real durante la exocitosis somática en neuronas grandes, por medio de la medición de cambios capacitivos en sus membranas plasmáticas. Otros sistemas para hacer este tipo de mediciones han sido desarrollados, pero estos no han sido capaces de realizarlas correctamente en tiempo real en neuronas cuya superficie membranal es muy grande y la relación señal a ruido es muy pequeña.

En otros trabajos, los mecanismos de la exocitosis somática han sido estudiados y descritos con gran detalle en las neuronas serotoninérgicas Retzius de la sanguijuela, las cuales proveen excelentes resoluciones espacial y temporal para este tipo de estudios, por lo cual permiten entender principios generales acerca de la secreción somática y extrasináptica. Sin embargo, los mecanismos de endocitosis aún no han sido descritos, así como tampoco se han realizado mediciones directas de la cantidad total de vesículas fusionándose en respuesta a actividad eléctrica.

El objetivo del sistema es registrar de forma directa la cinética del ciclo completo de exocitosis y endocitosis somática en las neuronas de Retzius, así como proporcionar estimaciones del número de vesículas fusionadas en cada evento exocitótico. Para conseguirlo, el presente sistema utiliza las propiedades eléctricas resistivas y capacitivas de la membrana celular en conjunto con un algoritmo que combina la detección sensible a la fase con un modelado lineal por segmentos. Las señales electrofisiológicas son obtenidas mediante *whole-cell patch-clamp* bajo fijación de voltaje, digitalizadas a través de una tarjeta de adquisición de datos de *National Instruments* y procesadas por el algoritmo programado en LabVIEW®.

Se han obtenido los primeros registros en neuronas de Retzius, en los cuales la cinética y la magnitud de los cambios capacitivos parecen tener un origen fisiológico.

ANTECEDENTES

1.1 FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS

Como se ha mencionado, el proyecto se desarrolla en un contexto biológico. Por ello es necesario explicar algunos conceptos básicos de biología celular, biología molecular y biofísica, que son esenciales para entender el fenómeno estudiado, los métodos electrofisiológicos, los desarrollos matemáticos, y las implementaciones ingenieriles en la realización del sistema. Además se describe la importancia científica y médica de entender los mecanismos y la cinética de los ciclos completos de exo-endocitosis somática haciendo énfasis en el de la serotonina.

1.1.1 NEURONA

Las neuronas son células eucariotas (con núcleo celular) excitables, consideradas las unidades funcionales en el sistema nervioso. Están altamente especializadas en la recepción de estímulos y generación de respuestas químicas y eléctricas, así como en la conducción de potenciales eléctricos. En general las células excitables se caracterizan por ser capaces de hacer variaciones rápidas en su potencial eléctrico en respuesta a estímulos o de forma espontánea, gracias a estructuras proteicas (i.e. canales iónicos) que controlan el flujo de iones hacia dentro y hacia fuera de la célula.

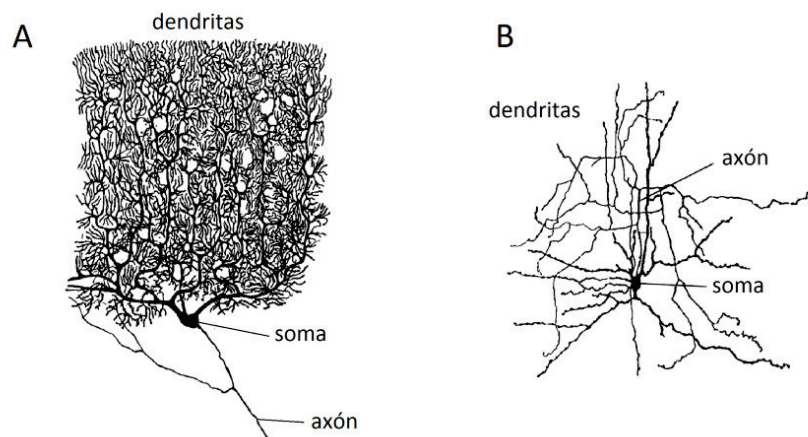


Figura 1.1 Diagrama de dos neuronas con distinto rol funcional. A) Neurona de Purkinje del cerebelo. B) Neurona estrellada de la corteza cerebral. Modificado de [1].

Una característica de gran importancia fisiológica en las neuronas, es que mantienen su potencial eléctrico interno en el reposo (i.e. potencial de reposo) por debajo del potencial del medio extracelular, lo que permite que al ser excitadas, aumenten su potencial rápidamente por medio de la apertura de canales iónicos. El potencial negativo dentro de la neurona se debe en gran medida a la numerosa presencia de moléculas orgánicas cargadas negativamente (ej. proteínas, ácidos nucleicos, grupos carboxílicos, y metabolitos¹) y al control activo de la concentración de iones inorgánicos dentro de la célula por medio de bombas iónicas (véase 1.1.2.3). Morfológicamente, aunque con muchas variaciones debidas al rol funcional de cada célula, cuatro regiones típicas en toda neurona pueden ser identificadas: las sinapsis, el cuerpo de la célula o soma, las dendritas y el axón (**Figura 1.1**).

Soma

El soma contiene el núcleo y la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas, es el centro metabólico y trófico de la neurona. Además a través de él se intercambian varias sustancias entre el medio intracelular y el extracelular tales como iones o neuromoduladores. El citoplasma somático tiene una presencia muy importante de citoesqueleto, principalmente microfilamentos y microtúbulos, los cuales se dispersan en grupos que se extienden desde el soma hasta el axón o las dendritas, dando soporte estructural y permitiendo el transporte de macromoléculas y organelos en ambos sentidos.

Dendritas

Las dendritas son ramificaciones que surgen del soma y reciben la mayoría de los estímulos provenientes de otras neuronas a través de conexiones sinápticas. La distribución tridimensional de las ramificaciones dendríticas tiene una relación directa con el tipo de información transferida a la neurona. Por ejemplo, una neurona con un árbol dendrítico restringido a una capa cortical, recibe aferentes de un número muy limitado de *pools*² neuronales, mientras que una con arborizaciones extendidas a través de diferentes capas corticales recibirá estímulos de muy diversos pools.

¹ Los metabolitos son cualquier sustancia utilizada o producida durante el metabolismo.

² Grupos funcionales de neuronas que procesan e integran información procedente de fuentes comunes, tales como los pools motoneuronales ubicados en la espina dorsal que inervan en un determinado músculo esquelético [4].

Axón

Los axones son proyecciones tubulares que se extienden desde el soma y permiten la transmisión de potenciales de acción hasta las sinapsis con otras células. En su mayoría las neuronas poseen un axón³, el cual usualmente surge de una pequeña elevación cónica en el soma llamada cono o montículo axónico. En los vertebrados, muchos axones están cubiertos por una vaina de mielina y en el caso de algunas células del sistema nervioso periférico están cubiertos por células de Schwann, las cuales son células gliales que funcionan como aislantes para mejorar la conducción de potenciales de acción (véase 1.1.5).

Sinapsis

Las sinapsis no son propiamente partes de una neurona, sino puntos de yuxtaposición entre dos células. Estas constituyen los bloques fundamentales de la comunicación neuronal, aunque no la única vía (i.e. comunicación paracrina). Las sinapsis se pueden clasificar en dos de acuerdo al tipo de señal transmitida, sinapsis químicas o sinapsis eléctricas.

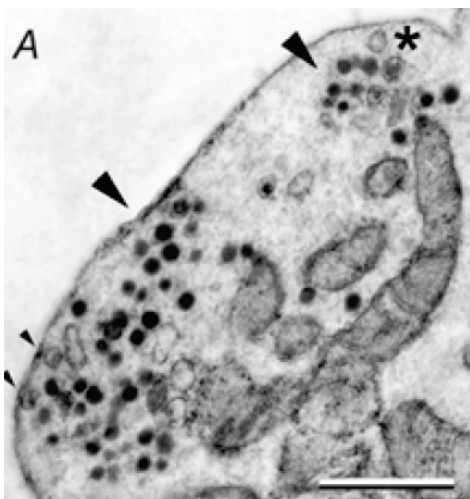


Figura 1.2 Micrografía electrónica mostrando cúmulos de vesículas secretoras en terminales presinápticas de una Neurona de Retzius. Tomado de [3].

Las sinapsis eléctricas se dan entre dos neuronas que intercambian iones directamente a través de uniones que separan a 2nm una célula de la otra y las conectan a través de poros llamados conexones. Esta conexión directa le permite a las neuronas transmitir señales eléctricas con enorme rapidez, como las asociadas con reflejos de huida en invertebrados [2].

Las sinapsis químicas son las más comunes en el cerebro humano y en ellas se transmiten señales por medio de mensajeros químicos (i.e. neurotransmisores). Toda sinapsis química se conforma de tres componentes: el elemento

³ Algunos tipos de neuronas no tienen axón y transmiten las señales por medio de sus dendritas. Además en el ser humano algunas neuronas sensoriales o de sistemas nerviosos periféricos pueden tener un axón dividido en dos ramas (ej. Células del ganglio basal dorsal) [4], o en el caso de invertebrados tales como la sanguijuela, el axón algunas veces consiste en varias regiones que funcionan más o menos de forma independiente [5].

presináptico, el espacio o hendidura sináptica y el elemento postsináptico. El elemento presináptico es una terminal especializada que libera mensajeros químicos en la hendidura sináptica cuando la neurona a la que pertenece dispara un impulso nervioso o potencial de acción, bajo estimulación química o eléctrica, o durante actividad espontánea. La hendidura sináptica es un espacio intercelular que separa a las terminales presináptica y postsináptica en aproximadamente 25nm. El elemento postsináptico corresponde a una terminal perteneciente a una segunda neurona, especializada en la recepción de mensajeros químicos y generación de una respuesta electroquímica. Los neurotransmisores se liberan mediante la fusión de pequeñas vesículas contenedoras de 30 a 100nm de diámetro con la membrana plasmática de la terminal presináptica (véase 1.1.8.1) (**Figura 1.2**).

1.1.2 MEMBRANA PLASMÁTICA NEURONAL: ESTRUCTURA, COMPONENTES Y FUNCIONES

La membrana plasmática actúa como contenedor, y barrera selectiva que permite a la célula concentrar los nutrientes recolectados de su ambiente y retener los productos que sintetiza para su propio uso, además de excretar los desechos de sus reacciones químicas. Sin una membrana plasmática, la célula no podría mantener su integridad como un sistema químico coordinado. En el caso de las neuronas, la membrana tiene alrededor de 50nm de espesor y está compuesta de varios tipos de lípidos, carbohidratos y proteínas; siendo las últimas las que mayor masa aportan debido a su gran tamaño y complejidad, en tanto que los lípidos son los que se encuentran en mayor número.

1.1.2.1 Fosfolípidos

Todas las moléculas que forman la membrana o que están acopladas con ella son móviles, interactivas y en muchos casos funcionalmente interdependientes. Gracias a sus propiedades físicas funcionan como barrera aislante que protege a la célula de la pérdida de iones (ej. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^-) y constituyentes polares (ej. agua), así como de la entrada de sustancias extracelulares potencialmente dañinas. Esto entre otras cosas, confiere propiedades capacitivas a la membrana plasmática.

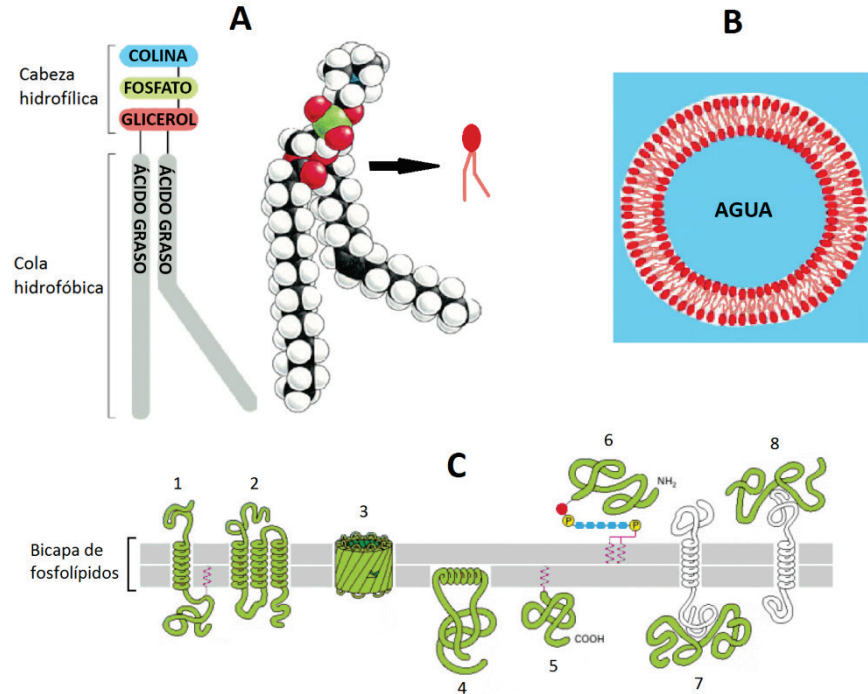


Figura 1.3 Fosfolípidos y proteínas membranales. A. Estructura molecular de la fosfatidilcolina, un fosfolípido típico en las células. B. Vesícula bicapa formada por la unión de fosfolípidos en presencia de agua vista en un corte ecuatorial. C. Formas en las que las proteínas membranales se asocian con la bicapa de lípidos. (1, 2, 3) proteínas integrales o transmembranales, (4, 5, 6, 7, 8) proteínas periféricas. Modificado de [6].

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, es decir, poseen extremos con características opuestas, a suficiente distancia para que cada uno manifieste sus propias características. En este caso un extremo es polar o hidrofílico y el otro es no polar o hidrofóbico (**Figura 1.3 A**). Cuando moléculas anfipáticas como los fosfolípidos son puestas en agua, se ensamblan espontáneamente formando una vesícula bicapa, haciendo que sus extremos hidrofóbicos estén en contacto unos con otros mientras sus extremos hidrofílicos son expuestos al agua (**Figura 1.3 B**).

1.1.2.2 Proteínas

Por otra parte, las proteínas presentan una gran variedad de funciones, las cuales pueden predecirse de acuerdo a la localización de la misma en la membrana plasmática. Las proteínas periféricas son aquellas que se encuentran ancladas a la membrana ya sea por el lado citoplasmático o por el extracelular, y las funciones que realizan son las de receptores de neurotransmisores, neuromoduladores, hormonas, y otros mensajeros químicos;

enzimas catalizadoras de señales intracelulares, elementos de soporte estructural para la membrana, mediadores en el crecimiento neural y agrupamiento de axones e intermediarios en el tráfico membranal y reciclando vesicular (**Figura 1.3 C-4,5,6,7,8**).

Las proteínas integrales o transmembranales son aquellas que atraviesan completamente la membrana, y las funciones que cumplen residen en el transporte activo y pasivo de moléculas en forma de bombas iónicas (moviendo iones en contra del gradiente de concentración), canales iónicos (permitiendo el paso de iones a través de la membrana en el sentido del gradiente electroquímico) y transportadores de azúcares y aminoácidos. (**Figura 1.3 C-1,2,3**).

1.1.2.3 Bombas iónicas

Las bombas iónicas son proteínas transmembranales que mueven iones a través de la membrana plasmática en contra del gradiente electroquímico, generalmente usando trifosfato 5' de adenosina (ATP) como fuente de energía. Las bombas de sodio-potasio (Na^+ , K^+) son un ejemplo de transportadores iónicos. Estas bombas consisten en una pequeña glicoproteína y una gran subunidad transmembranal a forma de conducto. Su función consiste en introducir a la célula un par de iones de potasio y al mismo tiempo

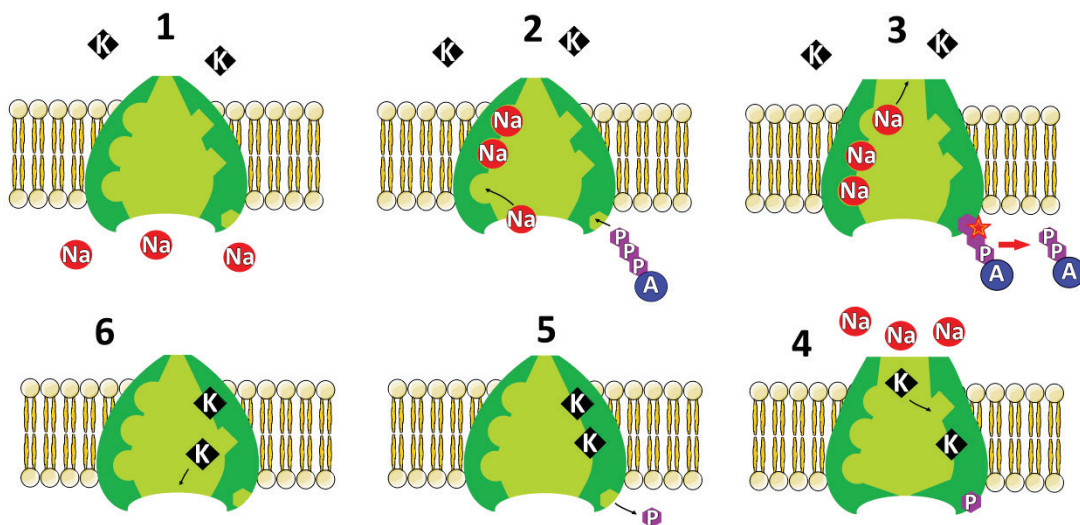


Figura 1.4 Ciclo de funcionamiento de una bomba de sodio-potasio. (1-2) Iones de Na^+ circundantes se insertan en sitios específicos en la bomba, (2) una molécula de ATP se une a la bomba iónica, (3) el ATP cede un fosfato a la bomba, liberando energía y causando cambios conformacionales en ella que permiten la liberación de Na^+ al espacio extracelular, (4) el mismo cambio permite la inserción de iones de K^+ en la bomba, (5-6) posteriormente los iones de K^+ se liberan al interior de la célula por medio de un nuevo cambio conformacional al separarse del fosfato.

retirar hacia el medio extracelular tres iones de sodio mediante un cambio en la conformación de la bomba inducido por su fosforilación⁴ con una molécula ATP (**Figura 1.4**).

1.1.2.4 Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembranales con poros selectivos al tipo de ión que dejan pasar a través de ellos. Una característica importante que distingue a los canales iónicos de las bombas iónicas es que el flujo a través de ellos no requiere de energía metabólica, es pasivo debido a que la fuerza electroquímica a través de la membrana es la que impulsa a los iones y determina el sentido de la corriente.

Los canales iónicos pueden clasificarse en dos variedades, canales con compuertas y canales de fuga. Los canales de fuga contribuyen al potencial de reposo de la célula. Los canales con compuertas son proteínas alostéricas⁵, capaces de abrirse o cerrarse mediante un proceso llamado gating en inglés. El flujo de iones o corriente iónica a través de los canales no es continua, sino que estos se abren y se cierran generando pulsos de corriente escalonada.

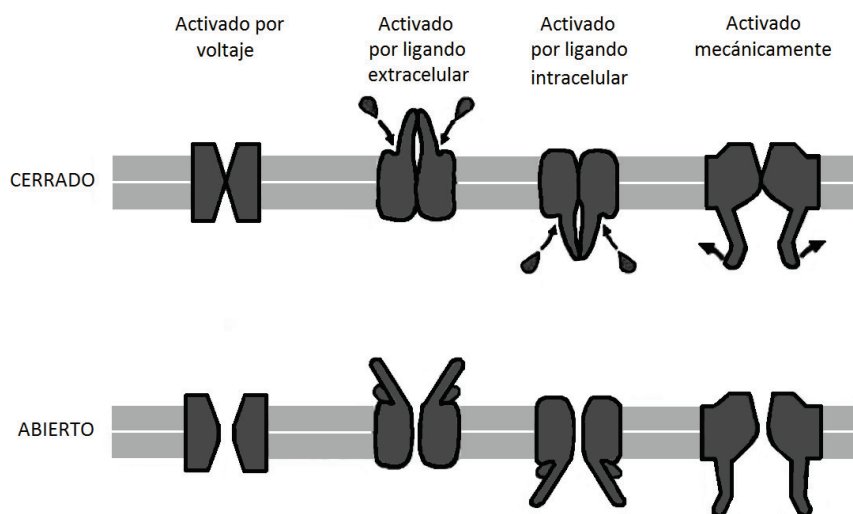


Figura 1.5 Representación de los estado de activación y reposo algunos tipos de canales iónicos controlados por compuertas. Modificado de [7].

⁴ La fosforilación es la adición de grupos fosfato a grupos hidroxilo en proteínas, donde el ATP puede ser el donador del fosfato.

⁵ Las proteínas alostéricas, son proteínas que existen en más de una conformación, y cuya función es alterada cuando cambian de una conformación a otra.

La apertura o cierre de los canales es probabilística, sin embargo la probabilidad de apertura es función de algunas magnitudes físicas (ej. potencial de membrana, pH, temperatura, fuerzas mecánicas) o de la unión de receptores con mensajeros químicos (ligandos) (**Figura 1.5**). Los canales cuya probabilidad de apertura depende del potencial de membrana son llamados canales activados por voltaje y su probabilidad de apertura aumenta a medida que la célula es despolarizada. Se piensa que su cambio de estado es debido al movimiento de la región cargada de la molécula hacia atrás o adelante en el campo eléctrico de la membrana [8].

1.1.3 POTENCIALES ELÉCTRICOS NEURONALES

1.1.3.1 Potencial de Membrana y de Reposo

La capacidad neuronal de distribuir iones selectivamente a través de la membrana citoplásmica origina diferencias en la distribución de carga eléctrica. A través de la operación de bombas iónicas y mecanismos especiales de almacenamiento de iones, las neuronas mantienen de forma activa las concentraciones internas de varios iones importantes como el Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . El transporte activo y pasivo de iones a través de la membrana provoca diferencias de concentración entre el citoplasma y el espacio extracelular dado que la membrana no presenta la misma conductancia para todos los tipos de iones, además de qué cada tipo ion es transportado en sentidos y formas distintas. Por ejemplo, K^+ es concentrado de manera activa dentro de la célula, mientras que Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} son expulsados activamente hacia el espacio extracelular.

La diferencia de concentración iónica entre el interior y el exterior de la célula, provoca una diferencia de potencial a la cual se le conoce como potencial de membrana. En reposo al potencial de membrana se le llama potencial de reposo y es de valor negativo. Por ejemplo en el sistema visual humano, las células fotorreceptoras tienen un potencial de reposo de aproximadamente -40mV, para las neuronas piramidales de la corteza visual humana es de aproximadamente -50mV y en las células Retzius de sanguijuelas es de alrededor de -60mV. En términos matemáticos el potencial de membrana V_M se define como

$$V_M = V_i - V_o \quad (1.1)$$

donde V_i es el potencial dentro de la célula y V_o es el potencial fuera de ella.

1.1.3.2 Potencial de Equilibrio y Ecuación de Nernst

La concentración desigual de soluto entre el citoplasma y el espacio extracelular provoca la aparición de una fuerza difusora que por efectos termodinámicos tiende a homogeneizar la concentración. Por ejemplo, si una neurona tuviera una concentración intracelular del ión Ψ^+ mayor a la extracelular y su membrana plasmática fuera permeable únicamente a esa especie de ión, los iones Ψ^+ tenderían a difundirse fuera de la neurona por efectos termodinámicos. La salida de Ψ^+ provocaría la redistribución de carga eléctrica entre el interior y el exterior de la célula, haciendo que la neurona tuviera un potencial aún más negativo. Esto continuaría hasta que la fuerza de atracción eléctrica entre la neurona y los iones Ψ^+ se balanceara con la fuerza difusora, circunstancia bajo la cual sería igualmente probable la salida o la entrada de un ión Ψ^+ . Al potencial de membrana en el cual el flujo neto de iones Ψ^+ es cero, se le llama potencial de equilibrio de Ψ^+ . Una expresión matemática que permite calcular el potencial de equilibrio cualquier tipo de ión (E_{ion}) conociendo la concentración intracelular y extracelular del mismo, se conoce como ecuación de Nernst en honor Walther Hermann Nernst,

$$E_{ion} = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_o}{[ion]_i} \quad (1.2)$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura en Kelvin, F la constante de Faraday, z es la valencia del ión, $[ion]_o$ la concentración extracelular del ión, y $[ion]_i$ la concentración intracelular del ión.

En 1902 Julius Bernstein propuso la “Teoría de membrana”, en la cual trató a la membrana plasmática como un medio semipermeable a la difusión de iones, bajo condiciones de diferencia de concentración y temperatura. Específicamente propuso que debido a la alta concentración de K^+ dentro de la célula, el potencial de reposo de la célula estaba determinado únicamente por el potencial de equilibrio de K^+ . Esta teoría proporcionó la primera explicación plausible de los eventos bioeléctricos.

1.1.3.3 Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz

La “Teoría de membrana” de Bernstein no estaba alejada de la realidad, ya que con el avance de las técnicas electrofisiológicas se probó que la membrana celular es semipermeable a iones inorgánicos, sin embargo, se descubrió que el potencial de membrana no está determinado únicamente por el potencial de equilibrio de K^+ .

Posteriormente una ecuación desarrollada por David E. Goldman y más tarde aplicada por Alan Hodgkin y Bernard Katz consiguió describir el potencial de reposo (V_{ss}) dadas las concentraciones iónicas dentro y fuera de la célula y las permeabilidades relativas de la membrana a cada uno de los tipos de ión (p_{ion_j}) presentes en el sistema [9]. En sí misma, la ecuación conocida como Goldman-Hodgkin-Katz representa una generalización de la ecuación de Nernst:

$$V_{ss} = -\frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_{j=1}^n (p_{ion_j} [ion_j]_o)}{\sum_{j=1}^n (p_{ion_j} [ion_j]_i)} \quad (1.3)$$

1.1.4 ANALOGÍA ELÉCTRICA DE LA NEURONA

El flujo de corriente a través de los canales iónicos es óhmico, es decir, la relación corriente-voltaje es lineal, por lo que una forma bastante conveniente de describir el comportamiento del potencial de membrana es en términos de circuitos eléctricos. El circuito consiste en tres componentes: (1) resistores, representando a los canales iónicos; (2) fuente de voltaje representando los gradientes iónicos; y (3) los capacitores representando la habilidad de la neurona de almacenar carga. El circuito equivalente permite un entendimiento intuitivo y cuantitativo de como el movimiento de iones genera las señales eléctricas en las células nerviosas. La bicapa de fosfolípidos que constituye la mayor parte de la superficie membranal tiene propiedades dieléctricas. La relación entre la carga almacenada q y el potencial de membrana V_M está dado por,

$$q = C_M V_M$$

donde C_M es la capacitancia de membrana.

La capacitancia total de la neurona depende del área total del dieléctrico, por lo que entre más grande es la neurona mayor es su capacitancia. Por otro lado, la representación de un canal iónico es la de una resistencia en serie con una fuente de voltaje, donde la fuente de voltaje corresponde al potencial de equilibrio E_{ion} del ión asociado al canal (**Figura 1.6**). Usando la ley de Ohm la suma de la corriente a través de todos los canales de un determinado ión ($I_{ión}$) en una neurona es,

$$I_{ión} = \frac{(V_M - E_{ion})}{R_{ión}} \quad (1.4)$$

donde $R_{ión}$ es la suma de las resistencias de todos los canales iónicos del tipo determinado.

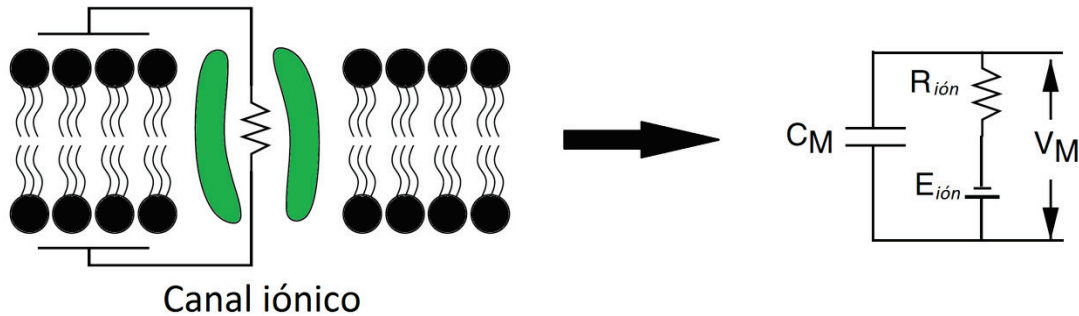


Figura 1.6 Analogía eléctrica de un canal iónico en la bicapa de lipídica, tomando en cuenta diferencias de potencial electroquímico. Modificado de [10].

Tomando en cuenta la contribución de las corrientes de los principales iones involucrados en la generación de señales neuronales (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}), se obtiene la ecuación

$$I_{iónica} = \frac{(V_M - E_{Na})}{R_{Na}} + \frac{(V_M - E_K)}{R_K} + \frac{(V_M - E_{Cl})}{R_{Cl}} + \frac{(V_M - E_{Ca})}{R_{Ca}}, \quad (1.5)$$

donde $I_{iónica}$ es la corriente total a través de todos los canales iónicos. Además las variaciones de voltaje de membrana (V_M) producen corrientes capacitivas (I_C) a través de la membrana celular

$$I_C = C_M \frac{dV_M}{dt}, \quad (1.6)$$

Por lo tanto la corriente total que circula a través de la membrana (I_M), se forma por la unión de las ecuaciones 1.5 y 1.6 y se expresa de la siguiente forma:

$$I_M = I_C + I_{iónica} = \frac{(V_M - E_{Na})}{R_{Na}} + \frac{(V_M - E_K)}{R_K} + \frac{(V_M - E_{Cl})}{R_{Cl}} + \frac{(V_M - E_{Ca})}{R_{Ca}} + C_M \frac{dV_M}{dt}, \quad (1.7)$$

Este comportamiento lineal se mantiene en tanto el potencial de membrana no sobrepase un umbral a partir del cual los canales iónicos activados por voltaje aumentan abruptamente su probabilidad de apertura, llevando el sistema a la generación de potenciales de acción.

1.1.5 POTENCIAL DE ACCIÓN

La comunicación entre neuronas o entre neuronas y músculos u órganos periféricos requiere que las señales viajen distancias considerables. La actividad eléctrica registrada en los nervios reveló que la conducción de la información es mediada por la generación activa de un potencial eléctrico dentro de las células, llamado potencial de acción. Los potenciales de acción permiten la transmisión activa de señales eléctricas, que de ser transmitidas pasivamente, no podrían llegar a receptores lejanos debido a la caída de la corriente.

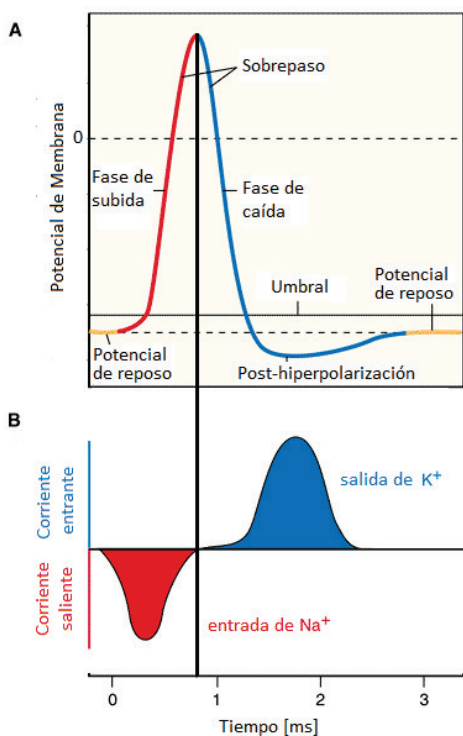


Figura 1.7 Potencial de acción. A) Fases de un potencial de acción. B) Corrientes de entrantes y salientes, debidos a la entrada Na^+ y salida de K^+ durante el potencial de acción. Modificado de [8].

A mitad del siglo XX Hodgkin y Huxley encontraron que durante los potenciales de acción, el potencial de membrana rápidamente sobrepasa los 0mV y se acerca al potencial de equilibrio de Na^+ , para después súbitamente volver a polarizarse llegando incluso a ser más negativo que el potencial de reposo (**Figura 1.7 A**) [11]. Cuando en una neurona suficientes sinapsis excitadoras son activadas, y la neurona consigue despolarizarse hasta alcanzar el umbral de potencial de acción a aproximadamente -40mV, las probabilidades de que se genere un potencial de acción son de cerca del 50% [8]. Sin embargo cuando la membrana es despolarizada más allá del potencial de membrana, con toda certeza se inician un par de procesos que generan potenciales de acción iniciando. Uno es un ciclo retroalimentado de corrientes entrantes de Na^+ y el otro es una corriente saliente de K^+ (**Figura 1.8**). Debido a la forma en que los potenciales de acción son producidos, se interpretan como

señales de “todo o nada” tal y como en las computadoras sucede con el “1” y el “0”. Así la información eléctrica en las neuronas es codificada por frecuencia modulada.

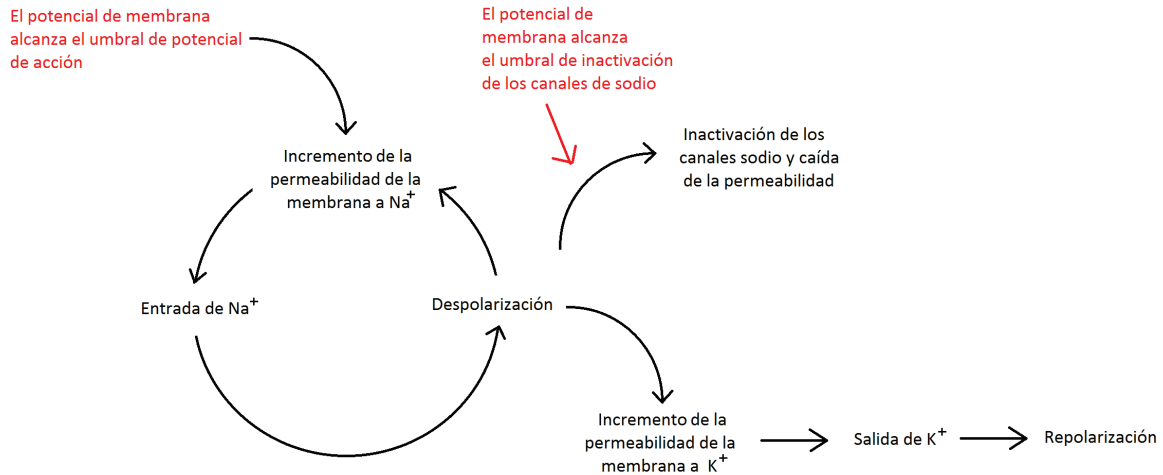


Figura 1.8 Procesos involucrados en las corrientes iónicas que generan los potenciales de acción.

1.1.6 SEROTONINA

Desde mitad del siglo XIX se tuvo conocimiento de una sustancia en el suero resultante después de coágulos sanguíneos, la cual contrae e incrementa el tono del músculo liso vascular. En 1948 Rapport, Green y Page aislaron e identificaron el suero vasoconstrictor como 5-hidroxitriptamina (5-HT), nombrándolo serotonina debido a su origen y efectos. En 1953 Twarog and Page detectaron por primera vez serotonina en extractos de cerebro por medio de bioensayos⁶ [12]. El papel de la serotonina ha sido consistentemente importante para la supervivencia de las especies a través de los primeros periodos de la evolución funcionando como antioxidante y ayudando a los organismos a mantener la homeostasis⁷ [31]. En mamíferos la expresión de los receptores de serotonina ocurre en etapas tempranas de la morfogénesis y se activa debido a la presencia de serotonina en el plasma de la madre.

1.1.6.1 Neuroanatomía del sistema serotoninérgico

En 1964 Dahlstrom y Fuxe, usando la técnica Falck-Hillarp de histofluorescencia, observaron que la mayor parte de las neuronas serotoninérgicas en mamíferos, se encuentran en grupos celulares previamente designados como núcleo de rafé, dentro del

⁶ Es un ensayo de la actividad de una sustancia el cual implica pruebas en material vivo.

⁷ La homeostasis es la conservación de las condiciones internas de un organismo.

tallo cerebral [13]. Posteriormente Dahlstrom y Fuxe describieron nueve grupos de células serotoninérgicas, los cuales fueron designados como B₁-B₉, ocupando la mayor parte del volumen del núcleo de rafé (**Figura 1.9**).

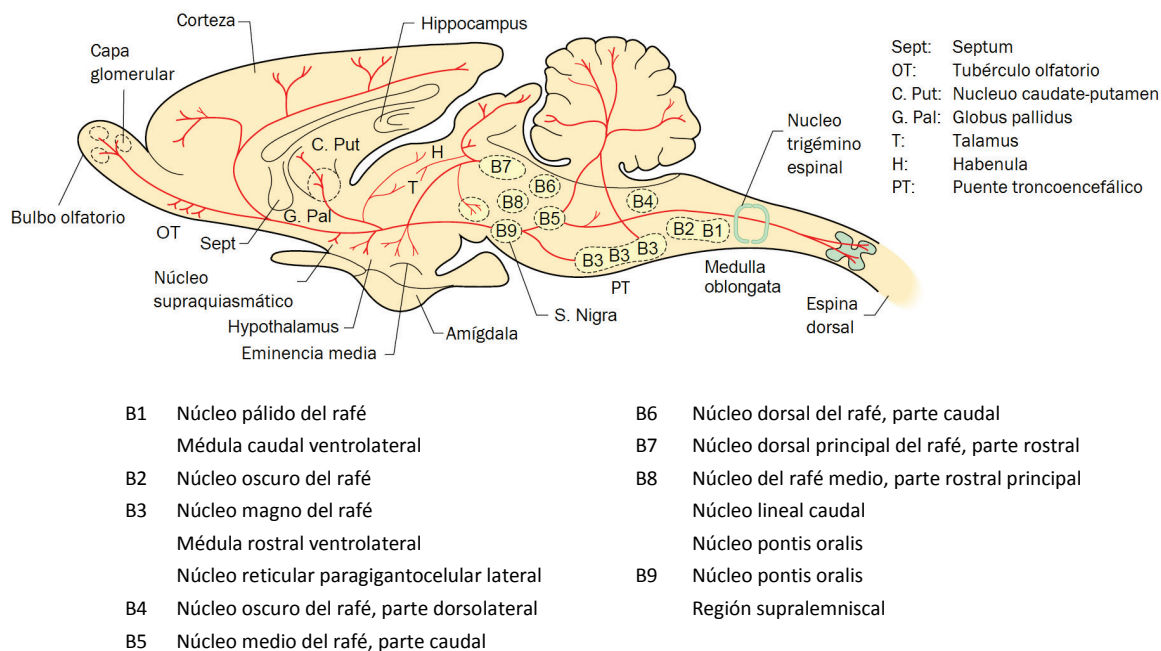


Figura 1.9 Figura esquemática de la localización, clasificación y principales proyecciones de los grupos de cuerpos celulares serotoninérgicos. de acuerdo con Dahlström y Fuxe, en una sección sagital del SNC de la rata. Modificado de [14].

Sin embargo, sólo del 40 al 50% del total de las células del rafé dorsal son serotoninérgicas. En total de unas cuantas decenas de miles (en roedores) a unos cuantos cientos de miles (en humanos) de neuronas serotoninérgicas en los grupos rostrales y caudales, dan lugar a una densa inervación axónica a casi todas las divisiones del sistema nervioso central [15, 16] (**Figura 1.10**). Proyecciones serotoninérgicas ascienden inervando la corteza cerebral y otras regiones del prosencéfalo, las cuales surgen principalmente del rafé dorsal, rafé medio y el grupo B₉, no obstante, las neuronas de los grupos dorsal y medio difieren en su inhibición por la activación de autoreceptores somatodendríticos, en la morfología y organización topográfica de sus proyecciones axonales, así como en sus características electrofisiológicas. Entender estas diferencias puede ser extremadamente importante para comprender el rol de esos dos distintos sistemas serotoninérgicos sobre el funcionamiento del SNC.

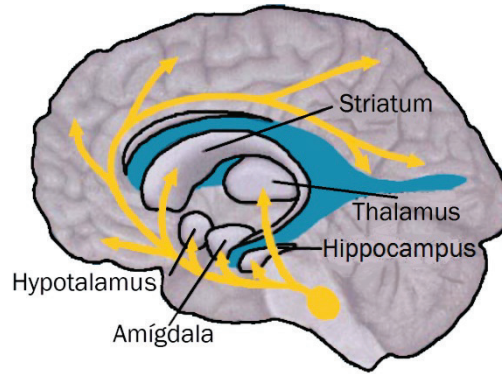


Figura 1.10 Esquema de la inervación de núcleo de rapé. Las neuronas serotonérgicas en el cerebro humano inervan (flechas amarillas) ampliamente hacia la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo, el núcleo estriado y la corteza frontal y prefrontal. Modificado de [16].

1.1.6.2 Funciones del sistema serotonérgico

La serotonina participa en el control de gran variedad de conductas (ej. conductas apetitiva, emocional, sexual, motora, cognitiva y social) y funciones fisiológicas (ej. control de dolor, ritmos neurofisiológicos, modulación neuroendocrina, aprendizaje y memorización). Además está asociada con muchas condiciones patológicas, tales como: el estrés, la depresión, adicción a drogas, esquizofrenia, pánico, ansiedad, anorexia y bulimia nerviosa, desordenes obsesivos compulsivos, hiperactividad y déficit de atención [15]. Sin embargo, desde una perspectiva fisiológica no es claro si la serotonina afecta tales conductas de manera específica, o de una manera más general coordinando la actividad del sistema nervioso, particularmente ajustando el tono de la actividad en conjunto con el nivel de excitación del organismo. Perturbaciones en el sistema serotonérgico pueden provocar cambios en una amplia variedad de conductas. De hecho, fármacos que actúan sobre neuronas serotonérgicas y sus receptores, son usadas para tratar enfermedades tales como la depresión, desordenes de ansiedad y esquizofrenia. A continuación se describe brevemente algunas de las funciones conocidas del sistema serotonérgico y la serotonina en el SNC:

La serotonina juega un rol importante en las conductas agresivas. El rol del sistema serotonérgico y la serotonina en conductas hostiles, antisociales y arranques violentos, ha sido consistentemente demostrado gracias a varios hallazgos en sujetos con esas conductas, incluyendo: niveles deficientes 5-HT y su ácido metabólico, polimorfismos en los genes que codifican enzimas metabólicas del 5-HT, mutaciones en los genes para algunos de sus receptores o transportadores y respuestas alteradas a ensayos farmacológicos con agonistas del 5-HT [17].

La serotonina tiene efectos en la conducta sexual. La serotonina es uno de los principales neurotransmisores asociados a la conducta sexual. El uso de antidepresivos que inhiben selectivamente la reabsorción de serotonina por parte de las neuronas serotoninérgicas, frecuentemente resulta en dificultad para obtener orgasmos o disminución del interés sexual. Debido a que también dificulta la eyaculación, ha resultado en su uso en el tratamiento de la eyaculación precoz [17]. Por otro lado, ha sido establecido que la serotonina juega papeles de inhibidor y facilitador en la conducta sexual femenina dependiendo de qué receptor de 5-HT es activado [15].

La serotonina participa en el ciclo sueño-vigilia. La serotonina funciona predominantemente inhibiendo el sueño REM (*Rapid Eye Movement*) [18]. Además muchas anécdotas clínicas han reportado intensificación del sueño debido al consumo de antidepresivos que inhiben la reabsorción de serotonina [17].

La serotonina modula funciones neuroendocrinas. El eje hipotálamo-pituitario-adrenocortical es regulado por aferentes ascendentes desde el núcleo de rafé, que particularmente modulan la secreción de adrenocorticotropina (ACTH), prolactina y la hormona del crecimiento [14].

El 5-HT participa en la regulación de los ritmos circadianos⁸. El núcleo supraquiasmático (NS) del hipotálamo, genera ciclos electrofisiológicos y metabólicos que se repiten aproximadamente cada 24 horas. El NS recibe una densa inervación del núcleo de rafé y la serotonina parece funcionar como inhibidor modulando el efecto de la luz en el ritmo circadiano, ya que en experimentos la aplicación directa de 5-HT a el NS bloquea los cambios de fase inducidos por la luz en los ciclos del ritmo [14, 17].

El 5-HT tiene efectos inhibidores en la conducta alimentaria. Fármacos que ya sea directa o indirectamente activan receptores postsinápticos de 5-HT, decrementan el consumo de comida, mientras que agentes que inhiben la transmisión serotoninérgica incrementan el ingestión de alimentos. Hipótesis sostienen que el 5-HT gobierna la selección de macronutrientes, influye en las respuestas a las cualidades de sabor de la comida, o modula la actividad gástrica. Esto ha llevado a que sustancias que regulan la actividad serotoninérgica como la fenfluramina sean usadas en el tratamiento de la obesidad en humanos [14, 15, 17].

⁸ Los ritmos circadianos son ritmos biológicos que ocurren con una frecuencia de un ciclo por día. Ejemplos de ciclos circadianos incluyen los ciclos de descanso y las oscilaciones diarias en temperatura corporal y presión sanguínea.

1.1.7 NEURONA DE RETZIUS DE LA SANGUIJUELA

1.1.7.1 Neuroanatomía de la sanguijuela

El sistema nervioso central (SNC) de las sanguijuelas consiste básicamente en cordones nerviosos (conectivos) con un cerebro (ganglio) en cada extremo. En total el SNC de las sanguijuelas se conforma de 23 ganglios: 21 ganglios segmentarios, un ganglio en la cabeza (cerebro anterior) y uno más en la cola (cerebro posterior) (**Figura 1.11**).

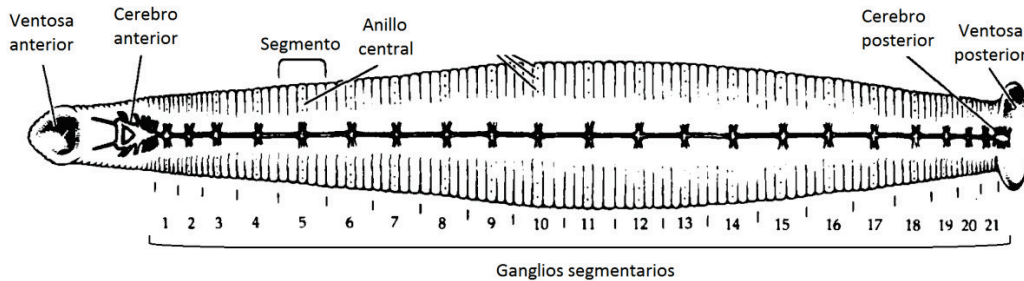


Figura 1.11 Localización y distribución del SNC en la sanguijuela. Modificado [19].

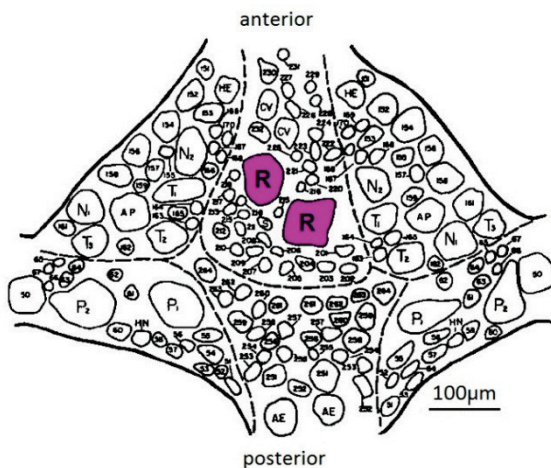


Figura 1.12 Mapa esquemático de las neuronas en un ganglio segmentario de sanguijuelas del género *Hirudo*. Las células resaltadas en el centro, son conocidas como células R o neuronas de Retzius Modificado [20].

Cada uno de los ganglios segmentarios es prácticamente idéntico a los otros, y aunque con pequeñas diferencias en los patrones de ramificación en células homologas [19], cada uno cuenta con cerca de 400 neuronas en posiciones aproximadamente iguales. Los estudios neuroetológicos en sanguijuelas son especialmente tratables a diferencia de animales más evolucionados, debido a que su SNC es distribuido y metamérico⁹, con un número finito de neuronas (un número de neuronas posible de contar). En la **Figura 1.12** se muestra un esquema con las neuronas identificadas y localizadas espacialmente en los ganglios segmentarios de una sanguijuela *Hirudo*.

⁹ Se conoce como metámero a cada uno de los segmentos de que se repiten en ciertos animales.

1.1.7.2 Uso de las sanguijuelas como preparación

Las sanguijuelas han sido usadas en diversas investigaciones por ser modelos favorables para la investigación médica, de genética del desarrollo, y de neurobiología, gracias a sus grandes y fácilmente manipulables neuronas, complejos comportamientos y locomoción. Además, estudios fisiológicos en el SNC de la sanguijuela podrían permitir entender la fisiología del SNC de otras especies como la humana, debido a que aún en animales muy alejados evolutivamente se han encontrado grandes similitudes a nivel fisiológico. Dichas similitudes han llevado a sostener que existen estrategias generales para producir conductas en cualquier animal con un SNC [21].

En [21] Kristan *et al.* enumeran las principales razones por las cuales las sanguijuelas han sido útiles en el estudio de las bases neuronales de las conductas y comportamientos en animales, entre las cuales están las siguientes:

1. El SNC de la sanguijuela es relativamente simple y de fácil acceso aun cuando el animal está vivo, lo cual permite correlacionar patrones motores con actividad neuronal.
2. Las neuronas son fácilmente visibles e identificables con base en la localización de su soma, morfología y propiedades fisiológicas (**Figura 1.12**).
3. La actividad intracelular puede ser registrada con facilidad debido a que el soma de las neuronas es relativamente grande (10-100 μm).
4. Los nervios periféricos largos y fácilmente accesibles permiten la estimulación de neuronas específicas mientras se monitorea la actividad neuronal con electrodos extracelulares.
5. El SNC de la sanguijuela es iterativo, con neuronas homologas en la mayoría, si no en los 21 ganglios segmentales. Por ello más allá de tener más de 10,000 neuronas totales, la unidad funcional del SNC puede considerarse como el ganglio segmentario de 400 neuronas, o incluso reducirla a 200 neuronas debido a que en los ganglios segmentales todas las neuronas se encuentran en pares (**Figura 1.12**).
6. La mayor parte de las neuronas del SNC de la sanguijuela son únicas más que miembros de clústeres de células funcionalmente idénticas, por lo tanto la activación o la inactivación (por hiperpolarización o muerte) una sola neurona frecuentemente tiene consecuencias detectables en el comportamiento.

1.1.7.3 Fisiología de las neuronas de Retzius

En la sanguijuela, las células que contienen serotonina son particularmente interesantes pues están involucradas directa o indirectamente en varias funciones. En estos animales una red formada por cinco tipos de neuronas serotonérgicas actúan en diferentes objetivos, afectando la actividad de neuronas sensoriales, interneuronas, motoneuronas, fibras musculares [22]; y modulando el nado [23], la alimentación [24], la interacción social [25] y formas básicas de aprendizaje [26, 27, 28].

El par de neuronas de Retzius en cada ganglio segmentario son las neuronas más grandes en el SNC de la sanguijuela con diámetros de entre 70 y 100 μm además de ser las mayores productoras de serotonina [29]. Estas neuronas se caracterizan por tener un axón primario grueso del cual emergen múltiples ramificaciones, y porque el par de neuronas de cada ganglio está acoplado eléctricamente, favoreciendo la actividad eléctrica sincrona [30, 31] (**Figura 1.13**).

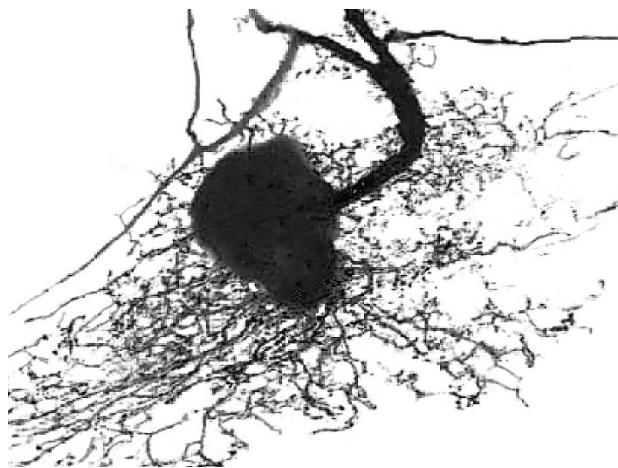


Figura 1.13 Reconstrucción de una neurona de Retzius en el ganglio teñida mediante la inyección de rojo de Texas. Modificado de [31].

Este tipo de neuronas son las utilizadas en el laboratorio del Doctor Francisco Fernández de Miguel para el estudio de los mecanismos de secreción somática de serotonina, debido a que las neuronas de Retzius adultas: son primordialmente serotonérgicas, presentan secreción somática de serotonina [3, 32, 33, 34], y pueden ser aisladas y mantenidas en cultivo, donde preservan sus propiedades eléctricas y continúan sintetizando y liberando serotonina [33].

1.1.8 COMUNICACIÓN EXTRASINÁPTICA

En sistemas neuronales tales como el cerebro humano, existen dos maneras de transmitir información. Una es por medio de circuitos “rígidos” constituidos por conexiones sinápticas y el otro es por medio de la liberación extrasináptica y difusión extracelular de transmisores químicos. La transmisión extrasináptica modula las relaciones entrada-salida de circuitos completos cambiando las propiedades eléctricas de poblaciones neuronales por largos periodos (de segundos a días). Este tipo de comunicación funciona de forma parecida a la comunicación paracrina o modulación hormonal, es por ello que a los neurotransmisores liberados de esta forma se les conoce también como neuromoduladores. Una variedad de este tipo de comunicación es la somática, que consiste en la exocitosis de mensajeros químicos a través del soma neuronal.

1.1.8.1 Exocitosis y endocitosis

Células como las neuronas, especializadas en la secreción rápida de algunos de sus productos cuando se les demanda, concentran y almacenan estos productos en vesículas secretoras. Las vesículas secretoras se forman en la red trans-Golgi y están formadas por una membrana bicapa similar a la que constituyen la membrana plasmática de la célula. El contenido de las vesículas varía de célula a célula y componerse de pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, proteínas u otras moléculas.

La exocitosis es el proceso mediante el cual la membrana de una vesícula secretora se fusiona con la membrana plasmática, resultando en la secreción del contenido vesicular al exterior. En este proceso los lípidos de las dos membranas (vesicular y celular) se fusionan una con otra formando eventualmente, una sola membrana.

La exocitosis consiste en cuatro etapas: anclaje, preparación, fusión y reciclaje:

Anclaje. Para que las vesículas secretoras puedan liberar su contenido primero deben de unirse a la membrana, es decir, anclarse a ella. El mecanismo molecular por medio del cual el anclaje es llevado a cabo continúa siendo desconocido, aunque en primera instancia las vesículas secretoras son llevadas de la red trans-Golgi hacia la membrana celular por medio de motores moleculares unidos a microtúbulos.

Preparación. Una vez ancladas las vesículas, éstas no se encuentran inmediatamente disponibles para secretar, antes deben acoplarse con la membrana celular para ser capaces de fusionarse. A este proceso se le conoce como preparación, y aunque sus

mecanismos no están completamente claros, se sabe que involucra a pares complementarios de proteínas las cuales sufren cambios conformacionales.

Fusión. Posteriormente la fusión se produce cuando ambas membranas se unen, formando un poro de fusión que conforme crece en diámetro, libera el contenido de la vesícula y fusiona a las membranas en una sola.

Reciclaje (Endocitosis). Después de la secreción, las vesículas secretoras son recuperadas por medio de un proceso llamado endocitosis, en el cual se recobra parte de las moléculas secretadas al espacio extracelular almacenándolo en vesículas que se desprenden de la membrana plasmática hacia el citoplasma.

1.1.8.2 Evidencia indirecta de exocitosis somática de serotonina

Estudios con microdiálisis han mostrado cambios en los niveles extracelulares de serotonina en respuesta a modulación farmacológica y de comportamiento [36, 37]. Además, estudios con voltametría han medido incremento en la serotonina extracelular bajo estimulación eléctrica [38]. El descubrimiento de secreción extrasináptica de serotonina en vertebrados es consistente con la observación del transportador de serotonina SERT¹⁰ en sitios periféricos a las sinapsis como axones y dendritas [39], y la observación del receptor de serotonina 5-HT_{1B} principalmente en sitios extrasinápticos [40].

1.1.8.3 Evidencia directa de exocitosis somática de serotonina

Desde los primeros trabajos ultraestructurales realizados en neuronas de Retzius por Coggeshall [29], fue demostrada la presencia de cantidades importantes de vesículas densas en contenido de serotonina en el soma de las mismas. Posteriormente se encontró en neuronas de Retzius cultivadas, que las vesículas se agrupan y exocitan cuánticamente [32]. En estudios más recientes se ha demostrado por medio de microscopía electrónica [33, 34] y microscopía con 3 fotones [41], que en el soma de neuronas de rata y sanguijuela la serotonina se acumula en estructuras multivesiculares. En las neuronas de

¹⁰ El SERT es una proteína transportadora, que retoma serotonina de la hendidura sináptica de vuelta a las terminales presinápticas.

Retzius de la sanguijuela han sido identificadas como cúmulos de vesículas de núcleo denso de alrededor de $1.3 \mu\text{m}$ de diámetro ubicadas en reposo en dos reservas, una alrededor del núcleo y en otra áreas más periféricas del citoplasma [33, 34].

1.1.8.4 Dependencia de la exocitosis somática a la frecuencia de la estimulación eléctrica

La secreción de 5-HT es inducida por la despolarización del soma celular. En neuronas de Retzius, la liberación sináptica de vesículas claras ocurre en respuesta a potenciales de acción individuales, mientras que la exocitosis vesículas densas ocurre bajo estimulaciones subsecuentes [42]. Estudios de la cinética de la exocitosis somática en neuronas de Retzius por medio de fluorescencia con FM1-43 [3, 33, 34] han demostrado que dicho fenómeno es dependiente de la frecuencia de estimulación eléctrica tanto en el ganglio como en cultivo. Usando ondas cuadradas con 10 ms de ciclo de trabajo con la finalidad de producir únicamente un potencial de acción por cada ciclo, la estimulación a 1 Hz prácticamente no produce exocitosis mientras que a 20 Hz se producen incrementos de $96 \pm 20\%$ sobre los niveles de fluorescencia basales después de 2 minutos, debido a la fusión entre las membranas vesiculares y la celular [3] (**Figura 1.14**). El rango de frecuencias que produce secreción somática de serotonina en neuronas de Retzius, es fisiológica. Frecuencias rápidas de disparo (~ 20 Hz) pueden ser originadas por medio de estimulación mecánica en la piel de las sanguijuelas [43].

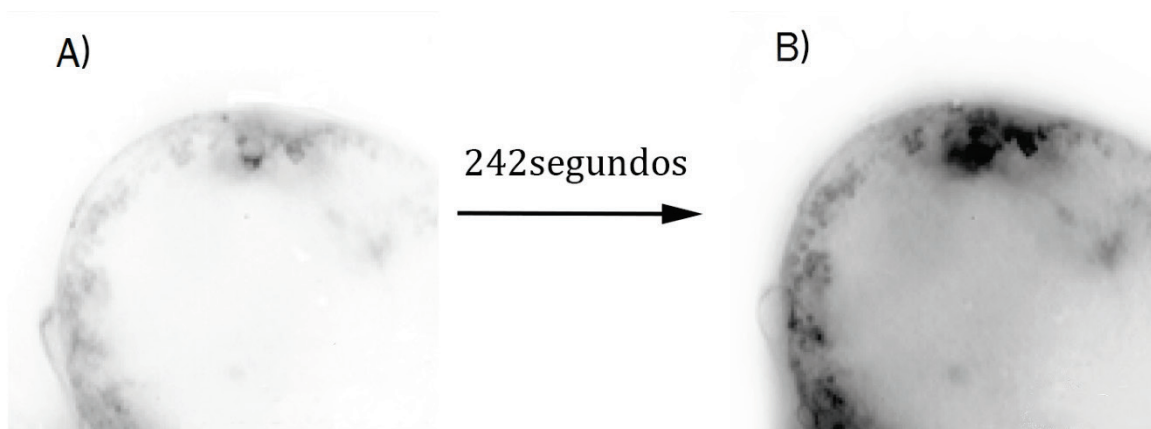


Figura 1.14 Imágenes de fluorescencia una región del soma de una neurona de Retzius. A) antes y B) 242 segundos después de ser estimulada con un tren de pulsos cuadrados a 20 Hz en presencia de $2 \mu\text{M}$ de FM 1-43. Modificado de [3].

1.1.8.5 Dependencia de la exocitosis somática al calcio

La secreción somática en neurona de Retzius depende de la entrada transmembranal de calcio seguida por la liberación de calcio de depósitos intracelulares [33]. La entrada de calcio que acopla a la secreción somática con la excitación se da a través de canales de calcio de tipo L [3]. Dichos canales se activan con estimulación eléctrica, y a altas frecuencias de estimulación la entrada de calcio activa la liberación de calcio almacenado en el retículo endoplasmático. Esto parece activar la síntesis de ATP en las mitocondrias, que en turno activa el transporte vesicular mediado por motores de kinesina adosados a microtúbulos [34, 44] (**Figura 1.15**).

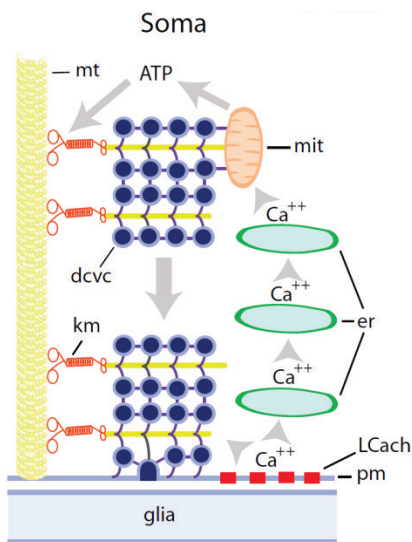


Figura 1.15 Representación esquemática de la exocitosis somática de vesículas de núcleo denso en neuronas de Retzius. Estimulación eléctrica con trenes de pulsos cuadrados de 10-20Hz produce la entrada de calcio a través de canales tipo-L (LCach). Este calcio a su vez activa la liberación de calcio inducida-por-calcio de progresivamente más reservas internas en el retículo endoplasmático (er). La onda de calcio se propaga a regiones internas del soma y activa la síntesis de ATP en la mitocondria (mit). El incremento de ATP activa a los motores de kinesina (km) que transportan cúmulos de vesículas de núcleo denso (dcvc) a lo largo de microtúbulos (mt) hacia la membrana plasmática (pm), con la cual se fusionan. Esta exocitosis dura del orden de minutos después del final del tren de pulsos cuadrados. La serotonina es liberada sobre células gliales. Tomado de [45]

1.2 MEDICIÓN DE LA EXOCITOSIS SOMÁTICA

1.2.1 TÉCNICAS DE MONITOREO DE SECRECIÓN SOMÁTICA

La liberación de neurotransmisores y hormonas son procesos altamente regulados, los cuales involucran varios mecanismos moleculares. Varios métodos han sido desarrollados para develar la cascada de reacciones bioquímicas que dan lugar a la exocitosis, así como para medir el número de vesículas endocitadas, exocitadas y la cantidad de producto liberado durante el ciclo vesicular en células vivas en tiempo real. Tres de las técnicas más utilizadas para llevar a cabo el monitoreo son: la amperometría, la microscopía de fluorescencia y el *patch-clamp*. Cada técnica tiene limitaciones inherentes, pero han

proporcionado información complementaria acerca de los procesos de secreción vesicular.

1.2.1.1 Amperometría

La amperometría permite la detección de los productos celulares secretados mediante la medición de la corriente generada por la oxidación o reducción del químico con la superficie de un electrodo de fibra de carbono cercano a la célula. Los electrodos de fibra de carbono fueron usados por primera vez por Ponchon et al. en los 80 para medir sustancias libres en el sistema nervioso central [46], y a principios de los 90 Wightman et al. combinaron la amperometría con microelectrodos de fibra de carbono para cuantificar la respuesta secretoria de células cromafines individuales [47].

La velocidad y la sensibilidad con la que permite medidos eventos individuales de exocitosis han permitido la caracterización relaciones espacio-temporales entre la entrada de calcio dependiente de voltaje y los subsecuentes eventos de fusión [48]. Las mediciones con amperometría están limitadas a zonas muy cercanas a la fibra de carbono, además su uso exige conocer perfectamente los materiales y la configuración que ofrezcan mayor selectividad¹¹ y que mejor se ajusten a las condiciones y equipo disponible.

1.2.1.2 Microscopía de fluorescencia

En 1985 Lichtman *et al.* describieron por primera vez la dependencia de la actividad en la toma y liberación de colorantes fluorescentes en estudios de terminales nerviosas motoras en la serpiente [49]. Con el desarrollo de los colorantes de estíril como el FM 1-43, fue posible extender el uso de los colorantes fluorescentes dependientes de la actividad vesicular y membranal [50]. Las características físico-químicas de colorantes como el FM 1-43 los hace muy útiles en estudio del ciclo vesicular:

1. La longitudes de onda de excitación y emisión son diferentes (500 nm y 650 nm para el FM 1-43).
2. Pueden se endocitados por las células al ser diluidos en la solución extracelular, para después ser liberados por exocitosis

¹¹ La selectividad es una medida que indica la porción de la corriente total generada en el electrodo por la sustancia de interés en la presencia de sustancias que interfieran.

3. Su estructura molecular similar a la de los fosfolípidos, es decir cuenta con una cola hidrofóbica formada de cadenas de hidrocarburos y una cabeza hidrofílica conocida como fluoróforo. Esto permite que al producirse la fusión vesicular, las colas hidrofóbicas se introduzcan a la membrana celular.
4. Al introducirse en la membrana plasmática, el colorante incrementa su rendimiento cuántico (incremento en su brillo, aproximadamente 350 veces para el FM 1-43).

Debido a lo anterior la toma de imágenes con cámaras en microscopios ópticos, o con fotomultiplicadores en microscopios confocales; permite la adquisición de información espacio-temporal acerca del tráfico y fusión vesicular en regiones de una célula o en una o más células completas (ej. [3, 33, 34]). Sin embargo, las mediciones suelen estar limitadas a un plano focal por captura y la resolución temporal de este método suele ser bastante inferior a la que poseen los métodos electroquímicos y electrofisiológicos debido a la latencia de captura de cada imagen. Además, en algunos sistemas el ruido puede ser un problema importante debido, por ejemplo, a fluorescencia endógena en la célula.

1.2.1.3 Patch-clamp

Después del descubrimiento de que la electricidad es parte de la fisiología animal, durante el siglo XIX, el registro de la actividad eléctrica en preparaciones biológicas fue posible gracias al desarrollo de sofisticados electrodos. Mucho antes, de que los canales iónicos fueran conocidos, los potenciales de membrana fueron registrados usando simples electrodos de vidrio llenos con agua de mar en experimentos como los de Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar, en los que estudiaron las corrientes iónicas presentes durante los potenciales de acción [11]. En 1949, los principios del *voltage-clamp* (fijación de voltaje) fueron desarrollados por Kenneth Cole. Esta técnica permitió controlar el potencial de membrana, mientras se miden las corrientes iónicas a través de la membrana, y su desarrollo hizo posible el estudio de las relaciones corriente-voltaje en las células. Posteriormente en 1976 Erwin Neher y Bert Sakmann propusieron el uso de micropipetas de vidrio en conjunto con el *voltage-clamp*, así como la creación de parches entre la micropipeta y la membrana celular, con la finalidad de aislar una pequeña región de membrana y reducir el ruido en el registro [53] (**Figura 1.16**). La técnica creada se denominó *patch-clamp*, y a pesar de las primeras limitaciones, con el paso de los años y su uso en múltiples trabajos de investigación (alrededor de 1000 artículos científicos cada año hasta 1995 [54]), la técnica tuvo un continuo desarrollo con la introducción de nuevos protocolos, materiales, equipo y técnicas de análisis.

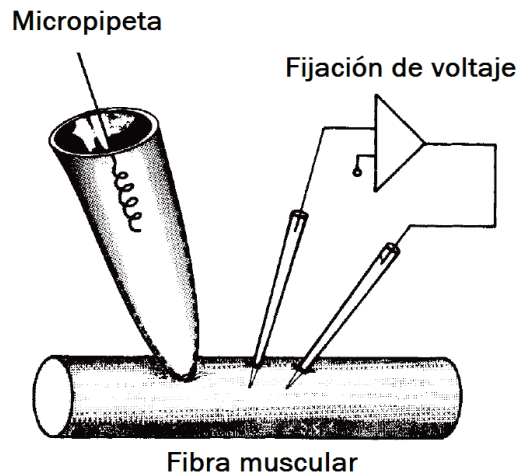


Figura 1.16 Ilustración de la configuración usada por Neher y Sakmann para medir corrientes en canales individuales en fibras musculares de rana. A la derecha están un par de microelectrodos de vidrio que junto con un circuito electrónico tenían la función de fijar el voltaje de la fibra muscular. A la izquierda se encuentra la micropipeta usada para medir la corriente en los canales iónicos. Modificado de [53].

En 1982, Neher y Marty [51] reportaron que la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell* (véase 1.2.2) junto con un análisis de admitancia podía ser usados para monitorear la capacitancia membranal. La cuantificación de secreción mediante esta técnica reporta el cambio total en el área del dieléctrico, y por tanto la exocitosis en la célula completa. Sin embargo, solo es posible medir cambios netos, lo cual hace imposible discernir entre los procesos dinámicos de endocitosis y exocitosis en un instante de tiempo. No obstante, los métodos electrofisiológicos permiten resoluciones temporales del orden de milisegundos, y resoluciones capacitivas del orden de femtofaradios en células de entre 10 y 20 μm , como las células cromafines en [51, 55]. Además, en el caso de eventos de exocitosis con duraciones del orden de minutos como la exocitosis somática en neuronas de Retzius, la cinética de exo-endocitosis puede ser resulta sin dificultades

1.2.2 WHOLE-CELL PATCH-CLAMP

El *patch-clamp* en configuración *whole-cell* fue descrita por primera vez en [55] por Hamill, Neher, Marty et al. (1981). El *whole-cell* es obtenido al romper con presión negativa el parche entre la micropipeta y la célula, sin deshacer el sello previamente formado (**Figura 1.17**). Esta técnica permite estudiar las corrientes iónicas totales en la célula y alterar los constituyentes del citoplasma de acuerdo a las necesidades del experimento.

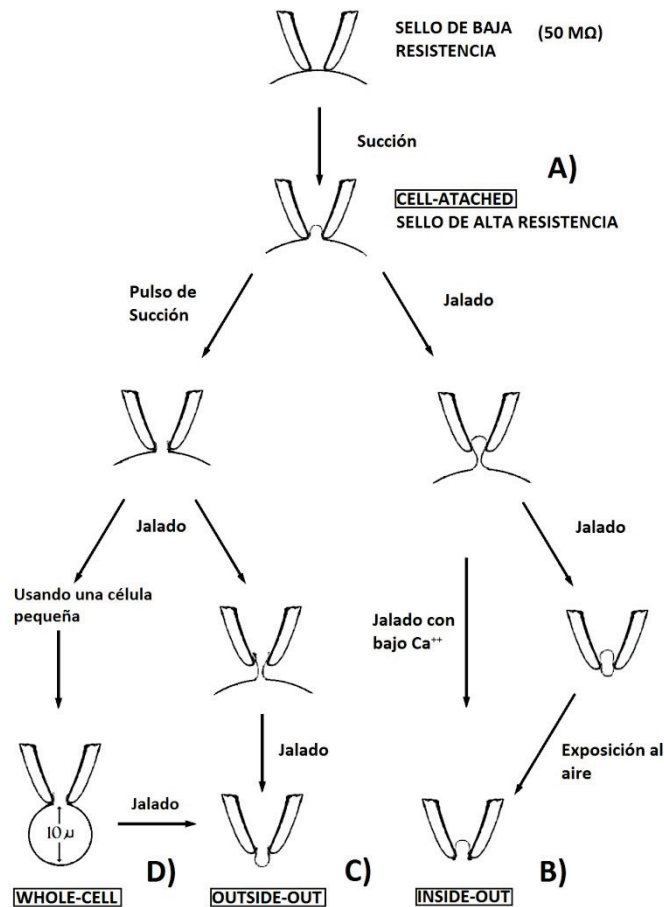


Figura 1.17 Representación esquemática de los procedimientos que llevan a las diferentes configuraciones de **patch-clamp**. A) La configuración en cell-attached es la base del patch-clamp, a partir de ella se llega a cualquier otra configuración. Mediante operaciones de jalado y succión se consigue llegar a las configuraciones de *inside-out* B), *outside-out* C) y *whole-cell* D). Modificado de [54].

1.2.2.1 Montaje para realizar el *patch-clamp*

La gran diversidad de preparaciones experimentales y tipos de experimentos que pueden realizarse con el *patch-clamp* se refleja en una gran variedad de montajes y equipo usados en diferentes laboratorios. En la práctica no existe un estándar, sin embargo hay algunos componentes básicos que deben estar presentes en cualquier montaje funcional de *patch-clamp*. A continuación se describe brevemente a algunos de ellos:

Mesa anti-vibraciones. Movimientos y vibraciones microscópicas están presentes en todos los edificios en mayor o menor medida y deben de ser amortiguados con una mesa anti-vibraciones. Es sobre esta mesa donde irán todos los componentes que puedan producir errores por vibración (**Figura 1.18 A**).

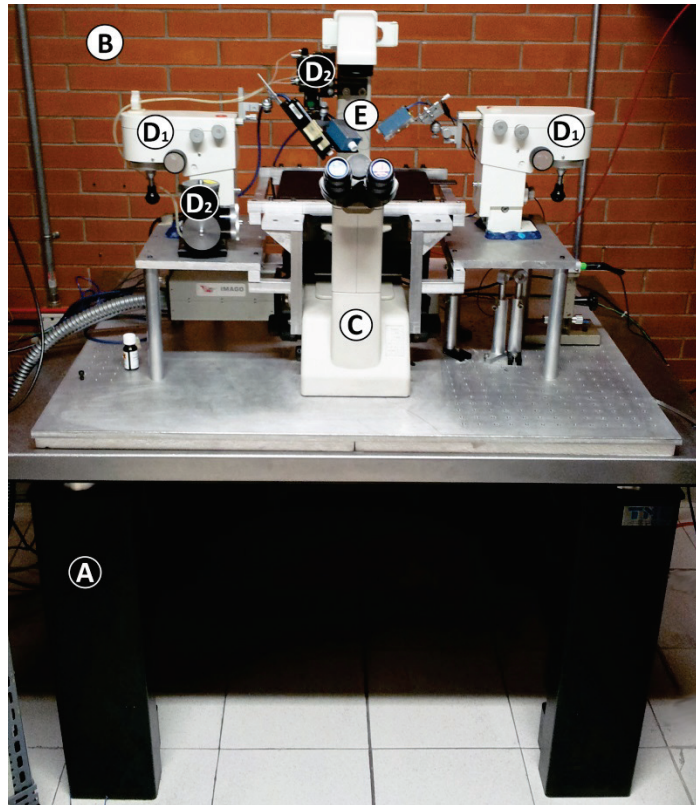


Figura 1.17 Fotografía del montaje usado para realizar *patch-clamp* en esta tesis. A) Mesa anti-vibraciones. B) Jaula de Faraday, puede ser parte de la construcción del cuarto, o ser una más pequeña que cubra al montaje. C) Microscopio invertido. D₁) Micromanipuladores mecánicos y D₂) micromanipulador hidráulicos con el control (abajo) y el efector (arriba).

Jaula de Faraday: La función de la jaula de Faraday es aislar del ruido electromagnético ambiental a la preparación así como a los componentes de electrónicos de precisión (**Figura 1.18 B**).

Microscopio: Cualquier microscopio que permita la observación de la célula con resolución espacial de micrómetros es adecuado para realizar el *patch-clamp*, siempre y cuando posibilite el acceso de la micropipeta a la célula (**Figura 1.18 C**).

Micromanipulador: Su función es dirigir las micropipetas de *patch-clamp* hacia las células, controlando el movimiento en un orden submicrométrico (**Figura 1.18 D**).

Amplificadores: Los amplificadores de registro son la base del *voltage* y *current-clamp*, que a su vez son parte esencial del *patch-clamp*. Como se ha mencionado antes, su función es la de proporcionar control sobre una de las variables (corriente o potencial de membrana), mientras la otra es medida; todo por medio de un único electrodo (**Figura 1.18 E**).

Estimuladores: Los estimuladores son usados para generar protocolos de estimulación en forma señales de voltaje, las cuales son enviadas al amplificador de registro para ser acondicionadas e inyectadas a la célula o membrana. En el caso del presente sistema, se utilizó una PC como estimulador.

1.2.2.2 Amplificador de patch-clamp

Los amplificadores de patch-clamp son los aparatos que contienen la circuitería necesaria para la medición y fijación de voltaje y corriente. Los amplificadores de patch-clamp tienen una pequeña extensión conocida como headstage (cabezal), dentro de la cual se encuentra el circuito eléctrico más importante del amplificador, el convertidor corriente-voltaje. En el caso del *voltage-clamp* o fijación de voltaje, el circuito convertidor con retroalimentación resistiva mostrado en la **Figura 1.19**, funciona de la siguiente forma: la corriente (I_p) que fluye a través del electrodo, atraviesa un resistor de alta impedancia (R) que causa una caída de voltaje (V_o) que es proporcional a I_p ; además un amplificador operacional es usado para ajustar automáticamente el voltaje de la fuente (V_s) y mantener el potencial en la micropipeta tan cercano al potencial de referencia como sea posible (V_{ref} , señal de estimulación). Dado que la respuesta del amplificador operacional es bastante rápida, puede asumirse para efectos prácticos que el potencial de la célula es igual al voltaje de referencia ($V_p = V_{ref}$). Cuando fluye corriente en la membrana a través de canales iónicos, V_p es desplazado instantáneamente del valor de V_{ref} . El amplificador consigue mantener la igualdad $V_p = V_{ref}$ modulando la amplitud de I_p .

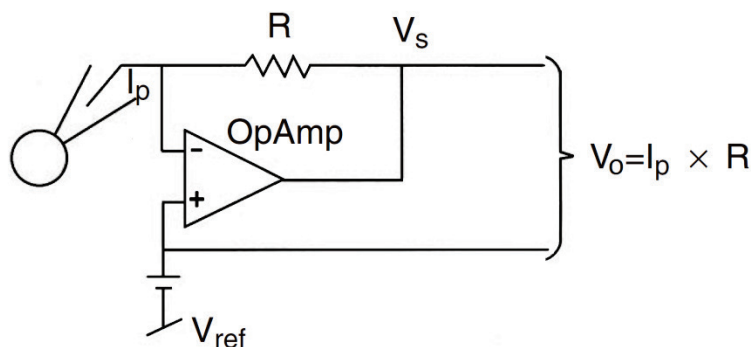


Figura 1.19 Diagrama eléctrico de un convertidor corriente-voltaje. I_p es la corriente de la pipeta, R es la resistencia de realimentación, V_{ref} es el voltaje de referencia o de estimulación, V_s es la corriente de la pipeta y V_o es la salida del convertidor. Modificado de [56].

1.2.2.3 Micropipetas, electrodo y soporte

Las pipetas de patch-clamp tienen tres funciones en el registro de actividad electrofisiológica: la creación de sellos que impiden la fuga de corriente durante la medición, la contención del puente líquido que conecta el electrodo con la superficie o el interior de la célula, y como aislantes permitiendo medir las corrientes iónicas con bajos niveles de ruido. Las propiedades eléctricas de las pipetas dependen del material con que son hechas, así como de su geometría, es por eso que para cada tipo de registro es necesario fabricar micropipetas *ad hoc*. Las micropipetas para *whole-cell* deben tener longitudes de estrechamiento de hasta 5 mm, diámetros en la punta de entre 2 y 4 μm y resistencias de entre 1 y 10 M Ω [57] (**Figura 1.20**).

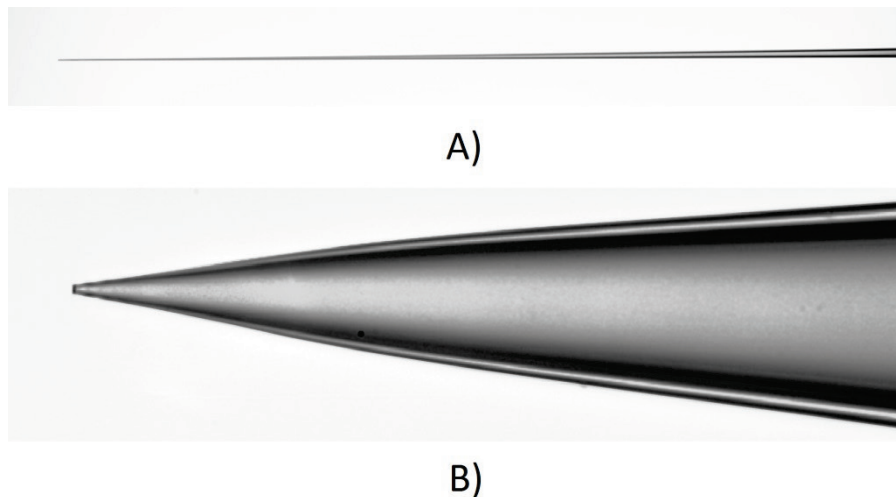


Figura 1.20 Fotografías de puntas de una micropipeta y un microelectrodo con magnificaciones de 400x. A) Microelectrodo para registro intracelular con 0.06 μm de diámetro en la punta y una longitud de estrechamiento de 1.2 mm B) Micropipeta para *whole-cell* con aproximadamente 2 μm de diámetro en la punta y una longitud de estrechamiento de 4 mm. Modificado de [57].

El primer paso en la fabricación de micropipetas adecuadas es la elección del material. El material elegido en este proyecto es el borosilicato pues es relativamente económico, tiene propiedades eléctricas y mecánicas aceptables, y permite la fabricación de puntas de 3 μm o más [57]. El segundo paso es el “jalado” de las pipetas, o propiamente, de los tubos capilares de vidrio de los cuales se derivan. Este procedimiento se lleva a cabo por medio de un aparato llamado *puller*, el cual en su forma más simple, pasa corriente a través de un filamento hecho de tungsteno o platino y jala de un tubo capilar de vidrio mientras este comienza derretirse por el calor del filamento (**Figura 1.21**). En el caso de las pipetas para *whole-cell*, suele ser necesario el uso de varios ciclos de jalado para poder fabricarlo con la geometría adecuada.

El tercer paso consiste en recubrir la punta, y en ocasiones la micropipeta completa, con un material hidrofóbico y con malas propiedades de dieléctricas, con la finalidad de formar un mejor sello, aminorar el ruido de la pipeta y reducir la capacitancia parasita de la pipeta. Sin embargo, aunque este paso es obligatorio para pipetas de registro de canal único, suele no serlo para pipetas de *whole-cell*. El cuarto y último paso, consiste en el pulido de la punta de la micropipeta por medio de calor. Este procedimiento ayuda a la formación del sello previniendo la ruptura de la membrana celular por irregularidades en la superficie de la punta.

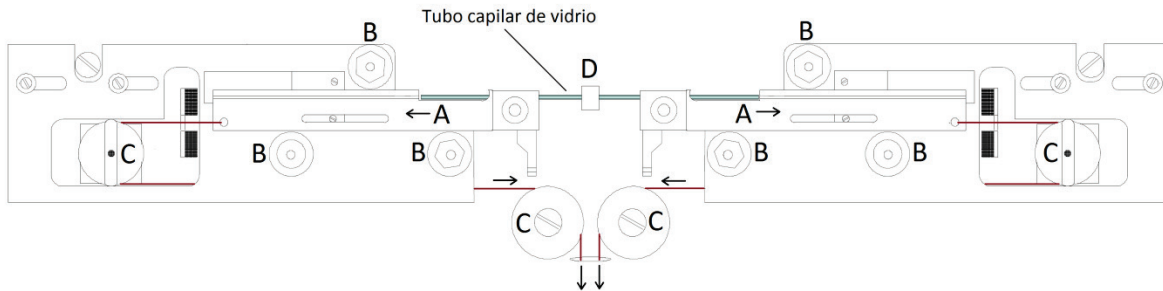


Figura 1.21 Esquema del mecanismo para jalar tubos capilares del *puller P-97* de Sutter Instruments. A) Barras de jalado en las cuales se sujeta a los tubos capilares, B) guías para las barras de jalado, C) poleas para los cables (en color rojo) que tiran de las barras de jalado, D) filamento para calentar los tubos de vidrio. Modificado de [58].

En los registros con *patch-clamp*, solo dos electrodos son usados, el electrodo de la micropipeta que sirve para estimular y registrar la actividad eléctrica, y el del baño o solución extracelular que funciona como referencia. Es importante el uso de electrodos tan idénticos como sea posible (en material y área superficial), hechos de materiales con potenciales de reducción bajos para evitar diferencias de potencial entre ambos electrodos por reacciones de reducción. Por otro lado, debido al envío de señales de estimulación a través de los electrodos, por momentos puede haber diferencias de potencial entre ambos, lo cual puede conducir a la polarización de los electrodos (**Figura**

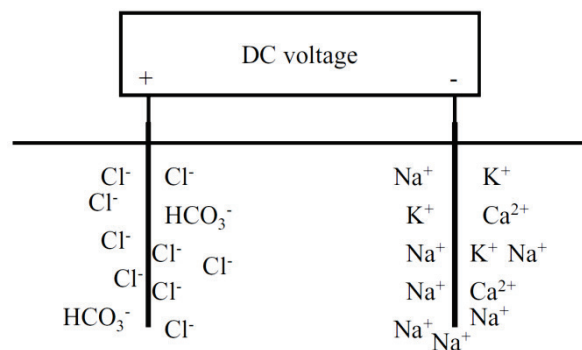


Figura 1.22 La polarización de los electrodos retrasa los cambios de potencial como lo haría un capacitor. Modificado de [59].

1.22). Esto sucede por la acumulación de iones con cargas opuestas a la de los electrodos, es decir, los cationes se acumulan alrededor del ánodo, y los aniones alrededor del cátodo. La acumulación de cargas provoca un efecto similar al de un capacitor, produciendo retrasos en las señales. Para evitar todos estos efectos indeseables, se recomienda el uso de electrodos de platino (Pt) o de plata clorurada (alambre de Ag con una capa de AgCl).

Por otro lado, el soporte de la micropipeta o holder, es un dispositivo en el cual se monta la micropipeta y el electrodo, y el cual permite la aplicación de presiones positivas o negativas dentro de la micropipeta. Además cumple la función de adaptador, conectando el electrodo al headstage del amplificador (**Figura 1.23**).

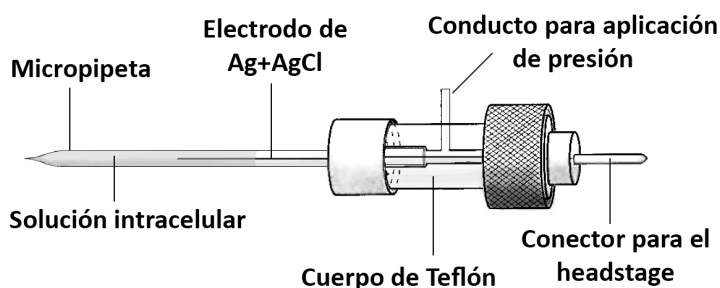


Figura 1.23 Ilustración esquemática de un *holder* o soporte para pipetas con succión. Basado en el *holder* HL-U de Axon Instruments.

1.2.2.4 Procedimientos experimentales

Durante realización de los experimentos, la micropipeta tiene que ser desplazada para entrar en contacto con la membrana celular, formar el sello y romper el parche. Para hacerlo, además de un microscopio, es necesario monitorear la resistencia de la pipeta aplicando un pequeño pulso de voltaje de entre 2 y 5mV a través del amplificador. Al meter el electrodo al baño, la señal de corriente debe de corresponder a la respuesta de un resistor (**Figura 1.24 A**). Una vez que el electrodo hace contacto con la célula, la resistencia debe aumentar espontáneamente de un 10 a 50%, además se aprecia la aparición de transitorios capacitivos originados por capacitancias parasitas de la micropipeta (**Figura 1.24 B**).

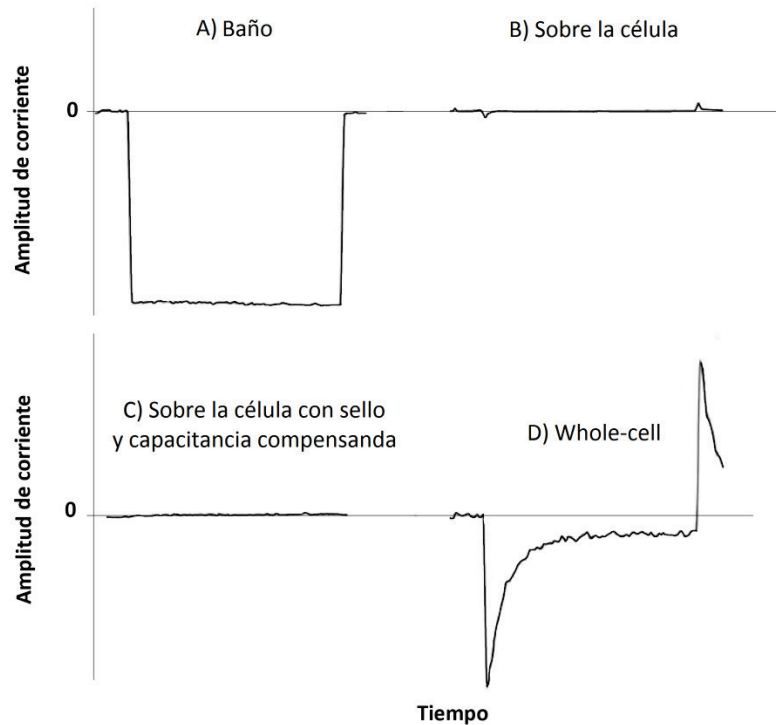


Figura 1.24 Trazos de corriente durante el establecimiento de un registro en *whole-cell*. A) La micropipeta dentro del baño. B) La micropipeta sobre la célula después de la formación del sello, C) y posteriormente con la capacitancia compensada. D) Después de la ruptura del parche.

Por medio de la aplicación de presión negativa dentro de la micropipeta a través del holder, se consigue la formación de un sello entre la membrana celular y la micropipeta. Esto se traduce en un aumento importante de la resistencia del orden de los gigaohms. Posteriormente la capacitancia de la micropipeta puede ser compensada (neutralizada) por medio de ajustes de compensación presentes en todos los amplificadores de patch-clamp comerciales (**Figura 1.24 C**). Finalmente, para romper el parche de membrana bajo el electrodo y tener acceso directo al citoplasma, es necesario efectuar un breve pulso de succión. El resultado, es una caída enorme de la resistencia y la aparición de transitorios capacitivos debidos a la capacitancia total de la célula (**Figura 1.24 D**).

1.2.2.5 Circuito equivalente de una célula en *whole-cell*

Como resultado de poner a la célula en *whole-cell* el circuito equivalente es el mostrado a continuación en la **Figura 1.25**:

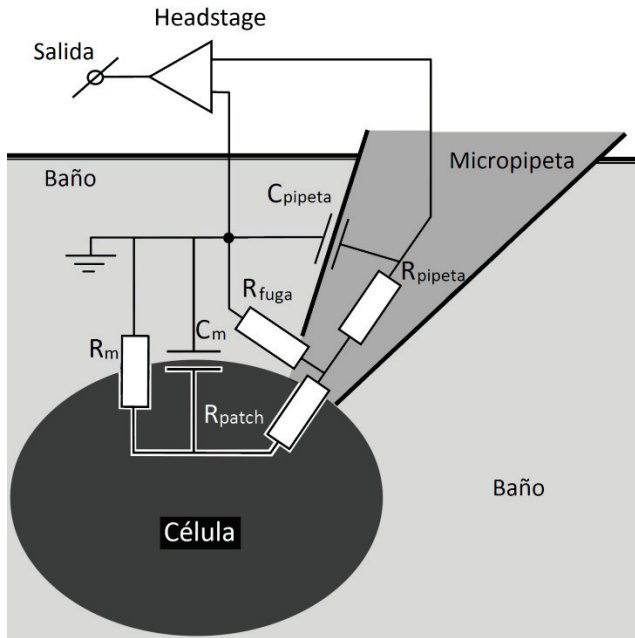


Figura 1.25 Circuito equivalente a una célula en whole-cell. C_{pipeta} es la capacitancia de la micropipeta debida al dieléctrico formado por el vidrio, así como R_{pipeta} es la resistencia de la micropipeta. R_{fuga} es la resistencia por la cual se fuga corriente en el sello. C_m y R_m son la capacitancia y la resistencia de la membrana celular respectivamente, R_{patch} es la resistencia del parche de membrana. Modificado de [59].

Donde G_m es la suma de la conductancia de todos los canales iónicos en la membrana plasmática

$$G_m = \frac{1}{R_m} = G_{Na} + G_K + G_{Cl} + G_{Ca}, \quad (1.8)$$

C_m es la capacitancia de toda la membrana celular, C_{pipeta} es la capacitancia formada entre la micropipeta y el baño, ya que el baño es conectado a tierra y del otro lado del vidrio se envían los estímulos de voltaje; R_{pipeta} es la resistencia del electrodo y la micropipeta; R_{fuga} es la resistencia por la cual se fuga electricidad en el sello entre la membrana y la pipeta; y R_{patch} es la resistencia que se forma por el parche de membrana.

1.2.2.6 Modelo simplificado de la neurona en whole-cell

Por procedimientos prácticos es posible obtener una forma simplificada del mismo que permite un desarrollo matemático más sencillo conservando la dinámica del sistema (**Figura 1.26 B**). La resistencia de fuga en el sello R_{fuga} , puede ser llevada a magnitudes muy altas (i.e. GOhm) creando un sello muy firme entre la pipeta y la célula ($R_{fuga} \rightarrow \infty$). En el caso de C_{pipeta} , su magnitud puede reducirse por varios medios, llevando su valor prácticamente a cero. En principio su valor es comúnmente de algunos picofarads y puede mantenerse pequeño usando la cantidad mínima necesaria de solución extracelular (baño), de tal modo que el área de contacto entre ambas sea pequeña. Además pueden

emplearse recubrimientos de Sylgard (elastómero de silicón) o cera dental en la superficie de la pipeta, de tal modo que el dieléctrico entre la solución de la micropipeta y el baño se vea afectado reduciendo la capacitancia. Por último, se puede utilizar la función de compensación de capacitancia de la micropipeta, incluida cualquier amplificador comercial de patch-clamp. Al eliminarse C_{pipeta} y R_{fuga} del circuito, R_{pipeta} y R_{patch} quedan en serie, cuya resistencia equivalente se denomina comúnmente en la literatura como resistencia de acceso (R_a).

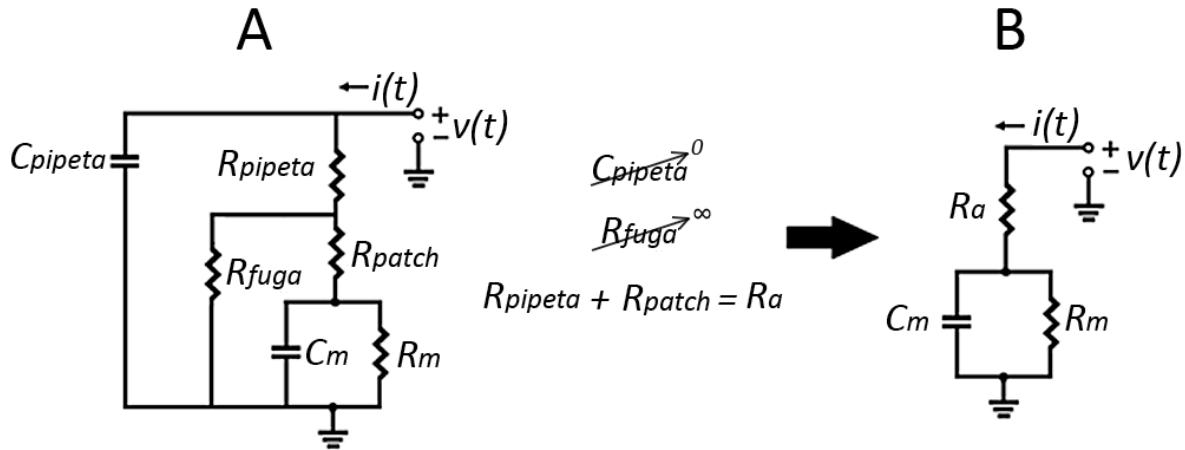


Figura 1.26 Diagramas esquemáticos de circuitos equivalentes a la célula en whole-cell. La representación (A) más exacta puede ser (B) simplificada por procedimientos prácticos reduciendo el circuito a tres elementos.

Los valores promedio de los componentes en neuronas de Retzius, se presentan en la siguiente tabla (Tabla 1.1), y a modo de comparación también se muestran los valores de células cromafines, las cuales son células neuroendocrinas en las que se han hecho mediciones de capacitancia durante eventos de secreción.

Tabla 1.1 Valores promedio de los componentes eléctricos, $R_a=25\text{M}\Omega$			
Célula	Diámetro	C_m	R_m
Neurona de Retzius	60-80 μm	1.2nF	50M Ω
Célula cromafin	10-20 μm	22pF	500M Ω

1.2.3 CUANTIFICACIÓN DE SECRECIÓN EN *WHOLE-CELL*

1.2.3.1 Estimación por estimulación con ondas cuadradas

Los métodos de estimulación con ondas cuadradas, también como “métodos en el dominio del tiempo”, son quizás los métodos más intuitivos por contar generalmente con mayor sencillez conceptual y matemática. Fueron introducidos por Lindau y Neher en 1988 [60], y en su forma más básica, consisten en estimular al sistema con un pulso cuadrado de voltaje, y a partir de la respuesta en corriente, calcular de forma muy directa un par de los componentes del sistema, tal y como se aprecia en la **Figura 1.27**. Al conocer I_{ra} e I_{ra+rm} , puede calcularse por ley ohm el valor de las resistencias R_a y R_m . Posteriormente para estimar la magnitud de C_m pueden usarse dos métodos. Uno integrando el área bajo la curva en el segmento transitorio de la respuesta, o el otro, ajustando exponenciales a los datos del segmento transitorio de la respuesta.

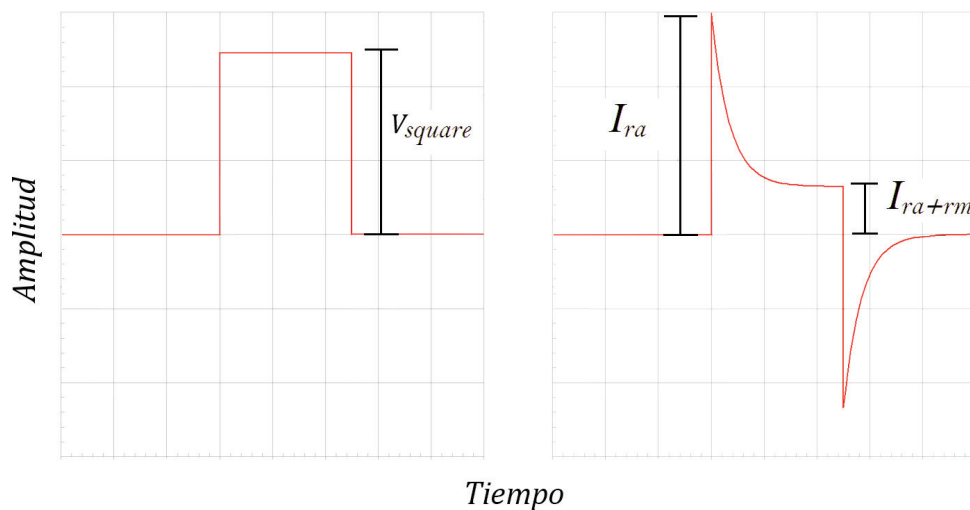


Figura 1.27 Gráficas de las señales de estímulo y respuesta, e identificación de corrientes resistivas en el método de estimación con ondas cuadradas. Un pulso de voltaje V_{square} es enviado a una célula y su respuesta en corriente presenta un pico al inicio, el cual idealmente es igual a la corriente que pasa únicamente por la resistencia R_a . En la parte final del pulso de voltaje, la respuesta del sistema entra a un estado estable en el cual la corriente total del sistema es igual a la corriente que pasa a través de R_a y R_m .

El método de integración, llamado *Q-method* fue desarrollado en 2006 por Novák, P. y Zahradník, I., [61], y ha demostrado tener alta resistencia al ruido y a errores inducidos por cambios en las resistencias, consiguiendo resoluciones muy cercanas al límite teórico. Una de sus mayores virtudes es la rapidez de los algoritmos de cálculo, llegando a ejecutar hasta 40,000 estimaciones de por segundo en computadoras contemporáneas al trabajo.

Sin embargo, de acuerdo con sus creadores, para conseguir cálculos suficientemente fiables se requiere que la frecuencia del pulso y por lo tanto de cada estimación, sea como máximo:

$$f_{Q \max} = \frac{1}{12 * \tau}, \quad \tau = \frac{R_m * R_a * C_m}{R_m + R_a}$$

donde τ es la constante de tiempo del sistema. En el caso de las células de Retzius cuyos valores promedio de capacitancia y resistencia se muestran en la Tabla 1.1, produce valores muy bajos de frecuencia de estimación:

$$R_a = 25 \text{ MOhm, en promedio para whole - cell,}$$

$$f_{Q \max \text{ Cromafin}} \approx 159 \text{ estimaciones por segundo}$$

$$f_{Q \max \text{ Retzius}} \approx 3.9 \text{ estimaciones por segundo}$$

La frecuencia de estimación con el método Q en células de Retzius puede ser impráctico, debido a que una frecuencia de muestreo de 4Hz puede generar una importante pérdida de información.

Por otro lado, el método de ajuste de exponenciales sufre del mismo inconveniente causado por el uso de pulsos cuadrados. Sin embargo, en este método el tiempo requerido por estimación puede ser mayor debido a que consiste en algoritmos iterativos para la el ajuste de exponenciales. Tradicionalmente ha sido ejecutado “*offline*”. Actualmente existen optimizaciones a este método [62], sin embargo, su aplicación en el monitoreo de neuronas de Retzius, sigue estando limitada por la constante de tiempo de la célula. Por último, un problema común en muchos de los métodos de estimación por estimulación con pulsos cuadrados, es que el pico máximo de corriente en la parte transitoria de la respuesta, puede resultar imposible de muestrear, o puede estar severamente afectado por ruido térmico, electromagnético, o biológico; por capacitancias parasitas o por filtros en el equipo. Esto puede producir que el cálculo de R_a sea muy impreciso y arrastre errores en el resto de las operaciones.

1.2.3.2 Estimación por estimulación con ruido

Los métodos de estimación y monitoreo de cambios en los componentes o parámetros eléctricos se basan en cálculos en el dominio de la frecuencia, generalmente por medio de transformadas rápidas de Fourier. En esencia estos métodos consisten en hallar la función

de transferencia de la célula en whole-cell definida por la relación de la corriente entre el voltaje en el dominio de la frecuencia (admitancia) [54].

A partir de él se pueden calcular fácilmente los valores de los componentes del sistema. Además, por medio de adición de algoritmos más complejos ha sido posible la obtención de estimaciones altamente precisas, permitiendo incluso la estimación de parámetros en neuronas no isopotenciales, y con sus neuritas (axones o dendritas) intactas [63]. Sin embargo, debido a que el ancho de banda de las neuronas de Retzius está situado aproximadamente entre los 10 y 80 Hz, la cuantificación de cambios capacitivos en tiempo real, no resulta muy práctica. Los tiempos de estimación con ruido blanco necesarios para poder obtener sets de datos suficientes en el ancho de banda del sistema, son demasiado largos e impiden la generación de una tasa de estimaciones por segundo suficiente.

1.2.3.3 Estimación por estimulación con ondas senoidales

Los métodos de estimación y monitoreo por estimulación con sinusoidales fueron introducidos por Neher y Marty en [51]. En ese trabajo se propone la utilización de una sencilla identidad trigonométrica para detectar cambios en la corriente de respuesta a ángulos de fase determinados, nombrándola detección sensible a la fase. En esencia la detección sensible a la fase (véase 1.2.4) funciona descomponiendo la corriente membranal en dos corrientes ortogonales, la corriente capacitiva y la resistiva. Las amplitudes de dichas corrientes pueden ser calculadas por métodos computacionalmente económicos, lo cual permite monitorear las variaciones de capacitancia de membrana midiendo un valor escalar y discriminando cambios de corriente debidos a la resistencia de membrana.

Debido a lo expuesto anteriormente, y a que durante mucho tiempo este método fue el único que permitió monitorear en tiempo real cambios capacitivos en las células, ha sido usado en la mayor parte de los trabajos que involucran la medición de endocitosis y exocitosis tales como: la comunicación entre células gustativas y terminales nerviosas [64], los efectos de la hemocromatosis¹² en la endocitosis y exocitosis de transferrina¹³ [65], o la dinámica de la exocitosis de insulina en células pancreáticas [66].

Algunas modificaciones a este método han sido desarrolladas. En [67] y [68] se propone el uso de una estimulación compuesta por la suma de dos senoidales armónicas, con el fin

¹²

¹³

de sobredeterminar el sistema de ecuaciones que describe a la célula en whole-cell. Sin embargo, cada una de las senoidales debe tener la mitad de la amplitud usada en métodos de senoidal simple, reduciendo considerablemente la relación señal a ruido [69]. Por otro lado, en [70] y [71] se propone la compensación de por software de las capacitancias y resistencias parasitas dentro de los amplificadores de *patch-clamp*, con el fin de mejorar la precisión en las mediciones.

El uso de estos métodos tiene algunas limitaciones que deben considerarse durante el diseño experimental y el análisis de datos. Su aplicación necesita de la asunción de que el potencial de equilibrio de todas las especies iónicas se mantiene constante durante todo el experimento, lo cual no es verdadero. Además, se asume que la célula estudiada es isopotencial, lo cual provoca errores especialmente importantes en células que cuentan con somas muy diferentes a los una esfera, y con muchas ramificaciones [69]. La mayoría de las variantes del método están optimizadas, y han sido usadas con células de tamaño pequeño a mediano (10-30 μm), sin embargo, en células grandes como la neurona de Retzius, se pueden producir errores importantes en la medición de cambios capacitivos debidos a cambios en resistencia de acceso [70]. Por otro lado, dado que la neurona de Retzius es bastante grande, y el valor de sus componentes resistivos y capacitivos genera una constante de tiempo muy grande, resulta imposible el uso de cualquier otro método que no sea el de estimulación con ondas sinusoidales para alcanzar el objetivo con suficiente precisión y alta resolución temporal.

Como se ha señalado anteriormente, la mayor parte de los métodos desarrollados actualmente no son adecuados para su uso con células grandes como la neurona de Retzius, es por eso que en el presente trabajo se propone generalizaciones de algunas ecuaciones así como algunas estrategias matemáticas y técnicas para obtener mediciones estables y con bajo ruido con neuronas de Retzius.

1.2.4 PRINCIPIOS MATEMÁTICO DE LA DETECCIÓN SENSIBLE A LA FASE

A continuación se muestra detalladamente el principio matemático en el que se basa la detección sensible a la fase, la cual permite la detección de cambios resistivos y capacitivos en las células, y por consiguiente, la detección y monitoreo eventos de exocitosis y endocitosis. En primer lugar, si a un sistema como el mostrado en la **Figura 1.26** se le estimula con una señal de voltaje sinusoidal $v(t) = A_v \text{sen}(\omega t)$, la corriente total ($i(t)$) del sistema será igualmente una señal sinusoidal con amplitud A_i y fase distinta a la del estímulo,

$$i(t) = A_i \text{sen}(\omega t + \beta),$$

la cual puede ser separada en dos corrientes ortogonales en fases (α) y $(\alpha + \frac{\pi}{2})$ por medio de la siguiente identidad trigonométrica:

$$\text{sen}(x + y) = \text{sen}(x)\cos(y) + \cos(x)\text{sen}(y)$$

si

$$x = \omega t + \alpha, \quad y = \beta - \alpha$$

entonces

$$\text{sen}(\omega t + \beta) = \text{sen}(\omega t + \alpha) \cos(\beta - \alpha) + \cos(\omega t + \alpha) \text{sen}(\beta - \alpha),$$

por lo tanto,

$$i(t) = A_i \text{sen}(\omega t + \beta) = A_i \cos(\beta - \alpha) \text{sen}(\omega t + \alpha) + A_i \text{sen}(\beta - \alpha) \cos(\omega t + \alpha),$$

Si

$$A_{i1} = A_i \cos(\beta - \alpha), \quad A_{i2} = A_i \text{sen}(\beta - \alpha)$$

$$i(t) = A_i \text{sen}(\omega t + \beta) = A_{i1} \text{sen}(\omega t + \alpha) + A_{i2} \text{sen}\left(\omega t + \alpha + \frac{\pi}{2}\right),$$

Cada una de las corrientes ortogonales es multiplicada por coeficientes constantes (A_{i1}, A_{i2}), los cuales determinan la amplitud de la corriente que circula por el sistema en esa fase $(\alpha + \frac{\pi}{2}, \alpha)$, y cuya magnitud depende de variaciones en los componentes del circuito. Si α es fijado a la fase en la que se dan los cambios de corriente capacitiva, entonces es posible medir los cambios capacitivos en la célula durante eventos de exocitosis, despreciando los cambios resistivos en la membrana, debido a que dichos cambios se dan en $\alpha + \frac{\pi}{2}$. Por otro lado, una forma muy sencilla y computacionalmente eficiente de calcular el valor de los coeficientes A_{i1} y A_{i2} , es utilizando otra identidad trigonométrica,

$$\text{sen}(w)\text{sen}(z) = \frac{\cos(w - z) - \cos(w + z)}{2},$$

si

$$w = \omega t + \beta, \quad z = \omega t + \alpha$$

entonces

$$\text{sen}(\omega t + \beta)\text{sen}(\omega t + \alpha) = \frac{\cos(\beta - \alpha) - \cos(2\omega t + \beta + \alpha)}{2},$$

en el caso de A_{i1} (el desarrollo para A_{i2} es similar),

$$i(t)\text{sen}(\omega t + \alpha) = A_i\text{sen}(\omega t + \beta)\text{sen}(\omega t + \alpha) = \frac{A_i}{2}\cos(\beta - \alpha) - \frac{A_i}{2}\cos(2\omega t + \beta + \alpha)$$

Además integrando la expresión anterior en un periodo T ,

$$T = \frac{2\pi}{\omega}$$

$$\frac{1}{T} \int_0^T \frac{A_i}{2} \cos(\beta - \alpha) - \frac{A_i}{2} \cos(2\omega t + \beta + \alpha) = \frac{A_i}{2} \cos(\beta - \alpha) = \frac{A_{i1}}{2}, \quad (1.1)$$

Como requisito previo para poder hacer la detección sensible a la fase, es necesario conocer el valor inicial o basal de los componentes eléctricos del sistema, para poder calcular el valor del ángulo de fase de los cambios de corriente capacitiva.

1.2.5 MODELO MATEMÁTICO DE LA NEURONA EN *WHOLE-CELL*

1.2.5.1 Corriente del circuito ante excitación de voltaje senoidal

A continuación se presenta el modelo matemático que permite conocer la corriente que circula en todo el circuito (célula en *whole-cell*) cuando es estimulado con un voltaje sinusoidal ($v(t)$). Este modelo es de gran utilidad en el desarrollo matemático de secciones posteriores de este trabajo. Dado que la corriente total del sistema ($i(t)$) es igual a la corriente de R_a ($i_{Ra}(t)$), que es la suma de las corrientes de C_m ($i_{Cm}(t)$) y R_m ($i_{Rm}(t)$),

$$i(t) = i_{Ra}(t) = i_{Cm}(t) + i_{Rm}(t), \quad (1.2)$$

una forma de hallar una expresión para i_{Ra} es primero encontrar expresiones matemáticas para i_{Cm} e i_{Rm} . Esto puede hacerse de la siguiente forma:

$$v(t) = v_{Ra}(t) + v_{Cm}(t) = v_{Ra}(t) + v_{Rm}(t)$$

Donde v_{Ra} es el voltaje de R_a , v_{Cm} es el voltaje de C_m , y v_{Rm} es el voltaje de R_m . Primero haciendo el procedimiento para i_{Cm} (Por simplicidad en la notación, en adelante sólo las variables de voltaje y corriente totales del sistema serán escritas con el tiempo como argumento):

$$v(t) = v_{Ra} + v_{Cm} = (i_{Cm} + i_{Rm})R_a + \frac{1}{C_m} \int i_{Cm} dt$$

$$v(t) = \left(i_{cm} + \frac{v_{cm}}{R_m}\right)R_a + \frac{1}{C_m} \int i_{cm} dt = i_{cm}R_a + \left(\frac{R_a}{R_m C_m} + \frac{1}{C_m}\right) \int i_{cm} dt$$

Transformando al dominio de la frecuencia por medio de la Transformada de Laplace con condiciones iniciales iguales a cero,

$$\mathcal{L}\{v(t)\} = v(s) = I_{cm}R_a + \left(\frac{R_a}{R_m C_m} + \frac{1}{C_m}\right) \frac{I_{cm}}{s}$$

$$\therefore I_{cm} = \frac{R_m C_m s v(s)}{R_a + R_m + R_a R_m C_m s}, \quad (1.3)$$

Por otro lado para i_{Rm} :

$$v(t) = v_{Ra} + v_{Rm} = (i_{cm} + i_{Rm})R_a + i_{Rm}R_m$$

$$v(t) = \left(C_m \frac{dv_{cm}}{dt} + i_{Rm}\right)R_a + i_{Rm}R_m = \left(C_m R_m \frac{d(i_{Rm})}{dt} + i_{Rm}\right)R_a + i_{Rm}R_m$$

Transformando al dominio de la frecuencia con condiciones iniciales iguales a cero,

$$\mathcal{L}\{v(t)\} = v(s) = (sC_m R_m I_{Rm} + I_{Rm})R_a + I_{Rm}R_m$$

$$\therefore I_{Rm} = \frac{v(s)}{(sC_m R_m + 1)R_a + R_m}, \quad (1.4)$$

Entonces transformando (1.2) al dominio de la frecuencia y sustituyendo (1.3) y (1.4),

$$\mathcal{L}\{i(t)\} = I(s) = I_{cm} + I_{Rm}$$

$$I(s) = v(s) \frac{sR_m C_m + 1}{R_a + R_m + sR_a R_m C_m}, \quad (1.5)$$

Como $v(t)$ es una señal sinusoidal de amplitud V y frecuencia ω , entonces

$$v(s) = \mathcal{L}\{v(t)\} = \mathcal{L}\{V\sin(\omega t)\} = V \frac{\omega}{s^2 + \omega^2},$$

$$I(s) = (V\omega) \frac{sR_m C_m + 1}{(R_a + R_m + sR_a R_m C_m)(s^2 + \omega^2)}, \quad (1.6)$$

para hallar una forma transformable de (1.6), esta ecuación puede separarse en fracciones parciales,

$$(V\omega) \left(\frac{sR_m C_m + 1}{(R_a + R_m + sR_a R_m C_m)(s^2 + \omega^2)} \right) = (V\omega) \left(\frac{As + B}{s^2 + \omega^2} + \frac{C}{R_a + R_m + sR_a R_m C_m} \right),$$

donde

$$A = \frac{R_m^2 C_m}{D}, \quad B = \frac{R_m^2 C_m^2 R_a \omega^2 + R_a + R_m}{D}, \quad C = -\frac{R_m^3 C_m^2 R_a}{D},$$

$$D = R_a^2 + 2R_a R_m + R_m^2 + R_m^2 C_m^2 R_a^2 \omega^2,$$

sustituyendo las fracciones parciales en (1.6),

$$I(s) = V\omega \left(\left(\frac{R_m^2 C_m}{D} \right) \left(\frac{s}{s^2 + \omega^2} \right) + \left(\frac{R_m^2 C_m^2 R_a \omega^2 + R_m + R_a}{\omega D} \right) \left(\frac{\omega}{s^2 + \omega^2} \right) + \left(\frac{R_m^2 C_m}{D} \right) \left(\frac{1}{s + \frac{R_m + R_a}{R_m R_a C_m}} \right) \right) \quad (1.7)$$

Finalmente, transformando (1.7) al dominio del tiempo,

$$I_{Ra} = V\omega \left(\left(\frac{R_m^2 C_m^2 R_a \omega^2 + R_m + R_a}{\omega D} \right) \text{sen}(\omega t) + \left(\frac{R_m^2 C_m}{D} \right) \left(\cos(\omega t) + e^{\left(-\frac{R_m + R_a}{R_m R_a C_m} t \right)} \right) \right),$$

Este modelo, fue útil en las simulaciones.

1.2.5.2 Corriente del circuito ante una excitación escalón de voltaje

A continuación se presenta el modelo matemático que permite conocer la corriente que circula en todo el circuito (célula en *whole-cell*) cuando es estimulado con un escalón de voltaje ($u(t)$) de amplitud A_u . Retomando la ecuación (1.5) y cambiando $v(s)$ o por $u(s)$

$$I(s) = u(s) \frac{sR_m C_m + 1}{R_a + R_m + sR_a R_m C_m}$$

Si

$$u(s) = \mathcal{L}\{u(t)\} = \mathcal{L}\{A_u\} = \frac{A_u}{s}$$

Entonces

$$I(s) = \frac{\frac{A_u}{R_a}}{s + \frac{R_a + R_m}{R_a R_m C_m}} + \frac{\frac{A_u}{R_a R_m C_m}}{\left(s + \frac{R_a + R_m}{R_a R_m C_m} \right) (s)}$$

Transformando al dominio del tiempo

$$i(t) = \frac{A_u}{R_a + R_m} + \left(e^{-\left(\frac{R_a + R_m}{R_a R_m C_m} t \right)} \right) \left(\frac{A_u}{R_a} - \frac{A_u}{R_a + R_m} \right)$$

2. DESARROLLO

2.1 MODELADO MATEMÁTICO DEL MÉTODO PARA MONITOREAR CAMBIOS CAPACITIVOS

2.1.1 ESTIMACIÓN DEL VALOR DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA

Como fue señalado en 1.2.4 para poder realizar la detección sensible a la fase es necesario conocer el ángulo al que se desea monitorear, en este caso el ángulo de fase de los cambios de corriente capacitiva, y para poder calcular ese ángulo es necesario conocer el valor inicial o basal de los componentes eléctricos del sistema (R_a , R_m , C_m), pues la expresión matemática para dicho ángulo depende de R_a , R_m , C_m , y ω .

El método propuesto en este trabajo es una modificación del método de Lindau-Neher presentado en [60] que consiste en usar estimulación con ondas cuadradas y sinusoidales para encontrar el valor de las variables en el sistema. El número de incógnitas en este caso es tres: R_a , R_m y C_m . En primer lugar puede aplicarse una estimulación sinusoidal, debido a que permite que el desarrollo matemático sea llevado fácilmente al dominio de la frecuencia (**Figura 2.1**) por medio de la transformada de Fourier, y de ese modo puedan obtenerse dos ecuaciones.

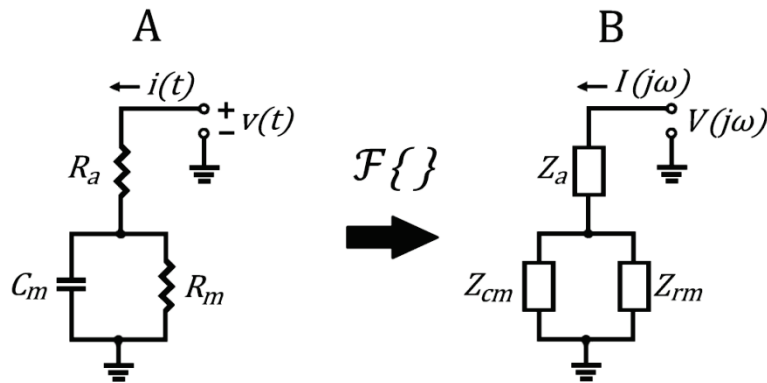


Figura 2.1 Diagramas esquemáticos del circuito equivalente a la célula en whole-cell. En A) el dominio del tiempo y B) el dominio de la frecuencia.

Si Z_{total} es la impedancia total del circuito, entonces:

$$Z_{total} = \frac{\mathcal{F}\{v(t)\}_{\omega_e}}{\mathcal{F}\{i(t)\}_{\omega_e}} = \frac{V(j\omega_e)}{I(j\omega_e)} = Z_a + \frac{Z_{rm}Z_{cm}}{Z_{rm} + Z_{cm}}, \quad (2.1)$$

donde

$$Z_{cm} = -jX_{cm}, \quad X_{cm} = \frac{1}{\omega_e C_m}, \quad (2.2)$$

$\mathcal{F}\{v(t)\}_{\omega_e}$ es el valor de la transformada de Fourier de la señal de estimulación en la frecuencia de la senoidal de estimulación (ω_e), y $\mathcal{F}\{i(t)\}_{\omega_e}$ es el valor de la transformada de Fourier de la señal de respuesta en la frecuencia ω_e . Sustituyendo (2.2) en (2.1)

$$Z_{total} = \left(Z_a + \frac{Z_{rm} X_{cm}^2}{Z_{rm}^2 + Z_{cm}^2} \right) + j \left(\frac{-X_{cm} Z_{rm}^2}{Z_{rm}^2 + Z_{cm}^2} \right), \quad (2.3)$$

haciendo un sistema de dos ecuaciones con la parte real e imaginaria de (2.3)

$$\left(Z_a + \frac{Z_{rm} X_{cm}^2}{Z_{rm}^2 + Z_{cm}^2} \right) = Re\{Z_{total}\} = Z_{Re}, \quad (2.4)$$

$$\left(\frac{-X_{cm} Z_{rm}^2}{Z_{rm}^2 + Z_{cm}^2} \right) = Im\{Z_{total}\} = Z_{Im}, \quad (2.5)$$

La ecuación faltante se puede obtener estimulando al sistema con un pulso suficientemente largo de voltaje de amplitud v_{dc} , de tal forma que la parte estacionaria de su respuesta (i_{dc}) se modele de la siguiente forma:

$$R_a + R_m = \frac{v_{dc}}{i_{dc}}$$

Y como

$$R_a = Z_a, \quad R_m = Z_{rm},$$

entonces

$$Z_a + Z_{rm} = \frac{v_{dc}}{i_{dc}} = Z_{dc}, \quad Z_a = Z_{dc} - Z_{rm}, \quad (2.6)$$

Finalmente, resolviendo el sistema de ecuaciones, donde la frecuencia de la sinusoide de estimulación es ω_{est} , las ecuaciones para R_m , C_m , y R_a son:

$$R_m = Z_{dc} - Z_{Re} + \frac{Z_{Im}^2}{Z_{dc} - Z_{Re}}$$

$$C_m = \frac{(Z_{dc} - Z_{Re})^2}{\omega_{est} Z_{Im} ((Z_{dc} - Z_{Re})^2 + Z_{Im}^2)}$$

$$R_a = Z_{Re} - \frac{Z_{Im}^2}{Z_{dc} - Z_{Re}}$$

Estas expresiones matemáticas permiten la estimación del valor de los componentes del modelo eléctrico de la neurona en whole-cell al estimularla con una señal de voltaje senoidal y un offset.

2.1.2 CUANTIFICACIÓN DE CAMBIOS CAPACITIVOS

2.1.2.1 Determinación de los ángulos de fase

Como se explicó en 1.2.5 y se expresa en la ecuación 1.1, es necesario conocer el ángulo de fase de la corriente en la que se dan los cambios del componente que se quiere medir (ΔR_a , ΔR_m o ΔC_m). En trabajos como [51] se han desarrollado ecuaciones para calcular dichos ángulos, sin embargo se ha tratado de ecuaciones ad hoc con el tipo de células usadas en los experimentos, por lo cual no son aplicables en este proyecto.

A continuación se presentan ecuaciones generales para calcular dichos ángulos de fase para cualquier célula en whole-cell. Para empezar, es necesario plantear el modo en el que se dan los cambios de admitancia en el sistema ($\Delta Y(j\omega)$), debido a que el ángulo de fase de las admitancia es el mismo que el de la corriente en los casos en los que la fase del voltaje de estimulación es cero; y además permite analizar directamente a los componentes del circuito. En este caso se propone el uso de un modelo lineal, similar al propuesto por Neher y Marty en [51].

$$\Delta Y \approx (a\Delta C_m + b\Delta R_m + c\Delta R_a)$$

para casos en los que los cambios en los componentes son pequeños comparados con su valor total, lo siguiente es bastante aproximado:

$$a = \frac{\partial Y}{\partial C_m}, \quad b = \frac{\partial Y}{\partial R_m}, \quad c = \frac{\partial Y}{\partial R_a}$$

$$\Delta Y \approx \left(\frac{\partial Y}{\partial C_m} \Delta C_m + \frac{\partial Y}{\partial R_m} \Delta R_m + \frac{\partial Y}{\partial R_a} \Delta R_a \right), \quad (2.7)$$

Dado que ΔY , $\frac{\partial Y}{\partial C_m}$, $\frac{\partial Y}{\partial R_m}$ y $\frac{\partial Y}{\partial R_a}$ son funciones complejas (\mathbb{Z}), pueden ser vistas como vectores de dos dimensiones,

$$|\Delta Y| \angle \Delta Y \approx \left(\left| \frac{\partial Y}{\partial C_m} \right| \Delta C_m \angle \frac{\partial Y}{\partial C_m} + \left| \frac{\partial Y}{\partial R_m} \right| \Delta R_m \angle \frac{\partial Y}{\partial R_m} + \left| \frac{\partial Y}{\partial R_a} \right| \Delta R_a \angle \frac{\partial Y}{\partial R_a} \right), \quad (2.8)$$

Por lo tanto, para encontrar los ángulos de variación de la corriente para cada elemento es necesario encontrar expresiones para $\angle \frac{\partial Y}{\partial C_m}$, $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_m}$ y $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}$. Para ello es necesario conocer a la admitancia del sistema, lo cual puede hacerse por medio de la ecuación (2.3), sustituyendo X_{cm} , Z_{rm} y Z_a ; y dejándola en función de C_m , R_m , R_a y ω .

$$Z_{total} = \frac{1}{Y} = \left(R_a + \frac{R_m \left(\frac{1}{\omega C_m} \right)^2}{R_m^2 + \left(\frac{1}{\omega C_m} \right)^2} \right) + j \left(\frac{- \left(\frac{1}{\omega C_m} \right) R_m^2}{R_m^2 + \left(\frac{1}{\omega C_m} \right)^2} \right),$$

simplificando

$$Y = \frac{j\omega C_m R_m + 1}{j\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m}$$

Ahora para hallar una expresión para $\angle \frac{\partial Y}{\partial C_m}$ es necesario primero conocer $\frac{\partial Y}{\partial C_m}$

$$\frac{\partial Y}{\partial C_m} = \frac{\partial}{\partial C_m} \left(\frac{j\omega C_m R_m + 1}{j\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m} \right) = \frac{j\omega C_m R_m^2}{(j\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m)^2}, \quad (2.9)$$

entonces

$$\frac{\partial Y}{\partial C_m} = \frac{j\omega R_m^2}{d + je} = \frac{(\omega R_m^2)e + j(\omega R_m^2)d}{d^2 + e^2}, \quad (2.10)$$

donde

$$\left. \begin{aligned} d &= (R_a^2 + R_m^2 + 2R_a R_m - \omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a^2) \\ e &= 2(\omega C_m R_m R_a^2 + \omega C_m R_m^2 R_a) \end{aligned} \right\} \quad (2.11)$$

como

$$\begin{aligned} \angle \frac{\partial Y}{\partial C_m} &= \tan^{-1} \left(\frac{(\omega R_m^2)d}{(\omega R_m^2)e} \right) = \tan^{-1} \left(\frac{d}{e} \right), \\ \therefore \angle \frac{\partial Y}{\partial C_m} &= \tan^{-1} \left(\frac{R_a^2 + R_m^2 + 2R_a R_m - \omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a^2}{2(\omega C_m R_m R_a^2 + \omega C_m R_m^2 R_a)} \right) \end{aligned}$$

Ahora para $\frac{\partial Y}{\partial R_a}$ y $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}$

$$\frac{\partial Y}{\partial R_a} = \frac{\partial}{\partial R_a} \left(\frac{j\omega C_m R_m + 1}{j\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m} \right) = \frac{-(j\omega C_m R_m + 1)^2}{(j\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m)^2} = \frac{-(j\omega C_m R_m + 1)^2}{d + je},$$

entonces

$$\frac{\partial Y}{\partial R_a} = \frac{(df + ge) + j(gd - fe)}{d^2 + e^2}, \quad (2.12)$$

donde

$$f = (\omega^2 C_m^2 R_m^2 - 1), \quad g = (2\omega C_m R_m), \quad (2.13)$$

y dado que

$$\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a} = \tan^{-1} \left(\frac{gd - fe}{df + ge} \right), \quad (2.14)$$

$$\therefore \angle \frac{\partial Y}{\partial R_a} = \tan^{-1} \left(\frac{2\omega C_m R_m^2 (R_a + R_m + \omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a)}{R_m^2 (1 - \omega^2 C_m^2 R_m^2) + (R_a + \omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a)^2 + 2R_a (R_m + \omega^2 C_m^2 R_m^3)} \right)$$

Finalmente, para $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_m}$

$$\angle \frac{\partial Y}{\partial R_m} = \angle \frac{\partial Y}{\partial C_m} + \frac{\pi}{2}$$

2.1.2.1.1 Simplificación de $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}$

Partiendo de la siguiente hipótesis:

$$\tan \left(\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a} \right) = \frac{2 \tan(\angle Y)}{1 - \tan^2(\angle Y)}, \quad (2.15)$$

se puede demostrar que $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a} = 2\angle Y$. Dado que,

$$Y = \frac{j\omega C_m R_m + 1}{\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m}$$

entonces,

$$\tan(\angle Y) = \frac{\omega C_m R_m^2}{\omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a + R_a + R_m}, \quad (2.16)$$

Sustituyendo (2.16) en (2.15)

$$\tan\left(\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}\right) = \frac{2\left(\frac{\omega C_m R_m^2}{\omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a + R_a + R_m}\right)}{1 - \left(\frac{\omega C_m R_m^2}{\omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a + R_a + R_m}\right)^2}$$

Expandiendo

$$\tan\left(\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}\right) = \frac{2\omega C_m R_m^2 (R_a + R_m + \omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a)}{R_m^2 (1 - \omega^2 C_m^2 R_m^2) + (R_a + \omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a)^2 + 2R_a (R_m + \omega^2 C_m^2 R_m^3)}$$

$$\therefore \angle \frac{\partial Y}{\partial R_a} = 2\angle Y = 2 \tan^{-1}\left(\frac{\omega C_m R_m^2}{\omega^2 C_m^2 R_m^2 R_a + R_a + R_m}\right)$$

Esta expresión permite que el computo de $\angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}$ sea más sencillo.

2.1.2.2 Cálculo de la frecuencia óptima de estimulación

Una forma de determinar la frecuencia óptima es hallar el valor de ω para el cual ΔY es máximo cuando solamente cambia C_m .

$$\Delta Y \approx \frac{\partial Y}{\partial C_m} \Delta C_m + \frac{\partial Y}{\partial R_m} (0) + \frac{\partial Y}{\partial R_a} (0) = \frac{\partial Y}{\partial C_m} \Delta C_m, \quad \Delta C_m = cte$$

Sustituyendo (2.10) en la ecuación anterior y derivandola con respecto a ω , e igualándola a cero para encontrar el valor de ω que la hace máxima,

$$\begin{aligned} \frac{\Delta Y}{\partial \omega} &= \frac{\partial^2 Y}{\partial C_m \partial \omega} \Delta C_m = \frac{\partial}{\partial \omega} \left(\frac{j\omega C_m R_m^2}{(j\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m)^2} \right) \Delta C_m = 0 \\ &= j\omega C_m R_m R_a + R_a + R_m - 2j\omega C_m R_m R_a = 0 \end{aligned}$$

$$\therefore \omega_{opt} = \frac{R_a + R_m}{C_m R_m R_a}$$

2.1.2.3 Factores de escala

Dado que la detección sensible a la fase muestra a la salida únicamente un valor escalar proporcional a la amplitud de la corriente en la fase de los cambios capacitivos, es necesario introducir un factor de escala que lo transforme en una magnitud capacitiva. Dicho factor es calculado considerando nuevamente que el sistema es lineal en intervalos pequeños, por medio de la pendiente que relaciona a la salida del detector sensible a la fase, con el cambio teórico de capacitancia, tal como lo muestra la siguiente ecuación:

$$\Delta C_m = (\delta_1 - \delta_0) K_{C_m} ,$$

donde,

$$K_{C_m} = \frac{\Delta C_{mt}}{\sum_{n=0}^{N-1} \left(\sin \left(\frac{2\pi n}{N} - \angle \frac{\partial Y}{\partial C_m} \right) (i_{ss}(n, C_m + \Delta C_{mt}) - i_{ss}(n, C_m)) \right)},$$

K_{C_m} : Factor de escala para la capacitancia.

ΔC_{mt} : Cambio teórico de capacitancia.

N : Número de muestras por periodo de corriente.

i_{ss} : Corriente del sistema en estado estable.

δ_1 : Salida del detector sensible a la fase durante la medición.

δ_0 : Salida del detector sensible a la fase cuando no ha habido cambios.

El mismo principio puede aplicarse para la medición en la fase de los cambios en R_m y R_a .

2.1.2.4 Errores por cambios en R_a

En neuronas pequeñas los vectores $\frac{\partial Y}{\partial C_m}$ y $\frac{\partial Y}{\partial R_a}$ son aproximadamente ortogonales, sin embargo esto no sucede con neuronas grandes como la de neurona de Retzius. Es por ello que cambios en R_a ocasionan lecturas erróneas en la fase de los cambios capacitivos. Por ello ha sido necesario diseñar un método para corregir dicho error, manteniendo el costo computacional lo más bajo posible.

2.1.2.4.1 Magnitud del error

El error o variación aparente en la medición de cambios capacitivos debido a cambios en R_a puede calcularse de forma directa por medio de proyecciones vectoriales, debido a

que los cambios en ambos componentes pueden representarse como vectores, tal como se muestra en la ecuación 2.8 y en la **Figura 2.2**.

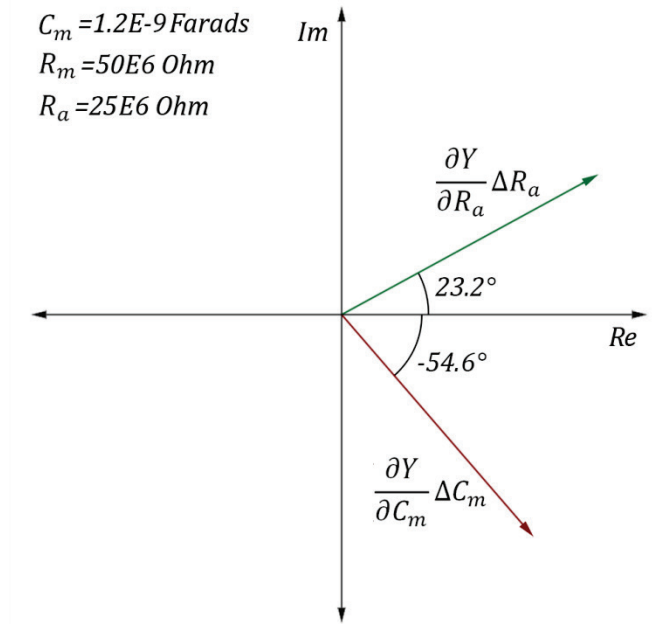


Figura 2.2 Gráfica de los vectores $\frac{\partial Y}{\partial C_m} \Delta C_m$ y $\frac{\partial Y}{\partial R_a} \Delta R_a$. El ejemplo mostrado considera los valores promedio en una célula de Retzius en whole-cell.

Considerando el caso en el que todos los cambios de admitancia son debidos a cambios en R_a (ecuación 2.17), el detector sensible a la fase de la capacitancia detectaría la componente de $\frac{\partial Y}{\partial R_a} \Delta R_a$ en la dirección de $\frac{\partial Y}{\partial C_m}$ (**Figura 2.3**).

$$\Delta Y \approx \Delta R_a \left| \frac{\partial Y}{\partial R_a} \right| \angle \frac{\partial Y}{\partial R_a}, \quad (2.17)$$

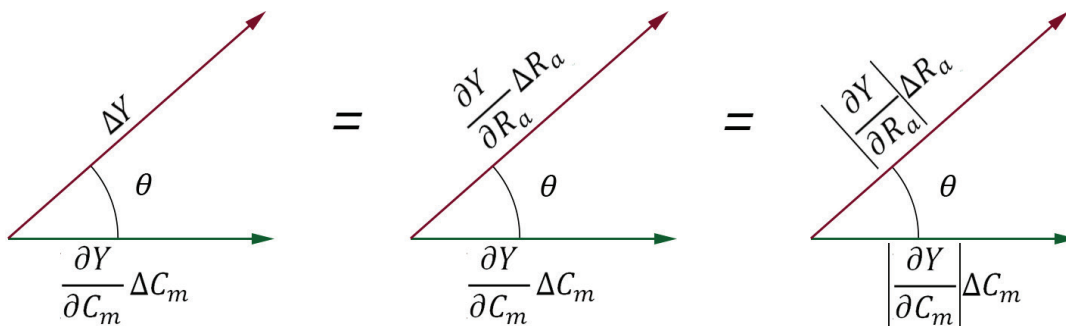


Figura 2.3 Gráficas de proyecciones equivalentes en la dirección de $\frac{\partial Y}{\partial C_m}$.

Por trigonometría se pueden obtener las siguientes ecuaciones:

$$\cos \theta = \frac{\left(\frac{\partial Y}{\partial C_m} \Delta C_m\right) \cdot \left(\frac{\partial Y}{\partial R_a} \Delta R_a\right)}{\left|\frac{\partial Y}{\partial C_m} \Delta C_m\right| \left|\frac{\partial Y}{\partial R_a} \Delta R_a\right|} = \frac{\left(\frac{\partial Y}{\partial C_m}\right) \cdot \left(\frac{\partial Y}{\partial R_a}\right)}{\left|\frac{\partial Y}{\partial C_m}\right| \left|\frac{\partial Y}{\partial R_a}\right|}, \quad (2.17)$$

$$\cos \theta = \frac{\left|\frac{\partial Y}{\partial C_m}\right| \Delta C_m}{\left|\frac{\partial Y}{\partial R_a}\right| \Delta R_a}, \quad (2.18)$$

Igualando la ecuación 2.17 con la ecuación 2.18 y despejando ΔC_m ,

$$\Delta C_{mRa} = \frac{\left(\frac{\partial Y}{\partial C_m}\right) \cdot \left(\frac{\partial Y}{\partial R_a}\right)}{\left|\frac{\partial Y}{\partial C_m}\right|^2} \Delta R_a, \quad (2.19)$$

Sustituyendo (2.10) y (2.12) en (2.19),

$$\begin{aligned} \Delta C_m &= \frac{\left(\frac{(\omega R_m^2)e + j(\omega R_m^2)d}{d^2 + e^2}\right) \cdot \left(\frac{(df + ge) + j(gd - fe)}{d^2 + e^2}\right)}{\left|\frac{(\omega R_m^2)e + j(\omega R_m^2)d}{d^2 + e^2}\right|^2} \Delta R_a \\ &= \frac{(df + ge)e + (gd - fe)d}{(\omega R_m^2)(d^2 + e^2)} \Delta R_a, \quad (2.20) \end{aligned}$$

Sustituyendo (2.11) y (2.13) en (2.20) y simplificando, se obtiene una ecuación que relaciona un cambio en ΔR_a con un cambio aparente en ΔC_m .

$$\Delta C_m = \frac{-2C_m}{R_m} \Delta R_a$$

Finalmente, para los valores promedio de los componentes eléctricos de una neurona de Retzius en whole-cell, el error producido en la medición de cambios capacitivos con respecto al valor total de la capacitancia de membranal, cuando la resistencia de acceso cambia un $\pm 1\%$ es:

$$\Delta C_m = \frac{-2(1.2E - 9 \text{ Farads})}{(50E6 \text{ Ohms})} (\pm 0.01)(25E6 \text{ Ohms}) = \pm 1.2E - 11 \text{ Farads},$$

$$error = 100 * \frac{|\Delta C_{mRa}|}{C_m} \approx 1\%,$$

Además, si se considera que al estimular a las neuronas de Retzius con trenes de 20Hz se fusionan del orden de decenas de miles de vesículas [34], cada una con radio (r) de aproximadamente 50nm [32] y aproximadamente $0.9\mu\text{F}/\text{cm}^2$ de capacitancia específica membranal ($C_{especifica}$) [74]; entonces la capacitancia total promedio de una vesícula es:

$$C_{vesicula} = 4\pi r C_{especifica} \approx 0.28E - 16 = 0.28f\text{Farads}$$

Por lo que el error en términos de vesículas, para excitosis de 10,000-100,000 vesículas es:

$$10,000: \quad error_{vesiculas} = 100 * \frac{|\Delta C_{mRa}|}{(10,000)C_{vesicula}} \approx 428\%,$$

$$100,000: \quad error_{vesiculas} = 100 * \frac{|\Delta C_{mRa}|}{(100,000)C_{vesicula}} \approx 42.8\%,$$

De tal modo que cambios de apenas el 1% en la resistencia de acceso puede reflejarse en cambios aparentes de capacitancia equivalentes a la fusión de aproximadamente 42800 vesículas, equivalente a entre 4 y 0.5 excitosis completas de una neurona de Retzius. Por ello es necesario implementar algún método para eliminar dicho error.

2.1.2.4.2 Corrección del error

La solución que se propone es resolver el sistema de ecuaciones que representa a la neurona en whole-cell y calcular el valor de los ángulos de fase y los factores de escala de forma periódica. Esto es posible mediante una estimulación compuesta por la suma de una señal senoidal a una frecuencia ω_{opt} con una señal cuadrada con un período T_{square} (Figura 2.4). La corrección se hace cada $\frac{T_{square}}{2}$, equivalente a un número entero de períodos de la señal senoidal, denominado "período de cálculo". El número de ciclos de senoidal por cada "período de cálculo" (n_{calc_period}) se calcula de la siguiente manera:

$$n_{calc_period} = n_{transient_sine} + n_{s_sine}$$

$$n_{transient_sine} = \text{ceil}(20 * \tau * \omega_{opt} * \pi)$$

$$\tau = \frac{R_m * R_a * C_m}{R_m + R_a}$$

donde,

$n_{transient_sine}$: Número de ciclos de senoidal en estado transitorio, considerado como 10τ

n_{s_sine} : Número de ciclos de senoidal en estado estacionario. Este número es arbitrario y es especificado por el usuario del sistema.

τ : Constante de tiempo del sistema

De este modo es posible conocer de antemano el número de ciclos de senoidal que no deben ser usados para el monitoreo de cambios capacitivos y eliminarlos de los cálculos, obteniendo estimaciones muy precisas. Además si la duración del “período de cálculo” es pequeña, los valores de $\angle \frac{\partial Y}{\partial C_m}$ y K_{Cm} pueden ser corregidos rápidamente eliminando errores en la lectura de cambios capacitivos.

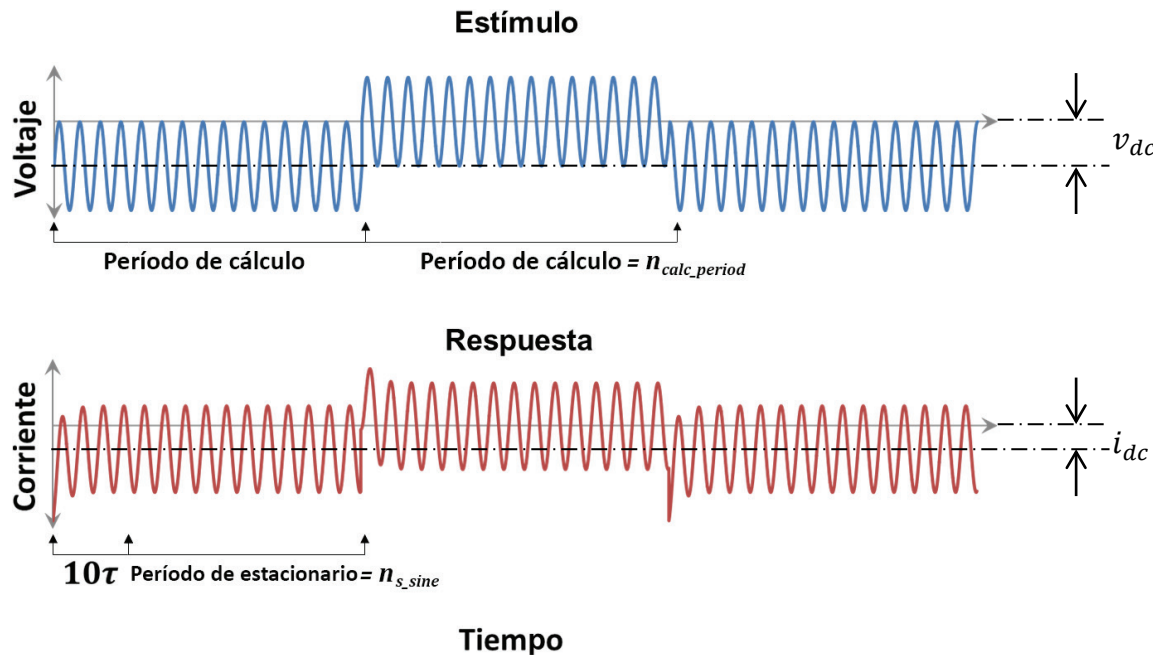


Figura 2.4 Gráficas de la señal de estimulación usada para corregir los errores provocados por ΔR_a y de la señal de respuesta. De la diferencia entre el promedio de las señales senoidales de voltaje y de corriente con offset y sin offset se obtiene el valor de v_{dc} e i_{dc} respectivamente (ecuación (2.6)). Cada “período de cálculo” son estimados los valores de C_m , R_m , R_a , $\angle \frac{\partial Y}{\partial C_m}$ y K_{Cm} . Para dichas estimaciones se utilizan únicamente los ciclos de senoidal posteriores a 10τ (n_{s_sine}).

Además, la señal de corriente ($i(t)$) usada en la ecuación (2.1) es resultado de la promediación de los n_{s_sine} ciclos de senoidal en estado estacionario en un solo ciclo de senoidal, lo cual hace que gran parte del ruido en la señal sea eliminado. Sumado a lo anterior, el hecho de que únicamente el componente en la frecuencia ω_{opt} de la transformada de Fourier de $i(t)$ es usado para los cálculos subsecuentes, implica que el ruido es casi completamente eliminado, garantizando estimaciones muy precisas.

2.2 IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE CUANTIFICACIÓN

2.2.1 COMPONENTES Y ESTRUCTURA DEL SISTEMA

El sistema de cuantificación de excitación somática en neuronas fue diseñado para monitorear dicho fenómeno en tiempo real, por medio del procesamiento de datos electrofisiológicos obtenidos del registro de una neurona en *whole-cell*. Como se muestra en la **Figura 2.5**, la estructura de funcionamiento del sistema consiste en tres módulos comunicados serialmente entre ellos.

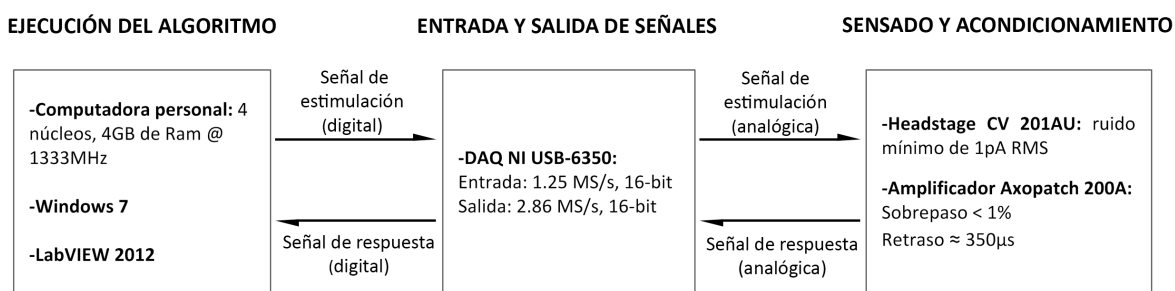


Figura 2.5 Esquema de la estructura funcional del sistema de cuantificación de excitación somática. La información se transmite entre los módulos de manera serial.

Ejecución del algoritmo. El control del sistema de cuantificación, la generación de señales de estimulación y el procesamiento de la señal de respuesta del sistema; son llevados a cabo por un algoritmo que entre otras cosas contiene los modelos matemáticos desarrollados en este trabajo. El algoritmo es ejecutado en una computadora personal con el sistema operativo *Microsoft Windows*[®] 7.

Entrada y salida de señales. El envío y adquisición de señales en la computadora se hace a través de la tarjeta de adquisición de datos (DAQ) NI USB-6351 de *National Instruments*. Esta cuenta con una tasa máxima de adquisición de 1.25 Mega-muestras por segundo, lo cual permite adquirir las señales biológicas de interés sin ningún problema, dado que éstas se encuentran por debajo de los 50Hz.

Sensado y acondicionamiento. El sensado de la corriente de respuesta neuronal a la estimulación con voltaje es hecho por el headstage CV 201AU de *Axon Instruments*, en tanto que el acondicionamiento de las señales de estimulación y de respuesta es llevado a cabo por el amplificador de patch-clamp Axopatch 200A de *Axon Instruments*.

2.2.2 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN

Se diseñó un protocolo de estimulación programable cuyos bloques básicos son ondas senoidales y cuadradas (Figura 2.6). Las ondas senoidales sirven para proveer de datos al detector sensible a la fase, mientras que las ondas cuadradas sirven para generar potenciales de acción en la neurona para activar la excitación somática como está descrito en [3, 33]. El protocolo de estimulación se compone de tres etapas, a cada una de las cuales le corresponde una etapa distinta del monitoreo de cambios capacitivos. La primera etapa es la de “monitoreo basal” y en ella la estimulación consiste en una señal similar a la definida en (2.1.2.4.2), repetida periódicamente durante un tiempo especificado por el experimentador. Esta fase de monitoreo se usa para calcular el valor medio de la capacitancia membranal durante el reposo, además de que permite confirmar si la célula se encuentra estable previo a la activación de la secreción.

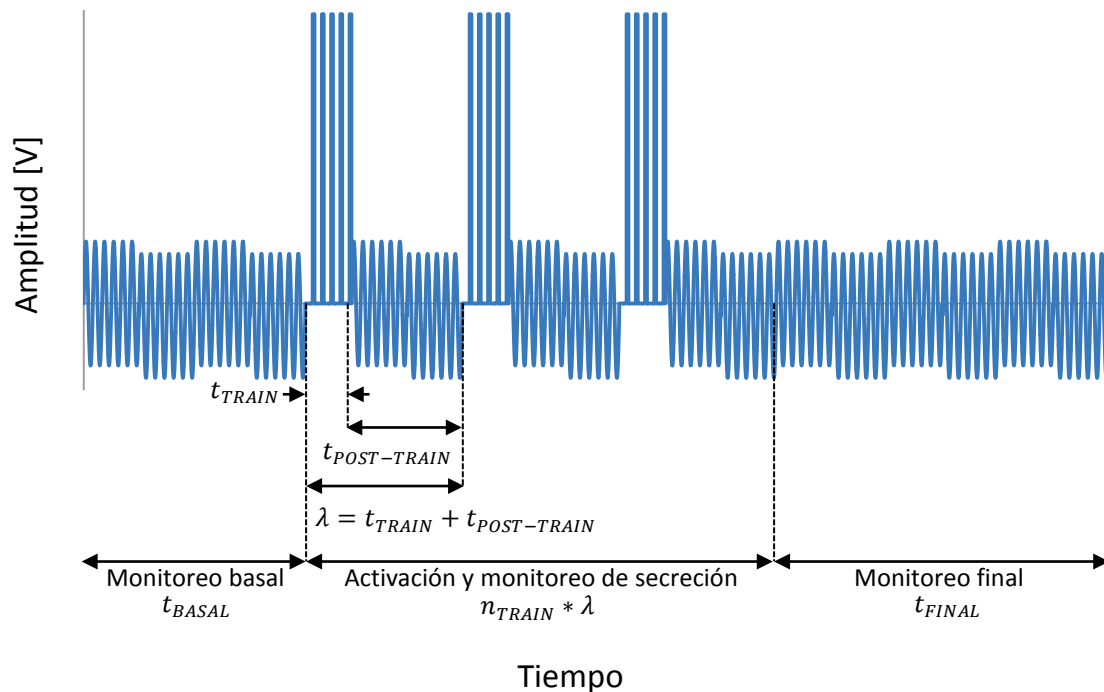


Figura 2.6 Gráfica de un protocolo de estimulación modelo. El protocolo de estimulación está compuesto por tres etapas en el siguiente orden: la etapa de monitoreo basal, la etapa de activación y monitoreo de secreción, y la etapa de monitoreo final. La primera y la última etapas tienen duraciones t_{BASAL} y t_{FINAL} respectivamente, ambas especificadas por el usuario. La fase activación y monitoreo de secreción está compuesta por n_{TRAIN} repeticiones del segmento de señal λ , formado por un tren de pulsos cuadrados con una duración t_{TRAIN} , seguido por una señal de monitoreo (idéntica a la usada en la etapa de monitoreo basal y final) con duración $t_{POST-TRAIN}$.

La segunda etapa es la “activación y monitoreo de secreción”, en ella la estimulación consiste en el envío de una señal para la activación de la excitación, seguida de una señal

para el monitoreo de la exocitosis. La señal de activación consiste en n_{SQ_PULSE} pulsos cuadrados de voltaje con frecuencia f_{TRAIN} , amplitud V_{TRAIN} , especificados por el experimentador. La señal de monitoreo es idéntica a la usada en la “fase de monitoreo basal”, pero con una duración propia especificada por el experimentador. Ambas señales (de activación y de monitoreo) pueden repetirse periódicamente cuantas veces sea especificado (n_{TRAIN}), siendo uno el número mínimo requerido para poder observar una cinética distinta a la basal.

La tercera etapa es la de “monitoreo final”, en la cual la estimulación es idéntica a la usada en la etapa de “monitoreo basal”, aunque su duración es especificada de forma independiente. Su función es monitorear los cambios capacitivos en los minutos posteriores a la activación de la secreción somática y registrar un posible regreso del valor de la capacitancia membranal a su valor basal. En otras palabras, en algunos experimentos puede servir para completar el registro del ciclo de exo-endocitosis completo.

2.2.3 PROGRAMACIÓN

2.2.3.1 Entorno de desarrollo

El entorno de desarrollo elegido para la programación del sistema fue LabVIEW® 2012 de *National Instruments*, debido a la facilidad que ofrece para la realización de tareas complejas y compatibilidad con el DAQ NI USB-6351. La programación en LabVIEW® es llevada a cabo por medio de un lenguaje de programación visual creado por *National Instruments* conocido como lenguaje-G.

2.2.3.2 Estructura general del programa

El sistema fue estructurado de manera modular, dividiéndolo en dos módulos principales con dos submódulos cada uno (**Figura 2.7**). Los módulos son: el de “creación del sello”, y el de “cuantificación de secreción”. El módulo de creación del sello tiene como función permitir la visualización de la corriente que fluye a través de la micropipeta para facilitar al experimentador la creación del sello alta resistencia. Sus submódulos son: el de “monitoreo del sello” y el de “medición de ruido”. El módulo de cuantificación de secreción tiene como objetivo la medición en tiempo real de fenómenos de exocitosis y endocitosis. Este módulo cuenta con los submódulos: el de “estimación valores iniciales” y de “monitoreo de cambios capacitivos”.

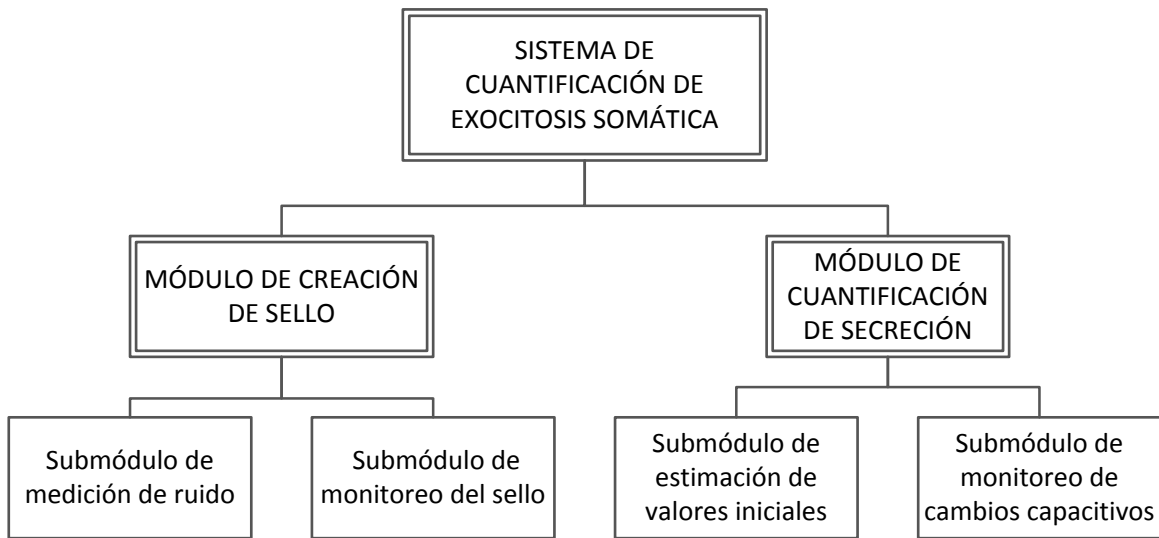


Figura 2.7 Diagrama de la estructura del programa. El programa tiene una estructura modular para simplificar el código y aligerar su ejecución.

2.2.3.3 Módulo de creación del sello

2.2.3.3.1 Submódulo de monitoreo del sello

Contar con la visualización en vivo de la corriente que fluye a través de la micropipeta permite que el experimentador tenga control sobre la formación del sello con la membrana plasmática. Tradicionalmente esta visualización se hace por medio un osciloscopio conectado a la salida del amplificador de patch-clamp. En este caso se cuenta con un convertidor analógico-digital por lo que dicha tarea puede llevarse a cabo en la computadora. A continuación se presenta un diagrama de flujo del submódulo de monitoreo del sello (**Figura 2.8**), los programas en LabVIEW® de este y los demás submódulos se encuentran en el Anexo A:

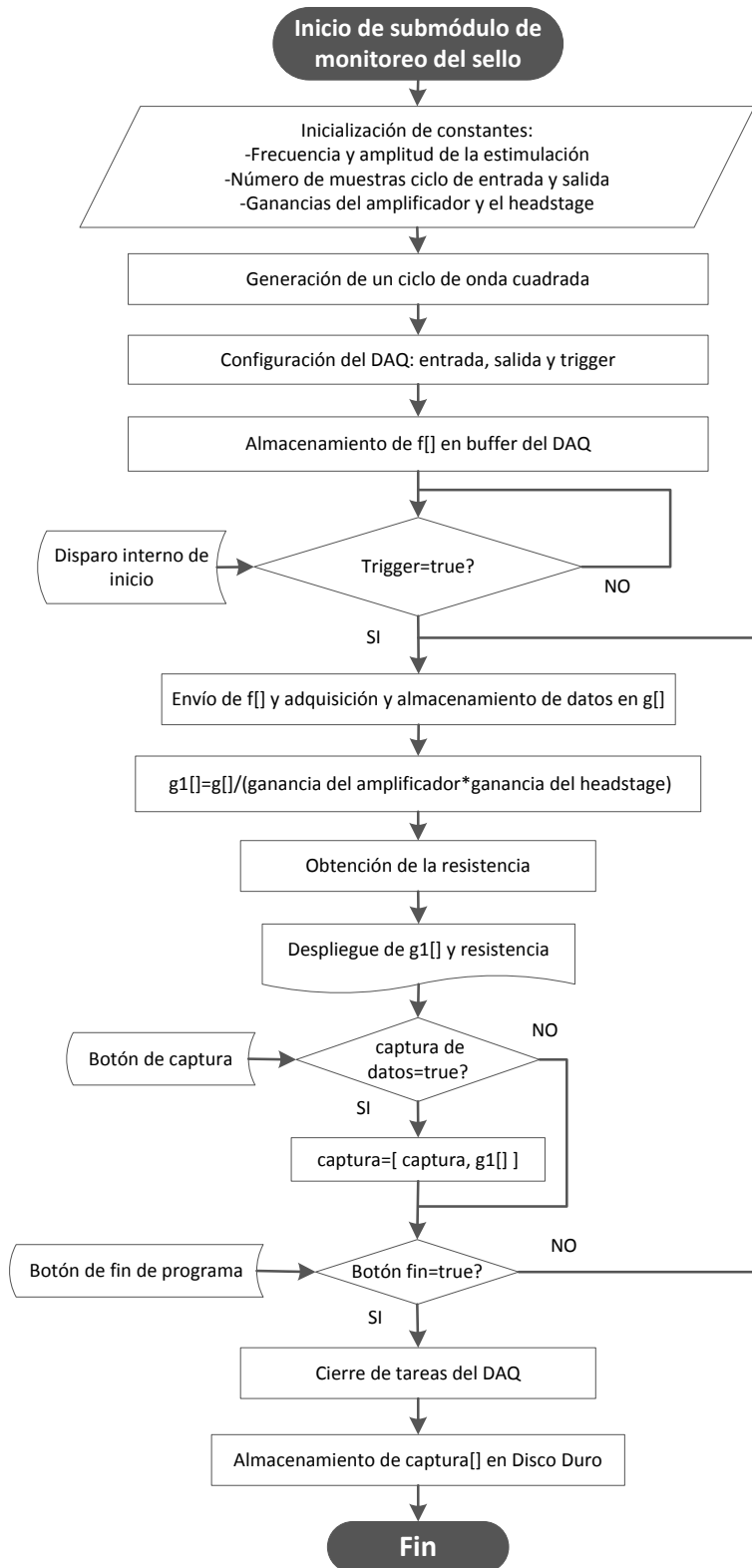


Figura 2.8 Diagrama de flujo del submódulo de monitoreo del sello.

2.2.3.3.2 Submódulo de medición de ruido

El submódulo de medición de ruido tiene como objetivo ayudar al experimentador en la preparación del set-up de patch-clamp, específicamente en la discriminación y localización de fuentes de ruido electromagnético. Esto se consigue por medio del despliegue en vivo del espectro de potencia de la señal eléctrica a la salida del amplificador de patch-clamp y la amplitud RMS del ruido en la señal. A continuación se presenta un diagrama de flujo del submódulo de medición del ruido (**Figura 2.9**):

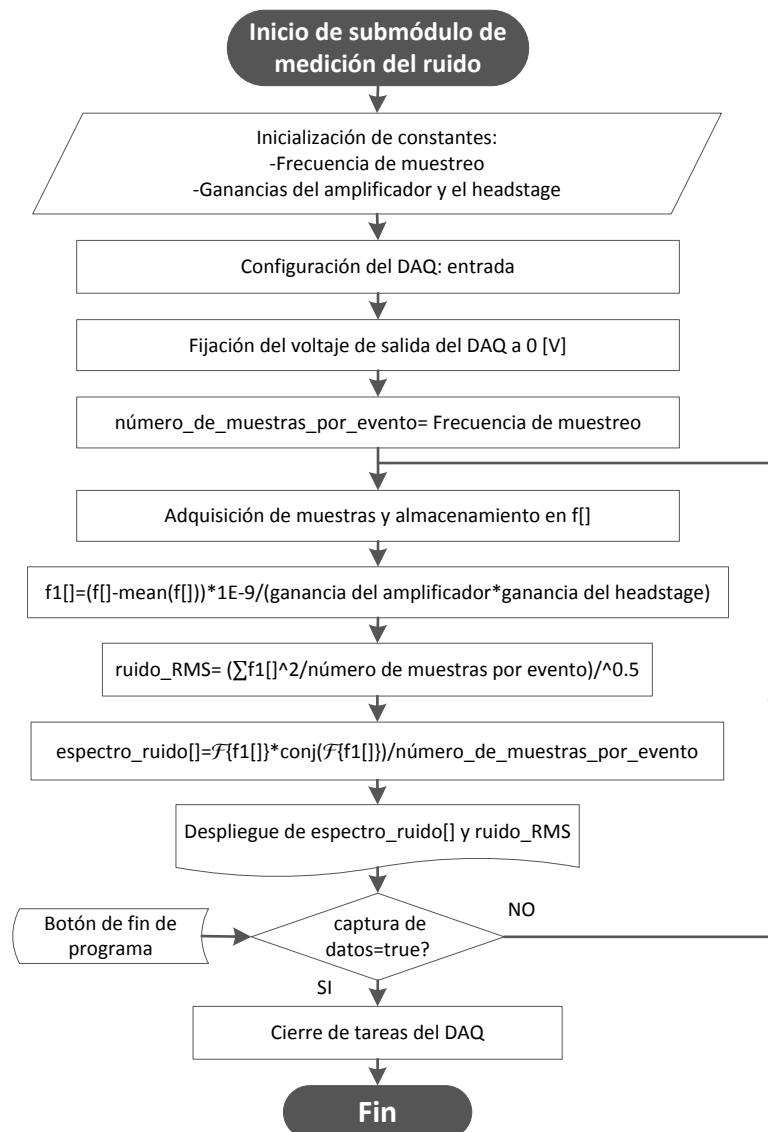


Figura 2.9 Diagrama de flujo del submódulo de medición de ruido.

2.2.4 Módulo de cuantificación de secreción

Este módulo fue diseñado para ejecutarse en dos submódulos cuasi-independientes. El primero es el “submódulo de estimación de valores iniciales” el cual permite al experimentador averiguar si el procedimiento experimental fue correcto y la célula está en buenas condiciones; y además estimar el valor de R_m , R_a , C_m , ω_{opt} , V_{opt} cuando la neurona está en reposo. El segundo es el “submódulo de monitoreo de cambios capacitivos”, cuya función es estimular a la preparación con el protocolo detallado en 2.2.2, monitoreando paralelamente la magnitud absoluta de R_m , R_a y el cambio de C_m con respecto al valor base estimado en el “submódulo de estimación de valores iniciales”.

2.2.4.1 Submódulo de estimación de valores iniciales

Aunque las neuronas de Retzius presentan formas y composiciones químicas muy parecidas, ninguna es idéntica a la otra. Además los procedimientos usados durante la disección del animal y el cultivo de la célula, así como el crecimiento neurítico durante el cultivo, promueven variabilidad en el valor de los componentes eléctricos de la membrana celular.

Por otro lado, es imposible hacer que el valor inicial de la resistencia y capacitancia de la micropipeta sea igual en todas las que se fabrican, dado que aun usando métodos de manufactura totalmente automatizados no puede garantizarse uniformidad. Sumado a lo anterior, el valor de la resistencia de acceso depende de calidad del sello entre la pipeta y la membrana celular, así como de la correcta ruptura del parche, los cuales son procedimientos manuales. Por las razones previas, antes de comenzar la cuantificación de secreción somática es importante conocer el valor de los componentes eléctricos de la célula en reposo para garantizar la correcta realización del whole-cell. A continuación se muestra un diagrama de flujo del “submódulo de estimación de valores iniciales” (**Figura 2.10.1, 2.10.2**):

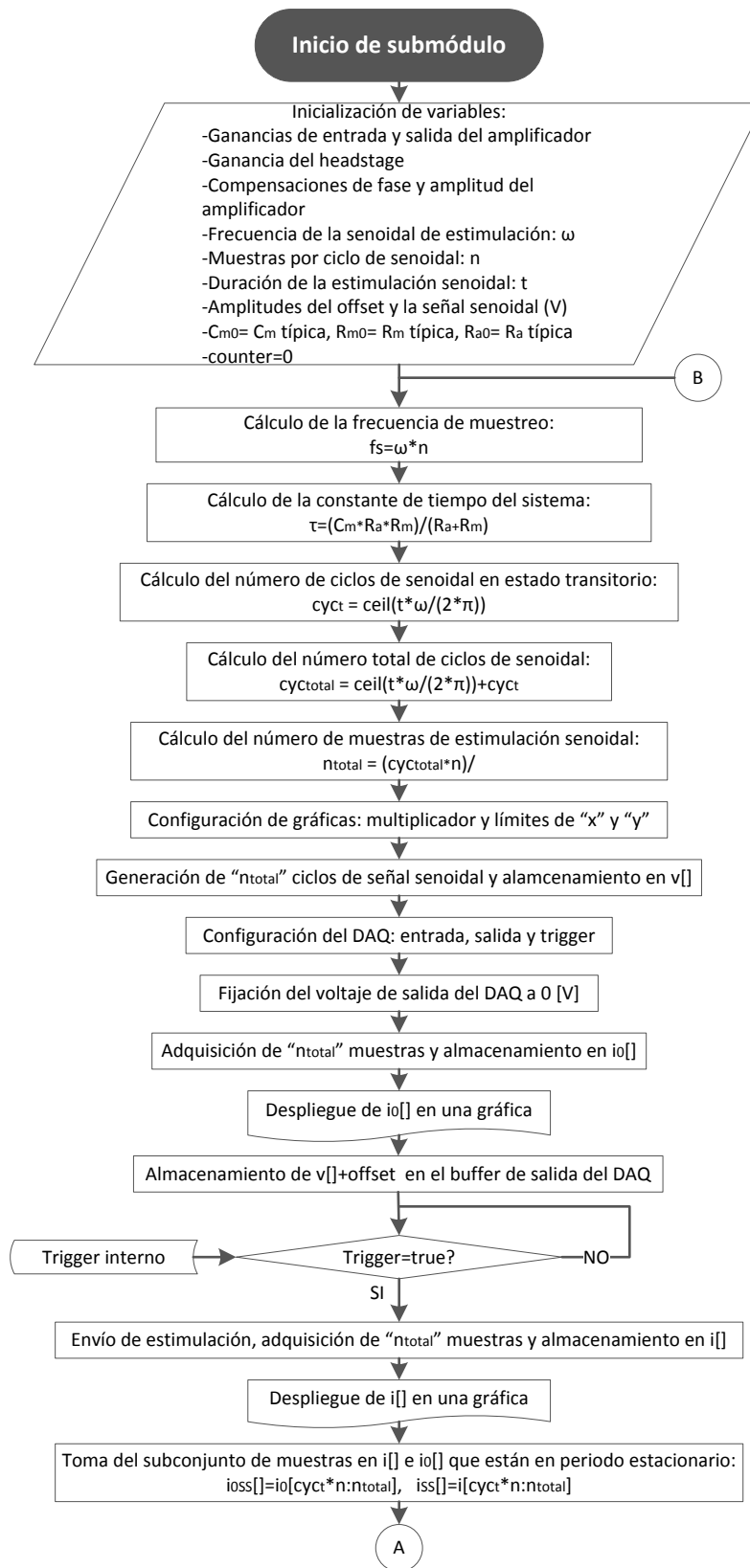


Figura 2.10.1 Diagrama de flujo del submódulo de estimación de valores iniciales.

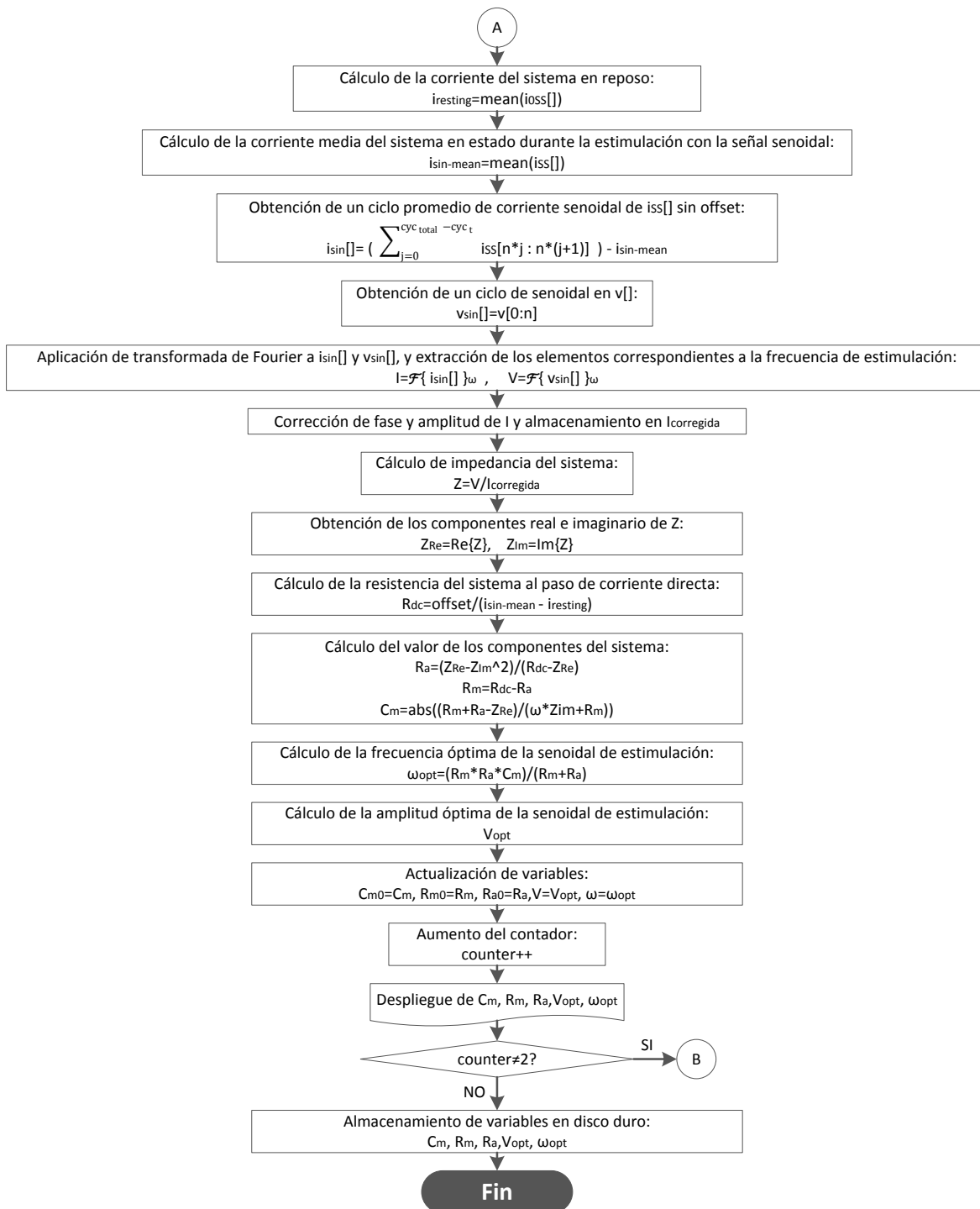


Figura 2.10.2 Diagrama de flujo del submódulo de estimación de valores iniciales.

2.2.4.2 Submódulo de monitoreo de cambios capacitivos

El submódulo de estimación de valores iniciales es el submódulo más importante de los cuatro, así como el más complejo. Por esa razón, a modo de guía se presenta un diagrama de flujo con la máxima abstracción de las tareas llevadas a cabo por el algoritmo (Figura 2.11), y posteriormente se presenta el algoritmo más detallado (Figura 2.12.1, 2.12.2, 2.12.3, 2.12.4, 2.12.5, 2.12.6).

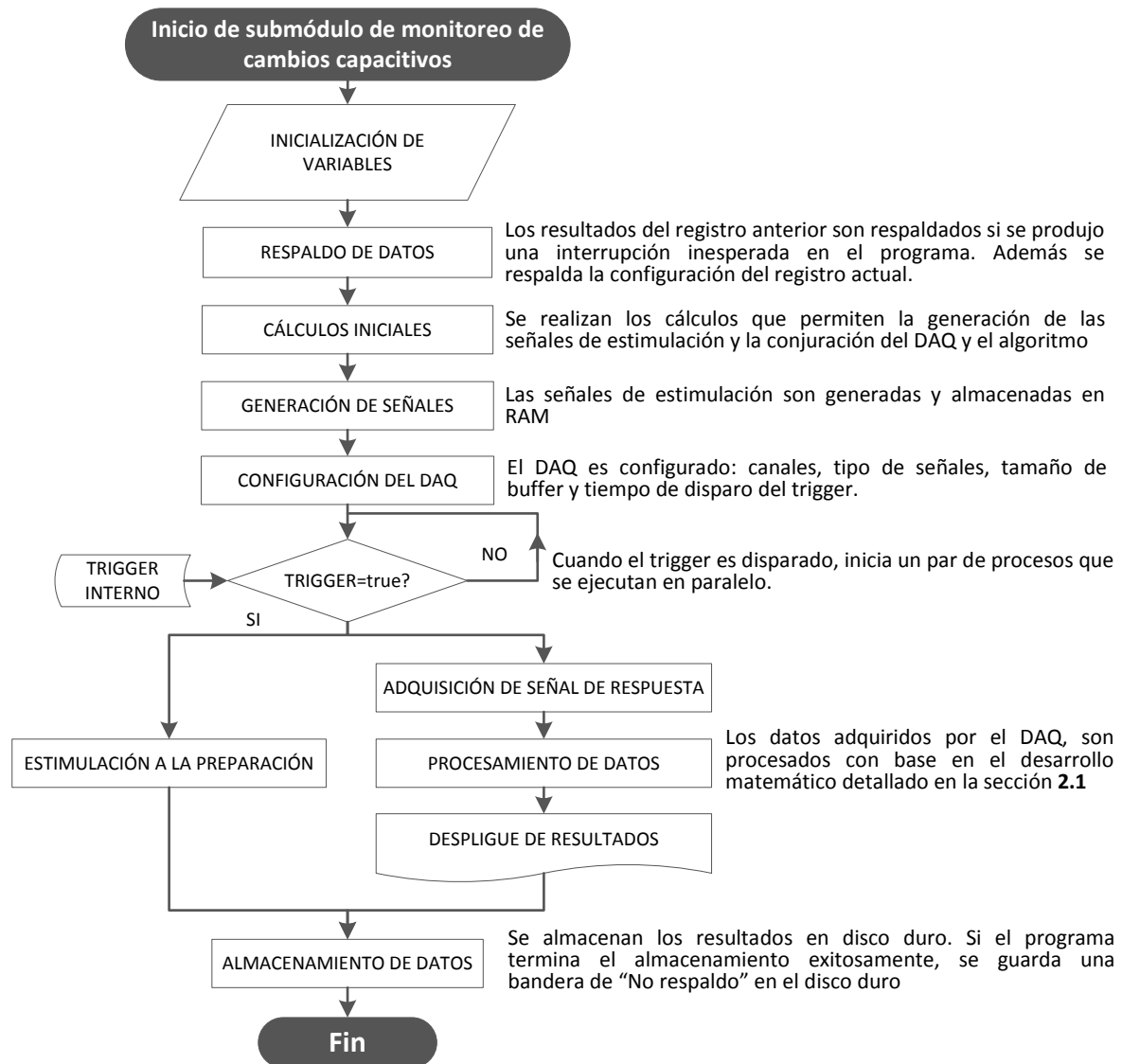


Figura 2.11 Diagrama de flujo simplificado del submódulo de monitoreo de cambios capacitivos.

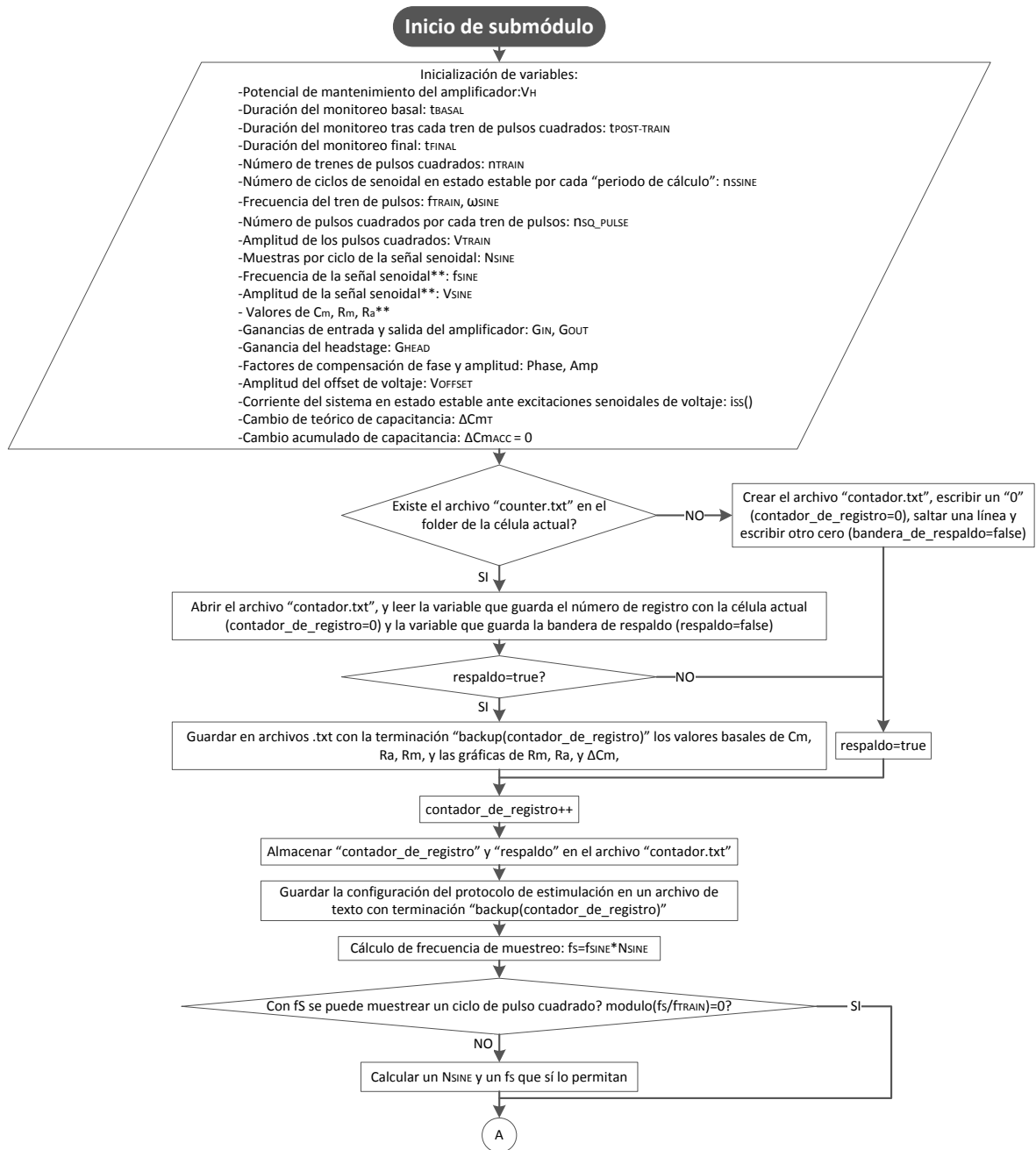


Figura 2.12.1 Diagrama de flujo detallado del submódulo de monitoreo de cambios capacitivos.

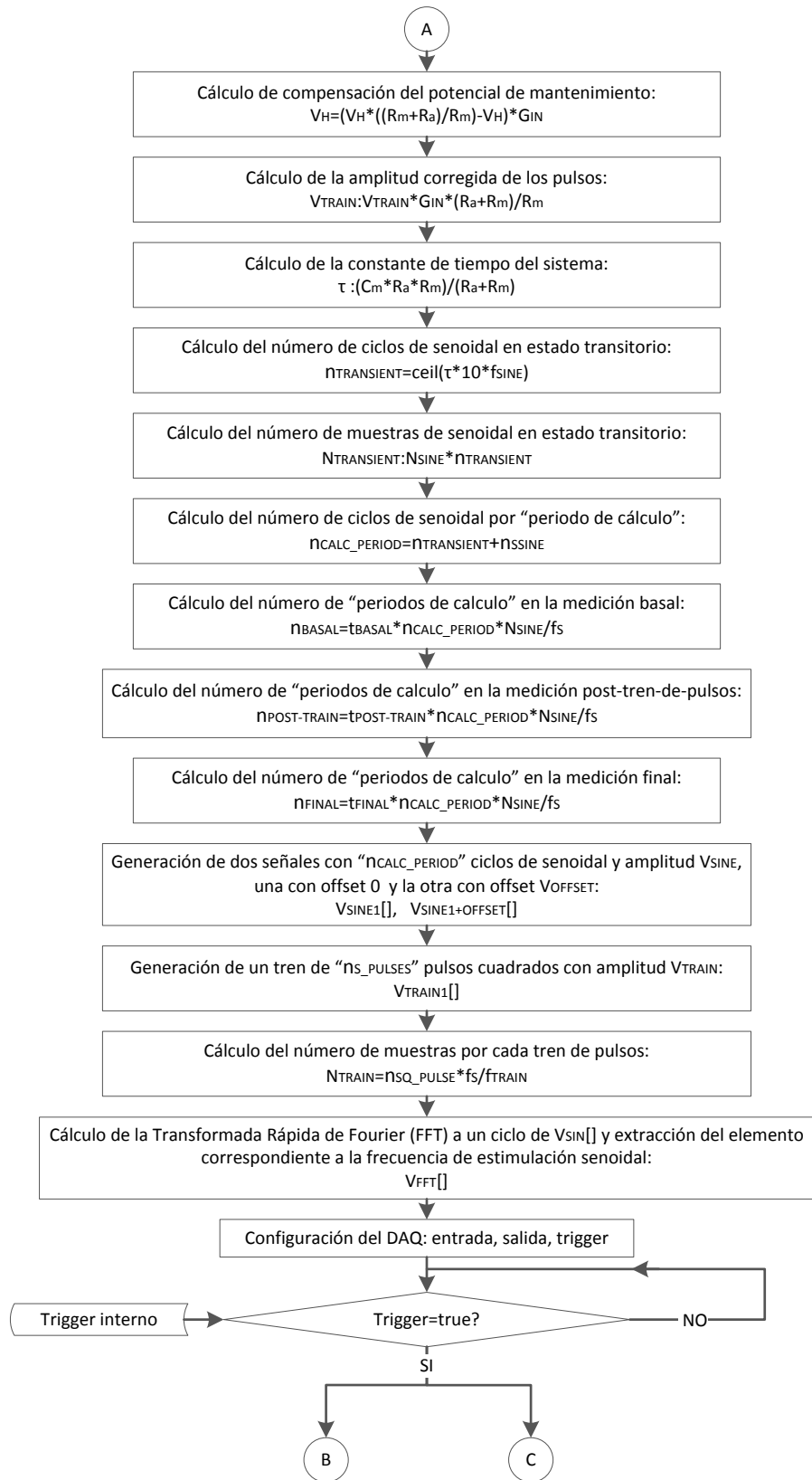


Figura 2.12.2 Diagrama de flujo detallado del submódulo de monitoreo de cambios capacitivos.

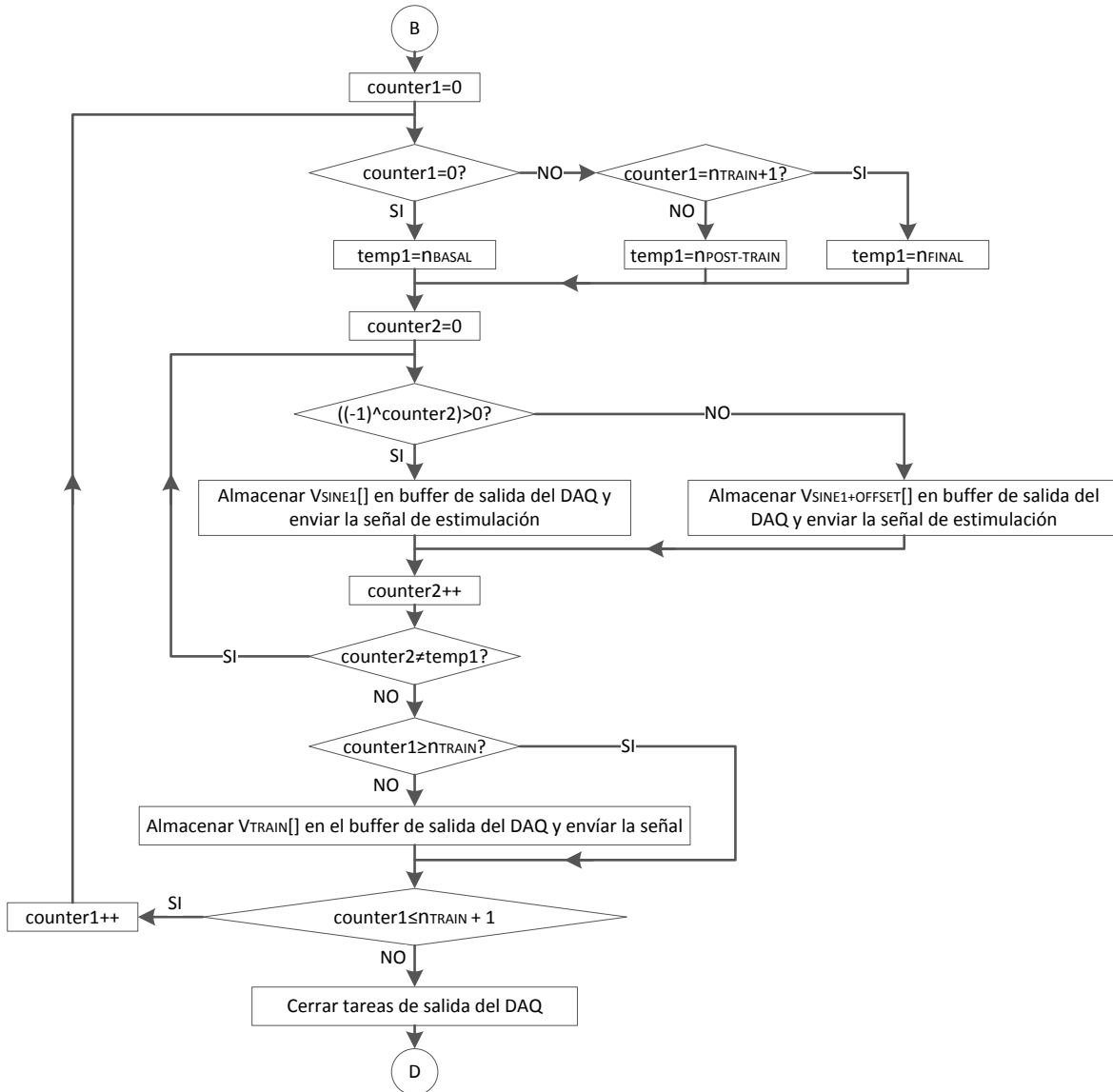


Figura 2.12.3 Diagrama de flujo detallado del submódulo de monitoreo de cambios capacitivos.

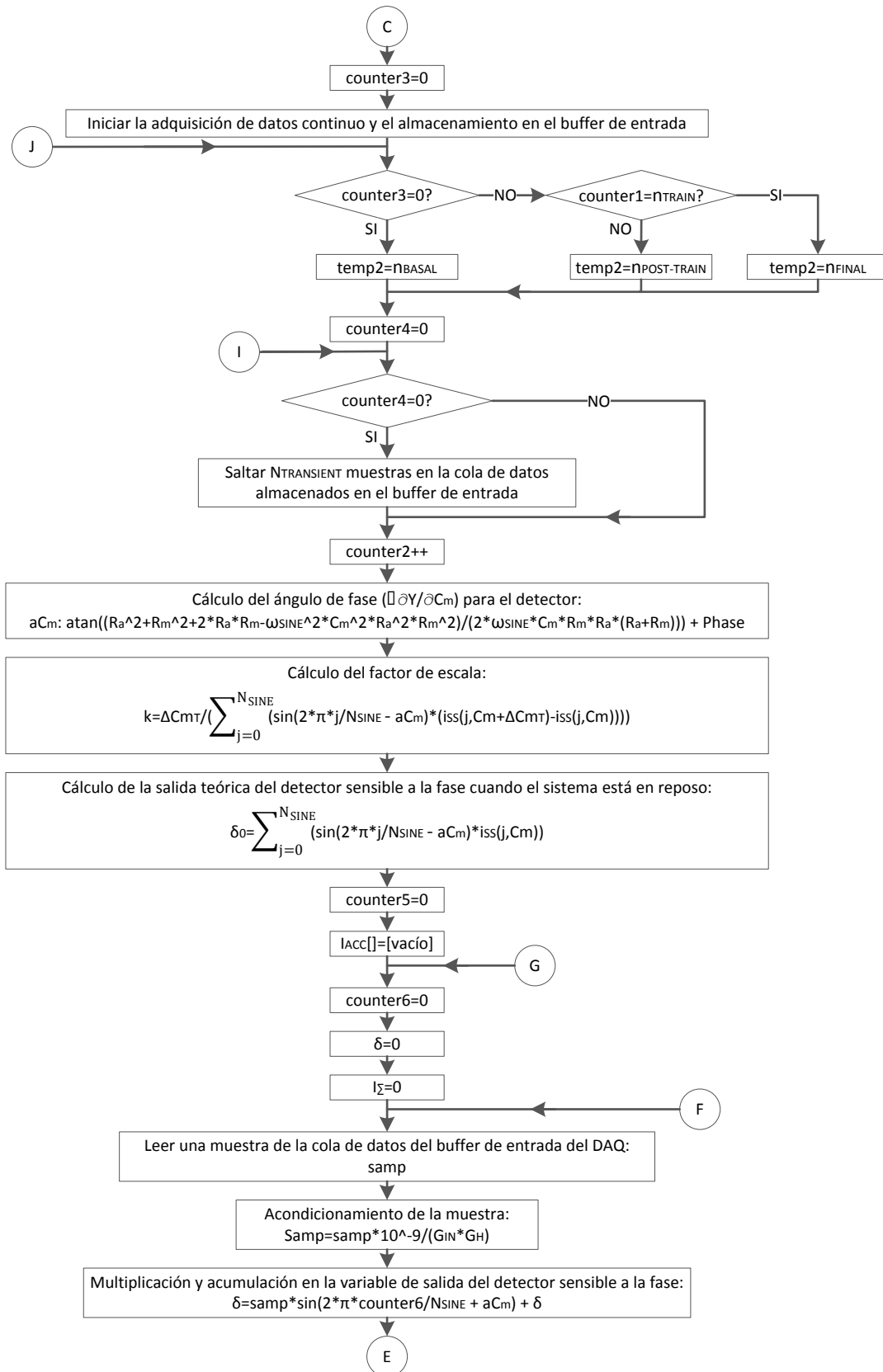


Figura 2.12.4 Diagrama de flujo detallado del submódulo de monitoreo de cambios capacitivos.

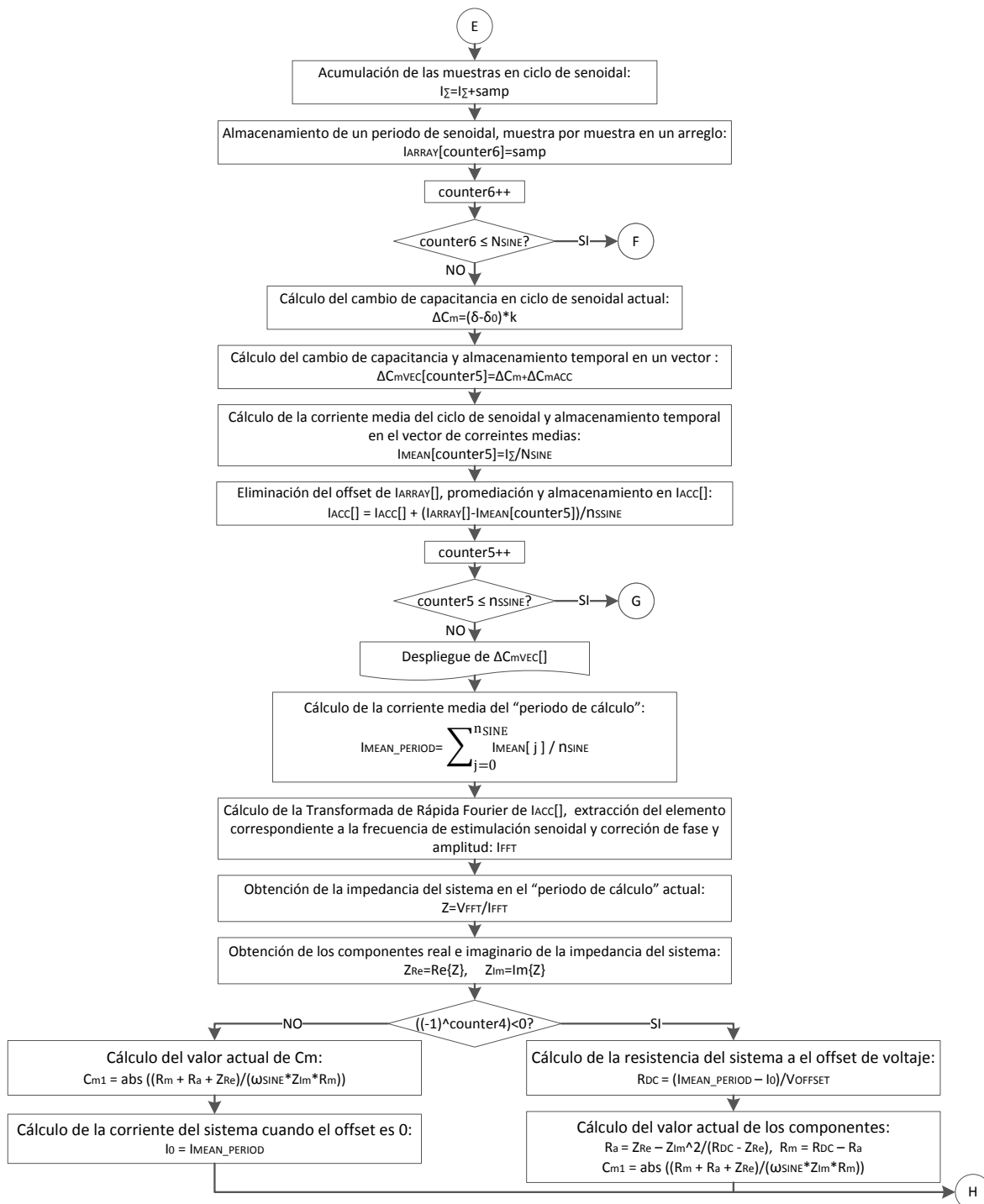


Figura 2.12.5 Diagrama de flujo detallado del submódulo de monitoreo de cambios capacitivos.

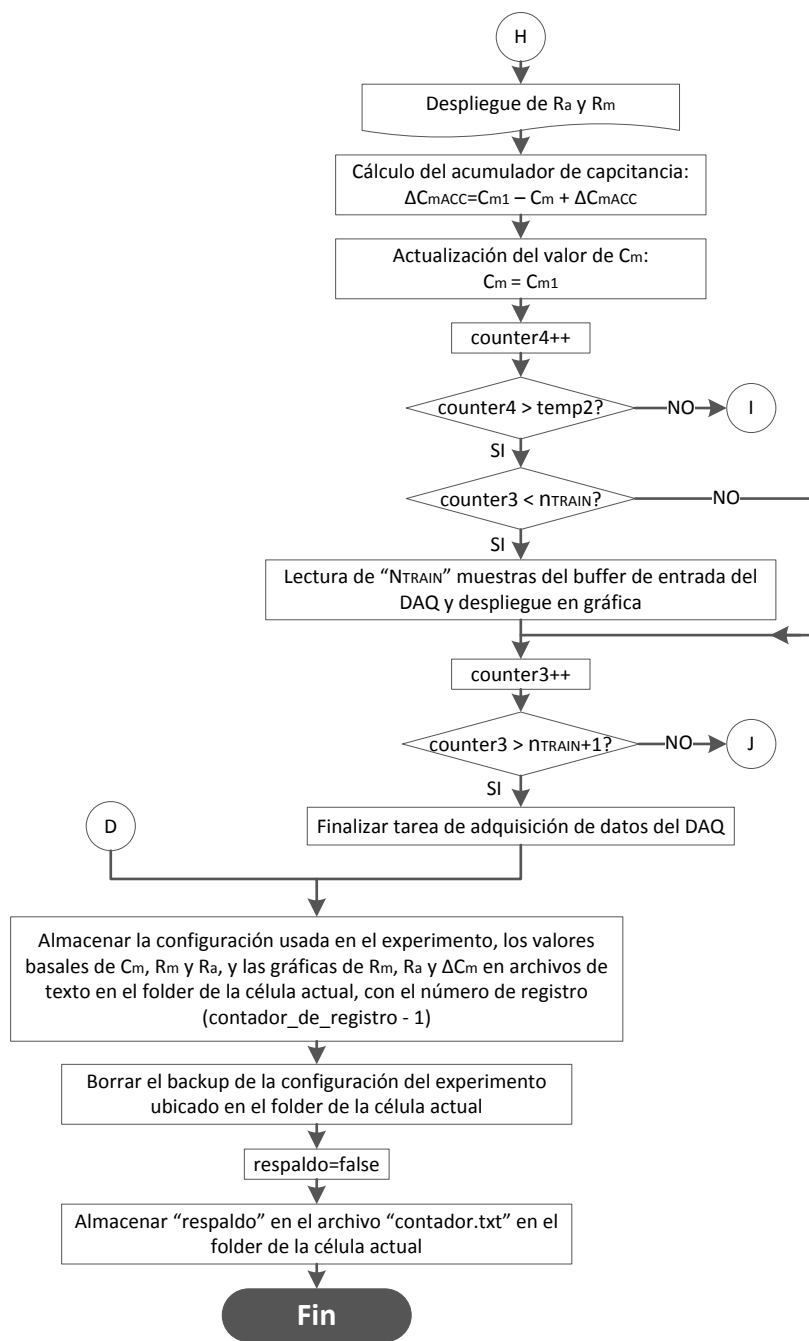


Figura 2.12.6 Diagrama de flujo detallado del submódulo de monitoreo de cambios capacitivos.

3. MÉTODO

Los experimentos se llevaron a cabo en neuronas de Retzius de sanguijuelas *Hirudo verbana* Carena 1820 (identificadas de acuerdo con [75]) y mantenidas en cultivo de acuerdo con [76]. El protocolo de estimulación consistió en 5 minutos de monitoreo basal, seguido por cinco trenes de pulsos cuadrados a 20Hz con 10ms de ciclo de trabajo y 2 minutos de estimulación entre cada uno de ellos, terminando con 5 minutos de monitoreo final. Los resultados se compararon con los obtenidos en simulaciones computacionales y registros con un modelo eléctrico pasivo de la neurona.

3.1 SIMULACIONES COMPUTACIONALES Y ELÉCTRICAS

Todas las simulaciones se realizaron usando los valores de los componentes eléctricos mostrados en la **Tabla 1.1** ($R_a = 25M\Omega$, $R_m = 50M\Omega$, $C_m = 1.2nF$). El objetivo de estas simulaciones fue usarlas para calibrar el sistema, además de utilizarlas como referencias del ruido y error ideales.

3.1.1 SIMULACIONES COMPUTACIONALES

La ejecución de las simulaciones computacionales fue hecha en MATLAB R2010b de MathWorks. En ellas se utilizaron señales adicionadas con ruido de 1.1 pA RMS (similar al medido en experimentos biológicos). La primera simulación computacional consistió simplemente en aumentar el valor de la capacitancia en 10pf, una magnitud dentro del rango reportado durante la exocitosis somática en neuronas de Retzius.

La segunda simulación fue hecha con la intención de probar la capacidad del algoritmo de hacer estimaciones cuando los valores de C_m , R_m y R_a no es constante. R_m se hizo disminuir linealmente 5% de su valor base (**Figura 3.1 B**), mientras que R_a aumentó linealmente un 4% de su valor base. Además se hizo que R_a tuviera aumentos súbitos del 10% de su valor base, tal como sucede en experimentos reales debido a bloqueos repentinos de la micropipeta (**Figura 3.1 C**). Al mismo tiempo C_m se hizo variar senoidalmente 0.5pF sobre su valor base (**Figura 3.1 A**).

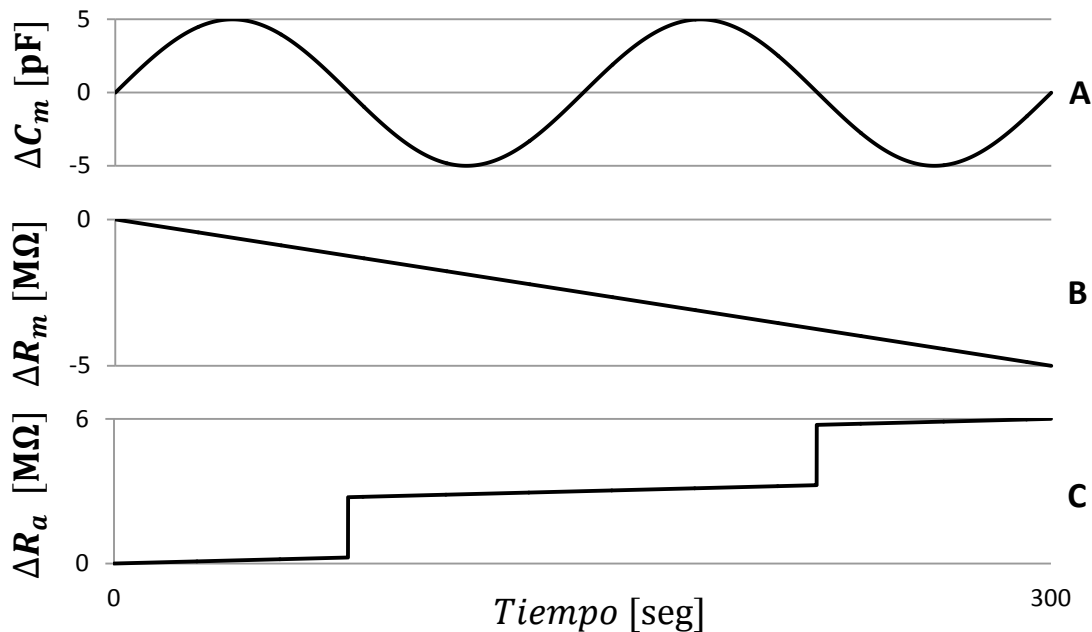


Figura 3.1 Gráficas del valor de ΔC_m , ΔR_m y ΔR_a durante la segunda simulación. ΔC_m tiene la forma de una función seno para simular cambios con pendiente variable como sucedería durante ciclos de exo-endocitosis, ΔR_m decrece linealmente simulando un posible cambio en la conductancia membranal, y ΔR_a aumenta linealmente además de tener saltos súbitos simulando lo que sucedería al bloquearse la pipeta.

Además, todos los resultados fueron presentados pares de gráficas, una con los datos crudos y la otra con los datos filtrados con un filtro FIR paso bajo de orden 30, con frecuencia de corte de 0.01 Hz, dado que las variaciones de capacitancia simuladas (**Figura 3.1 A**) tuvieron una frecuencia de 0.0067 Hz.

3.1.2 SIMULACIONES CON EL MODELO ELÉCTRICO

La simulación con el modelo eléctrico fue hecha con el programa final desarrollado en LabVIEW 2012. La simulación eléctrica consistió en aumentar en 10pF la capacitancia de membrana del modelo eléctrico. El resultado fue presentado con en dos gráficas, una con los datos crudos y otra con los datos filtrados con el mismo filtro usado en 3.1.1.

3.2 EXPERIMENTO

3.2.1 SOLUCIONES, EQUIPO Y MATERIAL

En las siguientes tablas se listan las soluciones (**Tabla 3.1**), el material y el equipo (**Tabla 3.2**), usados en la realización del experimento con la preparación biológica.

Tabla 3.1 Soluciones	
Solución intracelular (7.3 pH)	Con base en [77]: <ul style="list-style-type: none"> • CaCl₂ 1mM • EGTA 2.4mM • HEPES 2mM • CsCl 100mM • TEA 25mM • ATP 3mM • GTP 0.3mM • NMDG 17.93mM • Glucosa 20.07mM
Solución extracelular	<ul style="list-style-type: none"> • Medio de cultivo Leibovitz L-15

Tabla 3.2 Equipo y material		
	Equipo	Material
Fabricación de pipetas	<ul style="list-style-type: none"> • Puller P-97 de Sutter Instruments. • Microscopio Leica con objetivo y ocular de 10x. • Fuente de voltaje con filamento incandescente. • Micromanipulador mecánico con micrómetros Starrett. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos capilares de borosilicato BF150-86-10 de Sutter Instruments.
Preparación de soluciones	<ul style="list-style-type: none"> • Balanza electrónica • pH-metro Beckman. 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtros para jeringa estériles de 0.2 μm • Jeringa de 10ml
Experimento	<ul style="list-style-type: none"> • Mesa antivibraciones • Microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 con objetivos de 4x, 40x y oculares de 10x. • Micromanipulador hidráulico Narishigue • Sistema de cuantificación de exocitosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Jeringa de 1ml

3.2.2 PROCEDIMIENTO

Los experimentos se realizaron con el procedimiento mostrado a continuación:

1. Se verifica que el equipo en conjunto con el sistema de cuantificación funcionen correctamente.
2. Se fabrican las micropipetas en el puller. Las pipetas deben ser hechas momentos antes de comenzar el experimento, y no deberían usarse después de más de 5 horas de su manufactura [57].
3. Se pulen las puntas usando una microforja.
4. Se reduce la solución extracelular del plato de cultivo, y una vez sobre la platina del microscopio, se coloca el electrodo de referencia dentro del baño.

5. Se llenan las pipetas con la solución intracelular filtrada a $0.2\mu\text{m}$ preparada con anticipación al experimento, evitando la creación de burbujas en la punta.
6. Se coloca la micropipeta en el holder y se procede a hacer el whole-cell patch-clamp. El proceso se monitorea con el microscopio y con el “submódulo de monitoreo del sello” del sistema de cuantificación.
7. Se verifica en el “submódulo de estimación de valores iniciales” que los valores de los componentes eléctricos estén dentro de los rangos aceptables, indicando esto una correcta ruptura del parche. De lo contrario se cambia de célula.
8. Finalmente, se ejecuta el “submódulo de monitoreo de cambios capacitivos” y se realiza la cuantificación de la excitación somática en la neurona.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE LAS SIMULACIONES

4.1.1 SIMULACIONES COMPUTACIONALES

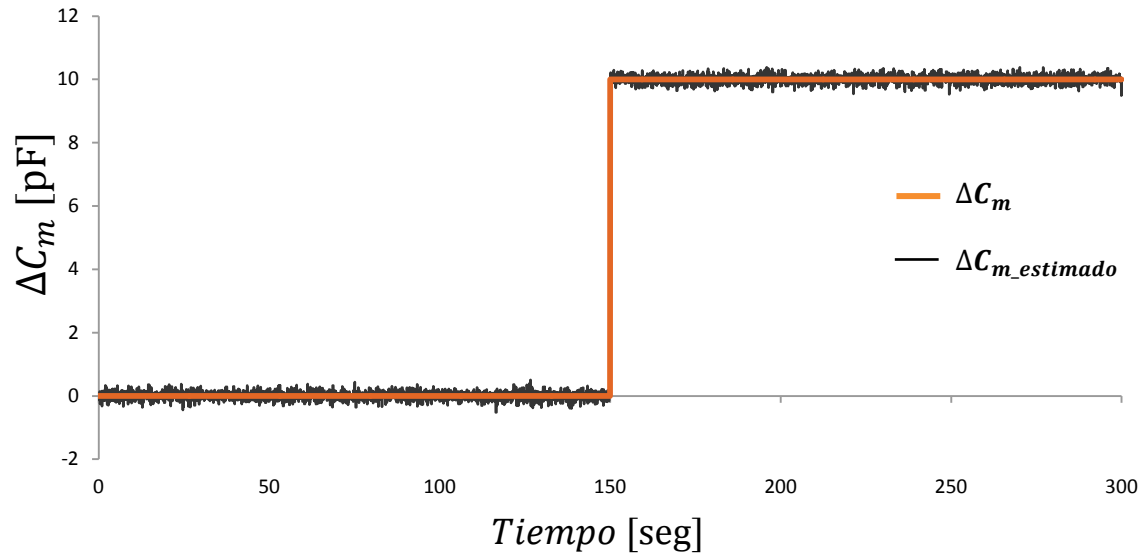


Figura 4.1 Gráfica de los valores crudos de ΔC_m y $\Delta C_{m_estimado}$ en la primera simulación computacional. Las estimaciones del valor de los cambios capacitivos tuvieron un error cuadrático medio (ECM) de 0.132 [pFarads], y un ruido RMS de 0.134 [pFarads].

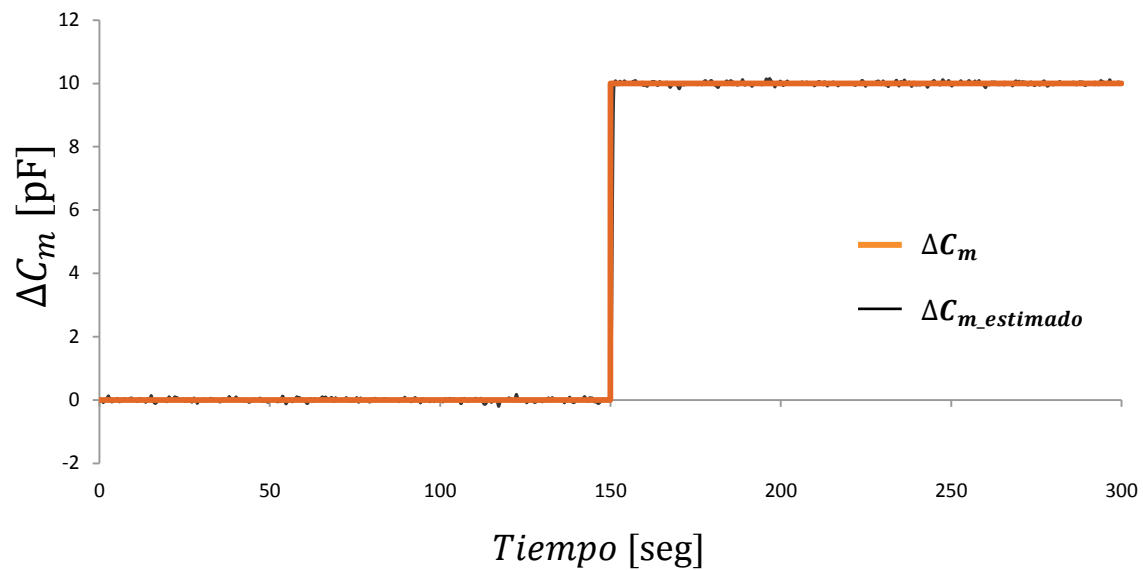


Figura 4.2 Gráfica de los valores filtrados de ΔC_m y $\Delta C_{m_estimado}$ en la primera simulación computacional. Las estimaciones del valor de los cambios capacitivos tuvieron un ECM de 0.051 [pFarads], y un ruido RMS de 0.049 [pFarads].

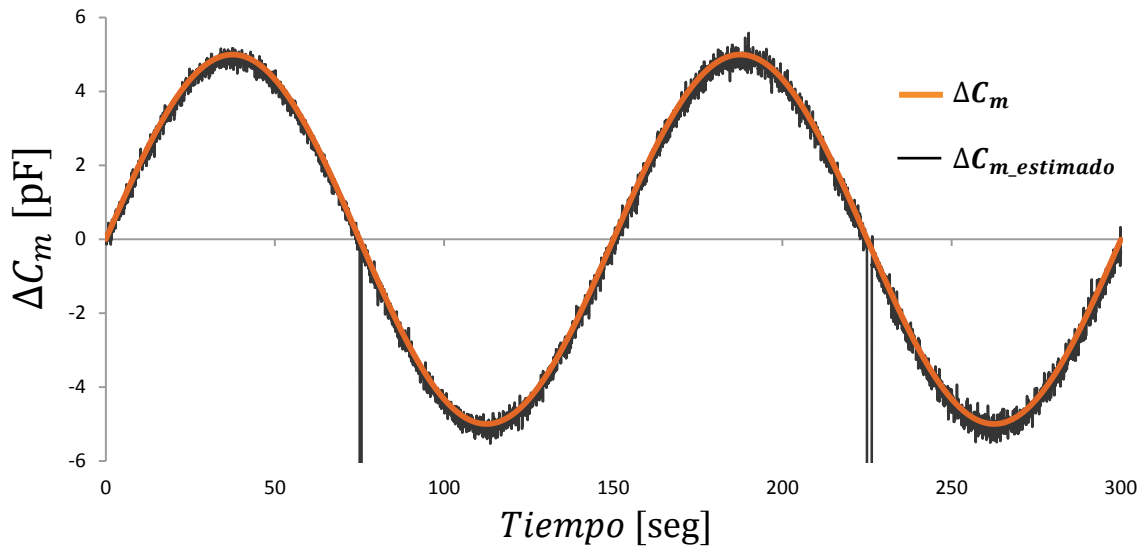


Figura 4.3 Gráfica de los valores crudos de ΔC_m y $\Delta C_{m_estimado}$ durante la segunda simulación computacional. Las estimaciones del valor de los cambios capacitivos tuvieron un ECM de 0.211 [pFarads], y un ruido RMS de 0.172 [pFarads].

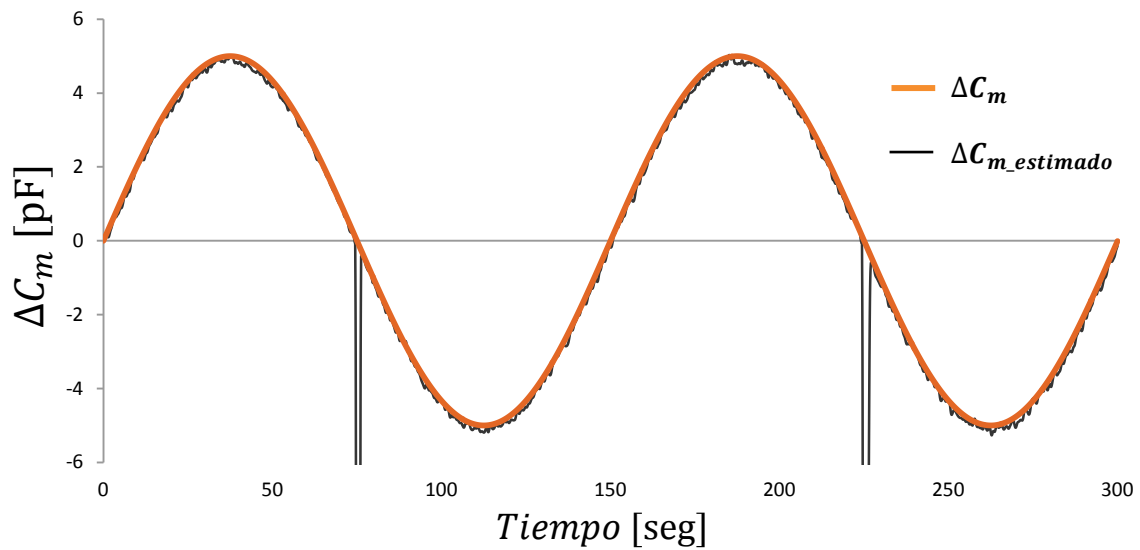


Figura 4.4 Gráfica de los valores filtrados de ΔC_m y $\Delta C_{m_estimado}$ durante la segunda simulación computacional. Las estimaciones del valor de los cambios capacitivos tuvieron un ECM de 0.134 [pFarads], y un ruido RMS de 0.067 [pFarads].

4.1.2 SIMULACIONES CON EL MODELO ELÉCTRICO

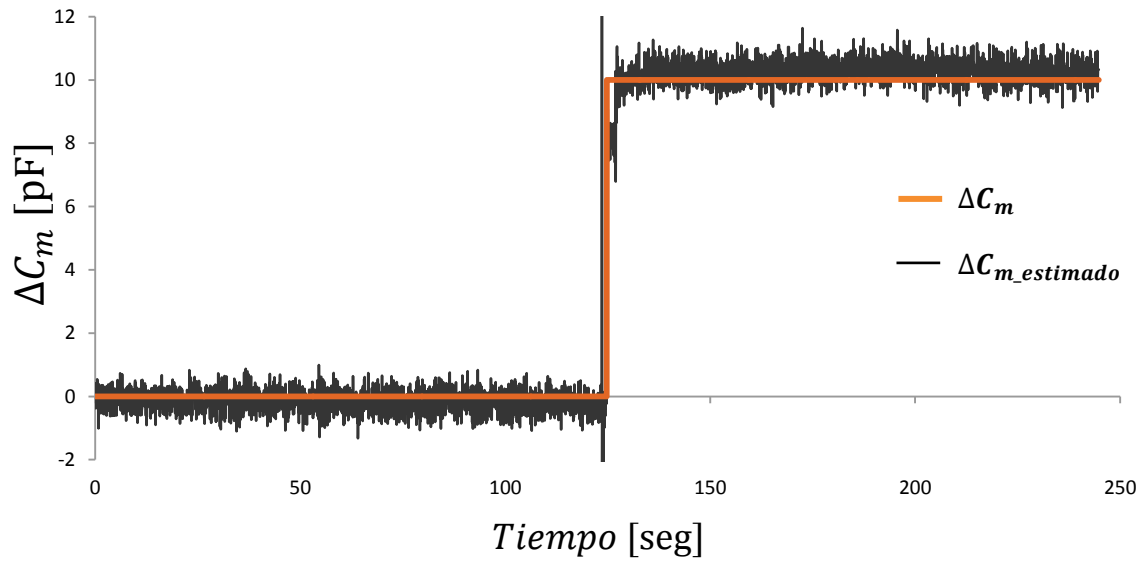


Figura 4.5 Gráfica de los valores crudos de ΔC_m y $\Delta C_{m_estimado}$ durante la simulación con el modelo eléctrico. Las estimaciones del valor de los cambios capacitivos tuvieron un ECM de 0.448 [pFarads], y un ruido RMS de 0.329 [pFarads].

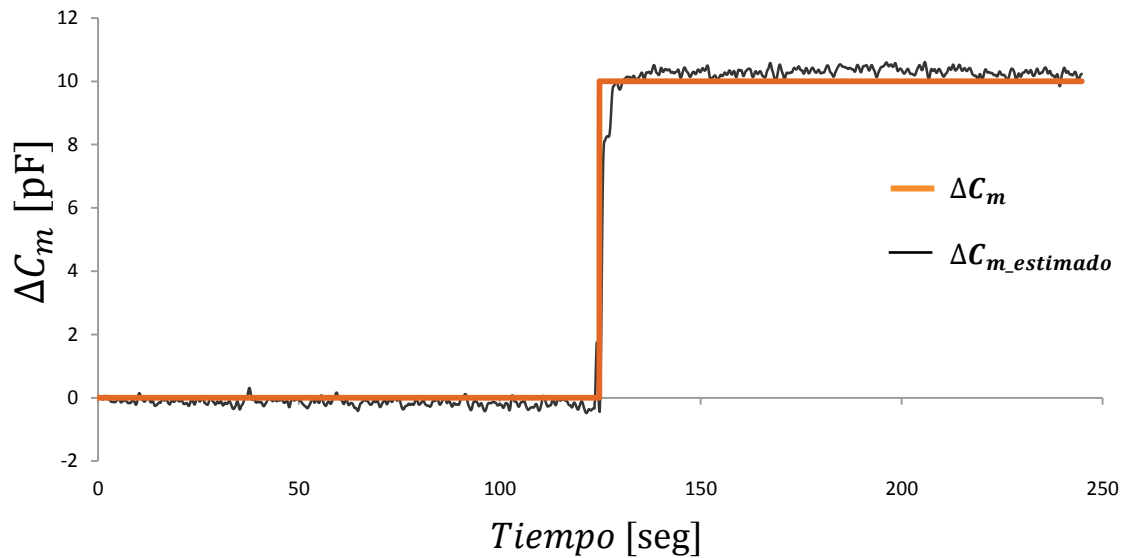


Figura 4.6 Gráfica de los valores filtrados de ΔC_m y $\Delta C_{m_estimado}$ durante la simulación con el modelo eléctrico. Las estimaciones del valor de los cambios capacitivos tuvieron un ECM de 0.548 [pFarads], y un ruido RMS de 0.117 [Farads]. Con el desfase corregido el ECM fue de 0.298 [pFarads].

4.2 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS

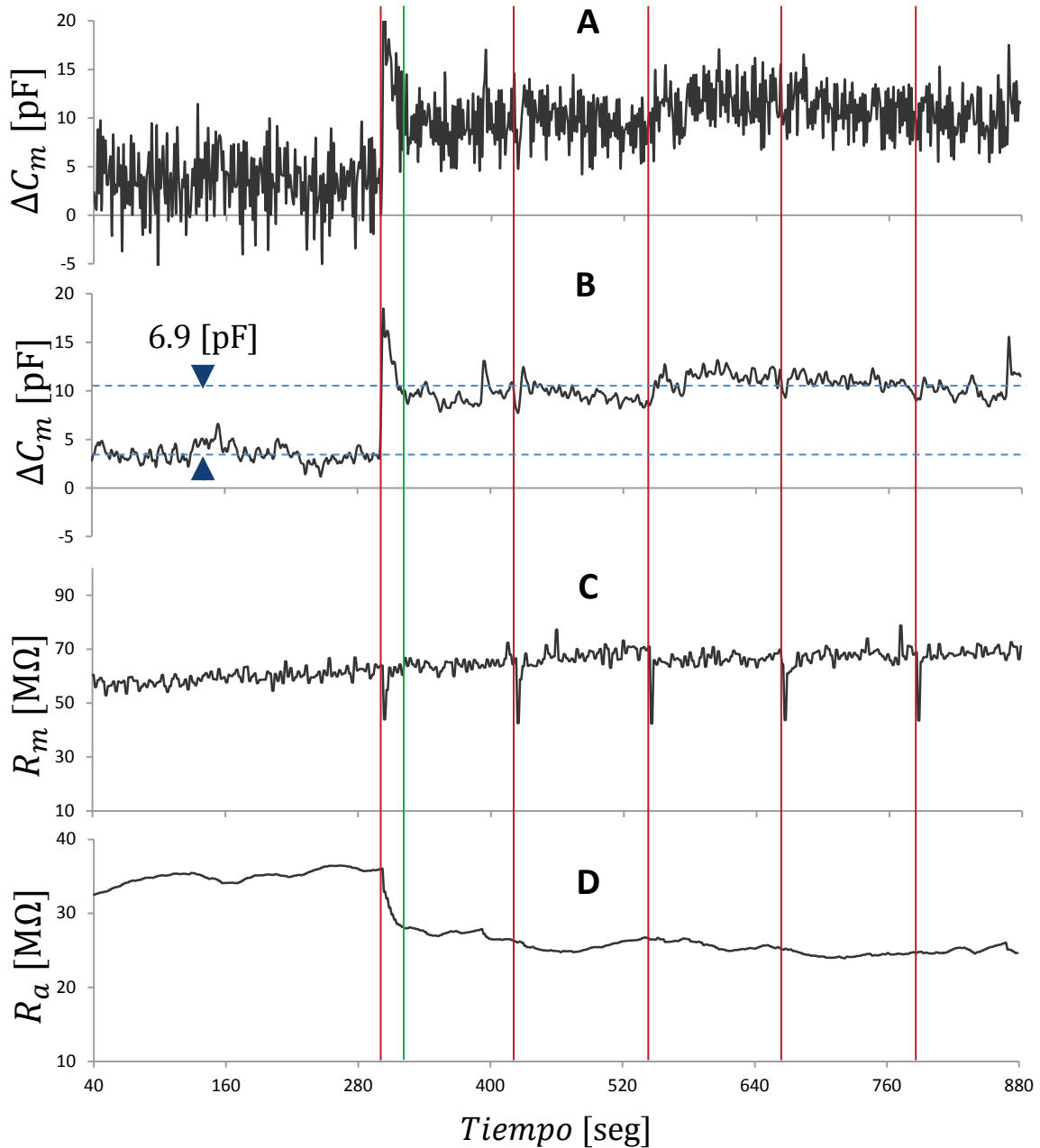


Figura 4.7 Gráficas de los valores de ΔC_m , R_m y R_a durante uno de los experimentos con neuronas de Retzius. A) Gráfica de los valores estimados de ΔC_m . B) Gráfica de los valores estimados y filtrados de ΔC_m . C) Gráfica de los valores estimados y filtrados de R_m . D) Gráfica de los valores estimados de R_a . Las líneas rojas verticales indican los momentos en los que la neurona recibió trenes de pulsos cuadrados (300, 420, 540, 660 y 780 segundos). En el periodo ubicado entre la primera línea roja y la línea verde se encuentra un artefacto que no fue tomado en cuenta para los cálculos. El cambio (líneas punteadas) entre la porción basal de la señal ($t < 300$ segundos) y la porción posterior al artefacto ($t > 320$ segundos), es de aproximadamente 6.9 [pFarads].

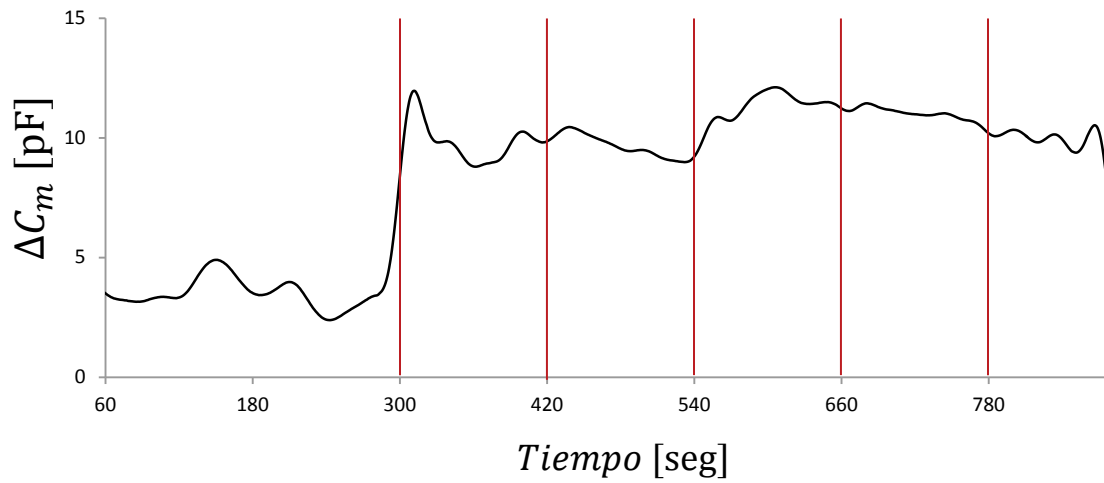


Figura 4.8 Gráfica de ΔC_m con un filtrado de mayor orden durante el mismo experimento. Al aplicarse a ΔC_m un filtro FIR paso bajo de orden 500 y frecuencia de corte de 0.01 Hz, se revelan cinéticas lentas durante el registro. Los incrementos posteriores a los trenes a los 300 y 540 segundos podrían tener un origen fisiológico.

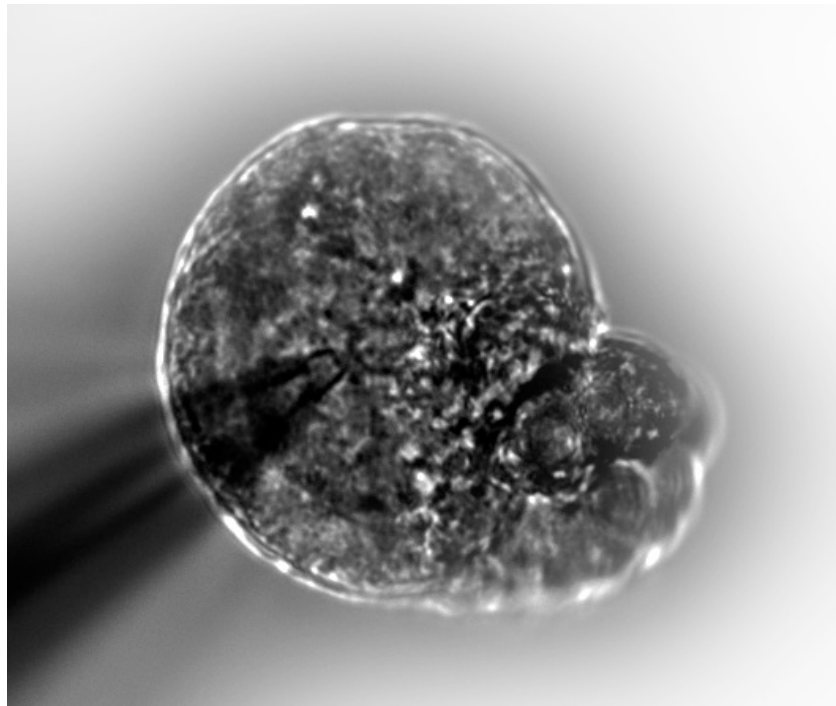


Figura 4.9 Fotografía de una neurona de Retzius durante uno de los experimentos. En la parte inferior izquierda se aprecia la micropipeta cuya punta se ubica encima de la neurona (centro), donde el sello fue hecho.

4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante las simulaciones computacionales, el algoritmo demostró ser capaz de estimar cambios capacitivos con errores y ruidos sumamente bajos ($ECM \approx 1.3\%$, $SNR \approx 40$ [db]).

Las pruebas eléctricas arrojaron resultados con ruidos y errores mayores a los obtenidos computacionalmente, aunque suficientemente pequeños ($ECM \approx 2.98\%$, $SNR \approx 30$ [db]) como para afirmar que la realización de mediciones en preparaciones biológicas es factible con el set-up actual. Las diferencias entre las pruebas eléctricas y las computacionales podrían deberse a factores como: la distorsión de las señales por parte de los instrumentos de medición y acondicionamiento, y aislamiento insuficiente contra el ruido de 60 Hz.

Por otro lado, la cuantificación de cambios capacitivos durante los experimentos con la preparación biológica, estuvo lejos de alcanzar niveles de ruido tan bajos como las pruebas computacionales y eléctricas. Sin embargo, por medio de la aplicación online de filtros FIR paso bajo a ΔC_m , es posible apreciar un aumento importante en la capacitancia membranal tras la primera aplicación de pulsos cuadrados (300 segundos). El artefacto ubicado entre los 300 y 320 segundos fue causado por la caída súbita de la resistencia de acceso, debida probablemente a modificaciones en el parche de membrana en la punta de la micropipeta, provocadas a su vez por un aumento repentino del flujo iónico a través de la pipeta.

El cambio capacitivo entre la porción basal de la señal ($t < 300$ segundos), y la porción posterior al artefacto ($320 < t < 880$ segundos) es de aproximadamente 6.9 [pFarads] o alrededor de 25,000 vesículas fusionadas, magnitud consistente con estimaciones indirectas [3, 33, 34], y que sugiere que dicho cambio tiene un origen fisiológico. Además por medio de la aplicación offline de un filtro FIR de mayor orden (500), es posible observar que el aumento en la capacitancia membranal está compuesto por dos aumentos individuales, uno a partir de los 300 segundos y otro a partir de los 540

segundos. Esto parece ser bastante consistente con el hecho de que las vesículas secretoras en las neuronas de Retzius se encuentran concentradas en dos poblaciones ubicadas a diferentes distancias de la membrana [33, 34], y podría representar el retraso en la fusión de cada grupo.

5. CONCLUSIÓN

El sistema de cuantificación de exocitosis somática desarrollado permite medir en tiempo real el cambio neto en la superficie de la membrana plasmática, mas no la cantidad individual de vesículas endocitadas o exocitadas. Sin embargo, dado que el curso temporal de la secreción somática en las neuronas de Retzius es del orden de minutos, este sistema puede ser una excelente herramienta para el estudio de la cinética y mecanismos del ciclo completo de exocitosis y endocitosis en estas neuronas, y con ello contribuir a la comprensión de principios generales de la secreción extrasináptica.

Las simulaciones computacionales y las pruebas con el modelo eléctrico demostraron que la medición de cambios capacitivos con errores y niveles de ruido relativamente bajos, es factible con el uso de la instrumentación propuesta y el algoritmo desarrollado.

En la mayor parte de los experimentos el ruido no ha alcanzado niveles tan bajos como en las pruebas con el modelo eléctrico. Esto es atribuible en gran medida a que los procedimientos experimentales, la composición de las soluciones y la fabricación de micropipetas, aún no son las óptimas. Además, debido a que en la literatura la información acerca de la realización de whole-cell en neuronas de Retzius es un muy poca, y acerca de la medición de cambios capacitivos en estas células es nula; la optimización del experimento ha sido básicamente empírica. No obstante, se han hecho registros en los cuales ha sido posible identificar incrementos en la capacitancia membranal después de estimular a las neuronas con trenes de pulsos cuadrados a 20Hz.

En el registro más estable obtenido hasta ahora (**Figura 4.7 y 4.8**), se detectó un incremento en la capacitancia membranal de 6.9pFaradas, el equivalente a la fusión de aproximadamente 25000 vesículas. Además, por medio de la aplicación offline de un filtro FIR al arreglo de datos, se observó que dicho cambio capacitivo está compuesto por dos incrementos individuales. La magnitud y la cinética del cambio en la capacitancia membranal son consistentes con mediciones indirectas de la cinética y del número de

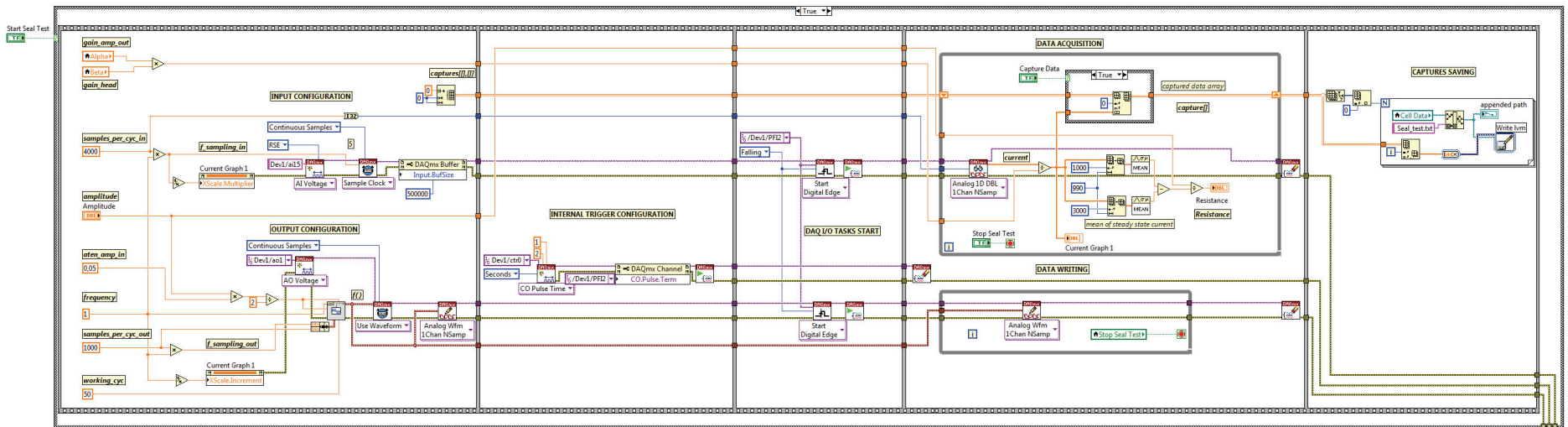
vesículas fusionadas por evento secretorio, así como con observaciones de la ultraestructura de los cúmulos vesiculares.

El sistema de cuantificación aún sigue en desarrollo y se prevé que con algunas mejoras sea posible identificar la cinética del ciclo de exo-endocitosis sin la necesidad de filtrado offline. Las mejoras que se han planteado son: la caracterización y compensación de la distorsión del amplificador de patch-clamp a las señales, el diseño de un algoritmo de control para la amplitud de la señal senoidal y del voltaje de mantenimiento, y el aumento de la relación señal a ruido por medio del uso de más de un ciclo de senoidal por cada estimación del sistema.

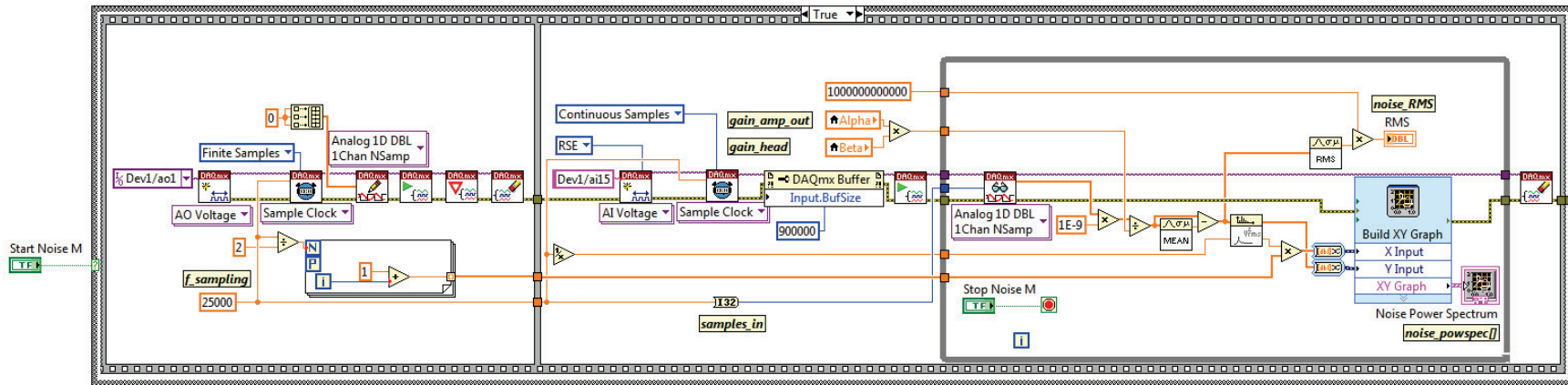
ANEXOS

ANEXO A: CÓDIGO EN LabVIEW®

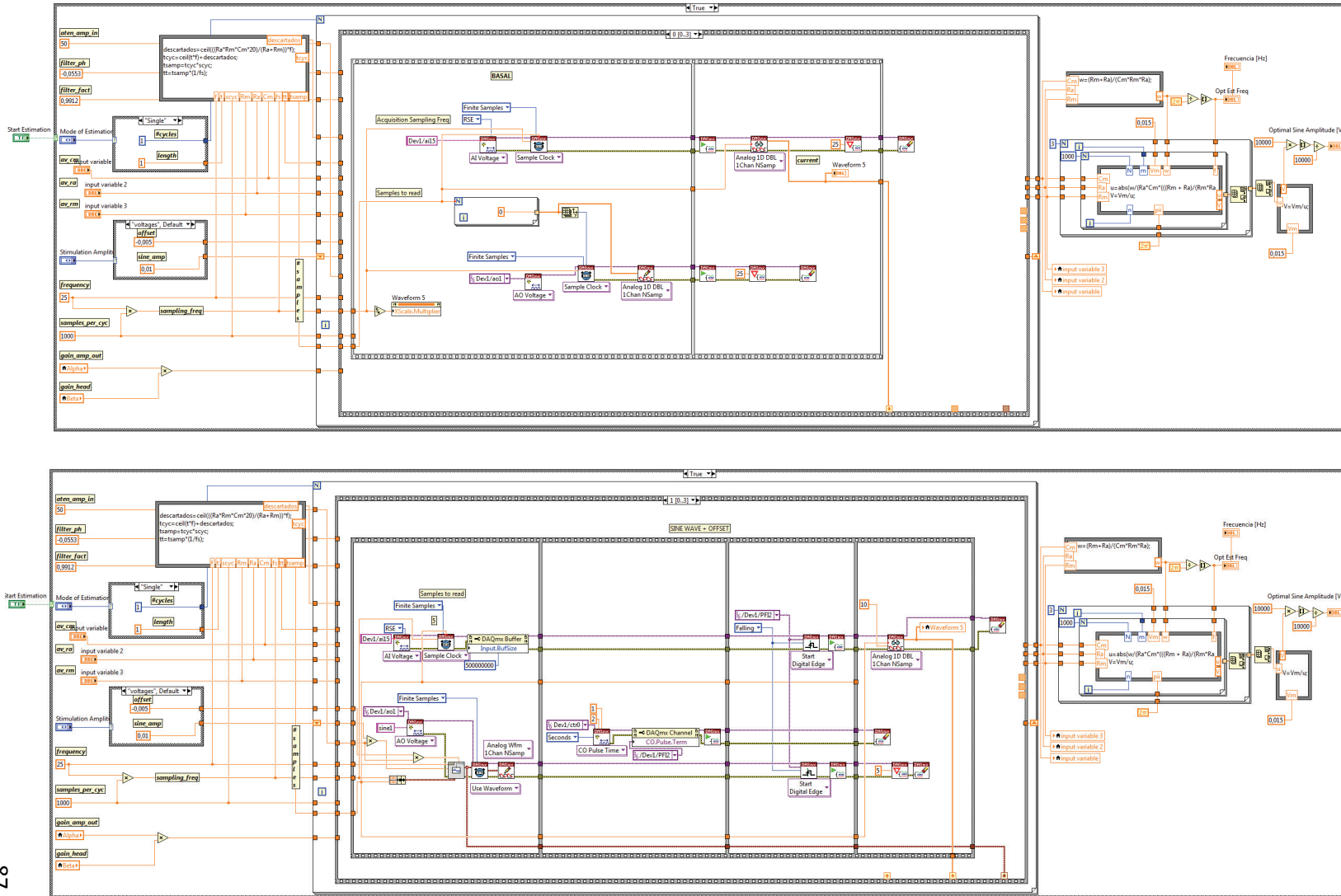
A.1 SUBMÓDULO DE MONITOREO DEL SELLO



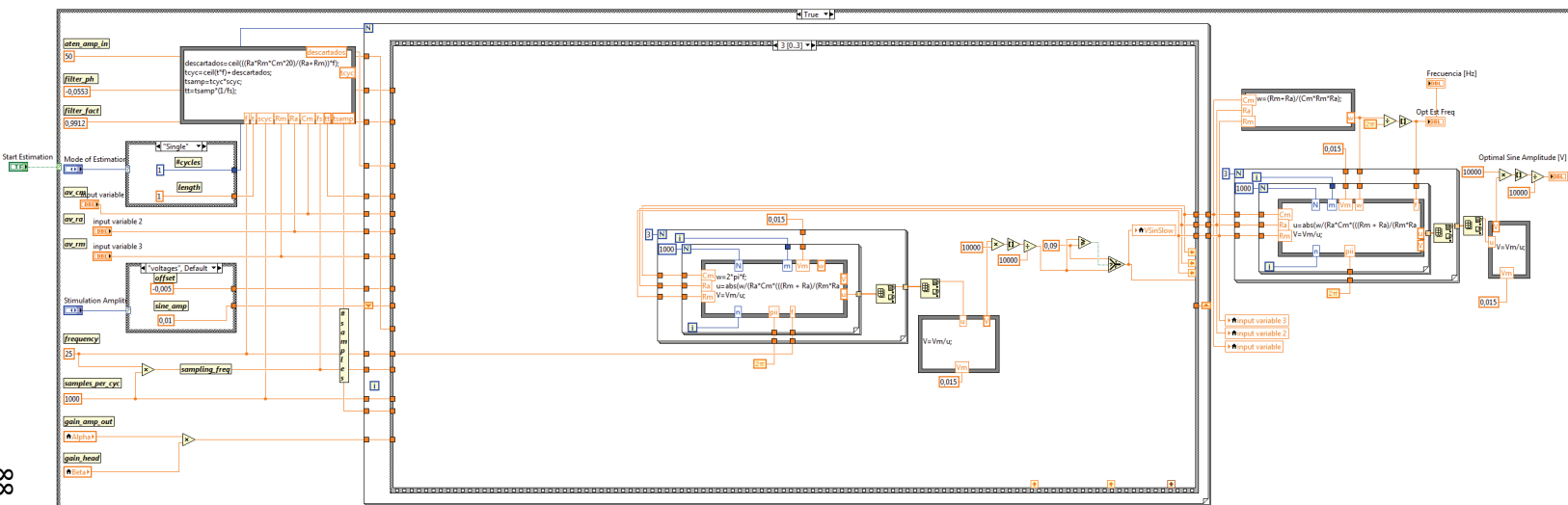
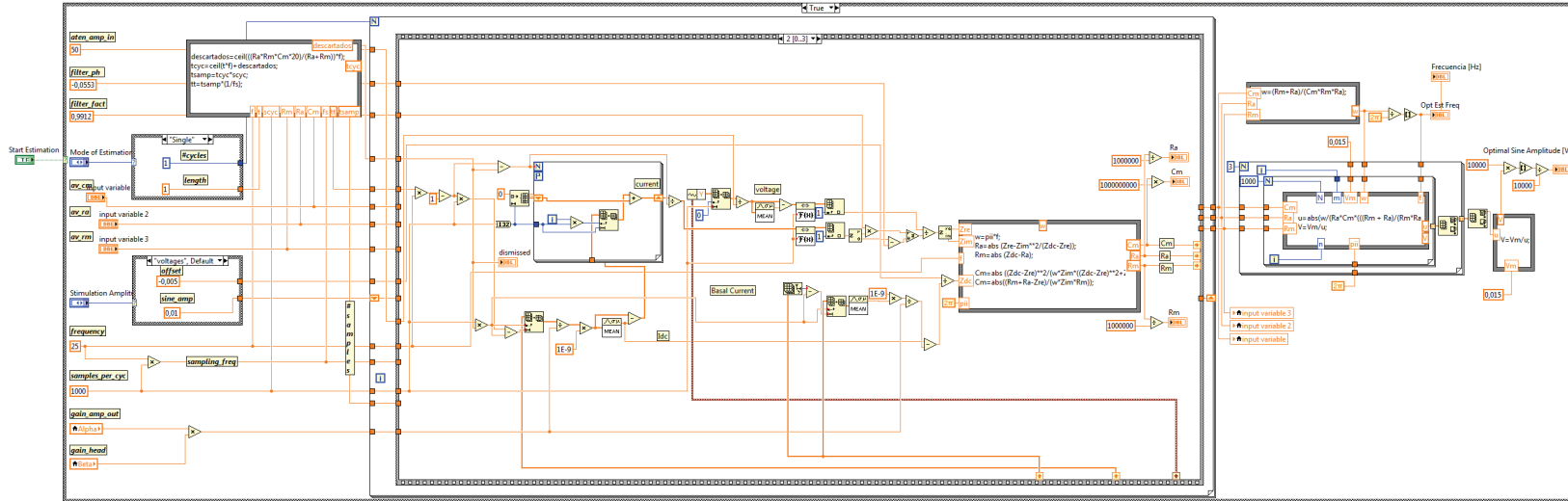
A.2 SUBMÓDULO DE MEDICIÓN DE RUIDO



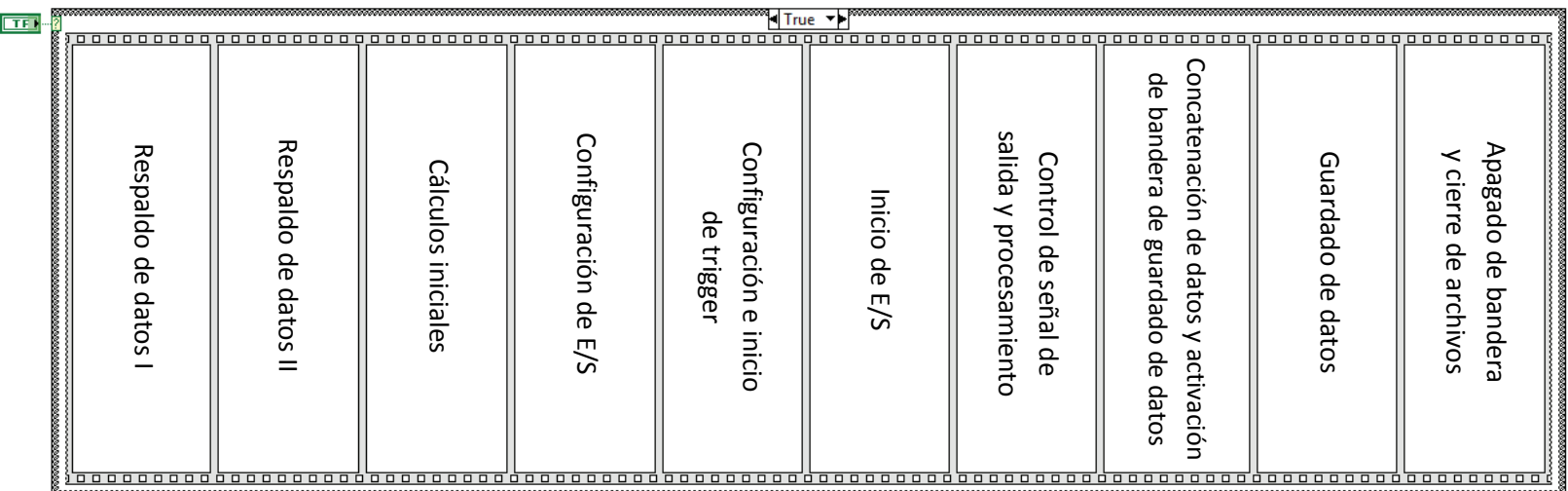
A3 SUBMÓDULO DE ESTIMACIÓN DE VALORES INICIALES (I, II)



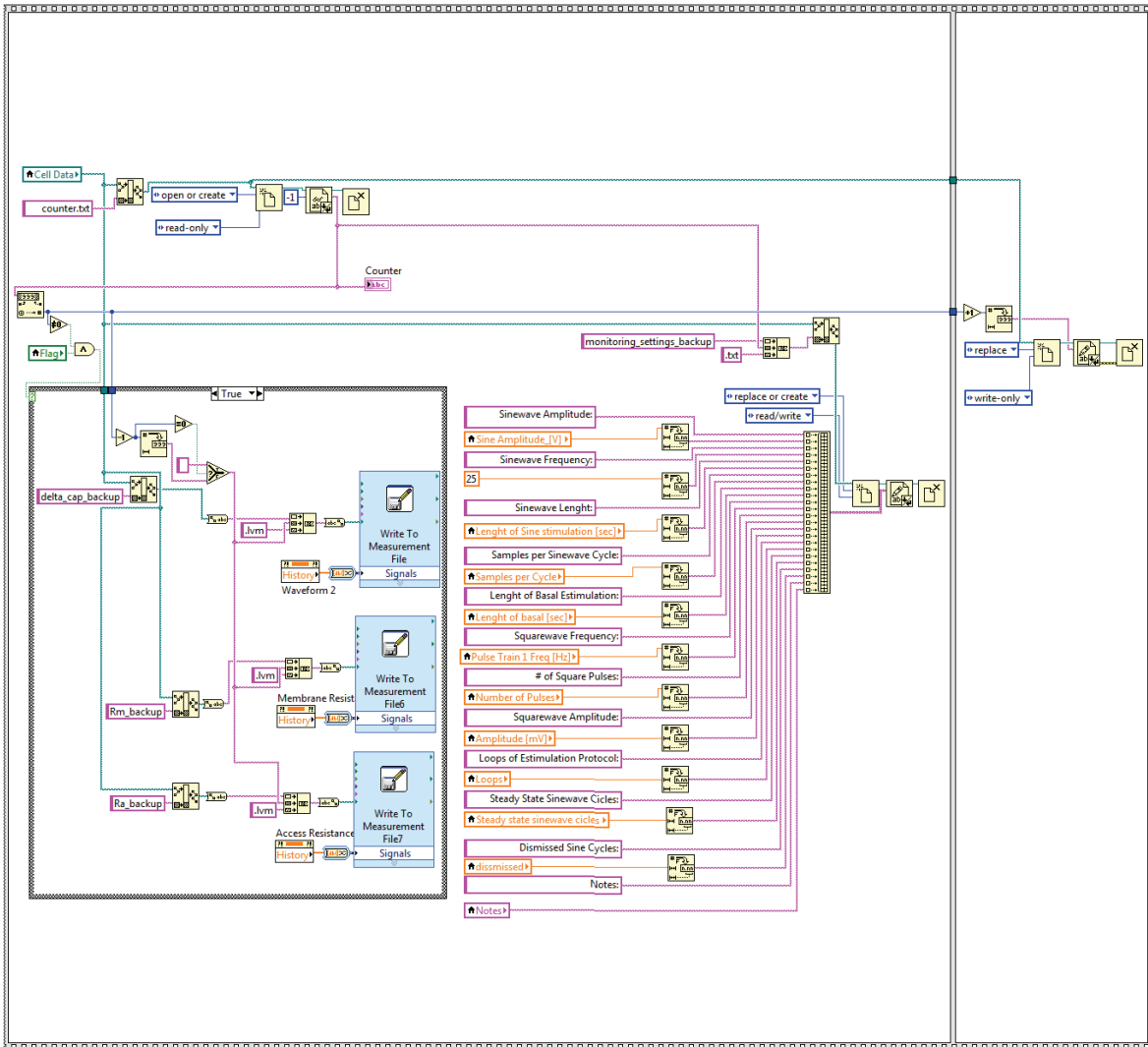
A.3 SUBMÓDULO DE ESTIMACIÓN DE VALORES INICIALES (III, IV)



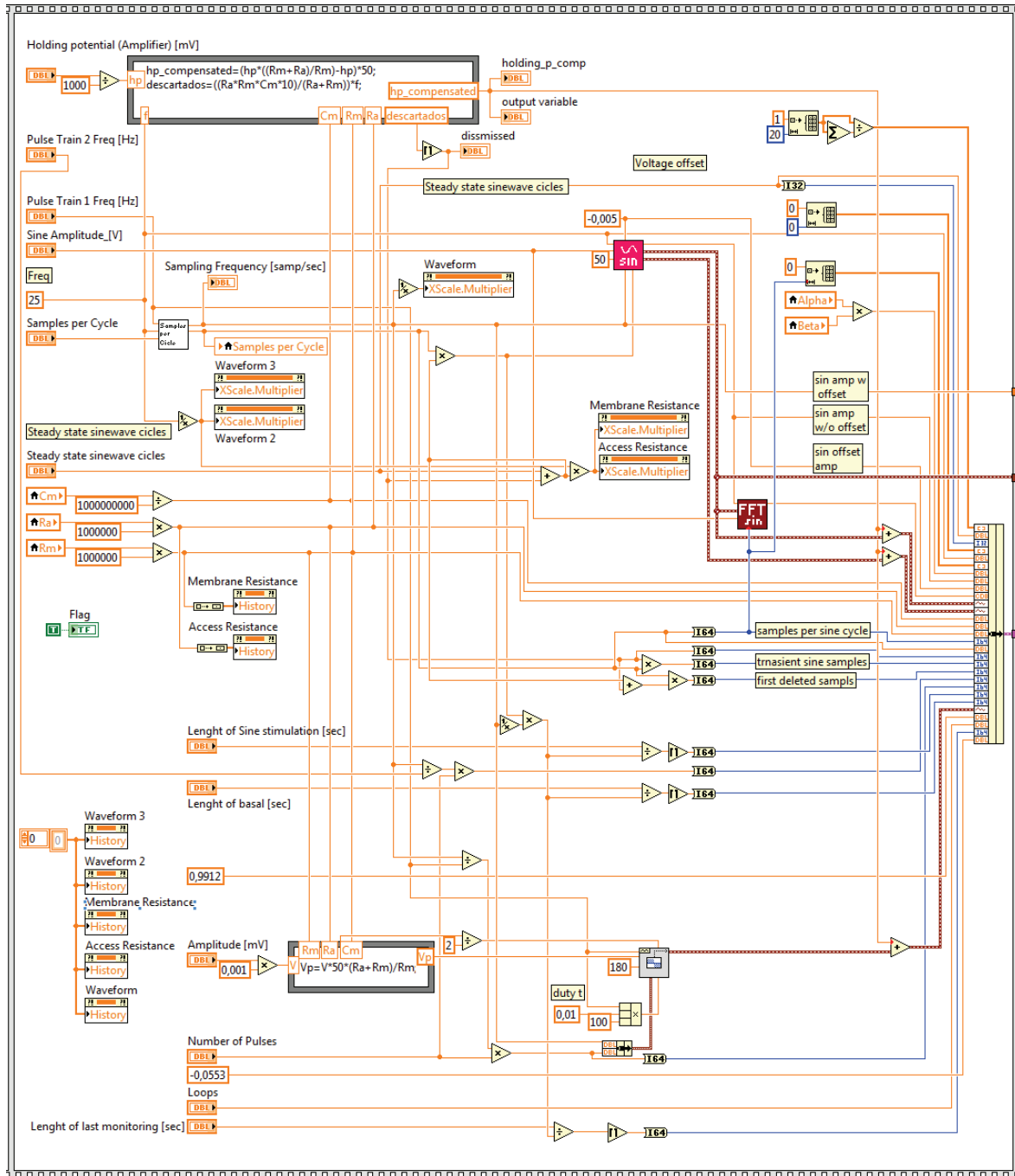
A.4 SUBMÓDULO DE MONITOREO DE CAMBIOS CAPACITIVOS



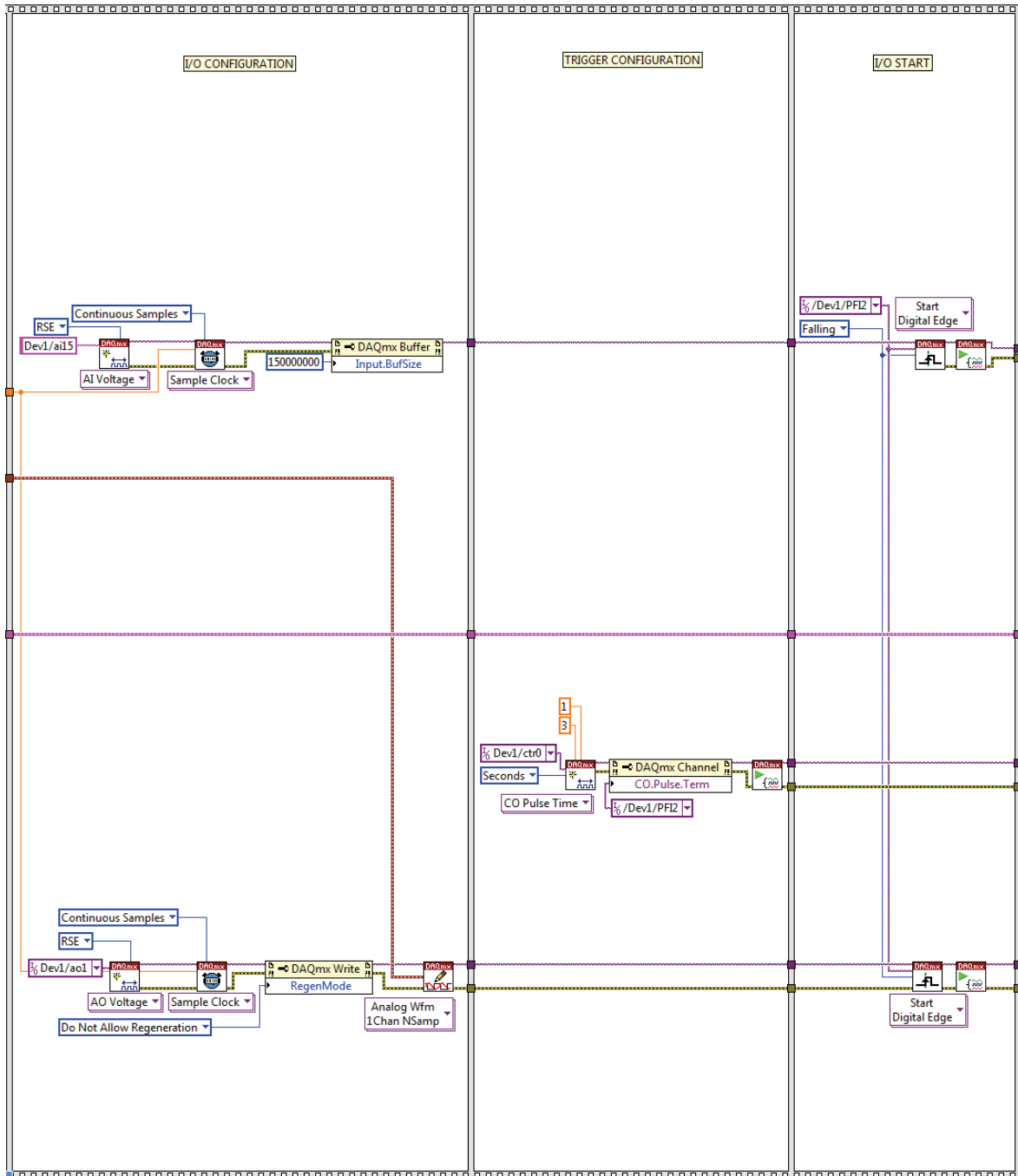
A.4.1 Respaldo de datos I, II



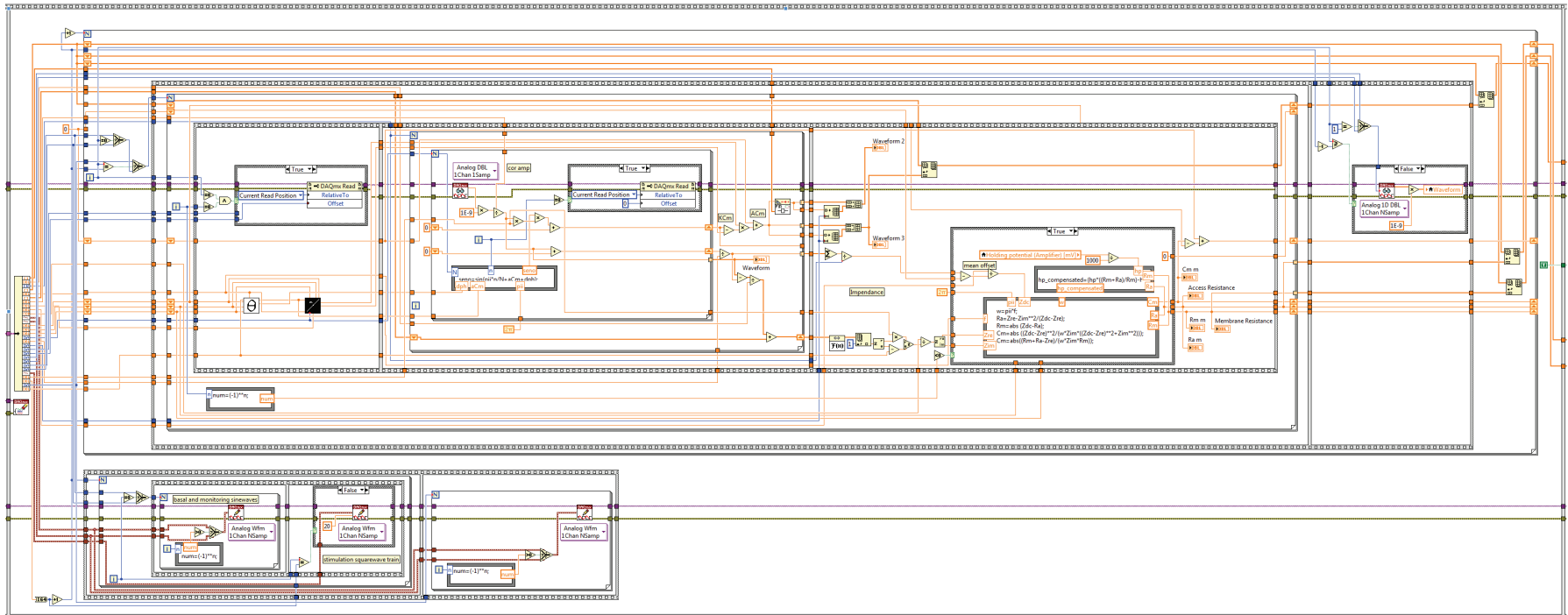
A.4.2 Cálculos Iniciales



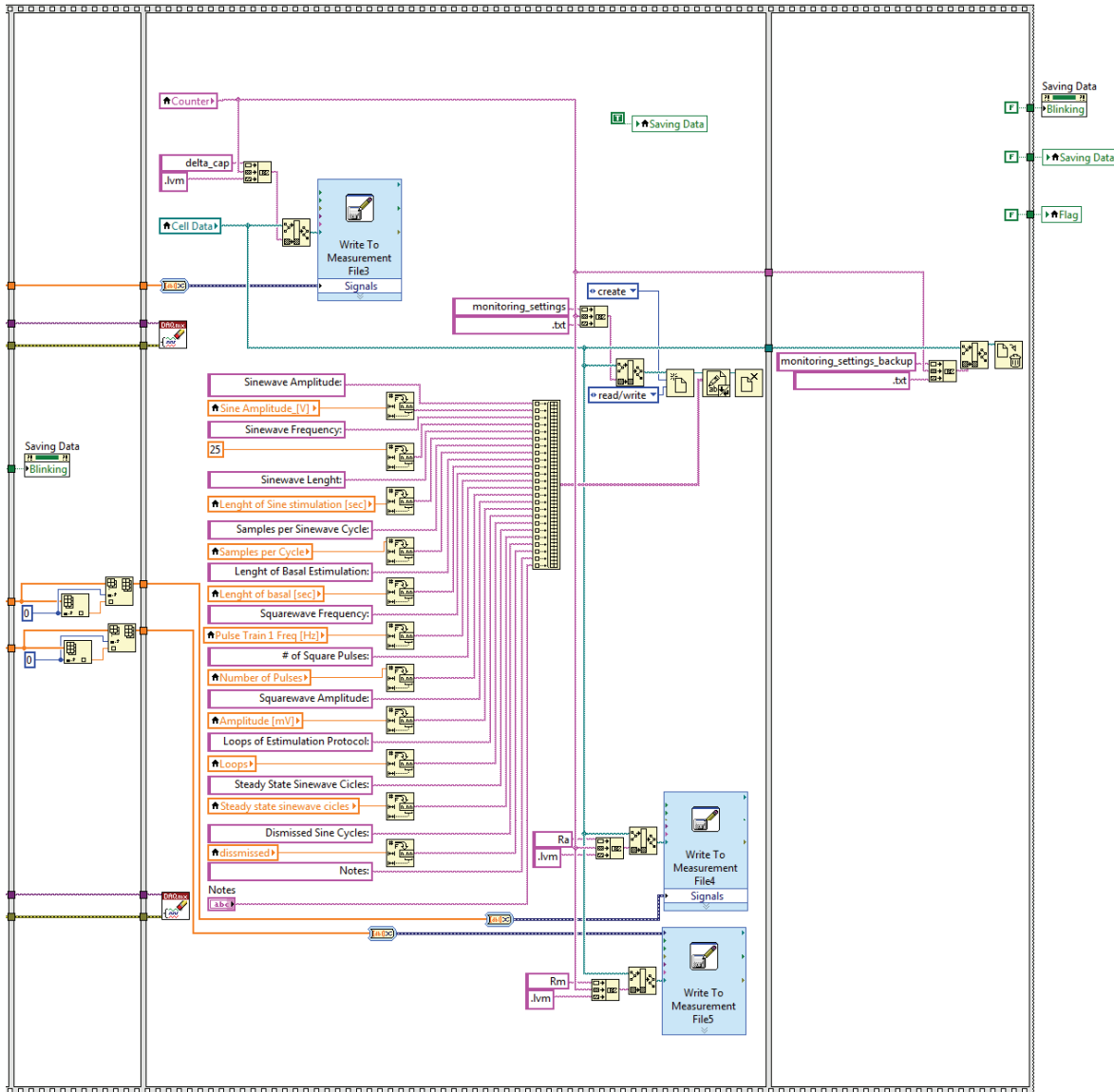
A.4.3 Configuración de E/S, y configuración e inicio de trigger



A.4.4 Control de la señal de salida y procesamiento

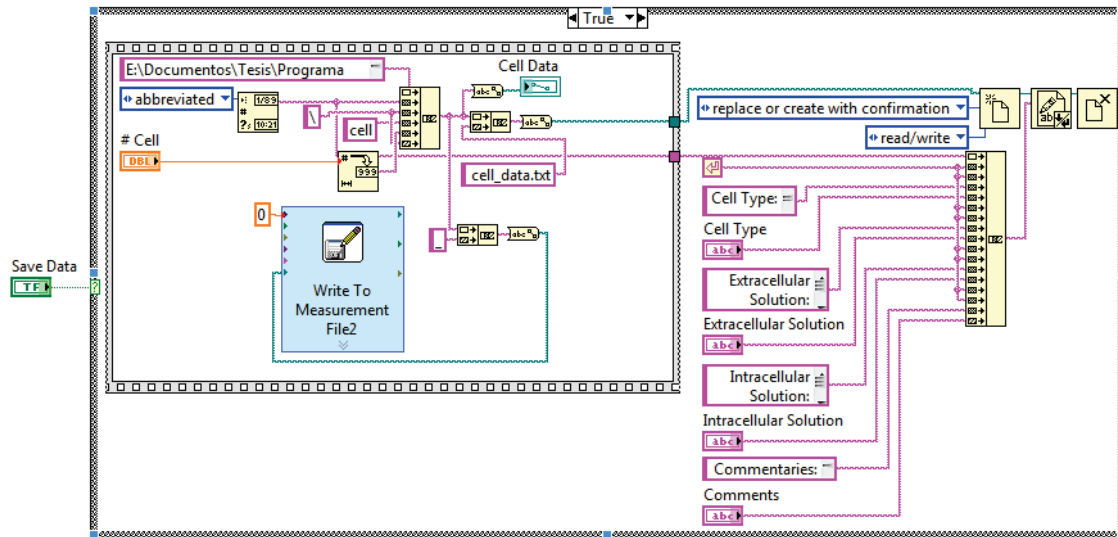


A.4.5 Concatenación de datos y activación de bandera de guardado de datos; guardado de datos; desactivación de bandera y cierre de archivos

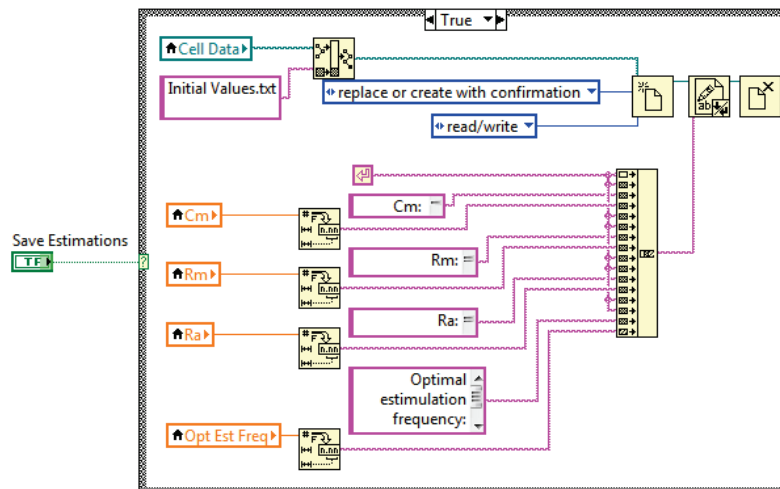


A.5 OTROS

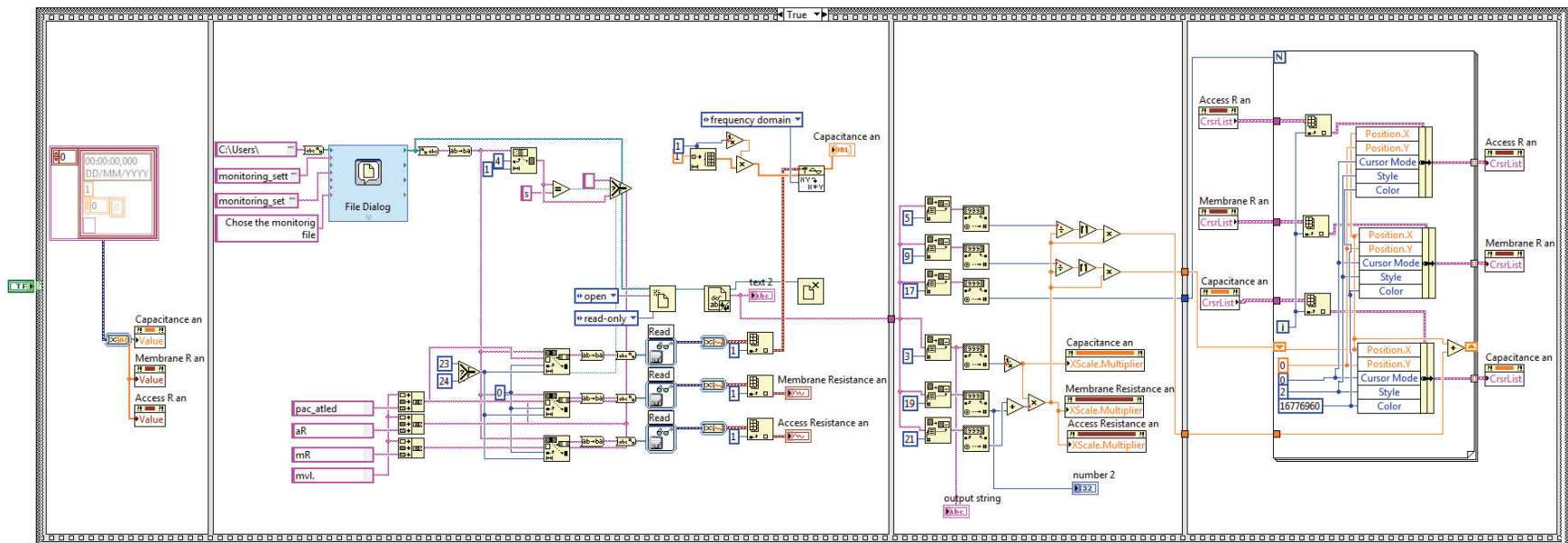
A.5.1 Almacenamiento de la descripción y creación del folder del experimento.



A.5.2 Almacenamiento de los valores iniciales del sistema.



A.5.3 Almacenamiento de la descripción y creación del folder del experimento.



ANEXO B: CÓDIGO DE LA SIMULACIÓN EN MATLAB®

```
%% Asignación de valores iniciales
clc
clear all
Rm0 = 50e6; Ra0 = 25e6; Cm0 = 1.2e-9;
dCm=Cm0*0.00005; dRm=Rm0*0.0005; dRa=Ra0*0.0005;
deltCm=5e-12; deltra=0.04*Ra0; deltrm=-0.1*Rm0;
N=1000;
Au=-5e-3;
tau=(Ra*Rm*Cm*10)/(Ra+Rm);
V=15e-3;
Cm=Cm0; Rm=Rm0; Ra=Ra0;

%% Frecuencia de estimulación
f=round((Rm+Ra)/(2*pi*Rm*Ra*Cm));
w=2*pi*f;

%% Ciclos desechados
Cic_des=ceil(tau*f);

%% Ciclos tomados en cuenta
ciclos=8;
for counter=1:ciclos
    coef(counter)=counter^3;
end
div=sum(coef);
coef=coef./div;

%% Ciclos totales en 5 minutos
repeticiones=ceil((60*5*f)/(ciclos+Cic_des));

%% Señal de estimulación
Vcorrected=V*(Ra0+Rm0)/Rm0
for n=0:(N-1)
    Sin_1(n+1)=Vcorrected*sin(2*pi*n/N);
    Sin_2(n+1)=Vcorrected*sin(2*pi*n/N);
end
FSin_1=fft(Sin_1);
voltage1=FSin_1(2);
FSin_2=fft(Sin_2);
voltage2=FSin_2(2);

%% Cinética real de los elementos
f_dcm=zeros(1,(ciclos+Cic_des)*(repeticiones));
f_drm=zeros(1,(ciclos+Cic_des)*(repeticiones));
f_dra=zeros(1,(ciclos+Cic_des)*(repeticiones));
for n=0:(ciclos+Cic_des)*(repeticiones)-1
    f_dcm(n+1)=deltCm*sin(4*pi*n/((ciclos+Cic_des)*(repeticiones)));
    f_drm(n+1)=deltRm*n/((ciclos+Cic_des)*(repeticiones));
    f_dra(n+1)=deltRa*n/((ciclos+Cic_des)*(repeticiones));
end
f_dra(round(1*((ciclos+Cic_des)*(repeticiones))/4):end)=f_dra(round(1*((ciclos+Cic_des)*(repeticiones))/4):end)+0.1*Ra0;
f_dra(round(3*((ciclos+Cic_des)*(repeticiones))/4):end)=f_dra(round(3*((ciclos+Cic_des)*(repeticiones))/4):end)+0.1*Ra0;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% SIMULACIÓN%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

ACm_acc=0;
ARm_acc=0;
ARa_acc=0;
Cm1=Cm0;
Rm1=Rm0;
Ra1=Ra0;
flag=1;
```

```

for counter=0:repeticiones-1
    Rm=Rm1;
    Ra=Ra1;
    Cm=Cm1;

    % Cambio de offset
    if flag==1
        V=Vcorrected;
        Au=-5e-3;
    else
        V=Vcorrected;
        Au=0;
    end

    % Cálculo de ángulo de Cm
    adYdCm=atan( (Ra^2+Rm^2+2*Ra*Rm-Ra^2*w^2*Cm^2*Rm^2) / (2*Ra^2*w*Rm*Cm+2*Ra*w*Rm^2*Cm) );

    % Cálculo de pendienteCm
    clear v1 v2;
    deltaCm0=0;
    D=Ra^2+2*Ra*Rm+Rm^2+Cm^2*Ra^2*Rm^2*w^2;
    for n=0:(N-1)
        deltaCm0=deltaCm0+(V*w*((Rm^2*Cm/D)*cos(2*pi*n/N)+((D
+Rm^3*Cm^2*Ra*w^2)/(D*(Rm+Ra)*w))*sin(2*pi*n/N)))*sin(2*pi*n/N+adYdCm);
    end

    Cm=Cm1+dCm;
    deltaCm1=0;
    D=Ra^2+2*Ra*Rm+Rm^2+Cm^2*Ra^2*Rm^2*w^2;
    for n=0:(N-1)

deltaCm1=deltaCm1+(V*w*((Rm^2*Cm/D)*cos(2*pi*n/N)+((D+Rm^3*Cm^2*Ra*w^2)/(D*(Rm+Ra)*w))*sin(2*pi*n/N)))*sin(2*pi*n/N
+adYdCm);
    end
    pendienteCm=dCm/(deltaCm1-deltaCm0);

    % Inicio de cuantificación
    clear Response Sum_res_vec FSin_res_vec K_Cm_vec
    Rm=Rm0;
    Ra=Ra0;
    Cm=Cm0;
    n0=0;
    Sin_acc(1:N)=zeros(1,N);
    Sum_res_vec=zeros(1,ciclos);
    K_Cm2=zeros(1,ciclos);
    K_Cm_vec=zeros(1,ciclos);
    Response=zeros(1,N);

    for m=0:ciclos+Cic_des-1;
        n0=m*N;
        Sum_res=0;
        K_Cm=0; K_Rm=0; K_Ra=0;

        if (m>=Cic_des)
            argu=1+m+counter*(ciclos+Cic_des);
            Cm=Cm0+f_dcm(argu);
            Rm=Rm0+f_drm(argu);
            Ra=Ra0+f_dra(argu);
            D=Ra^2+2*Ra*Rm+Rm^2+Cm^2*Ra^2*Rm^2*w^2;

            for n=0:(N-1)
                Response(n+1+n0)=Au/(Ra+Rm)+(exp(-((Ra+Rm)/(Ra*Rm*Cm)*(n+n0)/(N*f)))*(Au/Ra-
Au/(Ra+Rm))+V*w*((Rm^2*Cm/D)*cos(2*pi*n/N)+((D+Rm^3*Cm^2*Ra*w^2)/(D*(Rm+Ra)*w))*sin(2*pi*n/N))+exp(-
((Ra+Rm)*(n+n0)/(Ra*Rm*Cm*N*f)))*(Rm^2*Cm/D));
            end
        end
    end
end

```

```

end
Response(n0+1:end)=Response(n0+1:end)+wgn(1,1000,-247.432);
K_Cm=sum(Response(n0+1:end).*sin(2*pi*(0:(N-1))./N+adYdCm));
Sum_res=sum(Response(n0+1:end));
end

if (m>=Cic_des)
Sum_res_vec(m-Cic_des+1)=Sum_res;
Sin_acc(1:N)=Sin_acc(1:N)+((Response(n0+1:end)-Sum_res/N)*coef(m-Cic_des+1));
K_Cm2(m-Cic_des+1)=K_Cm;
K_Cm_vec(m-Cic_des+1)=pendienteCm*(K_Cm-deltaCm0);
end
end

FSin_acc=fft(Sin_acc);
current=FSin_acc(2);

if flag==1
Z=voltage1/current;
Zdc=Au*ciclos*N/sum(Sum_res_vec);
Ra2=real(Z)-imag(Z)^2/(Zdc-real(Z));
Rm2=Zdc-Ra2;
Cm2=abs((Zdc-real(Z))^2/(w*imag(Z)*((Zdc-real(Z))^2+imag(Z)^2)));
else
Z=voltage2/current;
Cm2=abs((Rm1+Ra1-real(Z))/(w*imag(Z)*Rm1));
end

if counter==0
K_Cm_plot(1:Cic_des)=0;
else
K_Cm_plot(1+counter*(ciclos+Cic_des):counter*(ciclos+Cic_des)+Cic_des)=K_Cm_plot(counter*(ciclos+Cic_des));
end

K_Cm_plot(1+counter*(ciclos+Cic_des)+Cic_des:(counter+1)*(ciclos+Cic_des))=K_Cm_vec+ACm_acc;
ACm_acc=ACm_acc+Cm2-Cm1;
Cm1=Cm2;
Rm1=Rm2;
Ra1=Ra2;
flag=flag*-1;
end
figure
plot(0:1/f:(repeticiones)*(ciclos+Cic_des)/f-1/f,K_Cm_plot*1e15,'m','LineWidth',1.5,'LineSmoothing','on')
set(gca,'Color',[1 1 1]);
hold
plot(0:1/f:(repeticiones)*(ciclos+Cic_des)/f-1/f,f_dcm*1e15,'b','LineWidth',3,'LineSmoothing','on')
xlabel('Tiempo [seg]')
ylabel('deltaCm [fF]')
hold

```

REFERENCIAS

- [1] Peter Dayan, L. F. Abbott, (2001). Theoretical neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems Computational neuroscience. 0262041995. *MIT Press*, 1a Ed.
- [2] Fanjul, M. L., Hiriart, M., Fernández de Miguel, F., (eds.), (1998). Biología funcional de los animales. 0262041995. Siglo Veintiuno, 1a Ed.
- [3] Trueta, C., Méndez, B., Fernández de Miguel, F., (2003). Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurons. *Journal of Physiology*, Vol. 547(2), pp.405-416.
- [4] Binde, Marc D., Hirokawa, N., Windhorst, U., (eds.), (2008). Encyclopedia of neuroscience. 0262041995. *Springer*, 1a Ed.
- [5] Yau, King W., (1976), "Receptive fields, geometry and conduction block of sensory neurons in the central nervous system of the leech", *The Journal of Physiology*, Vol. 263, pp.513-538.
- [6] Alberts, A., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (eds.), (2007). Molecular biology of the cell. 9780815341055. *Garland Science*, 5ª Ed.
- [7] Fanjul, M. L., Hiriart, M., (eds.), (2009). Biología funcional de los animales Vol. II. 6070300688. *Siglo Veintiuno*, 2a Ed.
- [8] Siegel, A., Sapru, H. N., (eds.), (2006). Essential Neuroscience. 0781750776. *Lippincott Williams & Wilkins*, 1a Ed.
- [9] Hodgkin, A. L., Katz, B., (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *Journal of Physiology*, Vol. 108, pp.37-77.
- [10] Ermentrout, G. B., Terman, D. (eds.), (2010). Mathematical Foundations of Neuroscience. 038787707X. *Springer*, 1a Ed.
- [11] Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *Journal of Physiology*, Vol. 116, pp.449-472.
- [12] Twarog, B. M., Page, I. H., (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *American journal of Physiology*, Vol. 175(1), pp.157-161.
- [13] Dahlström, A., Fuxe, K., (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, Vol. 20(7), pp.398-399.
- [14] Siegel, A., Alberts, R. W., (eds.), (2006). Basic Neurochemistry. 012088397X. *Elsevier Academic Press*, 7a Ed.

- [15] Müller, P. C., Jacobs, B. L., (eds.), (2010). Handbook of behavioral neurobiology of serotonin. 0123746344. *Elsevier Academic Press*, 1a Ed.
- [16] Stein, D. J., (2003). Serotonergic neurocircuitry in mood and anxiety disorders. 1841843032. *Martin Dunitz*.
- [17] Blaustein, J., Lajtha, A., (2007). Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Behavioral neurochemistry, neuroendocrinology, and molecular neurobiology. 0387303626. *Springer*, 3a Ed.
- [18] Monti, J. M., (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*, Vol. 15(4), pp.269-281.
- [19] Blackshaw, S. E., Nicholls, J. G., (1995). Neurobiology and development of the leech. *Journal of Neurobiology*, Vol. 27(3), pp.267-276.
- [20] Muller, Kenneth J., Nicholls, John G., Stent, Siegmund G., (eds.), (1981). Neurobiology of the leech. 0879691468. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- [21] William B. Kristan Jr., Ronald L. Calabrese, W. Otto Friesen, (2005). Neuronal control of leech behavior. *Progress in Neurobiology*, Volume 76(5), pp.279-327.
- [22] Gerry, Shannon P., Ellerby, David J., (2003). Serotonin modulates muscle function in the medicinal leech. *Biology Letters*, Vol. 7(3), pp.885-888.
- [23] Crisp, K. M., Mesce, K. A., (2003). To swim or not to swim: regional effects of serotonin, octopamine and amine mixtures in the medicinal leech. *Journal of Comparative Physiology*, Vol. 189(6), pp.461-470.
- [24] Zhang, X., Wilson, R. J. A., Li, Y., Kleinhaus, A. L., (2000). Chemical and thermal stimuli have short-lived effects on the Retzius cell in the medicinal leech. *Developmental Neurobiology*, Vol. 43(3), pp.304-311.
- [25] Bisson, G., Torre, V., (2011). Statistical characterization of social interactions and collective behavior in medicinal leeches. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 106, pp.78-90.
- [26] Sahley, C. L., (1995). What We Have Learned from the Study of Learning in the Leech. *Developmental Neurobiology*, Vol. 27(3), pp.434-445.
- [27] Burrell, D. B., Sahley, C. L., Muller, Kenneth J., (2001). Non-associative learning and serotonin induce similar bi-Directional changes in excitability of a neuron critical for learning in the medicinal leech. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 21(4), pp.1401-1412.
- [28] Crisp, K. M., Burrell, B. D., (1995). Serotonergic modulation of afterhyperpolarization in a neuron that contributes to learning in the leech. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 99(2), pp.605-616.
- [29] Coggeshall, Richard E., (1972). Autoradiographic and chemical localization of 5-hydroxytryptamine in identified neurons in the leech. *The Anatomical Record*, Vol. 172(3), pp.489-498.

- [30] Fernández de Miguel, F., Vargas-Caballero, M., García-Pérez, E., (2001). Spread of synaptic potentials through electrical synapses in Retzius neurons of the leech. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 204, pp.3241-3250.
- [31] García-Pérez, E., Vargas-Caballero, M., Velazquez-Ulloa, N., Minzoni, A., Fernández de Miguel, F., (2004). Synaptic integration in electrically coupled neurons. *Biophysical Journal*, Vol. 86, pp.646-655.
- [32] Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., Jahn, R., (2000). Quantal release of serotonin. *Neuron*, Vol. 28, pp.205-220.
- [33] Trueta, C., Sanchez-Armass, S., Morales, M. A., Fernández de Miguel, F., (2004). Calcium-induced calcium release contributes to somatic secretion of serotonin in leech Retzius neurons. *Journal of Neurobiology*, Vol. 61(3), pp.309-316.
- [34] Trueta, C., Kuffler, D. P., D De-Miguel, F. F., (2012). Cycling of dense core vesicle involved in somatic exocytosis of serotonin by leech neurons, *Frontiers in Physiology*, Vol. 3:175.
- [35] Henderson, L. P., Kuffler, D. P., Nicholls, J., Zhang, R., (1983). Structural and functional analysis of synaptic transmission between identified leech neurons in culture. *Journal of Physiology*, Vol. 340, pp.347-358.
- [36] Pudovkina, O. L., Cremers, T. I.F.H., Westerink, B. H.C. (2003). Regulation of the release of serotonin in the dorsal raphe nucleus by $\alpha 1$ and $\alpha 2$ adrenoceptors. *Synapse* Vol. 50, pp.77-82.
- [37] Mansari, M. E., Wiborg, O., Mnie-Filali, O., Benturquia, N., Sánchez, C., Haddjeri, N., (2007). Allosteric modulation of the effect of escitalopram, paroxetine and fluoxetine: in-vitro and in-vivo studies. *Int .J. Neuropsychopharmacol*, Vol. 10, pp.31-40.
- [38] Swanson, C. J., Blackburn, T. P., Zhang, X., Zheng, K., Xu, Z.-Q. D., Hökfelt, T., Wolinsky, T. D., Konkol, M. J., Chen, H., Zhong, H., et al., (2005). Anxiolytic- and antidepressant-like profiles of the galanin-3 receptor (Gal3) antagonists SNAP37889 and SNAP398299. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, pp.17489-17494.
- [39] Meyer-Bernstein, E. L., Morin, L. P., (1996). Differential Serotonergic Innervation of the Suprachiasmatic Nucleus and the Intergeniculate Leaflet and its Role in Circadian Rhythm Modulation. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 15(4), pp.2097-2111.
- [40] Riad, M., García, S., Watkins, K. C., Jodoin, E. D., Langlois, X., Mestikawy, S. E., Hamon, M., Descarries, L., (2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 417, pp.181-194.
- [41] Kaushalya, S. K., Desai, R., Arumugam, S., Ghosh, H., Balaji, J., and Maiti, S. (2008). Three-photon microscopy shows that somatic release can be a quantitatively significant component of serotonergic neurotransmission in the mammalian brain. *Journal of Neuroscience Research* 86, pp.3469-3480.

- [42] Bruns, D., Jahn, R., (1995). Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature*, Vol. 377, pp.62-65.
- [43] Velazquez-Ulloa, N., Blackshaw, S. E., Szczupak, L., Trueta, C., Garcia, E., De-Miguel, F. F., (2003). Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech. *Journal of Neurobiology* 54, pp.604–617.
- [44] De-Miguel, F. F., Santamaría-Holek, I., Noguez, P., Bustos, C., Rubí, J. M., (2012). Biophysics of active vesicle transport, a necessary step prior to serotonin exocytosis by the neuronal soma. *PlosONE*, Vol. 7(10).
- [45] Trueta, C., De-Miguel, F. F., (2012). Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. *Frontiers in Physiology*, 3:319.
- [46] Ponchon, J. L., Cespuglio, R., Gonon, F., Jouvét, M., Pujol, J. F., (1979). Normal pulse polarography with carbon fiber electrodes for in vitro and in vivo determination of catecholamines. *Analytical Chemistry*, Vol. 51(9), pp.1483-1486.
- [47] Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., Near, J. A., Diliberto, E. J. Jr., Viveros, O. H., (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88(23), pp.10754-10758.
- [48] Chow R. H., Klingauf J., Heinemann C., Zucker R. S., Neher E., (1996). Mechanisms Determining the Time Course of Secretion in Neuroendocrine Cells. *Neuron*, Vol. 16(2), pp.369-376.
- [49] Lichtman, J. W., Wilkinson, R. S., Rich, M. R., (1985). Multiple innervations of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. *Nature*, Vol. 314, pp.357-359.
- [50] Betz, W. J., Mao, F., Bewick, G. S., (1992). Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 12(2), pp.363-375.
- [51] Neher, E., Marty, A., (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 79, pp.6712-6716.
- [52] Klyachko, V. A., Jackson, M. B., (2002). Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals. *Nature*, Vol. 418, pp.89-92.
- [53] Neher, E., Sakmann, B., (1976). Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, Vol. 260, pp.799-802.
- [54] Sakmann, B., Neher, E., (eds.), (1995). Single-channel recording. 030644870X. *Plenum Press*, 2a Ed.

- [55] Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J., (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüger Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 391, pp.85-100.
- [56] Walz, W., (ed.), (2007). Patch-clamp analysis: Advanced Techniques. 1588297051. *Humana Press*, 2007.
- [57] Pipette cookbook: P-1000& P-97, Rev G. Sutter Instrument Company. Novato, California, EU, 2011.
- [58] Operation Manual P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Rev. 2.03. Sutter Instrument Company. Novato, California, EU, 2009.
- [59] Molleman, A., (2003). Patch clamping: An introductory guide to patch-clamp electrophysiology. 047148685X. *John Wiley & Sons*.
- [60] Lindau, M., Neher, E., (1988). Patch-clamp techniques for time resolved capacitance measurements. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 411, pp.137-146.
- [61] Novák, P., Zahradník, I., (2006). Q-Method for High-Resolution, Whole-Cell Patch-Clamp Impedance Measurements Using squarewave Stimulation. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 34(7), pp.1201-1212.
- [62] Thompson, R. E., Lindau, M., Webb, W. W., (2001). Robust, high-resolution, whole cell patch-clamp capacitance measurements using square wave stimulation. *Biophysical Journal*, Vol. 81, pp.937-948.
- [63] Tabak, J., Murphey, C.R., Moore, L. E., (2000). Parameter Estimation Methods for Single Neuron Models. *Journal of Computational Neuroscience*, Vol. 9, pp.215-236.
- [64] Vandenbeuch, A., Zorec, R., Kinnamon, S. C., (2010). Capacitance measurements of regulated exocytosis in mouse taste cells", *The Journal of Neuroscience*, Vol. 30(44), pp.14695- 14701.
- [65] Schwake, L., Henkel, A. W., Riedel, A. D., Stremel, W., (2002). Patch-clamp capacitance measurements: New insights into the endocytic uptake of transferrin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Vol. 29(3), pp.459-464.
- [66] Rorsman, P., Renström, E., (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, Vol. 46(8), pp.1029-1045.
- [67] Rohlíček, V., Schmid, A., (1994). Dual-frequency method for synchronous measurement of cell capacitance, membrane conductance and access resistance on single cells. *Pflüger Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 428, pp.30-38.
- [68] Barnett, D. W., Mislér, S., (1997). An optimized approach o membrane capacitance estimation using dual-frequency excitation. *Biophysical Journal*, Vol. 72, pp.1641-1658.
- [69] Lindau, M., (2012). High resolution electrophysiological techniques for the study of calcium-activated exocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1820(8), pp.1234-1242.

- [70] Rohlíček, V., Rech, F., (2002). Improvement of the accuracy by the measurement of the electrical cell membrane parameters. *Physiological Research*, Vol. 51, pp.169-177.
- [71] Zhang, H., Xiong, J., Luo, J., Qu, A., (2002). Experimental determination of C_m measurement related hardware parameters of the patch-clamp amplifier. *Physiological Research*, Vol. 51, pp.169-177.
- [72] Golowasch, J., Thomas, G., Taylor, A. L., Patel A., Pineda A., Khalil C., Nadim, F., (2009). Membrane capacitance measurements revisited: dependence of capacitance value on measurement method in nonisopotential neurons. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 102, pp.2161-2175.
- [73] Debus, K., Hartmann, J., Kilic, G., Lindau, M., (1995). Influence of conductance changes on patch clamp capacitance measurements using a lock-in amplifier and limitations of the phase tracking technique. *Biophysical Journal*, Vol. 69, pp.2808-2822.
- [74] Gentet, L. J., Stuart, G. J., Clements, J. D., (2000). Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophysical Journal*, Vol. 79, pp.314-320.
- [75] Dietzel, I. D., Drapeau, P. and Nicholls, J. G., (1986). Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology (Lond.)*, Vol. 372, pp.191–205.
- [76] Sidall, M. E., Trontelj, P., Utevsky, S. Y., Nkamany, M., Macdonald III, K. S., (2012). Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proceedings Biological Sciences (R. Soc.)*, Vol. 274, pp.1481-1487.
- [77] Bookman, R. J., Li, Y., (1990). Analysis of calcium channel properties in cultured leech Retzius cells by internal perfusion, voltage-clamp and single-channel recording. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 149, pp.223-237.
- [78] Angleson, J. K., Betz, W. J., (1997). Monitoring secretion in real time; capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends in Neuroscience*, Vol. 20(7), pp.281-287.
- [79] Haller, M., Heinemann, C., Chow, R. H., Heidelberg, R, Neher, E., (1998). Comparison of Secretory Responses as Measured by Membrane. *Biophysical Journal*, Vol. 74(4), pp.2100-2113.
- [80] Trueta, T., De-Miguel, F. F., (2012). Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. *Frontiers in Physiology*, Vol. 3 (319).