



LA TÉCNICA DEL PATCH CLAMP:

CUANDO LO IMPOSIBLE SE CONVIRTIÓ EN POSIBLE

Preguntas básicas que nos llegaba en nuestra niñez y fluían como las nubes en el cielo. ¿Por qué vemos, escuchamos, sentimos dolor, movemos nuestras extremidades? Respuestas que fueron dadas en el siglo XX por ingeniosas metodologías en las neurociencias. Una de ellas fue la técnica del Patch Clamp (parche de membrana), desarrollada en 1976, **Erwin Neher y Bert Sakmann** (*Neher, E. y Sakmann, B. Nature* 260, 799-802 (1976)), quienes ganaron el premio Nobel en Fisiología o Medicina 1991.

Mediante esta técnica estos investigadores demostraron definitivamente que las corrientes “eléctricas” que ocurren en nuestro sistema nervioso, denominadas “potenciales de acción”, resultan de la apertura de muchos canales de proteínas en la membrana celular de una neurona.

Aunque la técnica se diseñó originalmente para registrar corrientes diminutas, desde entonces se ha convertido en una de las herramientas más importantes en neurociencia para estudiar señales eléctricas, desde aquellas a escala molecular hasta el nivel de redes de neuronas.

Antes del desarrollo de esta técnica, en la década de 1970, se aceptaba generalmente que la corriente que fluía a través de la célula era el resultado de la apertura de muchos canales en la membrana, aunque se desconocía el mecanismo subyacente. En ese momento, la corriente se registraba comúnmente fijando tejido con un electrodo muy delgado y afilado, una pipeta con una punta muy fina. Sin embargo, desafortunadamente, la señal registrada de esta manera era excesivamente ruidosa, por

lo que solo se pudo resolver la gran corriente “macroscópica”, la corriente colectiva mediada por muchos tipos diferentes de canales, que fluye a través del tejido.

A partir de la técnica del parche-clamp, la cual es conceptualmente bastante simple. Es una técnica electrofisiológica empleada en el estudio de las propiedades eléctricas, tanto pasivas como activas, de las células. En lugar de las células, se presiona una pipeta con un diámetro relativamente grande contra la membrana celular de una célula. En las condiciones adecuadas, la punta de la pipeta se ‘adhiera’ a la membrana, formando un sello hermético. Esto reduce sustancialmente el ruido en comparación con el que se encuentra al usar electrodos afilados, porque el pequeño parche de membrana rodeado por la punta de la pipeta está eléctricamente aislado del resto de la membrana de la celda y del entorno que rodea la celda.

Así, se observaron por primera vez las diminutas corrientes que pasaban por los pocos canales del parche. La grabación confirmó las propiedades clave del canal: cuando los canales se abren, hay un salto escalonado en la traza actual y, cuando se cierran, un retroceso escalonado hasta la línea de base. Ahora era posible determinar detalles como las estadísticas de apertura y cierre de canales, la amplitud de las corrientes que median y los estímulos óptimos que desencadenan su apertura.

Con esta técnica se pudo verificar el modelo para la generación del potencial de acción propuesto por los premios Nobel Alan Hodgkin y Andrew Huxley en la década de 1950. Las predicciones específicas del modelo ahora podrían probarse directamente examinando la corriente a través de canales individuales y observando los cambios en la corriente que ocurren cuando se modifica la estructura molecular del canal. En última instancia, se demostró que el modelo es en su mayoría correcto y sigue siendo el estándar de oro para los neurocientíficos computacionales de hoy.

Una de las diversas variantes del patch clamp, consiste en la configuración de célula completa, por lo que permitió a los neurocientíficos estudiar

los fenómenos eléctricos en las neuronas más allá del nivel del canal. Esta configuración de “célula entera”, por medio de la formación de un sello de alta resistencia entre el microelectrodo y la membrana celular, es una técnica adecuada para el estudio de la totalidad de las corrientes iónicas de entrada o salida generadas en una célula.

Para lograr un registro de celda completa, se rompe el parche de membrana debajo del electrodo, lo que permite el acceso eléctrico a la celda. En comparación con el uso de electrodos afilados, la pinza de parche de celda completa permite grabaciones mucho más precisas y, lo que es más importante, es menos dañino para la celda. Esto permitió la investigación sistemática de procesos sinérgicos a nivel celular, como la regulación de corrientes macroscópicas por moléculas moduladoras, y las interacciones entre los diferentes tipos de canales en la neurona.

La abertura relativamente grande creada en la célula en la configuración de célula completa también proporcionó acceso a la célula mediante productos químicos, lo que permitió que se administraran tintes para visualizar estructuras celulares intrincadas, y que se extrajera ARN para el análisis de expresión génica (*Wang y col. Cereb. Cortex* 12, 395-410. 2002). El grupo de Neher examinó la secuencia de eventos que subyacen a la transferencia de información entre células mediante la introducción de sustancias químicas en la célula y el seguimiento simultáneo de los cambios resultantes en las propiedades eléctricas de la membrana celular (*Neher, E. y Marty, A. Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 6712-6716. 1982).

Además, con esta técnica, el patch clamp de células enteras, demostró ser ideal para estudiar las propiedades colectivas de neuronas y redes neuronales en cortes de cerebro mantenidos *in vitro*.

La técnica de pinza de parche también se utiliza para examinar las actividades celulares en condiciones más naturales. Para estudiar cómo se representan los estímulos y movimientos sensoriales en el cerebro, es necesario realizar experimentos en animales vivos.