

# La técnica del pinzamiento de membrana

*Un procedimiento sencillo para aislar canales iónicos de las membranas celulares. Sus autores, ganadores del premio Nobel por tal descubrimiento, explican lo que la técnica ha revelado sobre la señalización celular*

Erwin Neher y Bert Sakmann

La transmisión de señales entre células, y en el interior de éstas, se halla mediada por canales iónicos, proteínas formadoras de poros incrustadas en las membranas plasmáticas de casi todas las células. En el organismo, los canales iónicos producen los destellos de la actividad eléctrica que excita neuronas y células musculares. En los órganos de los sentidos, los canales transforman los estímulos físicos o químicos en señales eléctricas dirigidas al sistema nervioso. Incluso células sin conexión con el sistema nervioso central (las de la sangre, del sistema inmunitario, del hígado y otros órganos) usan canales iónicos en procesos de señalización.

Desde los años cincuenta los biólogos han podido estudiar, en un nivel macroscópico, las corrientes eléctricas que se originan a partir de estos flujos iónicos. Pero hubo que esperar a los años setenta para que el examen aislado de los canales de iones se convirtiera en realidad. La técnica

del pinzamiento, por cuyo descubrimiento acabamos de recibir el premio Nobel de fisiología y medicina, permitió acceder a estos detalles.

Aunque su desarrollo y perfeccionamiento se ha prolongado durante años, la técnica es bastante simple: una pipeta de vidrio muy fino y con un diseño adecuado se apoya firmemente contra una membrana celular; queda así aislada una zona pequeña de la membrana con los canales iónicos que contiene. Estos canales pueden manipularse por procedimientos químicos o eléctricos y de ello obtener datos que permitan deducir sus propiedades. El investigador puede extraer un fragmento de la membrana o abrir con cuidado una ventana en la célula para modificar sus constituyentes citoplasmáticos. En todas esas aplicaciones, la técnica del pinzamiento ha facilitado el examen de la influencia de los canales iónicos en el potencial de membrana, en la secreción y en la contracción, entre otros procesos.

Centenares de laboratorios de todo el mundo han adoptado y extendido el uso de la técnica del pinzamiento desde que la introdujimos en 1976. Cuanto aquí exponemos sobre lo que este procedimiento ha revelado acerca de los canales iónicos y sus funciones se basa no sólo en nuestras aportaciones, sino también en las de muchos otros investigadores.

Nuestro interés por los canales iónicos nació de la lectura de dos artículos fascinantes que aparecieron en 1969 y 1970, cuando preparábamos la tesis de doctorado y nos dedicábamos al estudio de la biofísica de las membranas en el departamento de psiquiatría del Instituto Max Planck de Munich. Los artículos estaban relacionados con el tema de las membranas lipídicas artificiales, que en su forma pura son

aisladores eléctricos. Ross C. Bean y sus colaboradores, de la empresa Ford Aerospace, y Steven Hladky y Denis Haydon, de la Universidad de Cambridge, demostraban en ellos que, si se insertaban en las membranas trazas de ciertos antibióticos o proteínas, se hacían conductoras de electricidad. Los cambios discretos en la corriente que discurre a través de las membranas sugerían que las proteínas creaban canales semejantes a poros que se abrieran y cerraran uno a uno. Los iones cargados podrían así atravesar la membrana por los canales abiertos.

Resultaba claro, para muchos, que las señales eléctricas en las neuronas y en otras células debían estar mediadas por proteínas semejantes en las membranas plasmáticas de naturaleza lipídica que las rodean. Allan L. Hodgkin y Andrew F. Huxley, de Cambridge, habían invocado antes el concepto de canales iónicos en su análisis clásico de las corrientes a través de las membranas de los nervios, por el que recibieron el premio Nobel en 1963. Quienes trabajábamos en biofísica de membranas veíamos que, en cuanto se perfeccionasen las técnicas de medida para conseguir la resolución adecuada, se descubriría todo un microcosmos de moléculas de señalización.

En los años siguientes continuaron acumulándose datos acerca de los canales iónicos de membranas celulares. Recordemos, en particular, el análisis estadístico de las fluctuaciones de potencial en la unión neuromuscular (sinapsis entre una neurona motora y una fibra muscular) que en el University College de Londres llevaron a cabo Bernard Katz y Ricardo Miledi, en 1972; llegaron a la conclusión de que las señales sinápticas consistían en pequeños fenómenos eléctricos, iguales en magnitud a los relacionados con canales artificiales.

ERWIN NEHER y BERT SAKMANN recibieron conjuntamente en 1991 el premio Nobel de fisiología por su descripción de los canales iónicos mediante su técnica del pinzamiento de membrana. Neher es director del departamento de biofísica de las membranas del Instituto Max Planck de Química Biofísica de Göttingen. Cursó la carrera de físicas en el Politécnico de Munich, donde se doctoró, tras una etapa de profundización en Estados Unidos, en 1970. Sakmann es director del departamento de fisiología celular del Instituto Max Planck de Investigaciones Médicas de Heidelberg. Terminó sus estudios médicos en 1969 en la Universidad de Munich. Entre 1970 y 1973, gracias a una beca del Consejo Británico, estudió biofísica en Londres con Bernard Katz, premio Nobel también.

Pero Katz y Miledi sólo pudieron inferir las propiedades de los canales a partir de su análisis, y éste dependía de varias hipótesis. No se disponía entonces de métodos que permitiesen la medición directa de los fenómenos unitarios que constituyen la señal sináptica. El ruido de fondo de las técnicas habituales de medida de la corriente eléctrica que pasa a través de una membrana era de sólo la diezbillonésima de ampère, valor, sin embargo, que centuplicaba todavía el correspondiente a una señal unitaria, lo que bastaba para ahogarla.

En 1973 decidimos abordar la reducción del ruido de fondo. Sabíamos que, con los componentes electrónicos disponibles, se podía conseguir la resolución necesaria para la medida, a condición de que se lograra aislar del resto un pequeño fragmento de la membrana. Aplicamos una micropipeta de vidrio a la superficie de fibras musculares, sometidas a previa limpieza enzimática. Nos guiaba la esperanza de que la pipeta de vidrio no conductora aislaría algunos canales iónicos, y que con ello obtendríamos una señal clara.

No resultaba nada fácil conseguir un cierre perfecto entre la pipeta de vidrio mensuradora y la membrana. Lo mismo que muchos otros que nos habían precedido en el uso de pipetas extracelulares, tuvimos que enfrentarnos con las fugas eléctricas que conectaban el líquido extracelular con el interior de la pipeta. Sin embargo, gracias a la limpieza exhaustiva de la superficie celular y a la optimización de la forma y el tamaño de la pipeta, logramos registrar corrientes de canales individuales que se producían en respuesta a la acetilcolina,



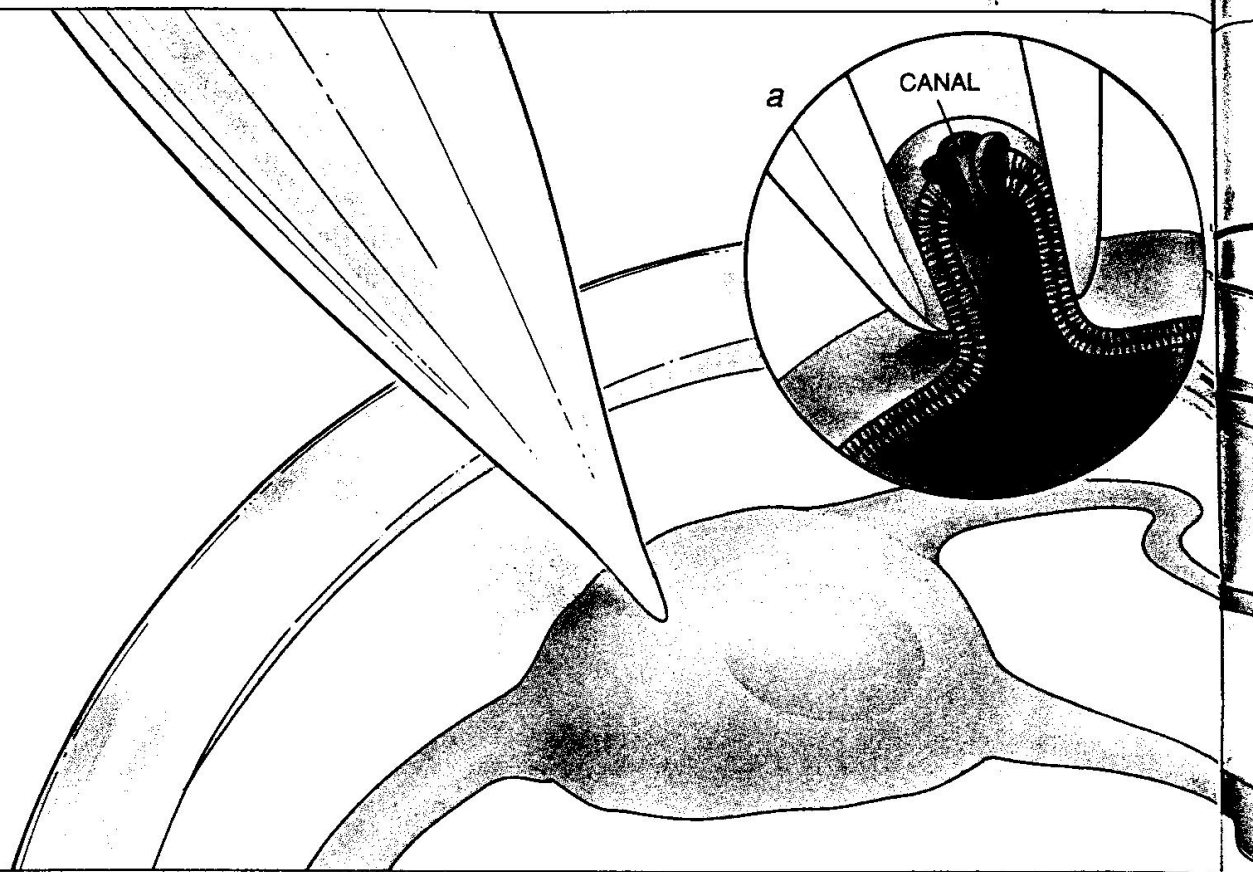
**1. PIPETA FIRMEAMENTE ADHERIDA** a la superficie de una neurona. Con ese ardor podemos estudiar los canales iónicos de la membrana plasmática exterior. La pipeta, que mide  $\frac{1}{25.000}$  pulgadas de diámetro, aísla física y eléctricamente los canales

atrapados. Gracias a esa técnica de pinzamiento de la membrana celular podemos registrar la apertura y el cierre de los canales iónicos. Se está ya empleando para adentrarse en las redes de señalización del interior celular.



### Triple forma del pinzamiento de membrana

**P**resionando con una pipeta de pinzamiento la superficie de una célula, previa limpieza enzimática de ésta, y aplicando una ligera succión, se consigue un cierre de un gigaohm alrededor de una zona minúscula de la membrana celular y los canales iónicos que contiene (a). Podemos aplicar entonces diversos estímulos desde el interior de la pipeta y medir el comportamiento de los canales atrapados. O bien, podemos arrancar de la célula la zona atrapada de la membrana, dejando expuesta la boca citoplásmica de los canales (b). Si arrancamos esa región sin perder el sello de un gigaohm (c), podremos alterar los constituyentes del citoplasma celular.



el transmisor (sustancia química inductora de señales) de la unión neuromuscular. Esos primeros experimentos confirmaron lo que ya se sospechaba acerca de la existencia de corrientes elementales a través de los canales iónicos, y en particular la idea de que se trataba de fenómenos pulsátiles de amplitud constante y duración variable.

La baja calidad del cierre entre la pipeta y la membrana, con el consiguiente ruido de fondo, nos impidió realizar registros finos de canales iónicos que no fuesen los que se encontraban en la unión neuromuscular. Unos años después descubrimos, por azar, que, al aplicar una ligera succión a través de la pipeta, junto con otras modificaciones de la técnica, se elevaba la resistencia hasta más de un billón de ohms, una mejora de varios órdenes de magnitud. Si tirábamos suavemente de la pipeta, comprobamos, podíamos rebanar fragmentos microscópicos de membrana para su estudio por separado. Desde entonces, el registro de canales iónicos aislados se convirtió en una técnica de alta resolución.

Los experimentos sobre la unión neuromuscular del músculo esquelético han aportado abundante información del papel que los canales iónicos desempeñan en la transmisión sináptica. Las neuronas presinápticas de esa zona liberan acetilcolina en cantidades multimoleculares discretas (paquetes multimoleculares) que reciben el nombre de "cuantos". Las moléculas de acetilcolina se unen transitoriamente a canales receptores de acetilcolina, constituidos por pro-

teínas especializadas de la membrana postsináptica, y provocan una corriente que fluye a través de la membrana de la placa terminal. Esta corriente de la placa terminal es la suma de las corrientes elementales que fluyen por cientos de miles de canales.

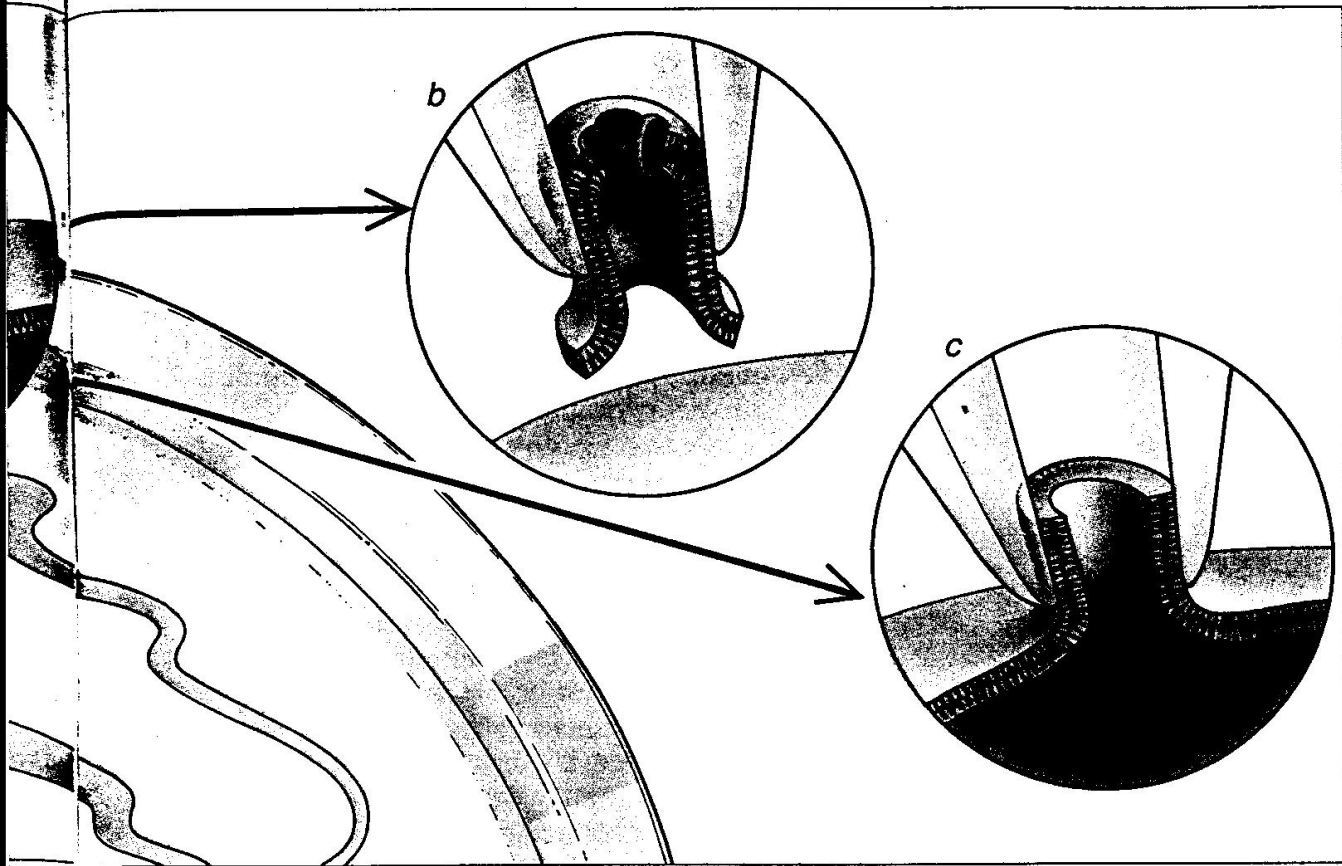
**P**ara medir estas corrientes elementales una a una, se presiona la punta de una pipeta de pinzamiento sobre la placa terminal de una fibra muscular. Esta región de la superficie muscular contiene el canal receptor de acetilcolina. Cuando en la solución de la pipeta está presente la acetilcolina a baja concentración, la corriente que se registra alterna entre dos niveles. A un nivel, no fluye corriente alguna, porque todos los canales iónicos del fragmento de membrana están cerrados. Cuando una molécula del canal pasa al estado abierto, como consecuencia de la aplicación de un voltaje a la membrana, fluye de manera abrupta a través de ella una corriente de unos 2,5 picoampères. Tras un período variable, la molécula pasa de nuevo al estado cerrado, y la corriente se interrumpe.

La apertura del canal del receptor se pone en marcha con la unión de éste a la acetilcolina; su separación provoca de nuevo el cierre del canal. La gran variabilidad del período de tiempo que el canal permanece abierto o cerrado refleja la naturaleza probabilística de las interacciones entre las moléculas de acetilcolina y sus receptores. La amplitud de los saltos de corriente representa la ca-

pacidad del canal para transportar iones, como los de sodio o potasio en el caso del canal receptor de acetilcolina. Al comparar las amplitudes de la corriente y la distribución de la duración con las predicciones de las diversas hipótesis, podemos determinar cómo interactúan los iones con una molécula del canal y de qué modo la interacción entre transmisor y receptor controla la apertura y el cierre del canal.

En las sinapsis del sistema nervioso central, los aminoácidos glicina, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y L-glutamato constituyen los principales elementos de señalización para el establecimiento de comunicaciones rápidas. La forma pulsátil de las corrientes registradas sobre los canales que se ligan con estos transmisores indica que también se abren y se cierran al azar. Los canales de los receptores pueden, por tanto, funcionar a la manera de los canales del receptor de acetilcolina en la placa terminal. A pesar de lo cual, los canales dependientes de transmisores en el sistema nervioso central presentan a menudo complejidades adicionales, como la de que algunos podrían hallarse sólo parcialmente abiertos o cerrados, y la de que puedan existir subtipos diferentes en las diversas regiones del cerebro.

La transmisión de información desde el sistema nervioso central a la placa neuromuscular tiene que ser extremadamente rápida. En los axones neuronales cubiertos de mielina que transportan esas señales en los vertebrados, la conducción no está mediada por canales dependientes de



transmisores con compuerta como los que acabamos de describir, sino que lo está por canales más rápidos, que responden a cambios del voltaje de la membrana, a la diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de la célula.

Los canales de iones de sodio dependientes de voltaje son los responsables de la elevación rápida del potencial de acción de las neuronas. El análisis de las corrientes elementales de sodio indica que los canales sensibles al voltaje alternan entre dos estados y tienen una gran probabilidad de abrirse poco después del inicio de un cambio de voltaje. Las corrientes que apoyan el impulso nervioso se generan por la superposición de decenas de millares de tales corrientes elementales de sodio. Los canales para otros iones, como los del potasio y del calcio, dependientes de voltaje, parecen funcionar a la manera de los canales de sodio, y comparten con ellos muchos rasgos estructurales.

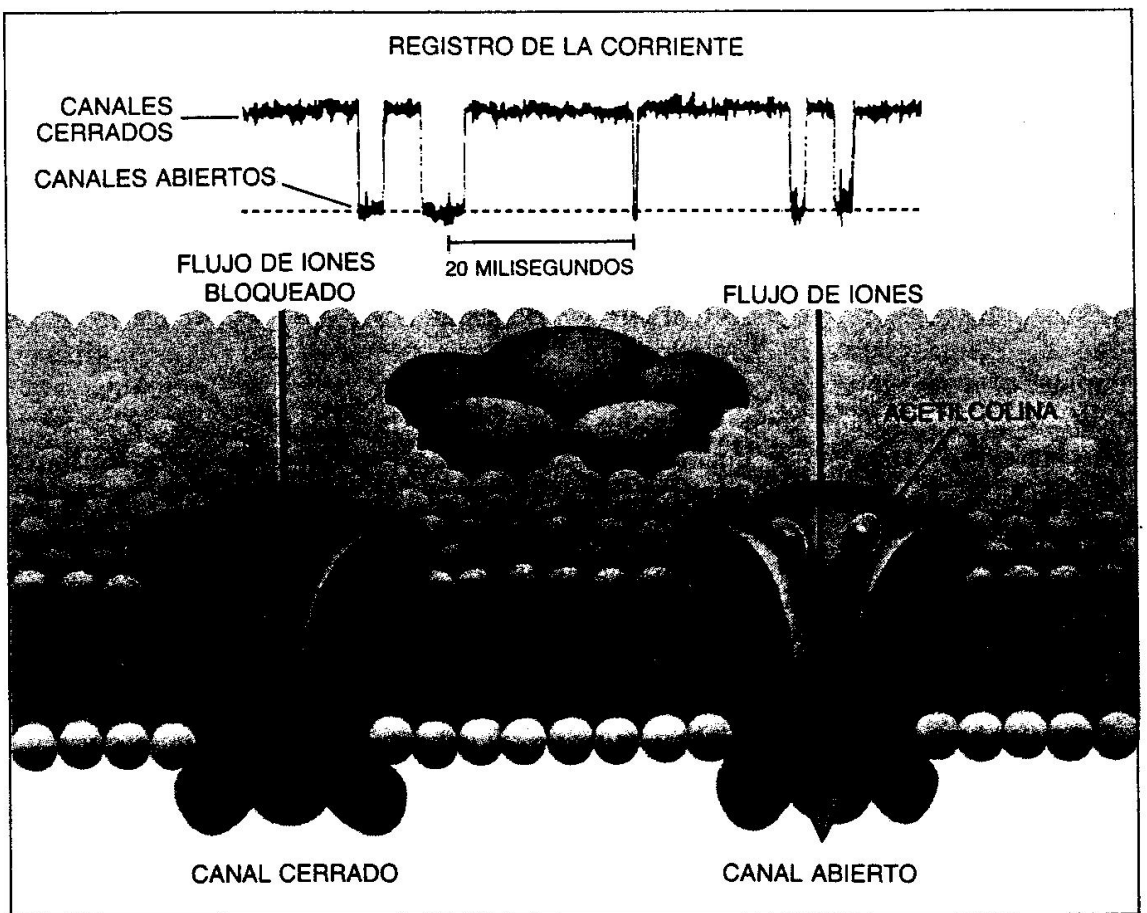
La técnica del pinzamiento de membrana aplicada a los canales dependientes de transmisores y de voltaje ha revelado mecanismos moleculares dinámicos de un nivel de detalle mucho más fino que el aquí expuesto. En casi todos los canales iónicos estudiados, se nos manifiesta que el fenómeno elemental no es un pulso de corriente, sino una serie de pulsos transitorios y separados por breves intervalos. Cuando un canal de receptor en la placa terminal de una unión neuromuscular se engarza en la acetilcolina, por ejemplo, se abre y se cierra varias veces antes

de que la acetilcolina se disocie finalmente de él.

Hemos investigado la estructura de estas transiciones de los canales de la placa terminal en colaboración con David Colquhoun, del University College de Londres. Haciendo uso de la teoría de probabilidades hemos calculado el número de estados que

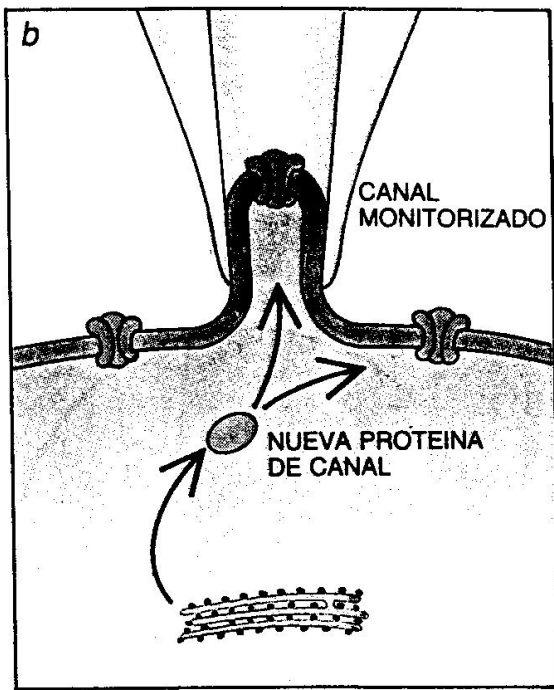
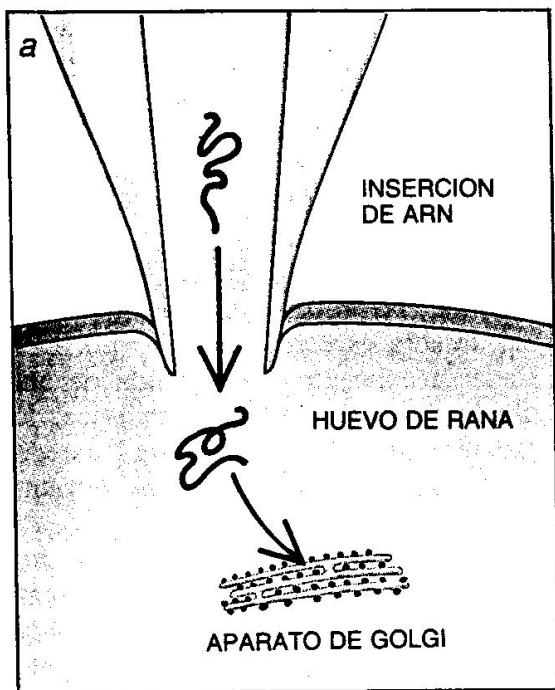
un canal de acetilcolina adopta durante una sucesión de aperturas y cierres, así como la frecuencia de transición de un estado a otro. Tales estudios nos indicaban que cada receptor poseía dos lugares de unión para la acetilcolina. Cuando ambos lugares están ocupados por moléculas de acetilcolina, la probabilidad de que el canal se abra es cercana al 100 por cien. Dada la concentración elevada de acetilcolina en la hendidura sináptica, los canales de la placa terminal pueden actuar como interruptores de corriente controlados químicamente.

Los canales de membrana se nos muestran heterogéneos. En un mismo fragmento de membrana aparecen activados dos o más clases de canales estrechamente emparentadas. Los farmacólogos conocen, desde hace años, la existencia de diferentes subtipos de receptores; ahora bien, gracias a las herramientas mucho más finas hoy disponibles, verbigracia el ADN recombinante, se ha visto que la diversidad de subtipos es muy superior a la imaginada. Para cada tipo de canal, esté mediado por transmisor o por voltaje, existen varias versiones o subtipos con distinta conductancia o propiedades referentes al control de su compuerta que forman una familia de canales. Los estímulos externos y la etapa de desarrollo de un organismo pueden alterar el mosaico



2. CANALES RECEPTORES de la placa terminal neuromuscular: se abren en respuesta al transmisor acetilcolina. En ausencia de acetilcolina, no pasa la corriente a través del canal. Cuando la acetilcolina se liga al receptor, se produce una corriente elemental de unos pocos picoampères. La duración de estas corrientes y el intervalo entre ellas varían.





**3. HUEVOS DE RANA MANIPULADOS POR INGENIERIA GENETICA, una herramienta útil para el estudio del comportamiento de los canales iónicos. Se pueden inyectar secuencias de ARN que codifican subunidades de los canales iónicos en el interior de un huevo (a). El huevo sintetizará entonces las proteínas del canal y las insertará en la superficie de su membrana, dejándolas así accesibles a la pipeta especial para experimentos de pinzamiento (b).**

de subtipos de canales que se encuentran en las membranas celulares.

Misión primera en toda investigación de los canales de membrana es la de averiguar la relación entre las propiedades funcionales de esos poros y sus estructuras tridimensionales. Para cumplir ese objetivo hay que localizar y cambiar secuencias críticas de aminoácidos en la proteína del canal, a fin de observar luego el efecto de dichas alteraciones en el funcionamiento del canal.

Pudo acometerse ese tipo de experimentos una vez se consiguió clonar y secuenciar el ADN de cada subunidad del receptor de acetilcolina. En esa línea, junto con Shosaku Numa y sus colaboradores, de la Universidad de Kioto, hemos trabajado con canales del receptor de acetilcolina, normales y genéticamente alterados, en las membranas de las células huésped, tales como los huevos de la rana de uñas africana *Xenopus*. A partir de las copias de ADN que codifican el receptor de acetilcolina hemos sintetizado, en el tubo de ensayo, moléculas de ARN mensajero complementario. Estas secuencias de ARN pudieron inyectarse en las células del huevo, que tradujeron entonces la información genética en proteínas del receptor y las insertaron en las membranas celulares. Las propiedades funcionales de estos canales de receptor recombinantes son semejantes a las de los canales de la placa terminal en la unión neuromuscular.

Esta combinación de técnicas nos permitió descubrir las diferencias estructurales entre los subtipos de los

canales de la placa terminal en el músculo. El registro de la corriente elemental de la placa terminal ha revelado que el músculo de mamífero produce dos subtipos de canales de placa terminal: un subtipo de baja conductancia, que aparece predominantemente en el músculo fetal y en el del neonato, y un subtipo de conductancia elevada con propiedades diferentes de compuerta, que se expresa en los músculos del adulto. Durante el desarrollo postnatal, el subtipo fetal desaparece gradualmente y se sustituye por el subtipo adulto. Como han revelado los experimentos con técnicas de ADN recombinante, el cambio de los tipos de canales se genera por cambios en la expresión de genes que codifican las subunidades de los canales.

Se ha recurrido a técnicas similares para localizar las secuencias de aminoácidos en la proteína del receptor de acetilcolina que forman la pared interna del canal de la membrana. El análisis de las secuencias de aminoácidos en las subunidades había sugerido que cada una constaba de cuatro segmentos que atraviesan la membrana, y que llevan la designación de M1 a M4. El canal del receptor de acetilcolina parecía estar recubierto por varios segmentos que atraviesan la membrana, como las duelas de un tonel; habría una subunidad para cada segmento.

Con técnicas de ADN recombinante hemos conseguido genes de canales quiméricos, constituidos por subunidades de especies (vaca y raya

eléctrica) cuyos canales tienen propiedades conductoras diferentes. Al analizar las propiedades de estos canales quiméricos, descubrimos que el segmento M2 y sus regiones vecinas encerraban determinantes importantes del transporte iónico. La inducción de mutaciones que provocaban sustituciones de aminoácidos en esas regiones nos permitió perfeccionar el mapa y precisar la localización de esos determinantes.

Hemos visto que tres cúmulos de aminoácidos cargados negativamente pueden formar anillos en las bocas extracelular e intracelular del canal; un anillo semejante de aminoácidos polares está presente en la porción que atraviesa la membrana junto a la boca intracelular. (Los aminoácidos polares poseen estructuras eléctricamente polarizadas, aunque carecen de carga neta.) Estos anillos cargados negativamente influyen de manera decisiva en la velocidad del flujo de la corriente y pueden seleccionar iones particulares para su transporte a través de la membrana: se permite el paso de iones sodio y potasio, cargados positivamente, mientras que se impide el paso de iones cloruro, cargados negativamente. Nuestros resultados sugerían que los aminoácidos polares, situados también junto a la parte intracelular del segmento de M2 que atraviesa la membrana, formaban la parte más estrecha del canal del receptor de acetilcolina.

La técnica del pinzamiento no se limita a revelar los pormenores moleculares de la función del canal; podemos valernos de las pipetas para el estudio de mecanismos de señalización celular, un procedimiento denominado análisis por pinzamiento de voltaje. Esta técnica aventaja a los microelectrodos convencionales en la medición de fenómenos en células pequeñas.

El análisis por pinzamiento de voltaje por medios convencionales contribuyó decisivamente al esclarecimiento de los procesos de señalización en el sistema nervioso. Lo introdujo en 1949 Kenneth S. Cole, del Laboratorio de Biología Marina de Woods Hole. Hodgkin y Huxley lo usaron para desentrañar los mecanismos básicos de la excitabilidad del nervio. La técnica implicaba, en palabras de Cole, la "doma del axón": forzar un potencial transmembrana sobre el axón de una neurona. Las corrientes de membrana resultantes pueden entonces medirse e interpretarse.

Por desgracia, la mayoría de las técnicas de pinzamiento de voltaje requiere que ambos cables axiales o al menos dos microelectrodos se in-

serten en una célula, lo que generalmente sólo es posible con los tipos mayores de células animales o vegetales. Las células de mamíferos, cuyo diámetro varía de 10 a 30 micrometros, a duras penas toleran el impalamiento con un microelectrodo estándar. Antes de que se hubiera desarrollado la técnica del pinzamiento de la membrana se conocía mucho mejor el potencial de acción en el axón del nervio gigante del calamar que los impulsos nerviosos del cerebro humano; en el ámbito de las células vegetales se conocían mejor las señales de algas gigantes, que las del maíz, las del trigo o las de la remolacha.

La posibilidad lograda de un cierre de un gigaohm entre una pipeta de pinzamiento y una membrana celular puso a nuestro alcance el mundo de las células de los mamíferos y el de otras células pequeñas. No sólo nos facultaba para medir los canales de membrana, sino también para aplicar el pinzamiento de voltaje a células pequeñas. Con un poco de suerte se puede desprender el retazo de membrana pinzado sin romper el cierre o sello de la pipeta con la membrana circundante, abriendo así un acceso al citoplasma. Esta configuración, que recibe el nombre de registro con célula entera, se asemeja al clásico impalamiento con microelectrodo. Con el añadido de que lo toleran células mucho más pequeñas y proporciona un control mucho mejor sobre el medio intracelular.

El registro con célula entera mediante este tipo de pipeta se cuenta ya entre los procesos rutinarios de la investigación en cultivos celulares de mamíferos. Las propias plaquetas y hematíes humanos —células de unos pocos micrometros de diámetro— han podido someterse a pinzamientos de voltaje con este tipo de pipetas. Así, la mayoría de los tipos celulares de interés clínico se han hecho accesibles a un análisis biofísico, y en muchas enfermedades, como la fibrosis quística, se ha podido establecer una relación con el funcionamiento deficiente de dichos canales.

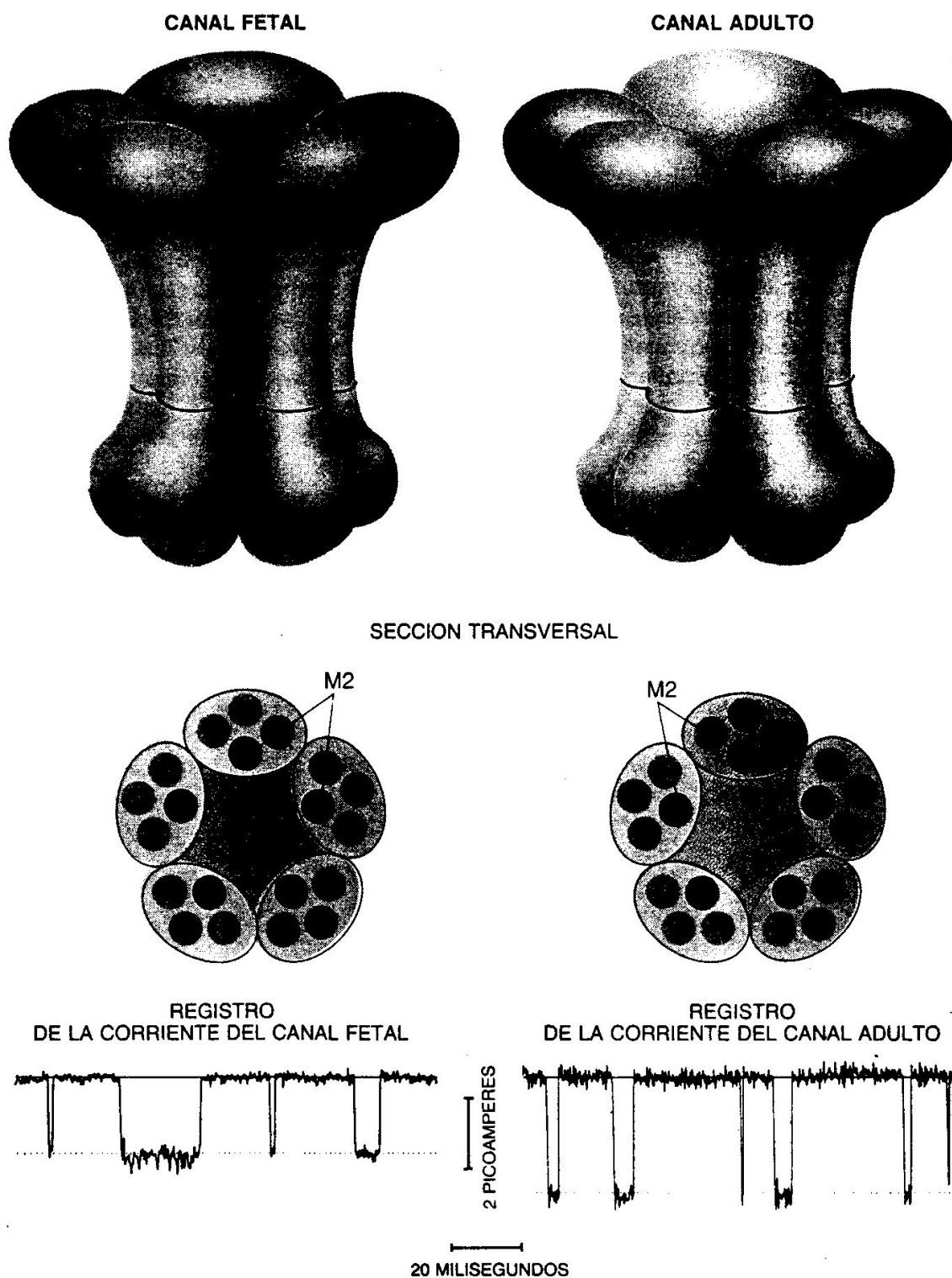
La precisión alcanzada recientemente en el registro con célula entera ha tenido una acogida muy favorable por parte de quienes investigan las señales eléctricas en el sistema nervioso central. Por culpa de su complejidad, las técnicas de pinzamiento de voltaje que se venían utilizando sólo podían aplicarse a neuronas aisladas. El interés biológico de los resultados obtenidos con aquéllas es limitado, porque las células no están en contacto con sus

vecinas naturales. Puede darse que los canales estudiados en células en cultivo no presentaran idénticas propiedades cuando se hallen en el órgano del que proceden. Incógnitas que resultan preocupantes si hablamos de células del sistema nervioso central, que poseen una especificidad muy elevada y una arquitectura muy elaborada.

Así las cosas, diseñamos una estrategia para aplicar el método de registro con célula entera al tejido cerebral respetando el entorno natural de las neuronas. Per Anderson, de la Universidad de Oslo, y Tomo Takahashi, de la Universidad de Kioto, habían ideado un procedimiento para obtener una pequeña rebanada

de tejido cerebral de un centímetro de ancho. La superficie de las neuronas se limpia de células de glía y de otros tejidos adherentes proyectando con gran cuidado, sobre la superficie de la rebanada, solución de lavado. Luego, se presiona con la punta de la pipeta de pinzamiento sobre la superficie de una de las neuronas expuestas hasta perforar la membrana para realizar el registro de una célula. Semejante procedimiento no permite medir las corrientes sinápticas con una resolución que supera en 10 a 50 veces la que se consigue con los microelectrodos intracelulares.

Cuando una de las neuronas libera glutamato de sus estructuras presi-



**4. ESTRUCTURA** de los canales receptores de acetilcolina, estructura que guarda relación con su función. Cada canal consta de cinco subunidades; cada subunidad contiene cuatro segmentos de transmembrana. El segmento M2 de cada subunidad recubre el interior del canal, a modo de duela en un tonel. El feto de los mamíferos produce un receptor de acetilcolina en las placas terminales neuromusculares que difiere del que posee el adulto en una de las subunidades. La diferencia de esta subunidad en el segmento M2 hace que las corrientes elementales sean menores.



nápticas, induce corrientes excitadoras postsinápticas (CEP) o corrientes inhibitoras postsinápticas (CIP) en una neurona vecina. (Las CEP aumentan la probabilidad de que se genere un potencial de acción y se liberen transmisores propios; las CIP rebajan esa probabilidad.) En el registro con célula entera, las amplitudes del pico de las CEP y de las CIP fluctúan al azar en pruebas sucesivas. Esta observación sugiere que las CEP y las CIP son el resultado de la superposición casi simultánea de fenómenos "cuánticos", de manera semejante a lo que ocurre con los fenómenos "cuánticos" que dan origen a las corrientes de la placa terminal en la unión neuromuscular.

Con sorpresa por nuestra parte comprobamos que sólo unos 20 o 30 canales de receptores postsinápticos parecen abrirse en respuesta a un "cuanto" o paquete de moléculas de transmisores liberadas por una única vesícula presináptica. Este número es menor, en varios órdenes de magnitud, que el de una sinapsis neuromuscular. En el sistema nervioso, esa respuesta limitada permite, a buen seguro, afinar el grado de excitación o de inhibición provocado por las señales que actúan sobre una neurona.

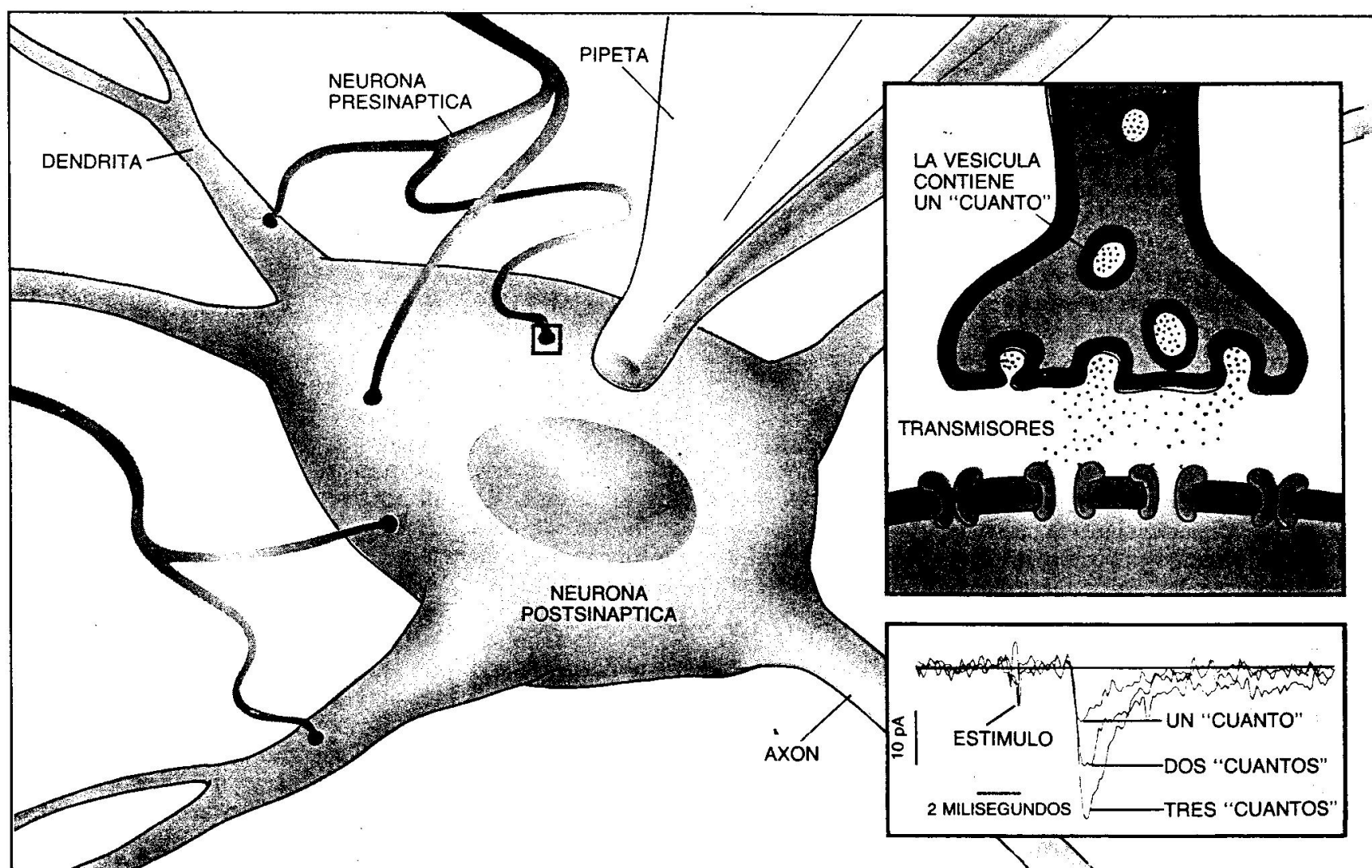
La resolución de tales fenómenos "cuánticos" en el sistema nervioso central nos faculta para distinguir los factores presinápticos y postsinápticos que subyacen en los cambios de rendimiento sináptico. Tales cambios se han observado a raíz del uso o de la ejercitación de una neurona. La comprensión de la eficiencia sináptica puede, por tanto, ayudarnos a entender el sustrato biológico del aprendizaje y de la memoria.

Los canales iónicos forman parte de una red compleja de mecanismos de señalización en la que intervienen también segundos mensajeros: moléculas capaces de transportar señales desde la superficie de las células hasta su interior, en su difusión a través del citoplasma. Las actividades de muchos tipos de canales que responden primariamente a transmisores externos o a cambios de voltaje están influidas o moduladas por esas sustancias intracelulares. Los canales iónicos ejercen, asimismo, un efecto recíproco sobre las funciones de las moléculas del segundo mensajero: casi todos los segundos mensajeros conocidos interactúan con ciertos canales iónicos, directamente o a través de otras moléculas, incluidas

las quinasas (enzimas que fosforilan moléculas) y las proteínas G (que acoplan receptores a enzimas que catalizan la formación de muchos segundos mensajeros).

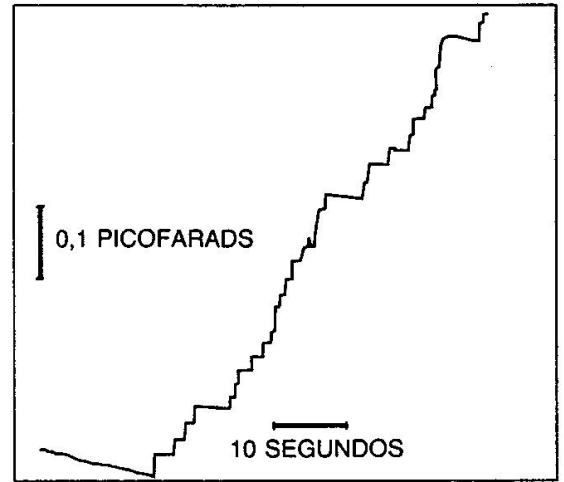
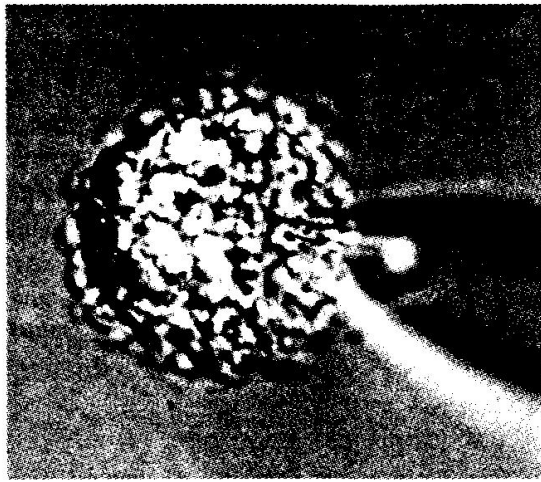
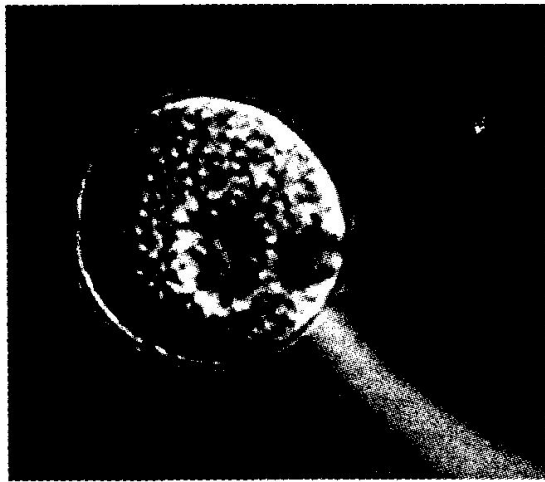
Buena parte de los canales iónicos de potasio, de las neuronas, se hallan condicionados por el potencial de membrana y por la concentración intracelular de los iones de calcio. Si esta concentración es baja, no se abrirán los canales de potasio, salvo que las despolarizaciones (cambios en el potencial de membrana) sean muy grandes; cuando la concentración de calcio es alta, comienzan a abrirse con despolarizaciones moderadas o incluso con el potencial de reposo.

Los canales que específicamente controlan la entrada de iones calcio en la célula están, a su vez, regulados por las concentraciones del ion calcio. Estos canales se abren en respuesta a despolarizaciones, si bien algunos tipos los desactivan los iones calcio que penetran en la célula. Podemos ver en ello un mecanismo de retroinhibición que regula los niveles de calcio, que es, a su vez, un segundo mensajero importante para muchas actividades celulares.



**5. EL REGISTRO CON CELULA ENTERA**, en el que una pipeta de pinzamiento ocupa el lugar del microelectrodo convencional, ha revolucionado el estudio de las células de mamíferos, y en particular de las neuronas. Los científicos pueden trabajar ahora con pequeños cortes de tejido nervioso que contienen

neuronas en contacto con su entorno natural. La técnica, muy sensible, detecta corrientes de excitación y de inhibición inducidas en las neuronas por paquetes ("cuantos") individuales de transmisores contenidos en una vesícula presináptica (*recuadro*). Registró el trazado de la corriente Peter Stern.



6. LA CELULA CEBADA (a la izquierda) segrega histamina y otros compuestos en respuesta a un estímulo aplicado a través de una pipeta de pinzamiento (centro). La técnica de pinzamiento de membrana sirve para medir los cambios de la capa-

citancia de la membrana que corresponden a la fusión de una sola vesícula secretora con la membrana plasmática. Cada fusión se traduce en un salto en el registro de la capacitancia (derecha). Fotografías de Julio M. Fernandes.

No debiera, pues, sorprendernos si resultó difícil resolver una red de tal complejidad de interacciones mutuas, con sinergismos y lazos de retrocontrol. El registro de la actividad eléctrica desencadenada por la estimulación de células no bastaba para deshacer los nudos de la red. Había que someter a control algunos de los reguladores intracelulares. El método de la célula entera proporcionó ese control al dejarnos manipular el contenido de una célula.

Al ser bastante amplia la zona de conexión entre el interior de la pipeta y el espacio intracelular, las moléculas se difunden rápidamente de uno a otro, lo que entorpecía el desarrollo de la experimentación. En los trabajos primeros sobre célula entera, los investigadores comprobaron que los mecanismos sutiles de control se perdían por culpa de su difusión hacia el exterior. Muchas de las moléculas controladoras solubles se diluían en el volumen relativo casi infinito de la pipeta de medida. Sólo permanecían intactos los canales muy robustos.

En el transcurso de estos años, muchos laboratorios han ido descubriendo gradualmente las concentraciones precisas de las sustancias que deben estar presentes en la pipeta para salvar la función propia de los diversos canales. Así se nos ha ido manifestando la red de interacciones entre receptores, segundos mensajeros y canales iónicos; y, con ello, se nos ha concedido la posibilidad de reconstituir algunas de las vías de señalización.

El mensaje que los canales iónicos transmiten a las células implica muy a menudo un cambio del calcio intracelular. A nosotros nos interesaba averiguar cómo llega esta señal a provocar la respuesta celular. Decidimos, pues, centrar nuestra atención

sobre el papel del calcio en la secreción.

En teoría, esos estudios demandan la medición simultánea de las corrientes iónicas, la señal de calcio y la secreción en una misma célula. A cuyo ideal se aproxima bastante la combinación del registro con célula entera y un método de determinación de calcio desarrollado por Roger Y. Tsien en la Universidad de California en Berkeley. La técnica de Tsien utiliza fura-2, un colorante que cambia sus propiedades fluorescentes cuando se une al calcio. La medida de la fluorescencia del colorante permite calcular la concentración de los iones de calcio libre.

Mediante la técnica del pinzamiento podíamos seguir las corrientes de iones y la secreción de la manera siguiente. Las células segregan materiales a través de la exocitosis, proceso en el que las vesículas de almacenamiento se funden con la membrana plasmática y expulsan su contenido. El proceso comporta la fusión de las membranas vesiculares con la membrana plasmática, cuya superficie aumenta en consecuencia. Este aumento se detecta fácilmente en el cambio de la capacitancia de la membrana, que es proporcional a la superficie de ésta. Aunque el cambio sea a veces transitorio o pequeño, la medida de la capacitancia es lo suficientemente sensible como para detectar la fusión de vesículas con la membrana plasmática. En muchos tipos de células, estas señales sirven para correlacionar la secreción con la concentración de calcio intracelular y con los fenómenos electrofisiológicos.

Hemos estudiado las células cromafines de la glándula suprarrenal, que segregan las hormonas adrenalina y noradrenalina en momentos de estrés. Nuestros primeros estudios habían puesto de manifiesto que las

células cromafines poseen canales de calcio dependientes del voltaje, de manera parecida a lo que ocurre con las células nerviosas. Cuando las células se estimulan eléctricamente o con acetilcolina, se abren los canales de calcio y sube la concentración de calcio, fenómeno éste que puede medirse fácilmente a través de la fluorescencia del fura-2. La capacitancia de la membrana también aumenta, señal de exocitosis.

Si un quelante de calcio —un compuesto que liga iones calcio— está presente en la pipeta, tanto la elevación de la concentración del calcio intracelular como la señal de la capacitancia se suprimen en las células cromafines. Si la pipeta contiene un nivel alto de calcio, se induce entonces un aumento del calcio intracelular y un aumento de la capacitancia. Estos resultados sugieren que la secreción por parte de las células cromafines obedece a los mismos principios que Katz y Miledi vieron que eran aplicables a la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular.

Cuando generalizamos esos estudios a células secretoras no excitables, quedamos sorprendidos ante la relación entre calcio y secreción. Nuestro tipo celular favorito en esta categoría es la célula cebada, que se encuentra en el tejido conjuntivo. Estimuladas con hormonas o antígenos (moléculas de otros organismos), las células cebadas segregan histamina y otros compuestos que median respuestas inflamatorias o inmunitarias. El interés de esas células para nuestro trabajo residía en su abundancia de grandes gránulos de secreción, o vesículas. Después de la estimulación se produce en estas células una vigorosa exocitosis: su superficie aumenta entre dos y cuatro veces al cabo de 10 a 20 segundos.





microscopios

**Kyowa**

JAPON

telescopios EE.UU.  
**CELESTRON**

Tipos Catadioptricos Schmidt-Cassegrain.

Aberturas: 200, 280 y 355 mm.

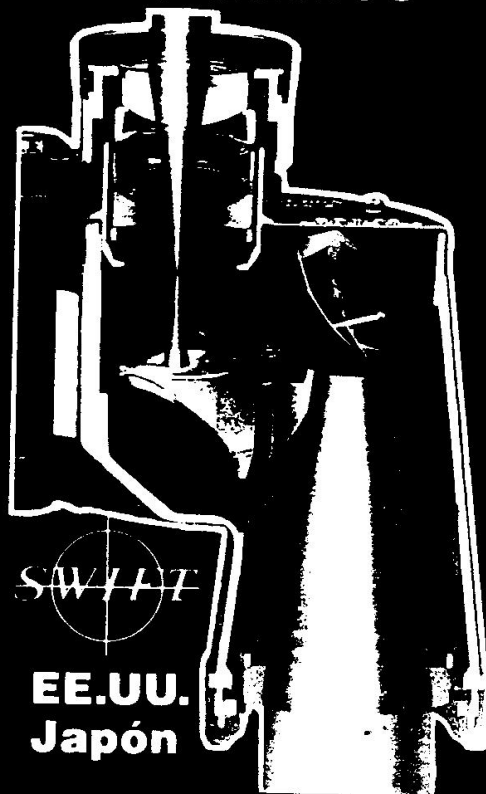
Focales: 2000, 2800 y 3910 mm.

Accesorios, Computadora, Prismáticos.

telescopios terrestres **KOWA**  
OBJETIVOS DE FLUORITA



**"PRISMATICOS"**



SWIFT

EE.UU.  
Japón

•AUDUBON- Compacto 7x35 mm DCF	•AUDUBON- 8.5x44 mm BWCF	•SARATOGA- SPWA 8x36 mm BWCF	•NEWPORT- SPWA 10x42 mm BWCF
--------------------------------------	-----------------------------	------------------------------------	------------------------------------

•GRAND PRIX- 8x40 mm ZWCF	•NEPTUNE- 7x50 mm ZCF	•TRITON- 10x50 mm ZWCF	•OBSERVATION- 16x70 mm BWCF
------------------------------	--------------------------	---------------------------	--------------------------------

•TRYLITE- 7x42 mm DCF	•TRYLITE- 10x42 mm DCF	•BELMONT- 8x40 mm BWCF	•BELMONT- 12x50 mm BWCF
--------------------------	---------------------------	---------------------------	----------------------------

•MARLIN- c/Brújula 7,5x45 mm BIF	•SEA WOLF 7x50 mm BCF	•OSPREY- 7,5x42 mm BCF	•SKIPPER- SP 7x50 mm BCF
--	--------------------------	---------------------------	-----------------------------

Ha sido el prismatico «oficial» del barco norteamericano «Star and Stripes» participante y ganador en la «Copa América» de yates.

Solicite nuestro Catálogo General de  
**MICROSCOPIOS**  
Y  
**APARATOS CIENTIFICOS**  
32 páginas de excepcional  
información  
A TODO COLOR

Solicite nuestro Catálogo General de  
**TELESCOPIOS ASTRONOMICOS,**  
**TERRESTRES,**  
**PRISMATICOS...**  
16 páginas de extraordinaria  
información  
A TODO COLOR

**MICROCIENCIA, S.A.**

Tels. (93) 410 58 56 / 55 - Fax (93) 321 05 07  
Montnegre, 2-6 - 08029 BARCELONA

Durante el proceso de exocitosis en que tiene lugar la liberación de los gránulos de almacenamiento, la capacitancia de una célula cebada crece de manera escalonada, representando cada salto la fusión de una vesícula. No se trata, empero, de saltos uniformes. Su amplitud oscila alrededor de valores cercanos a un valor medio, y la variación refleja la distribución de los tamaños de los gránulos.

Nos sorprendió ver que, al elevar la concentración de calcio en el interior de las células cebadas, no se iniciase la secreción, como sucedía con las células excitables. Durante algún tiempo llegamos a pensar que ello obedecía a la difusión y pérdida de moléculas esenciales. Después supimos que estas células requerían otros estímulos. Ciertas hormonas y antígenos, cuando se aplicaban extracelularmente, provocaban una secreción vigorosa, por sí solos o en sinergismo con una señal intracelular de calcio.

Todos los estímulos conducían invariablemente a una señal prominente de calcio —un aumento momentáneo de la concentración intracelular de calcio en más de un orden de magnitud—, después de cuya aparición acontecía la secreción. El pico transitorio de calcio se debía a la liberación de iones almacenados intracelularmente. Se producía también una entrada abundante de calcio exterior por vías no dependientes del voltaje, pero con escasa repercusión sobre la respuesta secretora. Aun cuando la concentración de calcio de la célula quedara fijada dentro de niveles bajos por haber incluido una mezcla quelante en la pipeta, la desgranulación procedía a un ritmo máximo después de la estimulación externa.

No obstante, la concentración de calcio influye sobre las células cebadas. Si aquella es muy alta, la secreción se produce con cierto retraso, hecho que podría explicar la base de muchas comunicaciones en las que se afirma que la secreción inducida por calcio se ha obtenido con inyecciones de calcio o de otras moléculas que permiten que dicho ion penetre en las células. También, porque después de la estimulación, hormonal o de otro tipo, la célula parece adquirir una mayor sensibilidad hacia el calcio: la elevación subsiguiente del nivel de calcio acelera la desgranulación ya iniciada. En estas células, pues, el calcio viene a ser uno más entre los diversos reguladores de la secreción.

Todos los hallazgos recientes indican que el proceso secretor está bajo control de una red de vías de señales con relaciones entre sí, semejantes a las que modulan los canales iónicos. Los componentes de esta red parecen ser los mismos: y de manera muy prominente, el calcio (particularmente en las neuronas y en otros tipos celulares), segundos mensajeros, quinasas y probablemente proteínas G. Nuestros conocimientos acerca de las interacciones que regulan la secreción se encuentran todavía en su fase incipiente, mientras que tenemos perfilada la red que controla los canales iónicos, gracias en muy buena parte a la técnica del pinzamiento.

En conclusión, la extraordinaria sensibilidad de la técnica del pinzamiento de membrana nos ha llevado hasta el funcionamiento molecular de los canales. Merced a esa técnica, potente y sencilla a la vez, nos es dado también estudiar las células minúsculas de los tejidos de los mamíferos y seguir la pista de las señales mediante el control del medio intracelular. A medida que aumenta el número de investigadores que la adoptan, se afianza nuestra esperanza de que seguirá siendo un instrumento eficaz para desvelar secretos que la célula aún guarda celosamente en su interior.

#### BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

IMPROVED PATCH-CLAMP TECHNIQUES FOR HIGH-RESOLUTION CURRENT RECORDING FROM CELLS AND CELL-FREE MEMBRANE PATCHES. O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth en *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, vol. 391, n.º 2, págs. 85-100; agosto de 1981.

THE PATCH-CLAMP TECHNIQUE IN THE STUDY OF SECRETION. Reinhold Penner y Erwin Neher en *Trends in Neurosciences*, vol. 12, n.º 4, págs. 159-163; abril de 1989.

A THIN SLICE PREPARATION FOR PATCH CLAMP RECORDINGS FROM NEURONES OF THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. F. A. Edwards, A. Konnerth, B. Sakmann, T. Takahashi en *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, vol. 414, n.º 5, págs. 600-612; septiembre (I) 1989.

THE STRUCTURE OF ION CHANNELS IN MEMBRANES OF EXCITABLE CELLS. Nigel Unwin en *Neuron*, vol. 3, n.º 6, págs. 665-676; diciembre de 1989.

STRUCTURE-FUNCTION STUDIES OF VOLTAGE-GATED ION CHANNELS. W. Stühmer en *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 20, págs. 65-78; 1991.