



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**

**“Optogenética para el control de la segregación de
Oxitocina en el Hipotálamo e Hipófisis en Ganado
Bovino”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

MARCO ANTONIO CRIOLLO ARELLANO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS VILLA ANGULO

DR. RICARDO MORALES CARBAJAL

Mexicali, B. C.

Junio del 2018

Dedicatoria:

A mi familia, por ser el pilar del que siempre me he podido sostener para continuar realizándome tanto personal como profesionalmente, ya que sin ellos no estaría en donde me encuentro el día de hoy.

A todos mis amigos, que en su momento han influenciado en la persona que soy hoy en día y que gracias a sus guías e inspiración lucho por seguir de frente a la vida.

Al amor de mi vida, que me ha demostrado lo bello que es amar y vivir, que nunca es demasiado tarde para empezar a ser feliz y que, sin importar la distancia, tiempo o lugar, está siempre a mi lado como mi compañera en el viaje de la vida.

Gracias.

Agradecimientos:

Al Dr. Carlos Villa por recibirme como alumno, por sus enseñanzas a lo largo de estos años, por confiar en mí la responsabilidad de realizar este primer trabajo interdisciplinario y ser una guía tanto moral como pedagógica sin la cual nada de esto hubiera sido posible.

Al Dr. Ricardo Morales por ser un apoyo importante al compartir sus conocimientos y experiencias sin las cuales no se pudiera haber realizado este trabajo.

Al Dr. González Vizcarra, que sin su guía este trabajo nunca hubiera tomado los rumbos correctos, y por su siempre disponibilidad por cooperar en todo lo posible para realizar este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC y al Instituto de Ingeniería de la UABC por su colaboración con el equipo, instalaciones y recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante este periodo de cuatro años y que permitió mi dedicación completa a la elaboración de esta Tesis.

Índice General

Introducción	I
--------------------	---

Antecedentes y contexto.....	I
Justificación.....	II
Motivación	III
Objetivo general	III
Objetivos específicos.....	IV
Descripción de la tesis	V

Capítulo 1. Estado del arte en electrofisiología	1
---	---

1.1. Propiedades eléctricas de las neuronas.....	1
1.1.1. Potencial de membrana	1
1.1.1. Potencial de acción y sus etapas.....	3
1.2. Resistencia y Capacitancia	5
1.2.1. Mielina y sus efectos en las propiedades eléctricas.....	5
1.3. La sinapsis, conexiones sinápticas y circuitos neuronales	6
1.3.1. La sinapsis.....	6
1.4. Introducción a electrofisiología.....	7
1.4.1. Current Clamp.....	8
1.4.2. Voltage Clamp	9

Capítulo 2. Estado del arte en optogenética.....	10
---	----

2.1. Antecedentes en la optogenética	10
2.2. Opsinas y sus efectos a la interacción de un fotón	11
2.2.1. Fotoisomerización de las proteínas	11
2.2.1. Clasificación de las opsinas	12
2.3. Caracterización de las opsinas.....	13
2.4. Metodologías de inserción	15
2.5. Generación de Luz:	16

Capítulo 3. La producción de leche en bovinos, un enfoque endocrino y neurológico.. 18

3.1. Orígenes de la oxitocina	18
3.1.1. El hipotálamo y la hipófisis.....	18
3.2. Glándulas mamarias	19
3.2.1. El alveolo secretor y células mioepiteliales.....	20
3.3. El miometrio	21
3.4. El reflejo de Ferguson	21

Capítulo 4. Diseño de equipo electrofisiológico y optogenético 23

4.1. Cámara de grabación.....	23
4.1.1. Diseño y construcción de la plataforma de grabación	24
4.2. Optopatcher	26
4.2.1. Electrodo de grabación.....	27
4.2.2. Estimulación óptica	27
4.2.3. Elaboración de pipetas	28
4.3. Circuitos eléctricos.....	30
4.3.1. Headstage	31
4.3.1. Amplificador	36
4.3.2. Aislamiento eléctrico	38
4.4. Equipo de perfusión	38

Capítulo 5. Protocolos de experimentación sobre un tejido de miometrio *in vitro* y resultados. 41

5.1. Protocolo de tratamiento del tejido biopsia y configuración de cámara de grabación	41
5.2. Protocolo de creación de solución de Ringer	43
5.3. Protocolo de configuración del sistema de perfusión.	44
5.4. Protocolo de estimulación óptica	45
5.5. Protocolo de identificación de opsina	46
5.5.1. Discusión sobre resultados de la prueba visual	47
5.6. Protocolo de grabación.....	49

5.7.	Post procesamiento de las señales eléctricas del cérvix	50
5.1.	Resultados	58
5.1.1.	Actividad eléctrica media sesión 1	58
5.1.1.	Actividad eléctrica media sesión 2	61
Capítulo 6.	Experimentación sobre un individuo <i>in vivo</i> y resultados.	64
6.1.	Primer estudio de oxitocina, el reflejo de Ferguson.	64
6.2.	Inserción de virus	68
6.3.	Segundo estudio de oxitocina, estimulación óptica del cérvix	71
6.3.1.	Estimulación óptica	71
6.3.2.	Niveles de oxitocina relacionados a la estimulación óptica	72
6.3.3.	Extracción de tejido.....	76
Capítulo 7.	Conclusiones y trabajos a futuro.	77
Referencias		79
Anexos		83

Índice de figuras

Figura I del lado izquierdo: disponibilidad de leche litros/habitante/año en la región; del lado derecho: volumen de producción de leche regional	I
Figura 1-1. Canales de Sodio y Potasio sobre la membrana	3
Figura 1-2 etapas del potencial de acción.....	3
Figura 1-3 canales de iones sobre el cuerpo de la neurona.....	4
Figura 1-4 Axón y un modelo eléctrico equivalente.....	5
Figura 1-5 Mielina y su modelo eléctrico.....	6
Figura 1-6 Modelo básico de neurona y sus diversas variantes	7
Figura 1-7 Modelo ideal de Patch Clamp	8
Figura 1-8 Modelo ideal de un electrodo unido a un seguidor de voltaje.....	8
Figura 1-9 Current Clamp con estimulación	9
Figura 2-1 Opsinas Tipo I fotoisomerización	12
Figura 2-2 Opsinas Tipo II fotoisomerización	12
Figura 2-3 Ejemplos de opsinas y su espectro de respuesta	14
Figura 2-4 Tipos de transfección genética.....	15
Figura 3-1 Hipotalamo en Vaca.....	19
Figura 3-2 Glándula mamaria bovina	20
Figura 3-3 Fases del reflejo de Ferguson.....	22
Figura 4-1 Cámara de grabación	23
Figura 4-2 Ejemplo de ensamble de cámara de grabación con adaptadores.....	24
Figura 4-3 Partes de la plataforma.....	25
Figura 4-4 Partes del adaptador de plataforma	25
Figura 4-5 Impresiones de los modelos de plataforma y adaptador de plataforma	26
Figura 4-6 Optopatcher acoplado a fibra óptica	27
Figura 4-7 Partes del optopatcher	28
Figura 4-8 Puller Modelo P-97	29
Figura 4-9 Etapas de procesamiento de señal	31
Figura 4-10 Respuesta de frecuencia del dispositivo MAX44252ASD+	32
Figura 4-11 Ejemplo de circuito para MAX660.....	32
Figura 4-12 Electrodo acoplado a seguidor de voltaje	33
Figura 4-13 Modelo de PCB para el headstage	33
Figura 4-14 Modelo renderizado en 3D del PCB	34
Figura 4-15 Impreso de PCB	34
Figura 4-16 Impreso de la caja para headstage.....	35
Figura 4-17 Headstage acoplado a la caja y con caja de Faraday.....	35

Figura 4-18 señal de prueba, izquierda dominio del tiempo, derecha dominio frecuencial	36
Figura 4-19 Amplificador Diferencial DP-301.....	37
Figura 4-20 Modelo de perfusión	38
Figura 4-21 Flujo laminar sobre la cámara de grabación	40
Figura 5-1 Led 470 nm de Thorslab	45
Figura 5-2 Conector de fibra óptica de Thorslab	46
Figura 5-3 Virus y sus respectivas nomenclaturas.....	47
Figura 5-4 Área de inserción de virus vs área de extracción	49
Figura 5-5 Espectograma de una muestra de señal sin procesar	51
Figura 5-6 Respuesta en frecuencia magnitud del filtro FIR diseñado	52
Figura 5-7 Espectograma de una muestra de señal después del procesamiento	52
Figura 5-8 Muestra de señal en el dominio del tiempo, con y sin filtro	53
Figura 5-9 Muestra de señal con curva de ajuste de offset	54
Figura 5-10 Muestra de señal, vista de actividad espontanea	55
Figura 5-11 Umbrales de detección.....	56
Figura 5-12 Muestra de señal, con filtro, ajuste de curva y detección de actividad con umbrales	58
Figura 5-13 Resultados del conteo de detección de actividad Sesión 1.....	59
Figura 5-14 Ruido mecánico	60
Figura 5-15 Resultados de conteo de detección actividad Sesión 2	62
Figura 6-1 Curva de ajuste primer estudio	65
Figura 6-2 Diagrama de caja, primer estudio	66
Figura 6-3 Nivel de Oxitocina por cada individuo, primer estudio	67
Figura 6-4 Mapa de secuencia del plásmido.....	69
Figura 6-5 Imagen del cérvix 3 semanas después de la transfección.....	70
Figura 6-6 Estimulación óptica sobre el cérvix	72
Figura 6-7 Curva de ajuste, segundo estudio.....	73
Figura 6-8 Diagrama de caja, segundo estudio.....	73
Figura 6-9 Curvas del nivel de Oxitocina del sujeto de estudio y control	75

Índice de tablas

Tabla 1-1. Concentración de iones y potencial de membrana en un ser humano	2
Tabla 2-1 Tipos de trasnfección genética	15
Tabla 4-1 Tipos de configuraciones del amplificador	37
Tabla 5-1 Contenido molar para una solución de Ringer	43
Tabla 5-2 Configuración del equipo de estimulación óptica	46
Tabla 6-1 Nivel de Oxitocina por individuo	68
Tabla 6-2 Nivel de Oxitocina, segundo estudio.....	74

Introducción

Antecedentes y contexto

Desde hace más de 6 mil años el ser humano ha llevado a práctica la crianza de ganado. Esto con la finalidad de poder obtener de ciertas especies seleccionadas los alimentos necesarios para la vida diaria. La vaca (*Bos primigenius taurus*) es por excelencia uno de los animales de granja más empleados alrededor del mundo. De ésta, son obtenidos el tipo de productos lácteos y carnes más consumidos en el país. La disponibilidad per cápita de la leche de bovino ha ido incrementando conforme los años en México, debido a su alta demanda por la población (v. Figura I)¹.

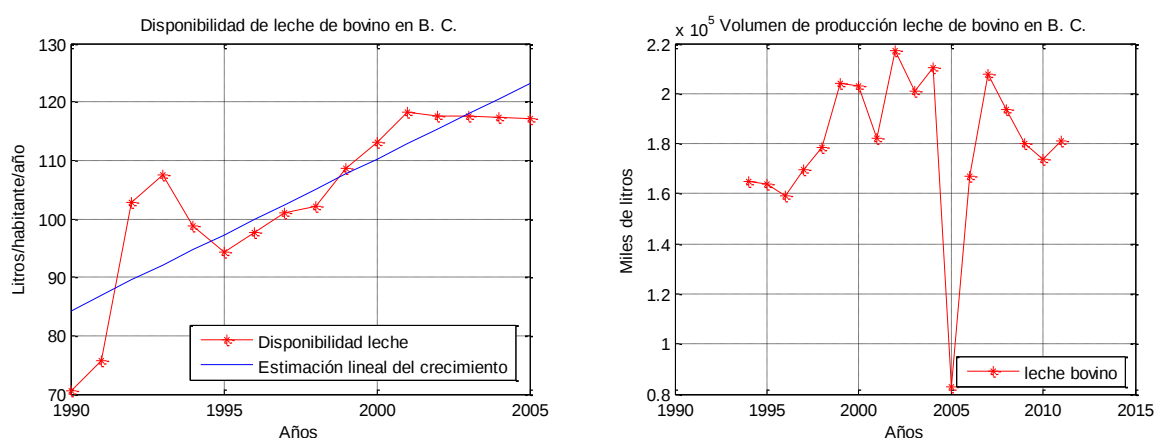


Figura I del lado izquierdo: disponibilidad de leche litros/habitante/año en la región; del lado derecho: volumen de producción de leche regional

De manera regional, se puede observar que, en el caso de la productividad y el consumo de leche, la proveniente de la vaca prolifera sobre los diferentes tipos de leche producida en Mexicali, siendo el 99% de la producción correspondiente a la leche de bovino y el 1 % a la leche de caprino².

¹ Disponibilidad per cápita de leche de huevo, miel y leche, SAGARPA, 2013

² Volumen de producción de leche de Bovino, Banco de Información de INEGI, consulta Abril 2014

Esta demanda y su respectivo crecimiento a través de los años (v. Figura I) ha conllevado al sector industrial a buscar técnicas de producción más optimas y automatizadas. Tales técnicas se ven reflejadas en la evolución del tradicional ordeño manual hacia el ordeño mecánico.

El ordeño manual se distingue por ser la manera más sencilla en la que se puede extraer la leche. Consiste en la extracción de leche simulado con las manos los movimientos de una cría al momento de ser amamantada. El ordeño mecánico es una manera de realizar el mismo proceso, pero de manera automatizada. Se realiza mediante un arnés que se coloca en cada una de las ubres y que extraen la leche al momento de generar un vacío. Aunque los dos tipos de técnicas son eficientes, es más común en la industria el empleo del ordeño mecánico, debido a que optimiza el volumen y velocidad de producción y a su vez disminuye la probabilidad de contaminación bacteriológica en la leche [1].

Sin embargo, para poder extraer de manera eficiente la leche que una vaca genera en su ciclo de lactación, es necesario generar un entorno favorable para el animal, *i.e.* hacer sentir cómoda a la vaca, masaje previo al ordeño, llamado de la cría, etc. En la glándula mamaria es posible observar dos etapas por las cuales pasa la leche. Primeramente, se tienen los alveolos, lóbulos en los cuales se extraen los nutrientes de la sangre y son sintetizados en leche, y la cisterna, el cual es un depósito donde se acumula la leche una vez liberada de los alveolos.

La estimulación es recibida por receptores que se encuentran en diferentes partes del cuerpo de la vaca, y estos son recibidos por el hipotálamo y la hipófisis, los cuales liberan a la sangre la hormona Oxitocina y que al ser recibida por las células mioepiteliales en los alveolos, facilita el traspaso de la leche de los alveolos de la vaca hacia la cisterna de la glándula mamaria [1], [2].

Justificación

Si estas condiciones para generar el estímulo en la vaca no son llevadas satisfactoriamente, entonces únicamente se podrá obtener del ordeño la leche cisternal. Más aún, si la vaca es sometida a situaciones de estrés entra en juego la liberación de adrenalina, la cual termina siendo un bloqueo completo en la producción y bajada de leche [2].

Desafortunadamente, muchas veces en las mismas industrias y debido al volumen de ejemplares bovinos que se tienen, no siempre es posible cumplir con estas condiciones para el correcto estímulo de la vaca, en especial en regiones áridas como Mexicali donde también entra en juego el factor climático [3].

Es por esto, que se propone el empleo de una alternativa de estimulación y generación de Oxitocina. La optogenética brinda una manera directa de estimulación neuronal selectiva empleando fotones de luz, y mediante esta primicia, se pretende estimular los sectores específicos en el hipotálamo e hipófisis para liberar la respectiva hormona, que a su vez terminara en un ordeño óptimo y generando un ambiente más satisfactorio para el animal.

Motivación

La ciencia siempre ha sido una herramienta para el hombre con la cual a alcanzado lo que en un momento solo se podía ver en sueños. La motivación por ser mejor y superar siempre nuevos retos es lo que ha llevado al ser humano al nivel de vida que tiene en la actualidad. Es importante no dejar de tener esta visión, la visión del uso del conocimiento por el bien de la humanidad. Y es que aquí, es donde un nuevo reto se presenta para el ser humano, hacer el uso de la ciencia no solo para mejorar e innovar la calidad de vida y en entorno del ser humano, sino de todos los seres vivos.

La motivación principal de este trabajo va más allá de encontrar técnicas para una mejor producción de leche, o razones económicas. La motivación engloba por si misma ya todos estos aspectos, pero los lleva de la mano para subir a un nuevo nivel de reto: ayudar a todos los seres vivos y al mismo planeta. Alcanzar esta meta nos llevara como especie a un nuevo nivel donde el individualismo deje de ser una idea grabada en la mente y se piense no solo en lo mejor para uno, si no lo mejor para todos.

Objetivo general

Desarrollar una técnica de estimulación para la producción de Oxitocina en el hipotálamo e hipófisis, activando o desactivando la actividad celular de las neuronas al

irradiar fotones sobre proteínas fotosensibles (Canalrodopsinas ChR2, mutaciones C128S de tipo biestables), mismas que servirán como bombas de iones que generarán actividad potencial en la célula, con la intención de estimular la liberación de la leche alveolar hacia la cisterna principal.

Objetivos específicos

Estudiar la estructura fisiológica del cerebro, cervix y glándulas mamarias, así como el paradigma del comportamiento, características y funcionamiento de las neuronas y neuroreceptores.

- Analizar y caracterizar la mejor forma de estimulación directa sobre el hipotálamo evitando ser una herramienta invasiva para el ser vivo.
- Investigar y estudiar los diferentes tipos de opsinas (proteínas fotosensibles), las características de ancho de banda y potencia del fotón necesarias para activarlas y su compatibilidad con la estructura celular de los sujetos de experimentación.
- Implementar una metodología para la inserción y selección específica de las neuronas de interés a estimular (virus, inserción genética, etc.).
- Desarrollar la interface y equipo necesario para la irradiación de los fotones en las regiones del cerebro de interés, de manera que esto sea lo menos invasivo posible para el sujeto de experimentación.
- Caracterizar la actividad eléctrica neuronal derivada de la irradiación de los fotones en las neuronas mediante electrofisiología y el procesamiento de señales.
- Observar el efecto de la producción de Oxitocina en el hipotálamo mediante la estimulación Optogenética en el cervix y determinar si es una alternativa para facilitar el paso de la leche Alveolar hacia la Cisternal.
- Divulgar los resultados obtenidos después del proceso y estudio de la presente investigación.

Descripción de la tesis

El ser humano y el bovino han tenido relación mutua como especie desde mucho tiempo atrás. Esta relación se ve reflejada desde el momento que el ser humano se adentró en el mundo de la ganadería. De ahí, que desde entonces y hasta la actualidad su importancia para el desarrollo y calidad de vida de las personas se ve directamente afectada por la sustentabilidad de esta especie. Es por eso, que es importante encontrar nuevas técnicas complementarias a los métodos convencionales de ganadería para mejorar la relación de los dos. La optogenética ofrece un conjunto de herramientas que ayudan a crear redes de estimulación a nivel neuronal con una efectividad como no se había visto antes, haciéndola una herramienta muy útil para entender patologías que antes no podían ser estudiadas y ayudar a tratamientos nuevos y efectivos. Y su utilidad va mas allá del simple tratamiento médico, ya que puede ser usada para el control directo sobre los sistemas que rigen a los mismos seres vivos. Apoyándose de lo anterior, ese trabajo busca una forma de complementar y ayudar a la producción de leche de los bovinos al controlar por medio de circuitos ópticos-neuronales la segregación de oxitocina en el organismo, resolviendo una problemática vista cada vez más en la actualidad: los peligros de la industrialización y las malas condiciones ambientales en los establos en los que habitan los bovinos.

Capítulo 1. Estado del arte en electrofisiología

Muchos son los procesos físicos y químicos que suceden dentro de un organismo vivo, y es que gracias a la constante realización de los mismo es que podemos definir la vida. Entre ellos, uno de los más estudiados son las propiedades eléctricas de las células. Al igual que nosotros empleamos el fenómeno electromagnético para definir todo nuestro sistema de comunicación, las células emplean potenciales eléctricos producto del fenómeno electroquímico que se lleva a cabo en su membrana para comunicarse unas entre otras.

1.1. Propiedades eléctricas de las neuronas

1.1.1. Potencial de membrana

El potencial de membrana se define como la diferencia de potencial eléctrico entre el lado interior y el lado exterior de la membrana de una célula. Éste es medido tomando como referencia el espacio extracelular en comparación con el espacio intracelular [4]–[6].

Dado que el espacio intracelular, así como el espacio extracelular está repleto de iones, el intercambio de estos, entre un espacio y el otro genera este efecto denominado potencial de membrana. Los iones más comunes encontrados en los seres humanos son: Ca, K, Na Cl [4], [7].

Es posible encontrar una relación directa entre la cantidad de iones que existen en equilibrio electroquímico y su potencial eléctrico a través de una membrana a la cual son permeables [4]. La ecuación de Nernst nos ofrece esta relación:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

Eq. 1.1

Donde X es el ion de interés. $[]_i$ indica la cantidad de iones sobre el espacio i , R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta medida en grados Kelvin, z es la valencia del ion y F es la constante de Fadaray. Dado que $R = 8.31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, $T =$

293.15 K a temperatura ambiente y $F = 96485.33289 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$, la ecuación puede ser reducida a:

$$E_X = \frac{(8.31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})(293.15 \text{ K})}{z(96485.33289 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1})} \ln(10) \cdot \log_{10} \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

$$E_X = \frac{0.0582}{z} \log \frac{[X]_2}{[X]_1} \text{ V} \sim \frac{58}{z} \log \frac{[X]_2}{[X]_1} \text{ mV}$$

Eq. 1.2

En la Tabla 1-1 es posible apreciar el potencial de membrana efecto de diferentes iones sobre células de un ser humano [4]:

Tabla 1-1. Concentración de iones y potencial de membrana en un ser humano

Ion	Extracelular	Intracelular	Em
Potasio	5 mM	100 mM	-80 mV
Sodio	145 mM	5 mM	+90 mV
Cloro	140 mM	10 mM	-70 mV
Calcio	2 mM	0.0002 mM	+123 mV

La limitante de esta ecuación se ve reflejada al existir más de un ion en el espacio intracelular y extracelular al cual la membrana es permeable. Para esto, existe una mejor aproximación, llamada la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz[4].

$$E_X = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Cl}[Cl]_2 + P_{Na}[Na]_2 + P_K[K]_2}{P_{Cl}[Cl]_1 + P_{Na}[Na]_1 + P_K[K]_1}$$

Eq. 1.3

Donde P_x es la permeabilidad de la membrana a un ion X . Esta expresión mide la contribución de cada uno de los iones al potencial de membrana sobre una superficie permeable.

El potencial únicamente es alcanzado cuando hay un equilibrio electroquímico entre el espacio intracelular y extracelular. Para poder alcanzar este equilibrio electroquímico en las membranas se encuentran un tipo especial de proteínas que permiten el flujo en una o ambas direcciones de ciertos tipos de iones (v. Figura 1-1).

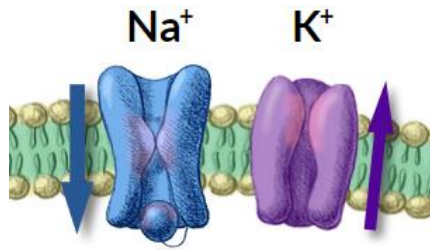


Figura 1-1. Canales de Sodio y Potasio sobre la membrana

La interacción entre el flujo de estas dos bombas o canales de iones mueve el potencial de membrana de un punto de reposo cambiando completamente la polaridad de este. A este cambio de niveles de potencial sobre la superficie de la membrana se le conoce como potencial de acción[4], [5].

1.1.1. Potencial de acción y sus etapas

Dependiendo de los valores de potencial, y de la misma interacción de las bombas de iones, el potencial de acción puede ser clasificado en 4 etapas importantes[4], [8] (v. Figura 1-2).

Reposo: esta etapa es definida como aquella donde el potencial de acción se encuentra en un punto de reposo, también conocido como potencial de membrana. Este punto es asociado también a que la membrana alcanza un equilibrio electroquímico tanto en el espacio intracelular como en el espacio extracelular.

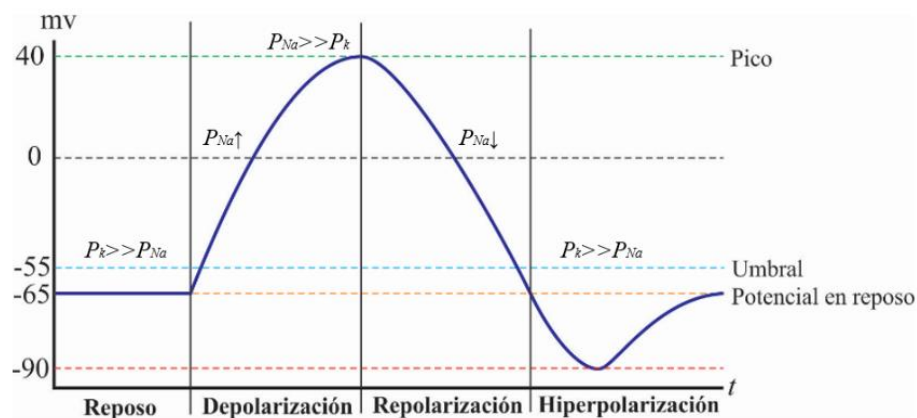


Figura 1-2 etapas del potencial de acción

Depolarización: la depolarización es alcanzada cuando, por estimulación eléctrica o bioquímica, las bombas de iones permiten el paso de iones (por lo general Na^+) haciendo el espacio de la membrana poco a poco más positivo con respecto al espacio extracelular. Esto se traduce en una rampa de crecimiento de potencial eléctrico, lo cual es el inicio del potencial de acción. Este efecto solo se alcanza cuando se supera un umbral eléctrico definido, por lo que es normal que aun cuando se estimule eléctricamente no siempre se alcance la depolarización. El efecto de depolarización también hace que los espacios aledaños al área de generación del potencial incrementen su valor, por lo que poco a poco canales de Na^+ adyacentes se van incrementado permitiendo el viaje del potencial por la membrana[4], [8].

Repolarización: la introducción de iones positivos de Na^+ al espacio intracelular hace que en un punto la cantidad de estos equipare e incluso supere a los iones de K^+ . Llegado este punto, la membrana a manera de compensación empieza a liberar iones de potasio K^+ (o introducción de Cl^-). Este flujo que suele ser mayor al de Na^+ se traduce en una decaída del potencial con respecto a la fase de depolarización con una pendiente incluso mayor.

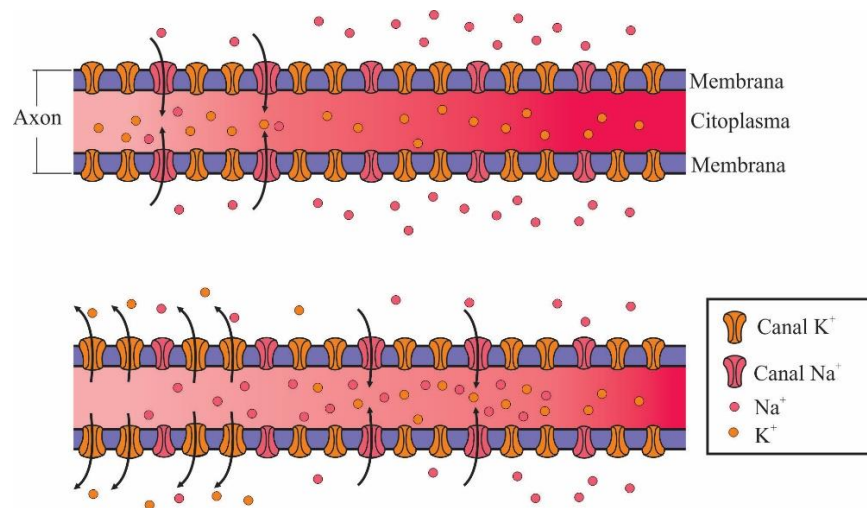


Figura 1-3 canales de iones sobre el cuerpo de la neurona

Hiperpolarización: el efecto de la expulsión de iones de potasio llega a un punto que el potencial alcanza valores negativos que sobrepasan los valores de potencial en reposo, que después de un tiempo logran ser estabilizado por un intercambio entre las bombas de iones para lograr estabilizar el equilibrio electroquímico de los iones tanto en el espacio interior como exterior a la membrana (v. Figura 1-3). Este efecto es también utilizado por la neurona (y célula en general) para evitar que algún tipo de estimulación eléctrica sobrepase el

potencial de umbral, evitando depolarizaciones erróneas y a su vez evitar la generación del potencial de acción por un tiempo definido.

1.2. Resistencia y Capacitancia

Internamente, el largo del cuerpo de la neurona junto con la membrana se forma un efecto característico sobre la señal medida producto de una resistencia eléctrica y capacitancia. Lo anterior sucede gracias al efecto de dieléctrico que tiene la membrana celular sobre el potencial de membrana y la resistencia al flujo de iones libres debido a las bombas de iones localizadas a su vez en la membrana[4], [5], [8]. Estos dos efectos se ven reflejados directamente sobre la forma de onda de la señal eléctrica y sobre los valores de decaída de la señal conforme se distribuyen a lo largo del cuerpo de la neurona. Un circuito equivalente puede ser supuesto a partir de este comportamiento (v. Figura 1-4).

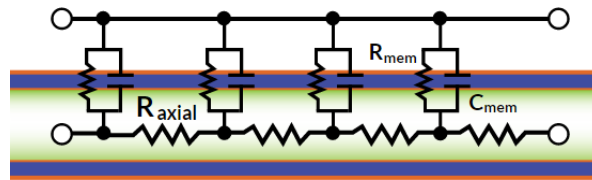


Figura 1-4 Axón y un modelo eléctrico equivalente

1.2.1. Mielina y sus efectos en las propiedades eléctricas

Para compensar el deterioro de la señal efecto de la red formada sobre la superficie de la membrana, existe un mecanismo natural que sirve para incrementar la resistencia eléctrica formada en la membrana celular. Lo anterior es llevado a cabo gracias a la mielina, una capa de lípido elaborada por los oligodendrocitos. La mielina recubre al cuerpo de la neurona en regiones no continuas[4], [8].

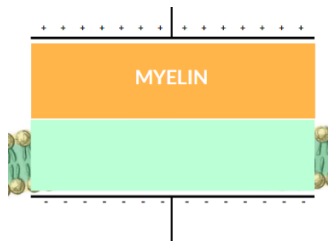


Figura 1-5 Mielina y su modelo eléctrico

Este recubrimiento disminuye la capacitancia formada por la membrana y aumenta la resistencia. Lo anterior se traduce de un incremento de la velocidad de viaje de la señal. Para evitar decaídas de la señal y mejorar el estímulo, la mielina deja espacios abiertos sobre la superficie de la neurona conocidos como nodo de Ranvier[4], [8]. En este espacio es donde las bombas de iones son vueltas a estimular eléctrica y químicamente y perpetúan la señal por todo el cuerpo de la neurona hasta que es transmitido a otra neurona.

1.3. La sinapsis, conexiones sinápticas y circuitos neuronales

1.3.1. La sinapsis

La sinapsis es la región donde dos neuronas sufren una conexión eléctrica y/o química y por la cual un potencial de acción es propagado de una neurona a otra neurona[4], [8].

Existen dos tipos de conexiones sinápticas:

- *Conexión eléctrica*: los canales iónicos de una neurona están conectados directamente con la otra, permitiendo el paso del potencial directamente.
- *Conexión química*: existe un espacio de separación entre las dos neuronas, la propagación es realizada por medio de la liberación de neurotransmisores que viajan de un lado de la sinapsis a otra.

Las diferentes formas de interacción sináptica entre dos o más neuronas definen en general su función, que puede ser meramente de transmisión de información, procesamiento o integración entre diferentes sistemas del organismo (muscular, endocrino, nervioso, etc, v. Figura 1-6)[8].

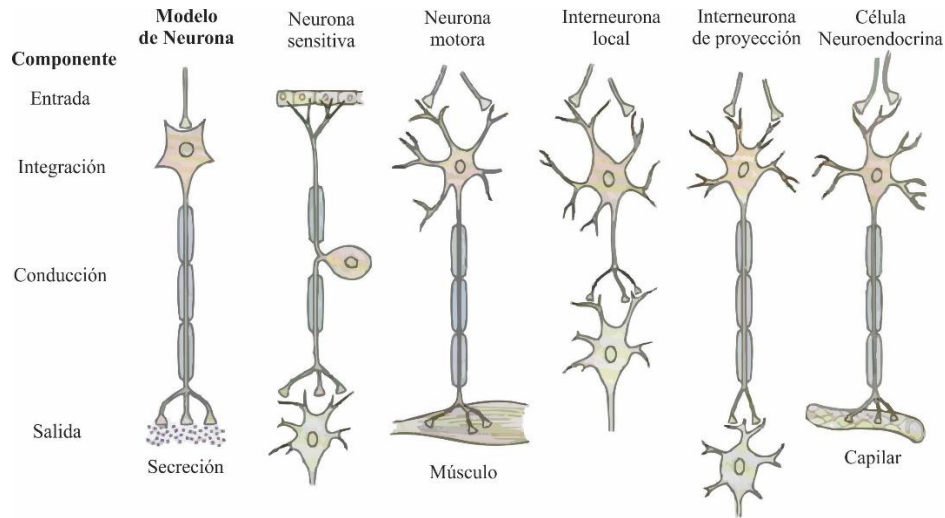


Figura 1-6 Modelo básico de neurona y sus diversas variantes

1.4. Introducción a electrofisiología

La electrofisiología es un área de la ciencia la cual, concretamente, se encarga del estudio de las propiedades eléctricas de las células [5]. En general, las propiedades eléctricas medibles son el voltaje o potencial eléctrico y el flujo de corriente en las células [5], [6], [9].

Existe una gran cantidad de metodologías de medición de estas propiedades, donde cada una es dependiente del tipo de tejido o célula que se esté estudiando y las condiciones en la que se encuentren. En esta investigación se trata de estudiar y caracterizar las propiedades eléctricas a partir de una muestra de tejido, por lo que una metodología óptima para esto es el Patch Clamp.

El Patch Clamp es una técnica por la cual se mide el potencial eléctrico o corriente eléctrica sobre un tejido o célula por medio de un electrodo acoplado a una pipeta[5], [6], [10], [11]. Aquí, se trata de estudiar las propiedades eléctricas o cambios en los iones del medio extracelular sin afectar la estabilidad de la membrana, por lo que el electrodo nunca entra en contacto directo con el tejido o célula estudiada. Para lograr este ambiente, una pipeta es acoplada al electrodo y conectar de manera directa el espacio extracelular de la membrana directamente con el electrodo, como se muestra en la Figura 1-7 [5], [6].

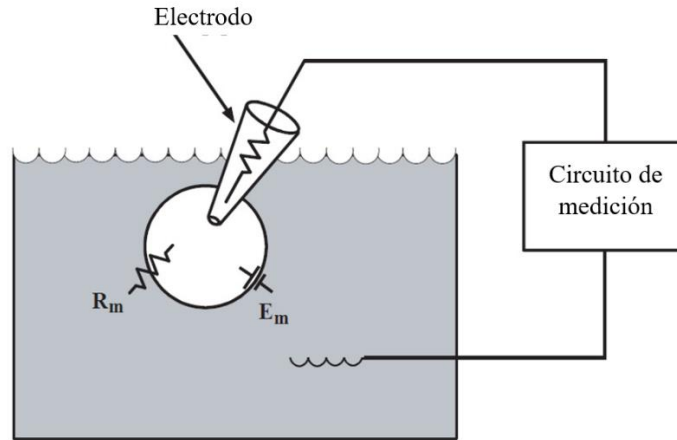


Figura 1-7 Modelo ideal de Patch Clamp

A partir de la variable que desea ser estudiada, existen varios circuitos eléctricos y metodologías en que deben de ser empleadas. En general, Patch Clamp puede medir el potencial o la corriente al usar una de dos configuraciones: Voltage Clamp y Current Clamp[6], [9], [11].

1.4.1. Current Clamp

Este es el método tradicional de medición, también conocido como “seguidor de voltaje”. La esencia de este método es conectar el electrodo con el equipo de instrumentación por medio de un amplificador de ganancia unitaria (v. Figura 1-8). Al estar solamente midiéndose el voltaje, o ser en si el voltaje la única variable que se permite estudiar, se dice que se “ancla” o se realiza un “anclaje” sobre la corriente.

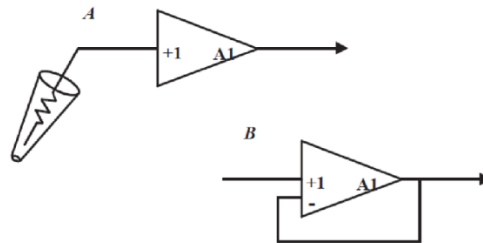


Figura 1-8 Modelo ideal de un electrodo unido a un seguidor de voltaje

Este mismo circuito puede ser modificado (v. Figura 1-9) para general una señal eléctrica o flujo eléctrico entrante que puede viajar por el mismo electrodo hacia el espacio extracelular[5], [6].

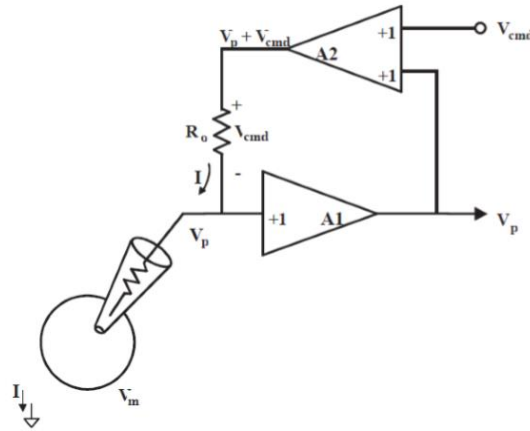


Figura 1-9 Current Clamp con estimulación

Esta variante es útil cuando se pretende realizar una estimulación directa sobre el tejido o célula para generar un estado de depolarización o hiperpolarización celular, o hacer una medición de la resistencia generada entre la punta de la pipeta y la membrana celular (generación de un Giga Sello)[5], [6], [11], [12].

1.4.2. Voltage Clamp

La técnica de voltage clamp es un complemento al current clamp. En este caso, el potencial no es de interés como variable a medir, por lo que se supone “fijo” o “anclado”, mientras que la corriente es ahora la variable de interés a medir[6], [9]. En sí, realmente no importa mucho la corriente en estos casos, si no la verdadera importancia es la conductancia que presenta la membrana, ya que la conductancia está directamente relacionada a la capacidad de las bombas por sobre la membrana de mover iones a través del espacio intra y extracelular[4], [6], [8].

La mayoría de los circuitos presentan una gran complejidad debido a varios problemas al momento de medir los cambios de corriente / conductancia de los canales por separado, entre ellos los efectos integrativos-derivativos del amplificador, lenta respuesta del amplificador, sensibilidad del ruido por los rangos de valores medidos (pico Ampere) entre otros[6].

Capítulo 2. Estado del arte en optogenética

El estudio de la neurociencia siempre ha presentado el reto del control y la estimulación no invasiva, *i.e.* lograr una estimulación en una red de neuronas sin afectar a las neuronas adyacentes a esta. Desde hace mucho tiempo, la estimulación eléctrica era una buena alternativa para corregir ciertas patologías, pero requería un gran cuidado y desafortunadamente el riesgo a efectos secundarios es muy grande. Es aquí donde la optogenética encuentra su fuerte. Un conjunto de metodologías capaces de estimular a neuronas con una gran capacidad de certeza y selección de las mismas.

2.1. Antecedentes en la optogenética

Cerca del año 1979, Francis Crick sugiere que uno de los mayores retos de la neurociencia es el control individual de las células encargadas de la actividad cerebral sin dañar o alterar el comportamiento de otras [7], [13], [14]. Para ese entonces, los métodos convencionales para el tratamiento de padecimientos neuronales eran el uso de electrodos, los cuales no solo estimulaban las neuronas o regiones del cerebro de interés, sino que también podían alterar diferentes regiones del cerebro teniendo más repercusiones que ventajas[13].

Aunado a su iniciativa, Francis Crick sugiere el empleo de la luz como un medio de control individual, pero desafortunadamente la tecnología para ese entonces no permitía poder comprobar este tipo de hipótesis.

La década de los 70's fue de gran importancia para esta rama de la ciencia. En 1971 Stoeckenius y Oesterhelt descubrieron en investigaciones que las Bacteriarodopsinas (un tipo de proteína encontrada en el dominio de las bacterias) funcionan como bombas de iones que pueden ser rápidamente activadas por luz visible [7], [13]. Así mismo, en 1977 Matsuno-Yagi y Mukohata descubren el mismo comportamiento en las Halarodopsinas (encontrada principalmente en el dominio de archaea) [13]. Más actualmente, en el 2002 Hegemann y Nagel descubren las Canalrodopsinas (del dominio de Eukarya) [7], [13].

Con estos descubrimientos, empieza lo que será una cadena de descubrimientos e iniciativas que terminaran en el control de la actividad celular mediante los pulsos de luz.

2.2. Opsinas y sus efectos a la interacción de un fotón

El principio de la Optogenética es el empleo de fotones para la manipulación y control de la actividad celular en los organismos vivos, al crear potenciales de membrana a partir de la estimulación óptica[7], [13], [14].

Existen diversos tipos de proteínas las cuales presentan comportamientos singulares al momento de ser irradiadas por fotones de luz. Este tipo de proteínas son conocidas como rodopsinas, las cuales funcionan como transductores de luz orgánicos [7]. Se pueden encontrar en diferentes sitios de la naturaleza, tanto en organismos bacteriológicos (con el cual controlar su actividad celular) como en los animales (empleadas en la retina).

2.2.1. Fotoisomerización de las proteínas

Las rodopsinas están compuestas por una opsina y parte proteica relativa a la vitamina A (*all-trans*), la opsina es la encargada de responder a ciertas longitudes de onda y servir como una bomba natural de iones, mientras que la parte proteica relativo a la vitamina A se encarga de absorber el protón [7], [13]–[16].

La parte opsina es, por lo tanto, la que diferencia entre los diferentes tipos de proteínas que reaccionan a la luz, haciéndose notar ya sea por el ancho de banda al que responder o si hiperpolarizar o depolarizan la célula anfitriona. Debido a la aplicación, se catalogan al lugar donde son encontradas[16].

Tipo I:

Encontradas principalmente en el dominio de las bacterias y archaeas. Tienen la propiedad de pasar de la configuración *all-trans* hacia *13-cis* después de la absorción del fotón, lo que termina en el efecto de bombear iones dentro de la célula de hospedaje (v. Figura 2-1). Este proceso es realizado de manera muy rápida, por lo que son eficaces al momento de querer manipular la actividad neuronal mediante la luz[16].

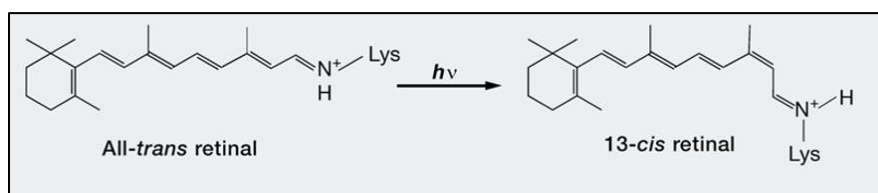


Figura 2-1 Opsinas Tipo I fotoisomerización

Tipo II:

Utilizadas principalmente por los seres vivos en el dominio de eukarya³. Son responsables especialmente de la visión de estos organismos. Al momento de absorber un fotón, pasan de la configuración *11-cis* hacia *all-trans* sirviendo como un receptor de acoplamiento de proteína G (GPCR's) (v. Figura 2-2). A diferencia del tipo I, este proceso no es reversible y es necesario el empleo de una nueva proteína en configuración *11-cis* para continuar con la actividad.

Lo anterior, y debido a que el tiempo del proceso de absorción-isomerización es más lento que el tipo I, son unas de las razones por la cuales son más empleadas las opsinas del tipo I. Aun así, existen variantes creadas sintéticamente a partir de este tipo que han sido empleadas para el control de la actividad neuronal satisfactoriamente [16].

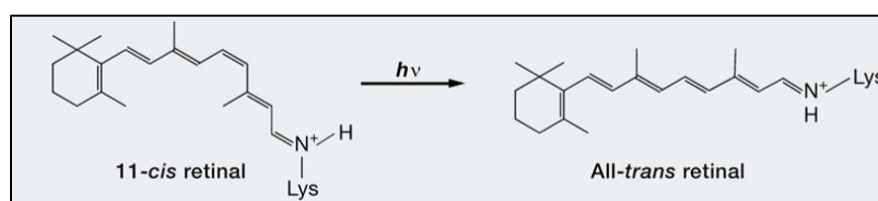


Figura 2-2 Opsinas Tipo II fotoisomerización

2.2.1. Clasificación de las opsinas

Como se menciona con anterioridad, las rodopsinas están compuestas por una parte opsina encargada de procesar el fotón y servir como bomba natural de iones, y a su vez por una parte proteica relativa a la vitamina A (retinal), que se encarga de la absorción de la luz.

³ Eukarya o Eukaryota es el dominio de los organismos celulares con núcleo verdadero.

En un principio, en los primeros años de empleo de la optogenética, se caracterizaban 3 opsinas, que eran encontradas en la naturaleza:

- *Canalrodopsinas ChR2*: este tipo de opsina es encontrada en *Chlamydomonas reinhardtii*, un tipo de alga unicelular encontrada en suelos y cuerpos de agua dulce a través del mundo. Este tipo de opsina es sensible al espectro azul, 470 nm [7], [16]–[22].
- *Canalrodopsinas VChR1*: esta opsina se encuentra en un alga, muy similar a *Chlamydomonas*, que consiste en un cuerpo de cientos de células que viven en una colonia globular, conocidos como *Volvox carteri*. Son encontradas en estanques, lagos y cuerpos acuáticos en general. Esta opsina es sensible a dos espectros de luz, verde de 535 nm y amarillo de 589 nm [7], [18]–[20].
- *Halarodopsina NpHR*: es encontrada en *Natronomonas pharaonis*, esta arqueobacteria vive en lugares con grandes concentraciones de sal, tales como los lagos salinos en Egipto y Gineá. Es sensible especialmente al espectro de luz amarillo, 589 nm [7], [18]–[20].

2.3. Caracterización de las opsinas

Mientras que la ChR2 y la vChR2 son usadas para la hiperpolarización de la célula, la NpHR es empleada para la depolarización de la célula [18]. A partir de estas tres opsinas a lo largo del tiempo se han encontrado diferentes variantes o mutaciones, con la finalidad de extender el espectro al cual son sensibles, combinar sus atributos o cambiar sus propias características de funcionalidad.

En general, es posible encontrar dos parámetros primordiales al momento de hacer una selección de opsina: el **tiempo límite de cinética** y el **espectro de sensibilidad**. Estos parámetros son encontrados a partir de la experimentación en laboratorio, aunque hay ciertos trabajos que tratan de encontrar un fundamento de los mismos [14], [18], [19], [23].

El espectro de respuesta es el espectro de la luz al cual es sensible cada opsina, este varía de una con respecto a otra y, aunque se trata de ver como un único espectro sensible es

en realidad un rango de espectro sensible, siendo el máximo el valor con el cual es caracterizada la opsina [7][13].

El tiempo límite de cinética es aquel que corresponde al tiempo total que la cinética dentro de la opsina permite el paso de iones a través de la estructura proteica de la opsina, o la **cinética del cierre del canal**. Al ser un factor dependiente de la fotoisomerización de la molécula, este también depende de la temperatura del medio en el cual se encuentra.

La Figura 2-3 muestra un panorama general del estado del arte en opsinas disponibles en el mercado, enfrentando la longitud de onda con el tiempo límite de cinética [15], [16], [18], [21], [22], [24]:

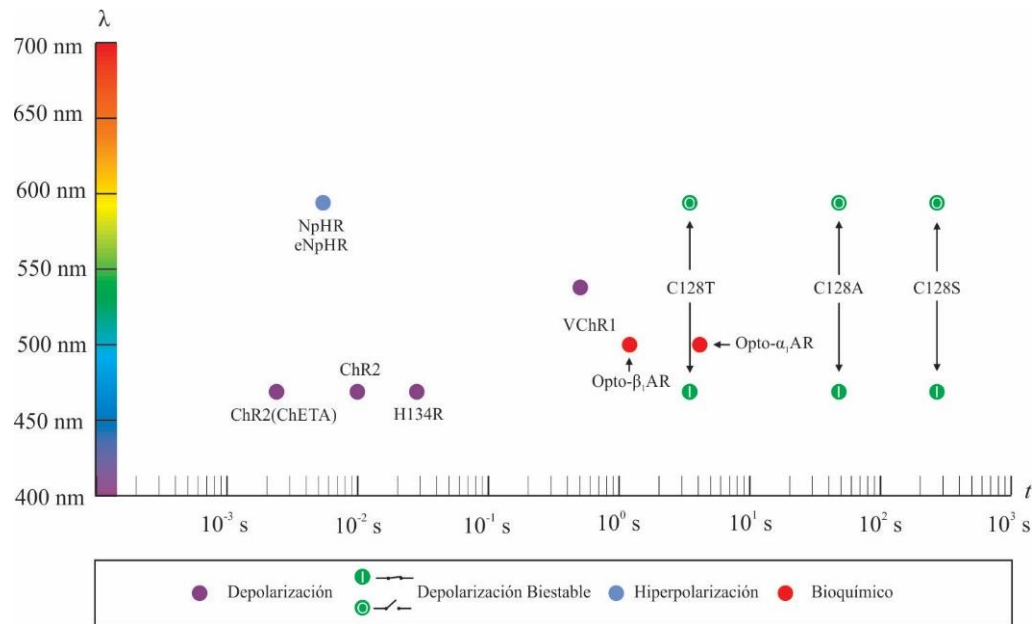


Figura 2-3 Ejemplos de opsinas y su espectro de respuesta

Al momento de ser irradiados por el fotón de luz, las proteínas actúan como bombas de iones en el citoplasma de las células, permitiendo lo que se conoce como proceso de hiperpolarización / depolarización celular. Así, es controlado (activado o desactivado) por lo tanto el proceso de actividad celular que a su vez sirve para manipular la actividad biológica de los organismos[7], [13], [14].

2.4. Metodologías de inserción

Existen una gran cantidad de metodologías de inserción de material genético. En general, cualquier metodología de inserción de material genético puede ser empleado para la inserción del ADN para generar las opsinas. Entre ellas, tenemos[7], [15], [18], [19], [25]–[30]:

Tabla 2-1 Tipos de transfección genética

Tipos de transfección			
Química	Física	Viral	Óptica
Ca+2- fosfato	Microinyección	Adeno-Asociados	Laserfección
Lipofección	Biobalística	Adenovirus	Optinyección
		Lentivirus	
		Virus de Herpes Simple	

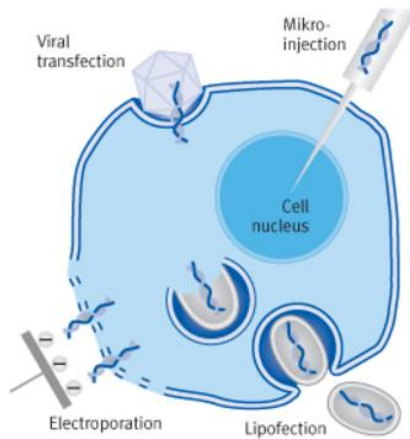


Figura 2-4 Tipos de transfección genética

En general, para las metodologías optogenéticas es más empleada la transfección viral, siendo uno de los virus más usados los Adeno Asociados[7], [13], [27], [31]. La ventaja que ofrecen las metodologías virales es que se puede tener acceso a áreas específicas de interés sobre el sujeto estudiado *in vivo*. Virus tales como combinaciones de Adeno Asociados con Chr2 ofrecen un tiempo de incubación-sintetización de aproximadamente 3 semanas[7].

Otras aproximaciones realizadas con transfección viral permiten la inserción del virus en etapas tempranas como en el estado embrionario[14], [19], [32] para el estudio de las neuronas en etapas tempranas, la creación de células tandem el estudio de celular disgregadas.

2.5. Generación de Luz:

El fotón es conocido como la principal partícula responsable del fenómeno electromagnético. Tiene masa invariante cero y viaja a la velocidad de c en el vacío. Se comporta como una onda o como una partícula, dejando mostrar únicamente su posición o su momento lineal según el observador. Viaja a través del espacio a una determinada frecuencia o longitud de onda λ (medida por lo general en nm). El fenómeno por el cual es creado el fotón es debido a la manifestación de energía, efecto del movimiento de los electrones de las últimas capas de los átomos al momento de recibir una excitación externa (ya sea trasladándose a una subcapa del mismo átomo o a otro átomo). No tiene polaridad y al momento de interactuar con materia viene dado un fenómeno de liberación y transferencia de energía definido por [33]:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

Eq. 2.1

donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz y λ la longitud de onda.

Es también conocida, desde el punto de vista de la aplicación, como la partícula responsable de la activación / desactivación de las proteínas fotosensibles. Existen muchos dispositivos capaces de generar satisfactoriamente esta partícula y proyectarla hacia la opsina. Difieren principalmente en las longitudes de onda alcanzadas, potencia y ángulo de emisión de luz. Entre ellos se encuentran:

Láser: son una opción muy prometedora para su uso en optogenética, con un ancho de banda muy estrecho (típicamente $<1\text{nm}$). Tienen poca divergencia, por lo que pueden ser dirigidos con facilidad y exactitud sobre los elementos deseados, especialmente fibras ópticas [14].

Led: los leds son una alternativa eficiente y de bajo costo para su uso en optogenética. Tienen definidos ya los anchos de banda en los cuales operan, pero a diferencia de los laser existe una gran divergencia en la proyección de la luz. Son útiles en las aplicaciones *in vitro* donde son empleados leds microscópicos o redes de leds, pero deficientes al momento de trasladar el experimento *in vivo*, debido a su baja eficiencia en el ambiente de la fibra óptica [14].

Fuentes incandescentes: son otra alternativa para la generación de fotones en el ambiente de la optogenética. A diferencia de los laser y los leds, los cuales operan a determinados anchos de banda, las fuentes incandescentes tienen la flexibilidad de operar al ancho de banda deseado. Desafortunadamente, no cuentan con la capacidad de control de intensidad que ofrecen los laser y los leds, así como una gran divergencia en la proyección del fotón [14].

La experimentación *in vitro* no necesita un medio para transmitir la luz. Esta es proyectada directamente sobre el lugar de interés, muchas veces controlado el entorno por un microscopio. Cuando el experimento cambia al estado *in vivo*, es necesario el empleo de medios de transmisión del fotón por el organismo. Cuando el área de interés se encuentra sobre la corteza cerebral, es posible emplear microleds que pueden ser montados sobre ésta. Si el área de interés se encuentra en una capa más profunda, es necesario el empleo de pequeña fibra óptica (haciendo laser el medio más óptimo para la generación de fotón) [14], [19].

Dependiendo de la especie del sujeto, es necesario el empleo de diferentes diámetros en la fibra óptica. Usualmente, se ha encontrado que los ratones soportan alrededor de 300 μm de fibra (fibra suelta, sin plástico), mientras que las ratas soportan hasta 400 μm . A su vez, es necesario el uso de cánulas que funcionen como guía a la fibra óptica una vez insertadas en la corteza cerebral. Éstas pueden tener una parte de fibra óptica ya insertada de manera permanente para evitar lesiones tanto del sujeto como del dispositivo empleado [19].

Capítulo 3. La producción de leche en bovinos, un enfoque endocrino y neurológico.

La producción de leche en un mamífero es un proceso muy complejo. Varios sistemas de organismo de los mamíferos interactúan en este fenómeno, que recurre ser un proceso natural y parte del ciclo de vida de todos los mamíferos. Desde un punto de vista endocrino, muchas hormonas intervienen en el proceso de producción de leche, cada una tiene una función muy peculiar, desde la transformación de sangre a leche hasta la relajación del propio individuo. Es aquí donde una hormona muy particular entra en juego, la oxitocina, y es en relación al estudio de los efectos y el control de la misma a la cual gira la hipótesis de este trabajo.

3.1. Orígenes de la oxitocina

La Oxitocina, también conocida como “molécula del amor”, “hormona del placer”, es una hormona a la cual se le relacionan los patrones de conducta social, sexual, así como la conducta paternal y maternal. Esta característica hormona es posible encontrarla en casi todos los mamíferos vertebrados actuando de manera similar en cada uno de ellos[34]–[36].

3.1.1. El hipotálamo y la hipófisis

Específicamente en las vacas, es producida a partir de células neurosecretoras magnocelulares en los núcleos (agrupamiento de neuronas) supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Es transportada entonces mediante una proteína transportadora (*neurophisine*) por el sistema hipotálamo neuro hipófiseal (*hypothalamo-neurohypophyseal*) hacia el hipotálamo para su posterior liberación en la sangre (v. Figura 3-1) [37].

Así mismo, la liberación de la Oxitocina por parte de los respectivos núcleos es llevada a cabo al momento de que diferentes neuroreceptores (distribuidos a lo largo del cuerpo del animal) reciben una determinada estimulación. Tales estimulaciones pueden ser el masajeo de la ubre, el sonido de una cría pidiendo alimento, un entorno favorable para su

movimiento, etc. No es un evento aislado, y es necesaria la interacción de varios neuroreceptores de ellos para la correcta segregación de hormona[2].

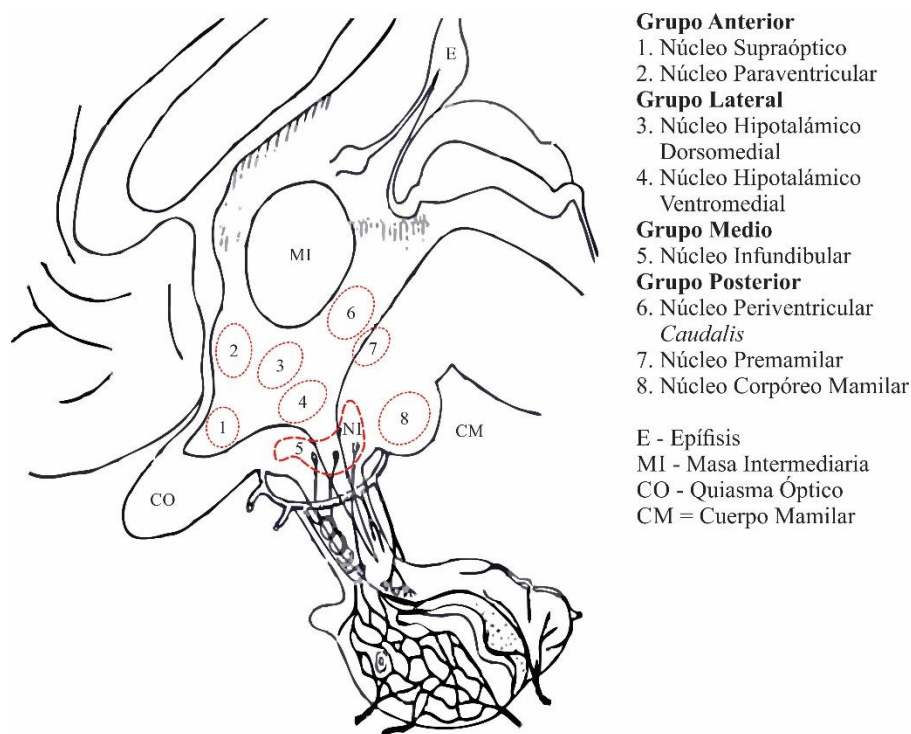


Figura 3-1 Hipotálamo en Vaca

Una vez llevada a cabo la liberación de Oxitocina por parte de la hipófisis en el torrente sanguíneo, esta es transportada por todo el cuerpo[37]. Son diferentes los empleos que el cuerpo le da a esta hormona, pero característico, y más importante debido a la aplicación, es aquel el que le dan las células mioepiteliales partes de las glándulas mamarias.

3.2. Glándulas mamarias

Desde el punto de vista del bovino, pero genérico para cualquier mamífero, las glándulas mamarias son aquel sistema exocrino que se encarga específicamente de la producción de leche[1], [2]. En general pueden ser divididas de manera física en dos partes: el pezón y la ubre. Cada bovino cuenta con 4 glándulas mamarias independientes, que son capaces de la producción y el drenado de la leche por el organismo de manera individual.

3.2.1. El alveolo secretor y células mioepiteliales

La función exocrina está relacionada directamente con la ubre del bovino, la cual se encarga de la producción de la leche[2]. Dentro de la ubre, existe un conjunto de células especializadas distribuidas sobre los alveolos, las cuales son el origen de la leche. Las funciones de los alveolos en general son:

- Recepción de los nutrientes de la sangre.
- Sintetización de los nutrientes de la sangre en leche.
- Transporte de la leche hacia la cisterna de la leche.

Las células mioepiteliales son unas células del tipo epiteliales que se encuentran rodeando a los lóbulos de los alveolos en la glándula mamaria (v. Figura 3-2). Tienen específicamente la función de contraerse al momento de la interacción con Oxitocina (de la misma manera que un músculo), para que una vez que la leche es segregada a partir de las células alveolares, ésta misma sea transportada hacia el depósito denominado cisterna (evento también llamado “bajada de la leche”)[2].

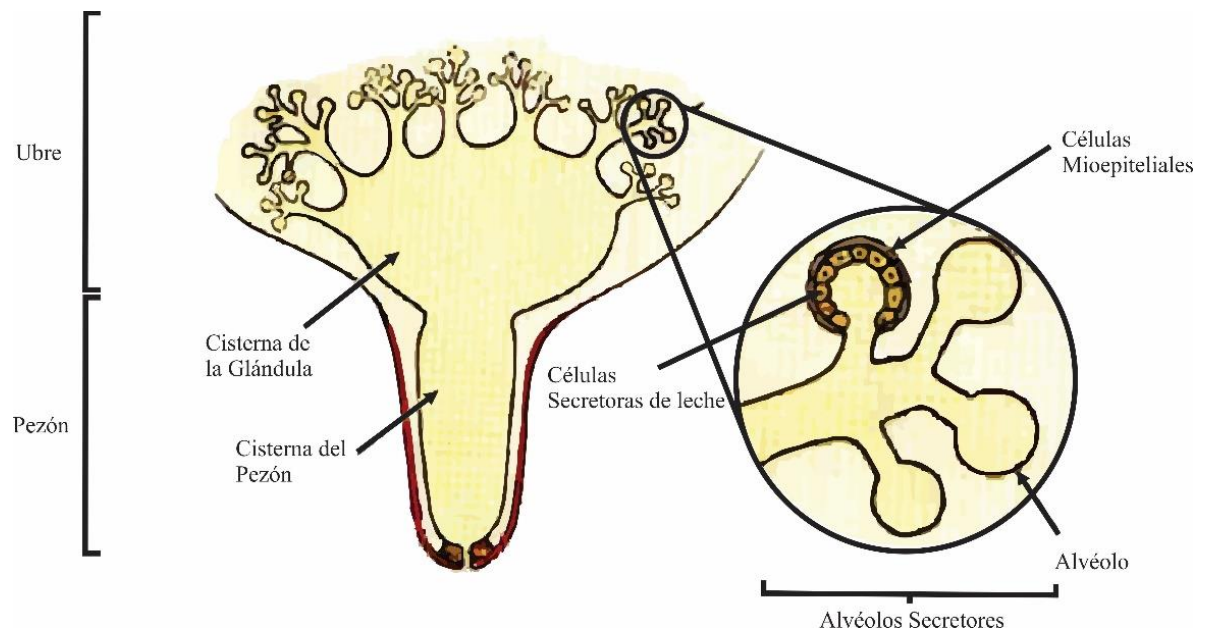


Figura 3-2 Glándula mamaria bovina

Por lo tanto, se tiene que el fenómeno de “bajada de la leche” a pesar de ser un conjunto de procesos biológicos dentro del animal, tienen orígenes neurológicos[2], [37]. El

estudio de la actividad cerebral y la estimulación no invasiva ha dado origen a diferentes metodologías, entre ellas la optogenética.

3.3. El miometrio

Una manera de estimular la producción de oxitocina sin afectar el sistema endocrino por medio de sustancias ajenas al organismo es por medio de la estimulación indirecta sobre terminales nerviosas directamente conectadas al hipotálamo [37].

Muchos puntos sobre el cuerpo del ser vivo tienen una conexión directa sobre el hipotálamo, pero existe un punto en especial en la que la conexión es tan fuerte que la respuesta del hipotálamo a la estimulación sobre esta área es directa e instantánea, y es el miometrio[38], [39].

El miometrio es una capa intermedia dentro del cuello uterino o cérvix formada por músculo liso, el cual está constituido principalmente por miocitos o fibra muscular. Se le atribuye principalmente el movimiento uterino durante las contracciones. Al contener miocitos (tejido muscular conectado a neuronas), es posible caracterizar sobre ellos potenciales de membrana y potenciales de acción[40], [41].

Este fenómeno de “arco reflejo” es un fenómeno ya caracterizado y muy estudiado en medicina, recibiendo el nombre reflejo de Ferguson[38].

3.4. El reflejo de Ferguson

Este es un fenómeno, caracterizado principalmente al momento del parto, el cual al estirarse los músculos del cuello uterino se manda una señal directa (arco regflejo) al hipotálamo, produciendo la liberación de oxitocina[35], [38]. Ésta hace que los músculos alrededor del útero se estiren, lo cual repite el arco reflejo y consecuentemente la liberación de oxitocina. Es un proceso de retroalimentación positiva y permite la dilatación del útero para permitir al bebe salir del útero[35], [38].

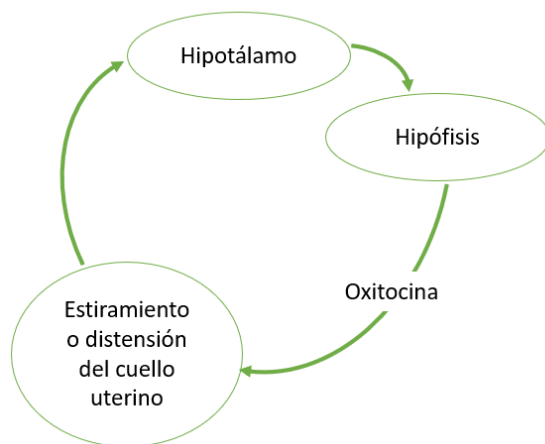


Figura 3-3 Fases del reflejo de Ferguson

Capítulo 4. Diseño de equipo electrofisiológico y optogenético

La electrofisiología de una neurona puede ser desarrollada por medio de varias aproximaciones. Básicamente se puede hacer la electrofisiología de manera directa sobre la célula o sobre el tejido del cual pertenece la célula. Los estudios y experimentación en este trabajo fueron desarrollados en base a una biopsia de tejido de miometrio, al cual se le introdujo de manera viral la opsina para su control meramente óptico.

Al hablar de un tejido, es entonces necesario diseñar todo un sistema de electrofisiología pensado en muestrear señales eléctricas de un tejido. Es así, como el diseño e implementación de algoritmos fue desarrollado para poder optimizar el muestreo de este tipo de señales, con la ventaja de ser aplicado a no solo tejido del miometrio si no a cualquier tipo de tejido el cual se desee caracterizar eléctricamente.

4.1. Cámara de grabación

La cámara de grabación es una de las partes esenciales del equipo de electrofisiología. La cámara es el área en la cual se coloca el tejido de estudio y, mediante técnicas de perfusión, se mantiene vivo a la vez que con el empleo de diferentes tipos de electrodos las señales eléctricas son muestreadas (v. Figura 4-1).



Figura 4-1 Cámara de grabación

El equipo de electrofisiología desarrollado para esta tesis cuenta con una cámara comercial desarrollada por la compañía Warner Instruments, con número de parte RC-22.

La cámara solo sujeta al tejido, por lo que es necesaria poder acoplarla a otras plataformas para poder ser montada sobre el microscopio. Este acoplamiento permite estudiar de manera visual, eléctrica y óptica el tejido mediante el empleo de los diferentes electrodos y estimuladores ópticos. Un esquema básico del acoplamiento de la cámara con el resto de la plataforma y adaptadores puede ser encontrado en la Figura 4-2, el resto de los elementos son explicados a continuación.

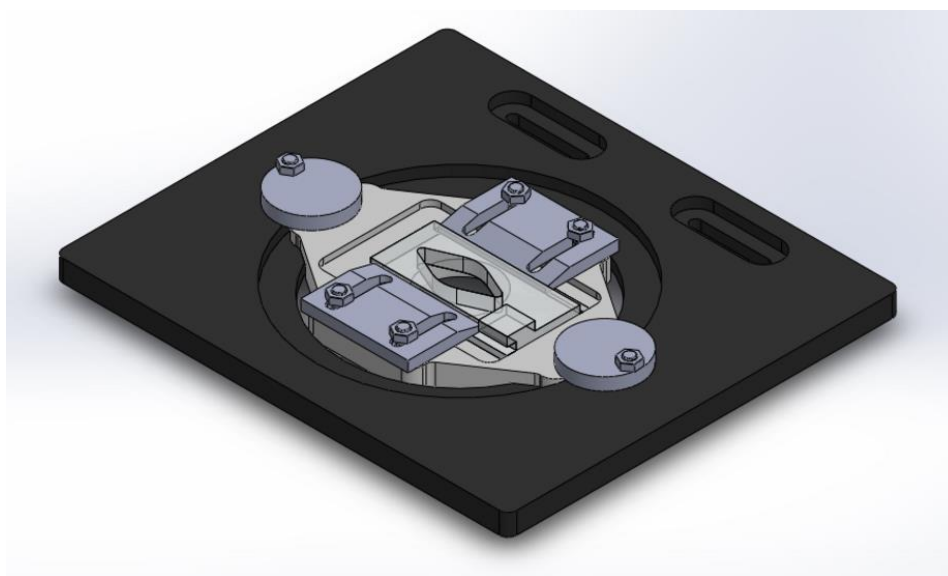


Figura 4-2 Ejemplo de ensamble de cámara de grabación con adaptadores

4.1.1. Diseño y construcción de la plataforma de grabación

Las plataformas de grabación, elementos de acoplamiento entre la cámara de grabación y el microscopio de estudio fueron desarrolladas por medio de software de diseño 3D. Su diseño está basado en otras plataformas comerciales para facilitar su acoplamiento con la cámara RC-22 de Warner Instruments.

Primeramente, una plataforma de ajustamiento y anclaje para la cámara de grabación fue desarrollada, esta consiste en tres partes móviles que son ajustadas entre sí con la ayuda de tornillería. Su objetivo principal es evitar el movimiento de la cámara de grabación y sujetar la cámara junto con el cubreobjetos.

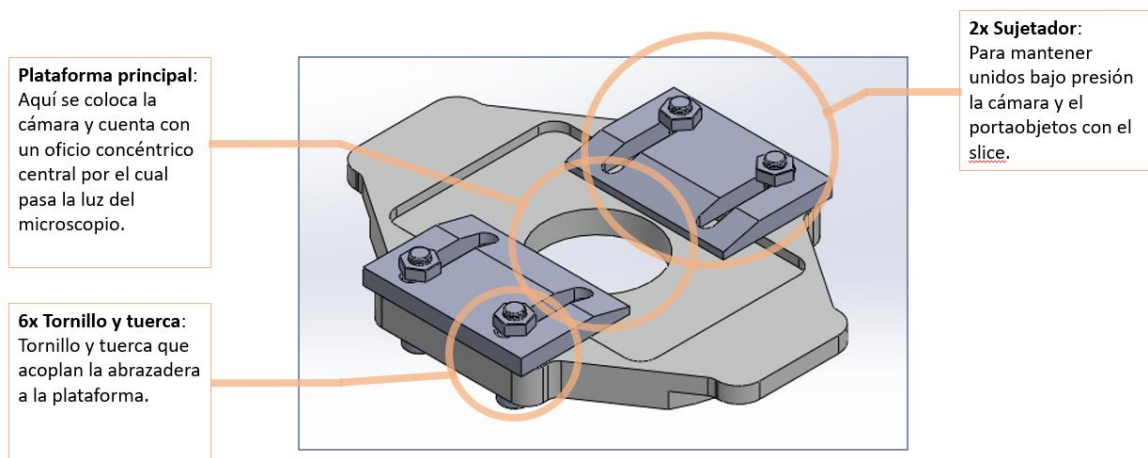


Figura 4-3 Partes de la plataforma

El adaptador de plataforma forma también parte de los instrumentos mecánico de acoplamiento. Su función principal es el servir como base de montaje del adaptador de plataforma hacia el microscopio de estudio. Muchas variantes pueden realizarse a partir del microscopio empleado, pero el diseño fue ajustado al microscopio MICRO empleando en este estudio.

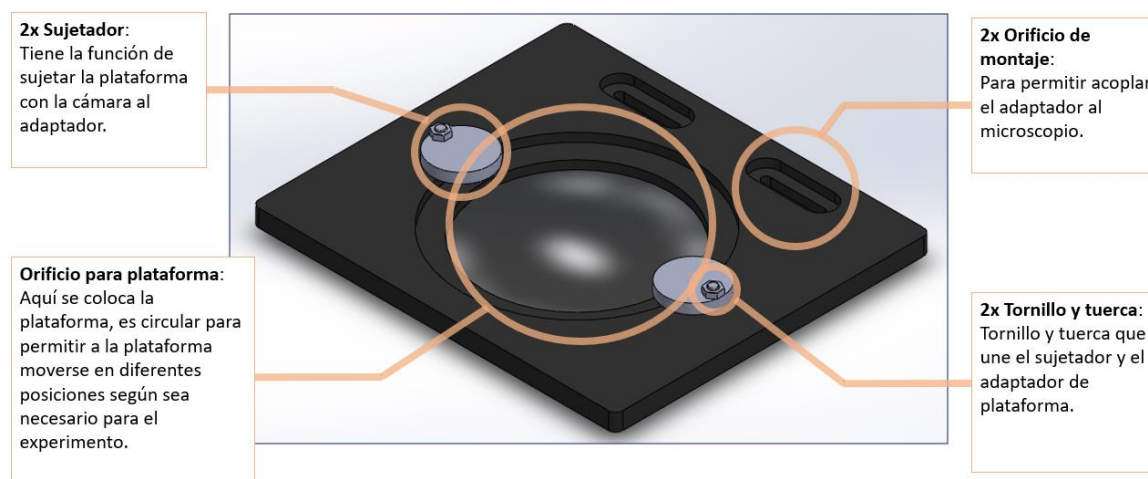


Figura 4-4 Partes del adaptador de plataforma

Ambos elementos, tanto el adaptador de plataforma como la plataforma de ajuste para la cámara fueron elaborados por medio de una impresora 3D de material PLA.

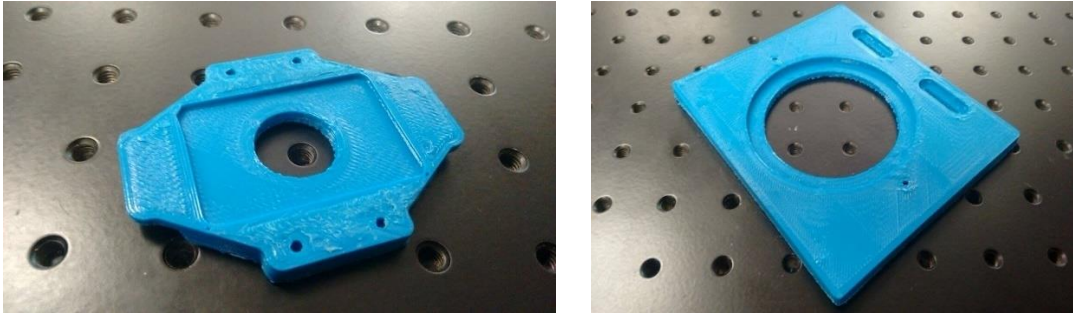


Figura 4-5 Impresiones de los modelos de plataforma y adaptador de plataforma

4.2. Optopatcher

Uno de los mayores intereses en este estudio es poder obtener una caracterización eléctrica de la célula a la cual se está estimulando eléctricamente. La estimulación por medio de fotones puede ser realizada en cualquier área del tejido obteniendo resultados favorables independientemente de la localización. Se puede tener fibra óptica dirigida sobre el tejido mientras que en otra área el microelectrodo de grabación, pero como se ha visto en otros trabajos[14] en soluciones salinas, así como dentro de tejido, la intensidad lumínica se ve disminuida conforme los fotones se adentran a la solución/tejido (por efecto de reflejo o absorción). Esto se traduce en pérdidas o mala estimulación si no se incide de manera directa a la célula que ha generado la opsina.

Una manera de disminuir al mínimo las pérdidas para aprovechar al máximo la potencia lumínica del fotón es incidir el fotón en la misma área donde se estudiará eléctricamente el tejido. El Optopatcher es un dispositivo desarrollado por Benny Pasmantirer y Oz Diner[42] para hacer grabación eléctrica a la par que se estimula en una misma área de tejido o célula de interés (v. Figura 4-6).

El optopatcher es un soporte dentro del cual se colocan pipetas para hacer Patch Clamp, que a su vez cuenta con fibra óptica interna para hacer incisión de fotones dentro del tejido estudiado. Este dispositivo corrige la problemática de pérdida de potencia eléctrica en función del contacto de los fotones por la solución salida y el tejido, permitiendo sesiones de grabación-estimulación más reales y prácticas.

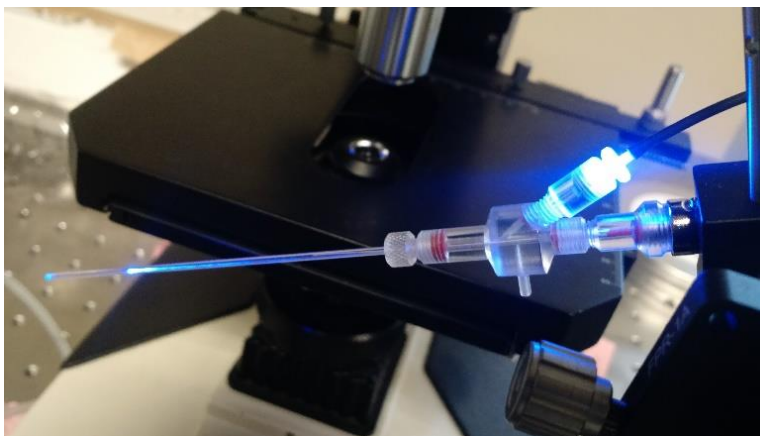


Figura 4-6 Optopatcher acoplado a fibra óptica

4.2.1. Electrodo de grabación

Dentro del OptoPatcher es posible encontrar un electrodo de plata desmontable para hacer electrofisiología de tejido o células disgregadas. La longitud del electrodo está ajustada para diversas fabricaciones de pipetas por lo que no es necesario que sea alterada. Cuenta con una terminación a conexión BNC tipo macho para poder acoplarse a otros instrumentos de procesamiento eléctrico de señales.

4.2.2. Estimulación óptica

Una fibra óptica cortada en forma transversal perpendicularmente al eje del núcleo es la terminación de la fibra óptica. La fibra óptica utilizada es una fibra multimodo de núcleo de 200 μm para un ancho de banda de 400 a 2200 nm y una NA (Apertura Numérica) de 0.39. Esta fibra cuenta con la capacidad de transportar si gran atenuación el espectro azul (470 nm), por lo que es excelente para la aplicación, a su vez, al ser multimodal no presentara problemas para transportar la fuente de luz unimodal generada por el led.

Es conectado con el circuito de estimulación óptica por medio de un *slave* de Zirconio (v. Figura 4-7), el cual hace la función de abracadera entre las terminales LC de fibra óptica tanto del optopatcher como de la fibra del led de estimulación.

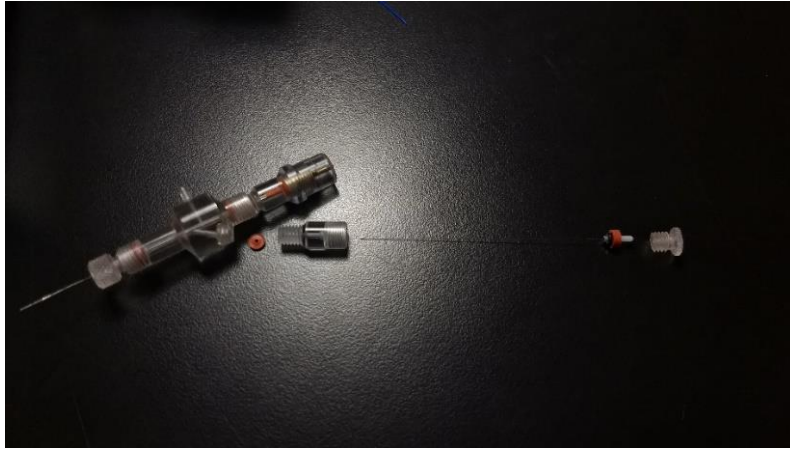


Figura 4-7 Partes del optopatcher

El NA es un elemento importante, ya que permite observar el ángulo de apertura de la luz con respecto a la terminación de la fibra óptica. Este ángulo de apertura se ve modificado por el medio en el cual la luz es incidente. Por lo tanto, de acuerdo con la siguiente ecuación, el NA puede ser encontrado como:

$$NA = n \sin \theta$$

Eq. 4.1

Donde n es conocido como el índice de refracción del medio. Los valores de los índices de refracción pueden variar de 1 hasta 5 aproximadamente dependiendo mucho del material, siendo 1 asociado al vacío y 1.000293 al aire.

Es difícil poder encontrar un ángulo de apertura para la solución de la pipeta debido a la composición de la misma solución de Ringer, pero de manera práctica se puede corroborar que el ángulo de apertura ofrecido por la fibra óptica es suficiente para incidir de manera directa sobre el tejido con el cual se está haciendo contacto con la pipeta.

4.2.3. Elaboración de pipetas

La pipeta forma un papel fundamental en la instrumentación al momento de realizar electrofisiología por medio de Patch Clamp. El electrodo de grabación realmente entra en contacto con el tejido o célula de estudio, si no que graba la señal eléctrica que es transportada por el medio entre la célula y el electrodo. Este medio, que puede ser la solución

de Ringer u otro medio extracelular debe favorecer como tal la conductividad de la señal para evitar pérdidas e introducción de ruido. La pipeta es entonces la encargada de encerrar el espacio donde la señal eléctrica de la célula viajara hacia el electrodo sin que esta se vea afectada por ruidos del medio externo, al grado de emular el contacto directo del electrodo sobre el tejido[5].

Un aspecto importante y delicado es la elaboración de estas, pues su proceso no es preciso y se ve afectado por muchas variables[5]. Toda pipeta debe de ser tratada para formar una punta de tamaño tal que pueda entrar en contacto con la célula, esta punta en general debe de tener una forma cónica.

El proceso de elaboración de esta punta puede ser diverso, pero en general y en la práctica es desarrollado por medio de un Puller. El Puller es un dispositivo que por medio de calor y fuerza mecánica genera las puntas de la pipetta. Existen muchos Pullers comerciales, el empleado en el laboratorio es un Puller Modelo O-97 de Sutter Instruments.



Figura 4-8 Puller Modelo P-97

El dispositivo cuenta con la capacidad de crear programas que se guardan en la memoria del dispositivo para su posterior empleo. Cada programa permite modificar parámetros como: tiempo de exposición a la resistencia (temperatura), fuerza de arrastre, tiempo de arrastre, etc. Entre todos los parámetros, es necesario encontrar los parámetros óptimos para cada tipo de pipeta usada, ya que el proceso de elaboración de las mismas por

fabricante hace que sus propiedades mecánicas cambien, modificando el proceso de maquinado para obtener resultados deseados.

Aunque hay que cuidar las características físicas, como el contorno y longitud de punta creada, los dos aspectos más importantes a atender es la resistencia creada por la punta y la forma de la punta. La resistencia se puede medir introduciendo la pipeta en líquido conductor y llenando la pipeta con el mismo líquido, y por medio de un medidor de resistencia caracterizar este parámetro. Un valor deseado de resistencia en la punta de la pipeta suele ser entre 1 y 10 M Ω [11]. Otros tratamientos pueden ser desarrollados para moldear mejor las puntas, pero no son requeridos en aplicaciones prácticas convencionales.

Las pipetas empleadas son de la compañía Kimble y cuentan con las siguientes características:

- I.D.: 1.1 – 1.2 mm
- Grosor de vidrio: 0.2 ± 0.02 mm
- Longitud: 75 mm

Al final se buscó una configuración de Puller que ofreció una resistencia de 1 M Ω aceptable para los estándares de la experimentación realizada.

4.3. Circuitos eléctricos

Aunque existe una gran cantidad de métodos para medir señales eléctricas en una célula, muchos dependientes del tipo de señal y las características del entorno, la metodología elegida para este protocolo de experimentación fue Current Clamp.

Al emplear Current Clamp como método de grabación, la señal de corriente se busca que sea anclada para poder trabajar meramente con la señal de voltaje. El circuito básico e ideal para trabajar con Current Clamp es un seguidor de voltaje.

Como es visto en muchas situaciones de tratamientos de señales, el empleo del seguidor de voltaje tiene una importancia fundamental en la instrumentación, la cual radica en el acoplamiento de impedancias para evitar la caída de voltaje de la señal fuente hacia los instrumentos de amplificación y adquisición de datos.

Una vez anclada la corriente y evitada la caída de los voltajes de la señal fuente, es necesario entonces amplificar la señal de bajo voltaje para que pueda ser procesada por un

adquisidor de datos de resolución media. Amplificando la señal se acorta el rango de resolución de voltajes medidos por el amplificador, permitiendo evitar los errores por falta de información creados por la digitalización de la señal.

Un enfoque general de las etapas de tratamiento de la señal puede ser visto a continuación:

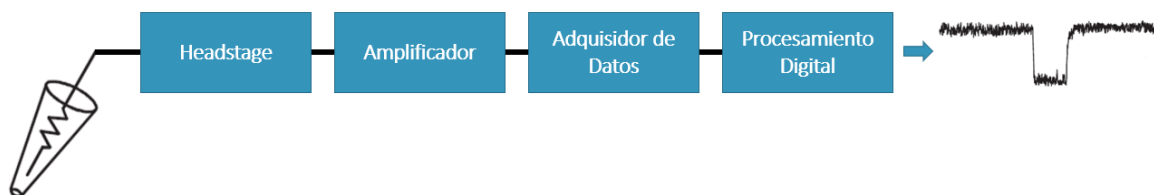


Figura 4-9 Etapas de procesamiento de señal

4.3.1. Headstage

Esta etapa tiene un gran impacto sobre todo el equipo de instrumentación, y es que acorde al tipo de Patch Clamp que se va a realizar es el tipo de circuito eléctrico que debe de diseñarse para usarse como headstage. Al elegir el método de Current Clamp, el circuito eléctrico que debe diseñarse debe ser un seguidor de voltaje[6].

Un seguidor de voltaje convencional no ocupa grandes cálculos, ya que su diseño es si es demasiado simple. El problema del seguidor de voltaje para un Current Clamp radica principalmente en el tipo de Amplificador Operacional usado.

Un seguidor de voltaje para Current Clamp debe de emplear un Amplificador Operacional de bajo ruido y capaz de responder a bajos nivel de voltaje. Existen muchos Amplificadores Operacionales que pueden cumplir este requisito, pero es importante analizar sus características para encontrar el mejor según la aplicación. Una buena alternativa de Amplificador Operacional es el MAX44252ASD+ de la empresa Max Integrated[43]. Este Amplificador Operacional está diseñado especialmente para hacer instrumentación médica. En general dos de sus grandes características son su excelente respuesta a pequeñas señales y su bajo ruido:

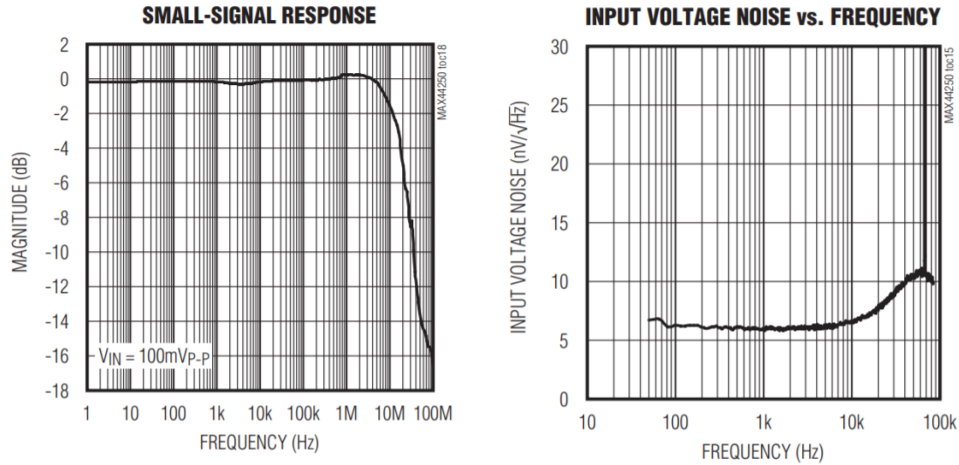


Figura 4-10 Respuesta de frecuencia del dispositivo MAX44252ASD+⁴

Otras gráficas de interés también pueden ser encontradas en el Data Sheet del Amplificador. La adquisición de este Amplificador Operacional es gratuita, Maxim Integrated dona dispositivos cuando estos van a hacer empleados en labores de experimentación.

Acoplado al MAX44252ASD+ se integró un convertidor inversor de voltaje MAX660EPA+[44]. Lo anterior considerando que el circuito será alimentado por una fuente de voltaje positivo de 5V, y el MAX44252ASD+ necesita de preferencia voltaje tanto positivo como negativo. Este dispositivo, de acuerdo con la aplicación desea puede tener varias configuraciones, la configuración para crear un inversor de voltaje es la siguiente:

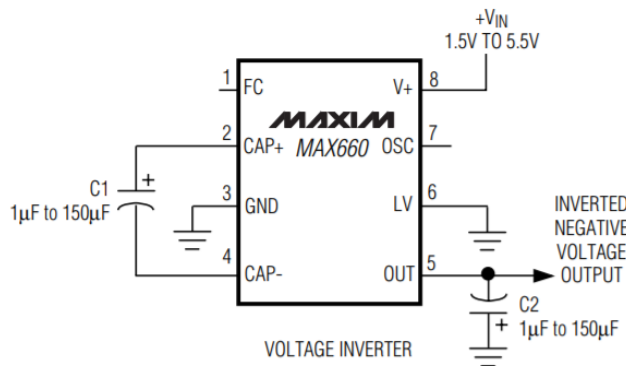


Figura 4-11 Ejemplo de circuito para MAX660⁵

⁴ Extraído del datasheet de MAX44252ASD+

⁵ Extraído del datasheet de MAX660

Contando con los voltajes de polarización especificados para la correcta operación del MAX44252ASD+ es posible desarrollar el circuito del headstage. En la Figura 4-12 es posible observar un esquema simple del circuito y su interacción con el resto de la etapa de instrumentación.

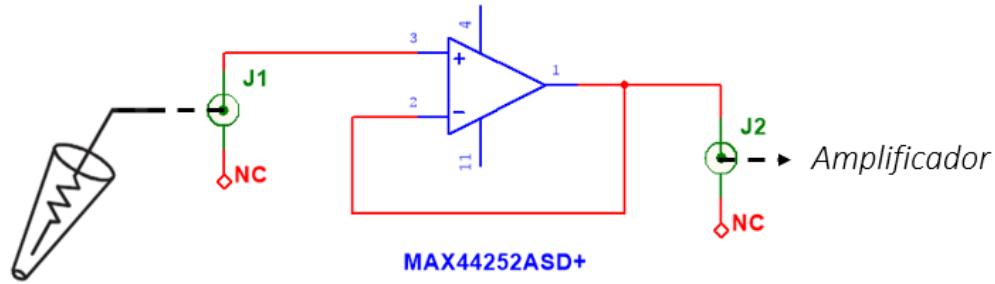


Figura 4-12 Electrodo acoplado a seguidor de voltaje

Este circuito, al ser modelado correctamente, puede ser pasado a PCB (v. Figura 4-13). Existen una gran cantidad de software de diseño de circuitos y PCB electrónicos. Entre uno de ellos se desarrolló el PCB correspondiente al circuito del headstage junto con el inversor de voltaje.

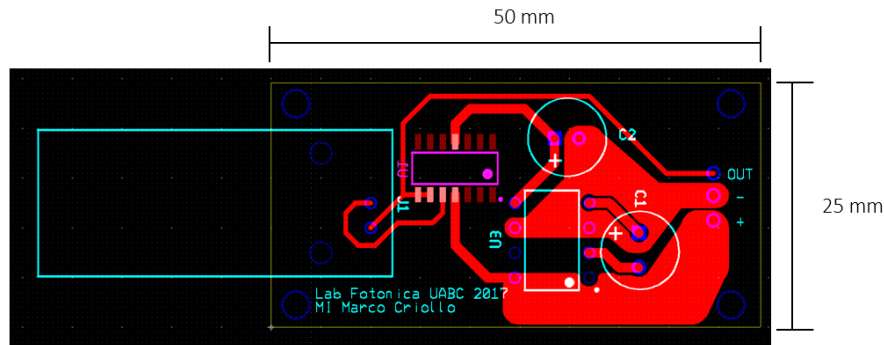


Figura 4-13 Modelo de PCB para el headstage

Un modelo en 3D del PCB impreso para observar que las dimensiones físicas de los elementos no intervinieran entre si también fue desarrollado por el mismo software (v. Figura 4-14).

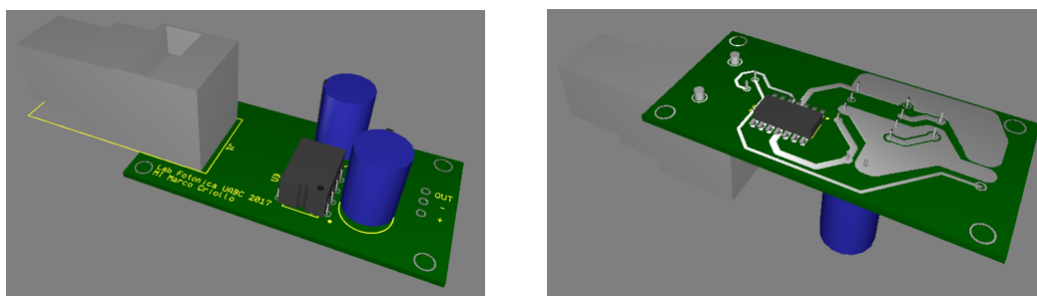
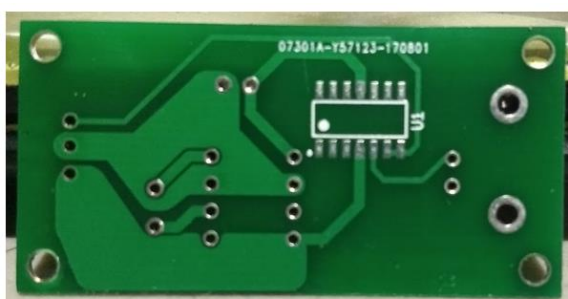


Figura 4-14 Modelo renderizado en 3D del PCB

Como es posible observar en las figuras anteriores, las dimensiones físicas del PCB son muy pequeñas. La razón principal de esto es para evitar cualquier desperdicio de espacio que pueda interrumpir mecánicamente sobre todo el sistema de instrumentación. Estas dimensiones, a su vez afectan en las dimensiones físicas de las vías de cobre de la circuitería interna el PCB. El ancho de vía mínimo encontrado en el circuito es de 0.5 mm. Desarrollar un impreso por medio de la impresión de líneas sobre una placa fenólica es una tarea muy compleja que conllevaría a errores en la producción del PCB.



Circuito Impreso lado de soldado



Circuito Impreso lado de componentes



Circuito Impreso lado de soldado



Circuito Impreso lado de componentes

Figura 4-15 Impreso de PCB

Existen varias empresas que a bajo costo realizan la impresión de PCB con calidad industrial a bajo costo. El diseño fue mandando a la empresa ITEAD studio, una empresa encargaba de la impresión de diseños PCB a bajo costo. La calidad de la impresión fue excelente ya que es desarrollada por medio de impresoras de PCB en 3D.

La colocación de componentes y el soldado puede ser entonces llevada a cabo con métodos convencionales, no se requiere de ningún tratamiento en especial (v. Figura 4-15).

Al ser un circuito seguidor de voltaje en la escala de miliVolts, es sensible a ruidos eléctricos externos a la instrumentación. Una caja de Faraday puede ser usada en esta situación para aislar el circuito a la intervención de señales electromagnéticas externas.

La caja de Faraday puede ser implementada de manera sencilla. Se desarrolló en un software de modelado 3D una caja elaborada de material PLA con las dimensiones necesarias para cubrir el circuito y conectores BNC (v. Figura 4-16).



Figura 4-16 Impreso de la caja para headstage

Esta caja fue entonces fue cubierta en todas sus caras internas con cinta de cobre para asegurar que el circuito fuera encerrado en su totalidad por una superficie conductora (v. Figura 4-17).

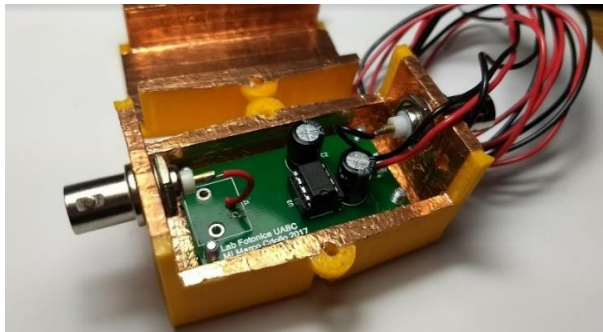


Figura 4-17 Headstage acoplado a la caja y con caja de Faraday

Una señal de prueba tipo sinusoidal a 60 mV y 100 Hz fue empleada para probar las características eléctricas y en el dominio de la frecuencia del circuito (v. Figura 4-18). La selección de esta señal fue para simular las escalas de voltaje en las cuales interactúan los potenciales de acción. Esta señal fue elaborada a partir de un calibrado de equipo eléctrico. Por medio de Matlab y con la ayuda del adquisidor de datos de Labview esta señal de prueba resultante del circuito fue caracterizada tanto en el dominio del tiempo como en el dominio frecuencial por medio de una FFT.

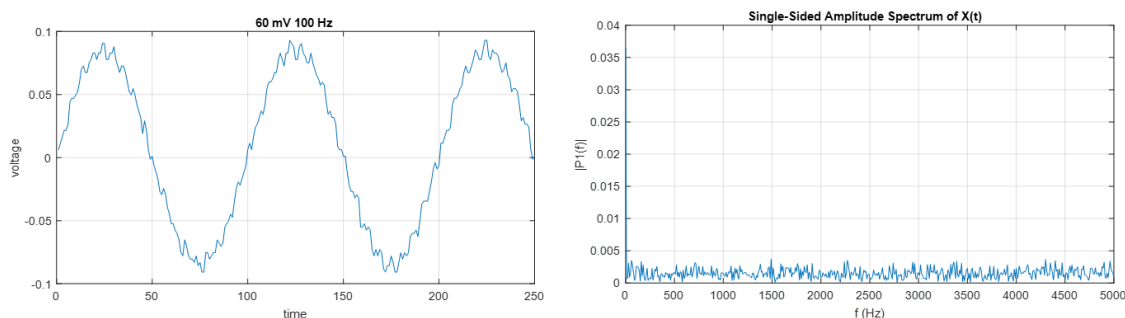


Figura 4-18 señal de prueba, izquierda dominio del tiempo, derecha dominio frecuencial

Como se aprecia, existe un ruido a alta frecuencia que no puede ser aislado aun con la caja de Faraday, producto de los conectores BNC los cuales funcionan como antenas, pero se muestra una señal con muy buenas características, lo cual muestra uno de los beneficios del uso del Amplificador Operacional MAX44252ASD+.

4.3.1. Amplificador

Para la etapa de amplificación de la señal, justo después del acoplamiento de impedancia por medio del headstage, se empleó un Amplificador Diferencial DP-301 de Warner Instruments. Este amplificador diferencial esta empecialmente diseñado para el tratamiento de señales pequeñas tales como EEG, EKG, EMG y potenciales de acción extracelulares. Entre las ventajas de este amplificador comercial de bajo costo de cuenta con:



Figura 4-19 Amplificador Diferencial DP-301

- Alta impedancia de entrada
- Bajo ruido con alta ganancia (x100 x1000 x10000)
- Alta tolerancia a Offset y Offset ajustable
- Filtro pasa banda ajustable

A su vez, cuenta con un modo de calibración en la cual se puede ajustar el Offset para mejorar completamente la referencia de la señal. Los ajustes de ganancia y filtrado de la señal están delimitados por la configuración que ofrece el panel del equipo, entre las configuraciones y sus diferentes opciones se tiene:

Tabla 4-1 Tipos de configuraciones del amplificador

Tipo de Entrada	Filtro Pasa Banda			Ganancia	Offset
	Filtro (KHz)	Pasa Alta	Filtro Pasa Baja (Hz)		
AC	0.1		0.1	x100	Ajuste
DC	1		1	x1000	Continuo
	10		3	x10000	
	300		10		

4.3.2. Aislamiento eléctrico

Un aspecto importante resaltado con anterioridad es lo determinante del aislamiento eléctrico. Las pequeñas señales, tales como los potenciales de acción celulares, tienen una gran probabilidad de adquirir ruido eléctrico al momento de ser estudiadas con el sistema de instrumentación. Una primera alternativa para evitar el efecto del ruido eléctrico sobre la señal fue la construcción de la caja de Faraday dentro del headstage. Este aislamiento, aunque en un ensayo y en condiciones controladas prueba ser efectivo, no es suficiente.

El ruido eléctrico tiene la capacidad de introducirse en casi cualquier etapa del circuito de instrumentación y en cualquier dispositivo. Una manera óptica de poder aislar y maximizar los efectos del mismo es creando una jaula de Faraday sobre todo el circuito de instrumentación. Esta jaula de Faraday, en los experimentos de electrofisiología, se ha convertido en un estándar necesario que debe de siempre aplicarse.

Muchas variantes existen en el mercado; a continuación, se muestra las empleadas en la mesa de electrofisiología ya instalada con el debido equipo de instrumentación.

4.4. Equipo de perfusión

El sistema de perfusión es aquel sistema hidráulico encargado de mantener al tejido siempre con solución de extracelular, para protegerlo de la oxidación, así como ataques bacteriológicos por parte del medio ambiente. El sistema como tal mantiene el flujo laminar constante de líquido mediante el empleo de la gravedad. A continuación, se muestra un esquema básico del funcionamiento de los elementos que conforman el sistema de perfusión:

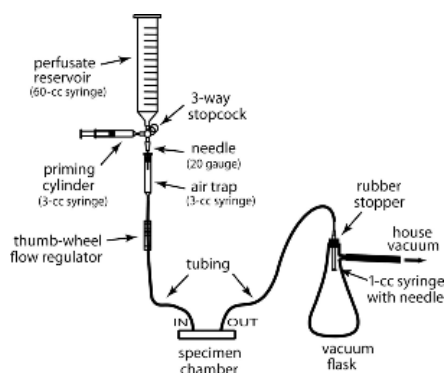


Figura 4-20 Modelo de perfusión

Deposito principal

Aquí, la solución de Ringer es colocada para poder ser usada en la experimentación. Pasa desde el depósito hacia la cámara por solamente gravedad, limitada por el control del ajuste de caudal. Tiene una capacidad total de 3 litros y cuenta con tres entradas/salidas de líquido.

Ajuste de Caudal

Empleado para controlar la cantidad de flujo que pasa por sobre el sistema de perfusión. Tiene una etapa de corte que puede cortar completamente el flujo, por lo que puede ser usado como un sistema de cierre alternativo o emergencia al cierre de seguridad. Junto con la bomba peristáltica deben de ser ajustado de tal manera que el flujo laminar no permita el contacto de oxígeno con el tejido y evitar el derrame de solución por los límites de la cámara. Solo debe de ponerse en la posición de corte completo cuando el sistema de perfusión ya no será usado para la experimentación.

Cierre de seguridad

El cierre de seguridad es solo empleado cuando no se requiere el flujo de líquido por el sistema de perfusión. Debe estar siempre en posición tal que bloquee el paso de líquido en toda ocasión salvo en los momentos en que el sistema sea usado para la experimentación. Solo en ciertas ocasiones completamente calculadas puede ser usado como un cierre de emergencia para la manipulación de los componentes dentro de la cámara.

Salida y entrada a cámara de grabación.

La forma de la cámara de grabación dentro del sistema de perfusión forma un papel muy importante. La cámara no sirve únicamente para mantener el tejido fijo y asegurar un patch consistente. Gracias a su forma, permite el flujo laminar dentro del compartimento

donde el tejido es asegurado. El flujo laminar en esta situación es de gran importancia porque permite una condición de estrés y ruido constantes, lo cual es traducido como un efecto mínimo en la vida útil del tejido, así como en las características de la señal eléctrica muestreada. La Figura 4-21 muestra el comportamiento laminar de la cámara de grabación, así como el sentido del líquido entrante y saliente.

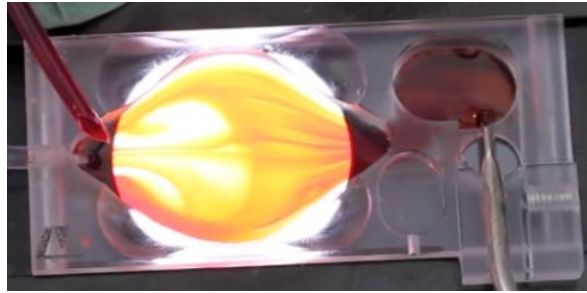


Figura 4-21 Flujo laminar sobre la cámara de grabación

Bomba peristáltica

Esta bomba es la encargada de crear el vacío que retira el líquido y desechos orgánicos de la cámara de grabación por medio de la succión. Por su mismo mecanismo de operación nunca entra en contacto con el líquido por lo que su mantenimiento es relativamente sencillo. Conecta mediante tuberías la cámara de grabación con el depósito de desechos orgánicos.

Depósito de desechos orgánicos.

Una vez que el líquido pasa por el tejido y es succionado por la bomba peristáltica este es depositado en un contenedor de desechos orgánicos. Se le considera de desecho orgánico por que el líquido final no solo contiene la solución de Ringer si no una combinación de solución y desechos orgánicos, los cuales pueden provenir del desprendimiento de células de la pared del tejido estudiado. Su tratamiento una vez terminada con la experimentación es ser situado en las áreas de recolección de desechos orgánicos como lo indican los protocolos de la institución.

Capítulo 5. Protocolos de experimentación sobre un tejido de miometrio *in vitro* y resultados.

En general, los experimentos realizados en esta investigación pueden ser catalogados en dos secciones según sus características. En un principio se cuentan con los experimentos *in vitro* y por otra parte los experimentos *in vivo*. Este capítulo abarca de manera general los protocolos realizados para el estudio del tejido *in vitro*. Tales protocolos conllevan al tratamiento y cuidado del tejido, así como la configuración y puesta en marcha de cada parte importante en el equipo de electrofisiología. Así mismo, se detallan los resultados obtenidos con el tejido extraído del individuo de estudio al cual se le introdujo el material genético (opsina, ver capítulo 6 para más detalle)

5.1. Protocolo de tratamiento del tejido biopsia y configuración de cámara de grabación

Todo tejido tras ser extraído como biopsia debe de resguardarse cuidando ciertas condiciones, los cuales aseguran su vida útil y efectividad de las señales estudiadas. Las condiciones de tratado de todo tejido extraído como biopsia para estudio deben ser, de manera general, las siguientes[45]–[47]:

- Ser resguardado a temperatura ambiente, para evitar el choque de temperatura.
- Depositado sobre solución de Ringer, para asegurar su sustentabilidad y evitar el contacto con el oxígeno.
- Usar depósitos de plástico/vidrio oscuro para evitar el contacto con la luz.

La cámara de grabación es una estructura de policarbonato la cual es empleada para almacenar al tejido durante el periodo de grabación de la experimentación. Como tal, la estructura de la cámara cuenta con varias áreas las cuales tienen diferentes finalidades:

- *Baño*: es el área donde es colocada la muestra al momento de estudiarla, cuenta con forma de diamante para facilitar el flujo laminar por sobre el tejido.

A su vez, cuenta con un ancla en forma de diamante para sujetar el tejido evitando que se mueva por acción del flujo constante del sistema de perfusión.

- *Agar Bridge Well*: empleado como un área para la colocación de electrodos de referencia que empleen un Agar Bridge, otros electrodos pueden ser colocados en cualquier sección de la cámara.
- *Depósito de succión*: deposito empleado específicamente para la succión del líquido de perfusión. Como tal, es parte del sistema de perfusión y contiene un ajuste de nivel para modificar de igual forma el nivel del líquido en función del grado de succión ocasionado por la bomba peristáltica.

La cámara a su vez es acoplada a un cubreobjetos de la misma dimensión que la cámara, sobre el cubreobjetos es depositado el tejido a estudiar. Para poder acoplar el cubreobjetos a la cámara es necesario contar con un compuesto de silicona resistente al agua, Molykote 111 y un pincel de aplicación. El procedimiento a seguir para unir el cubreobjetos con la cámara de grabación es el siguiente:

Protocolo de preparación de cámara

1. Tomar un poco de Molykote 111 con el pincel.
2. Esparcir el Molykote 111 por sobre toda el área inferior de la cámara, asegurando que no quede espacios vacíos o sin aplicación del compuesto.
3. Colocar el cubreobjetos por sobre el área inferior de la cámara, aquí es importante tratar de evitar que el cubreobjetos se mueva al momento de la aplicación para evitar manchas sobre el área del baño que puedan afectar la visibilidad de la biopsia.
4. Colocar la cámara de grabación dentro de la plataforma utilizando los tornillos para asegurar la cámara evitando que se deslice por sobre la plataforma.

Al tener la cámara de grabación completamente ensamblada es posible transferir el tejido de su depósito hacia la cámara para entonces encender el sistema de perfusión.

5.2. Protocolo de creación de solución de Ringer

La solución de Ringer es un líquido empleado como medio extracelular. Las características de esta solución es su alto contenido de sales que permiten un medio en el cual el tejido vivo puede ser colocado para sobrevivir y a su vez permitir los potenciales de membrana de las células.

Existen una gran cantidad de variantes[5], [40], [48], dependiendo del tipo de tejido sobre el cual se va a estudiar y el tipo de estudio en general aplicado. En este trabajo se detalla el procedimiento de creación, empleo y cuidado para el tejido del miometrio, el cual se basa en otros trabajos de electrofisiología encontrados en la literatura.

De aquí, es posible en una simple tabla englobar las cantidades por cada reactivo empleado en la solución, las cuales se presentan a continuación:

Tabla 5-1 Contenido molar para una solución de Ringer

Reactivo	Contenido en Moles	Contenido en Gramos
NaCl	58.44	8.4738
KCl	74.55	0.37275
CaCl ₂	110.99	0.277475
MgSO ₄	246.47	0.24647
Glucosa	180.16	1.8016

Un protocolo simple para la creación de la misma solución puede ser empleando el siguiente procedimiento:

Protocolo de preparación de solución de Ringer-Krebs:

1. Preparar 500 ml de agua destilada a temperatura ambiente.
2. Agregar a la solución los ingredientes de la forma en que se presentan en la tabla X.
3. Mezclar hasta que la solución sea homogénea

4. Preparar otros 500 ml de agua destilada y combinar con la solución para llevar a la solución original a 1 l.
5. Mezclar hasta obtener una única solución homogénea.

Una vez lista la solución es posible colocarla en depósitos de 1l de vidrio oscuro para preservarlas o introducirse directamente sobre el depósito del sistema de perfusión.

5.3. Protocolo de configuración del sistema de perfusión.

Para poder en marcha el sistema de perfusión es importante asegurarse que el tejido ha sido colocado en el área de tejido dentro de la cámara de grabación.

Protocolo de puesta en marcha del sistema de perfusión

1. Antes de iniciar con la puesta en se debe de asegurar que el cierre de seguridad este accionado para evitar derrames innecesarios. Las conexiones de las tuberías deben de introducirse a sus respectivas posiciones en la cámara de grabación.
2. Se debe de encender la bomba peristáltica a fin de provocar la succión antes de que el líquido empiece a moverse por operación de la gravedad. Al ser la bomba variable se puede empezar con niveles bajos de succión, aunque la succión a máxima potencia también es permisible.
3. El ajuste de caudal se mueve hasta la posición de cierre, y entonces se remueve el cierre de seguridad para permitir el paso de líquido. Es entonces que se va cambiando se posición el rodillo hasta lograr un caudal tal que el nivel de líquido dentro de la cámara se mantenga constante a una altura tal que se sumerja completamente el tejido sin que el flujo de agua pueda ocasionar algún tipo de desborde.
4. Se coloca la plataforma con la cámara sobre el adaptador de plataforma al microscopio donde se acoplará al resto del sistema de patch clamp.

5.4. Protocolo de estimulación óptica

Existe una gran variedad de métodos y protocolos a seguir para la estimulación óptica. Aunque es factible el solo emplear estimulación de luz por medio constante en esta tesis se buscó un método empleado en otros trabajos de características similares.

Primeramente, la estimulación óptica fue llevada a cabo con el dispositivo DC2100 de Thorslabs, el cual permite diferentes configuraciones de proyección de luz:

- Luz constante: una fuente de luz constante con capacidad de variación de potencia de 0 a 1000 mA.
- Luz en tren de pulsos: el tren de pulsos permite configurar una fuente de luz variable en señal cuadrada, donde se puede modificar
 - Ciclo de trabajo
 - Frecuencia
 - Potencia

Anexo a esto, una fuente de luz led compatible debe ser conectada al dispositivo. El led empleado es un led azul de 470 μm de ancho de banda debido a las características de operación de la opsina (v. Figura 5-1). El led puede ser conectado a una fibra óptica por medio de un conector que emplea el estándar SMA.



Figura 5-1 Led 470 nm de Thorslab

En este protocolo se empleó el cable comercial RJPFL2 de Thorlabs, un cable de fibra óptica con conector intermedio rotatorio y terminales SMA y LC. Este diseñado especialmente para aplicaciones de optogenética donde el led esta siempre en contacto con el sujeto de estudio in vivo. Al tener un conector intermedio rotatorio, permite completa

flexibilidad de movimiento del sujeto para poder efectuar la estimulación en cualquier momento.



Figura 5-2 Conector de fibra óptica de Thorlabs

El cable RJPFL2 es conectado por medio de un slave a una de las entradas del optopatcher. Dentro del optopatcher es posible encontrar en un mismo el cable con el electrodo y la fibra óptica empleada como salida final de luz hacia el tejido de estudio.

La configuración empleada como protocolo de estimulación óptica del tejido fue la presente en la Tabla 5-2. Esta configuración fue elegida alternativa óptica al estrés constante de luz siguiendo otros protocolos encontrados en la literatura.

Tabla 5-2 Configuración del equipo de estimulación óptica

Tipo de señal	Ciclo de Trabajo	Frecuencia	Potencia	Repetición
Tren de pulsos	50%	30 Hz	1000 mA	Infinita

5.5. Protocolo de identificación de opsina

El virus empleado para la inserción de la opsina en el tejido del cérvix cuenta con una parte de proteína fotosensible, este es detallado en secciones posteriores junto a los estudios efectuados *in vivo*. El momento de la inserción es detallado en capítulos posteriores al ser considerado como parte de los experimentos *in vivo* sobre el sujeto. Esta proteína es la mCherry.WPRE.SV40, la cual ya es muy empleada ya en los estudios de optogenética.

Al momento de ser secuenciadas las Canaradopsinas también son producidas las proteínas fosforescentes, ya que el código genético es secuenciado a la vez por los ribosomas al ser una única cadena de código genético.

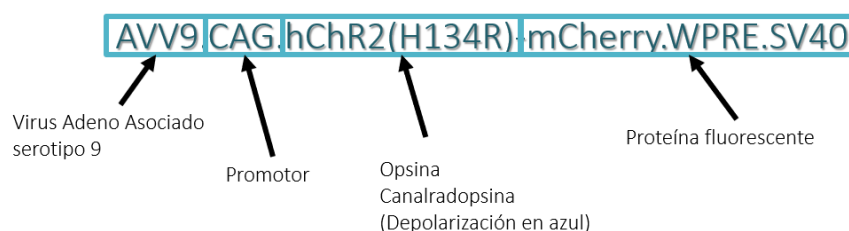


Figura 5-3 Virus y sus respectivas nomenclaturas

Estos entonces se colocan a la par en la membrana celular. Al ser iluminada por medio de una correcta fuente de luz produce un destello característico de color rojo, que puede ser apreciado con claridad por cualquier microscopio. Este fenómeno puede ser aprovechado entonces para la identificación visual de la correcta sintetización de la opsina en la membrana celular.

Un protocolo a seguir para la identificación de la opsina puede ser el iluminar el tejido con una fuente de luz blanca constante por lo menos 1 minuto y entonces retirarla para que, en la oscuridad total, se pueda observar la iluminación fosforescente producto de la proteína mCherry, WPRE, SV40.

Al emplear este protocolo sobre el tejido obtenido de la servir, no se pudo apreciar con claridad ninguna prueba visual de la sintetización de la opsina en la muestra de tejido. La prueba de visual fue realizada varias veces a fin de evitar el error aleatorio, pero en ninguna de las pruebas realizadas se pudo obtener evidencia sustancial de la existencia de la opsina en el tejido.

5.5.1. Discusión sobre resultados de la prueba visual

De lo anterior, varias conclusiones se obtuvieron a fin de comprender este fenómeno:

1. **Fallo en el equipo de detección visual:** aunque la fuente de luz es blanca y constante, es posible que su potencia no fuera la requerida para que la proteína fosforescente pudiese absolver correctamente los fotones, y a su vez, la falta de potencia no permitía poder visualizarlos en el equipo de electrofisiología.

2. **Biopsia de un tejido sin opsina:** en esta situación, la biopsia no fue extraída exactamente de la misma área donde ocurrió la inserción física del virus o el virus fue insertado en un espacio muy profundo a comparación de donde se extrajo la biopsia, lo cual conllevaría a que la biopsia correspondería en su mayoría a tejido del endometrio y no del miometrio.
3. **Presencia no sustancial de virus en la biopsia:** Aunado a lo anterior, el no poder determinar de manera visual la presencia de virus no significa que no exista en si presencia del mismo, si no que puede que su presencia no sea de manera significativa como para poder ser visualizado entre todo el tejido extraído. Su escasa o nula presencia puede no ser evidente visualmente pero puede afectar de manera importante la actividad eléctrica en el tejido. Así mismo, el espacio donde ocurrió la transfección viral puede que no haya sido demasiado grande o cercano a comparación del punto de recolección de la biopsia (v. Figura 5-4), apoyando el hecho de que la opsina tenga escasa o nula presencia en la muestra tomada de la cervix, que es un órgano muy grande y complejo si se compara con los órganos/tejidos/células en las cuales hasta el día de hoy se ha realizado la transfección viral de opinas en el área de la optogenética.
4. **No sintentización del virus:** Al ser el primer ensayo realizado sobre esta especie de inserción de virus de puede que el sistema inmunológico haya atacado al mismo y no permitido su proliferación. Otra conclusión es que el virus, revisado en la literatura como efectivo para el músculo liso del miometrio no hubiese sido compatible. Y finalmente, aun cuando el material genético se haya insertado satisfactoriamente puede que el promotor CAG no fuese identificado por los ribosomas de las células del tejido del miometrio y por lo tanto no sintetizado. El virus elegido mostraba grandes resultados en otros estudios al momento de interactuar con musculo liso, pero de igual forma existen otras alternativas en las diferentes bases de datos de virus en el mercado. Para poder identificar si alguna de estas situaciones pudieron haberse desarrollado y por qué es necesario todo un estudio sobre el efecto del virus sobre el tejido del miometrio que no ha podido ser desarrollado por las limitantes de tiempo, equipo y capital.

Considerando la vertiente en la cual el virus si fue sintetizado, pero su presencia en la biopsia fue nula o escasa, otras pruebas pueden realizarse para comprobar si de alguna manera la opsina afecta la actividad celular, entre ellas el conteo de la actividad eléctrica media en una muestra definida de la señal. Partiendo de esto, se realizó todo el siguiente esquema de experimentación definido en los apartados siguientes.



Figura 5-4 Área de inserción de virus vs área de extracción

5.6. Protocolo de grabación

Una sesión es definida dentro de este trabajo como el todo aquel conjunto de experimentos y grabaciones entre los cuales se empleó una misma pipeta sin ningún tipo de cambio o modificación de esta. La idea es para diferenciar las características eléctricas y mecánicas que están en función de la forma de la elaboración de cada pipeta, la cual es única para cada pipeta aun empleando el mismo protocolo de elaboración.

Por cada sesión, se desarrolló el siguiente esquema de experimentación:

- Fase 1: Grabación en reposo durante 5 minutos.
- Fase 2: Grabación con estimulación Led durante 5 minutos.
- Fase 3: Grabación en reposo durante 5 minutos.

- Fase 4: Grabación con estimulación Led durante 5 minutos.

Estos esquemas fueron planeados de forma que se obtuviera suficiente información la cual llevara a obtener conclusiones más objetivas del comportamiento de la actividad eléctrica de las células, y del cérvix en específico al estar en reposo (sin estimulación) y con la respectiva estimulación ontogenética. Estos resultados son complementarios al protocolo de estimulación ontogenética *in vivo* que se realizó sobre el sujeto de estudio en cuestión, analizados más a detalle en el capítulo 6.

Se caracterizaron principalmente dos sesiones, donde en cada sesión se empleó una pipeta diferente. Una vez logrado el sello con cada pipeta, fue posible caracterizar su resistencia correspondiente:

- Pipeta 1: Resistencia $3\text{M}\Omega$
- Pipeta 2: Resistencia $27\text{M}\Omega$

5.7. Post procesamiento de las señales eléctricas del cérvix

Obtenidos los datos eléctricos de cada fase de cada sesión de en el protocolo de experimentación, fueron sometidas a una etapa de post-procesamiento para mejorar la calidad de la señal, miniar los ruidos y más importante aún, caracterizar el número de picos o potenciales de acción en cada una de las fases.

Los números de picos o potenciales de acción son contabilizados al medir la cantidad de picos de la señal eléctrica que sobresalen a un umbral preestablecido. Cada sesión debe de ser trabajada con diferentes umbrales, ya que la amplitud de la señal se ve directamente afectada por la resistencia generada por la pipeta.

Analizando en el espectro de las frecuencias una muestra de la señal eléctrica es posible visualizar ciertas cantidades de armónicas muy definidas sobre toda la señal. Estas armónicas definidas afectan de manera sustancial la calidad de la señal en el espectro del tiempo, por que como se aprecia en su espectrograma su contribución energética es igual o mucho mayor que la señal electrofisiológica, las cuales tienen armónicos a muy bajas frecuencias (por debajo de los 100 Hz).

Una de las probables fuentes de estos armónicos puede ser armónicos menores, correspondientes a las altas frecuencias producto de las antenas de radiofrecuencias situadas en el lugar de estudio.

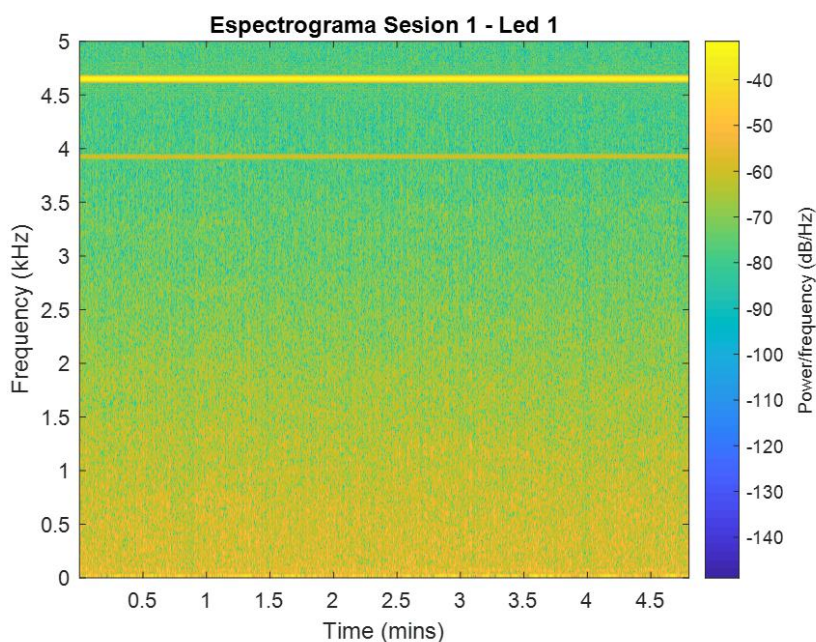


Figura 5-5 Espectrograma de una muestra de señal sin procesar

Para poder reducir su contribución, se empleó un filtro FIR pasa baja de orden 100 a una frecuencia de corte de 3 kHz y una atenuación de alrededor de -80 dB. Desde Matlab, se puede emplear la función `firceqrip()` para un diseño preliminar del filtro. Esta función a partir de un orden de filtro, frecuencia de corte, nivel de atenuación y rizado permitido calcula un filtro FIR equivalente a estas características, que puede ser modelo después por la función `dsp.FIRFilter()`.

Un ejemplo del código empleado es posible verse a continuación:

```
%Diseño de Filtro Fir
N = 100;           % Orden del filtro
Fp = 3e3;          % 3 kHz Frecuencia de corte
Fs = 10e3;         % 10 kHz Frecuencia de muestreo
Rp = 0.00057565;   % Correspondiente a 0.01 dB peak-to-peak ripple
Rst = 1e-4;        % Correspondiente a 80 dB de la banda de atenuación
eqnum = firceqrip(N,Fp/(Fs/2),[Rp Rst],'passedge'); % eqnum = vec of
coeffs
```

```
lowpassFIR = dsp.FIRFilter('Numerator',eqnum);  
  
signalFL = lowpassFIR(signal(:,2));
```

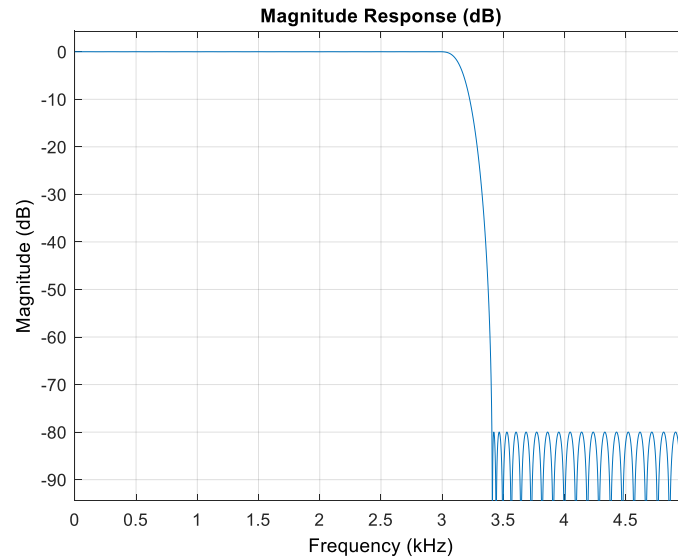


Figura 5-6 Respuesta en frecuencia magitud del filtro FIR diseñado

Una respuesta de frecuencia – magnitud del filtro puede ser vista en la Figura 5-6, donde podemos apreciar que el mayor rizado se encuentra en la parte atenuada. A su vez, un análisis del espectrograma de la señal una vez procesada por medio del filtro es posible verla en la Figura 5-7.

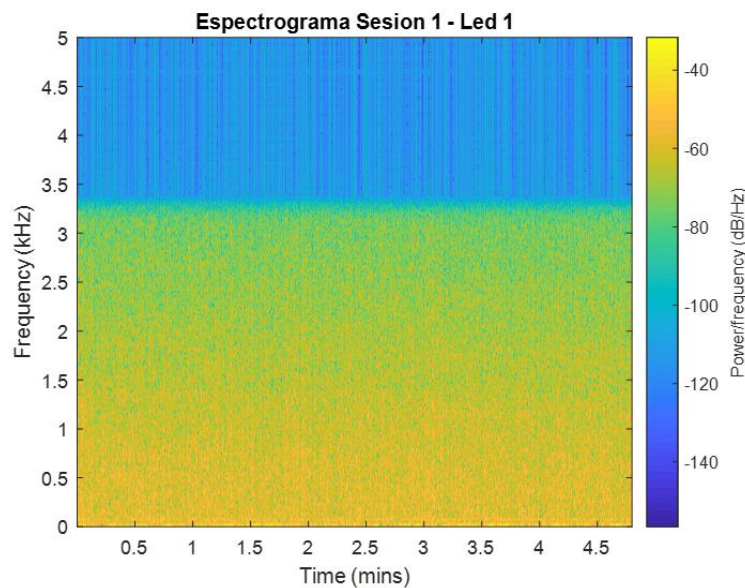


Figura 5-7 Espectrograma de una muestra de señal después del procesamiento

Y una comparación simple en un mismo rango temporal de la señal con filtro y sin filtro también puede ser visto en la Figura 5-8.

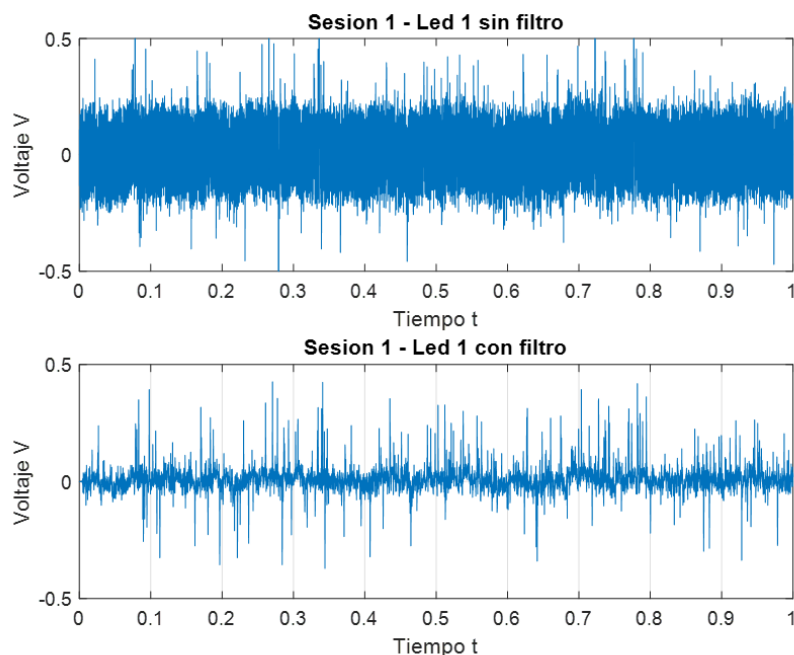


Figura 5-8 Muestra de señal en el dominio del tiempo, con y sin filtro

Una segunda etapa de post-procesamiento sobre la señal fue la caracterización y sustracción del offset, que también puede ser interpretado como potenciales de campo. Este offset mueve los potenciales impidiendo poder establecer un umbral único sobre toda la muestra de señal. Muchos métodos pueden ser aplicados para la sustracción de Offset.

Para caracterizar el Offset se ajustó una curva polinomial de grado 50. Dado que calcular la curva sobre la señal completa no permite obtener un modelo preciso de ajuste sobre la curva de Offset, estas fueron divididas en 10 partes iguales. Un ejemplo del código de la sustracción del Offset por medio de un ajuste de curva polinomial se muestra a continuación:

```
%forma polinomial se secciona a 10 partes de la señal original para poder  
%computar un correcto polinomio que se ajuste a la curvatura de la señal  
numP = length(signal)/10;  
px = [];
```

```
for i=0:9
    p =
    polyfit(t(i*numP+1:(i+1)*numP),signalFL(i*numP+1:(i+1)*numP)',50);
    pxtemp = polyval(p,t(i*numP+1:(i+1)*numP))';
    px = [px;pxtemp];
end
%p = polyfit(t,signalFL',130);
%px = polyval(p,t)';
signaladj = signalFL-px; %subtracción del offset polinomial
```

Una muestra de la caracterización del potencial de campo y su sustracción correspondiente a la señal original puede ser observada en la Figura 5-9. Como es posible observar, este procedimiento ajusta de manera precisa los picos de la señal a lo largo de todo el tiempo muestreado.

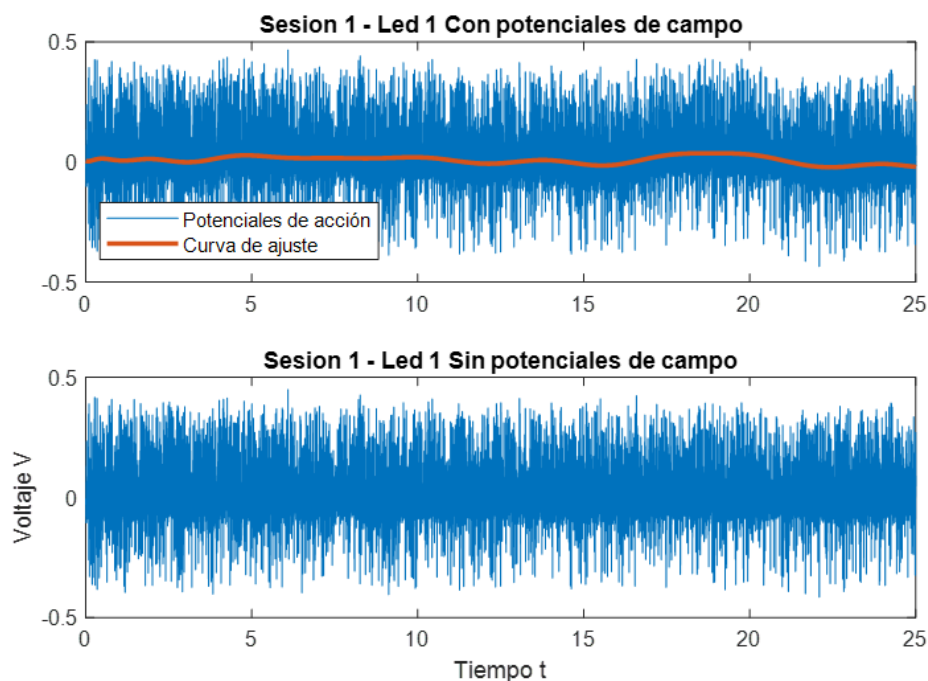


Figura 5-9 Muestra de señal con curva de ajuste de offset

Una vez obtenida una señal libre completamente del Offset, se puede proceder a determinar la cantidad de picos de voltaje relacionados a la actividad eléctrica celular (potenciales de acción). Para poder identificar estos picos de voltaje, es necesario hacer un estudio para poder definir un umbral de detección. Aunque el potencial de acción está muy

bien caracterizado en la literatura, como se observó en capítulos posteriores, dadas las condiciones eléctricas del sistema de medición los valores reales de voltaje pueden variar de manera muy drástica. Es importante retomar el hecho de que cada sesión tiene una pipeta diferente, y cada pipeta cuenta a su vez con una resistencia única en su punta y a la vez por la resistencia del sello. Esta resistencia se suma en serie a la resistencia del electrodo y a su vez a al circuito de resistencia capacitor formado por la pared de la pipeta. Un análisis simple hace ver que el circuito formado es un divisor de tensión por acción de estas resistencias. En la práctica, puede ser muy difícil caracterizar todos estos parámetros, ya que varían en función de muchos factores, cada uno explicado en al menos una parte de los capítulos de estado del arte y procedimientos. Al final, es posible presumir que la amplitud de la señal medida será diferente para cada una de las sesiones en el protocolo de experimentación.

Concluyendo lo anterior, entonces es necesario para cada sesión considerar umbrales diferentes. Aunque las señales han sido pasadas por etapas de procesamiento a fin de reducir de manera considerable el ruido, se puede presumir que la presencia de ruido puede aún ser significativa, y que muchos de los picos de voltaje también son producto del ruido de la señal. Entonces, el umbral de detección debe de ser definido de tal manera que se pueda discriminar entre los picos procedentes de potencial de acción y del ruido eléctrico. Pueden existir muchas maneras de teorizar la diferencia entre un potencial de acción y ruido eléctrico, pero una manera práctica y simple es la observación de la señal en el dominio del tiempo, como se aprecia en la Figura 5-10.

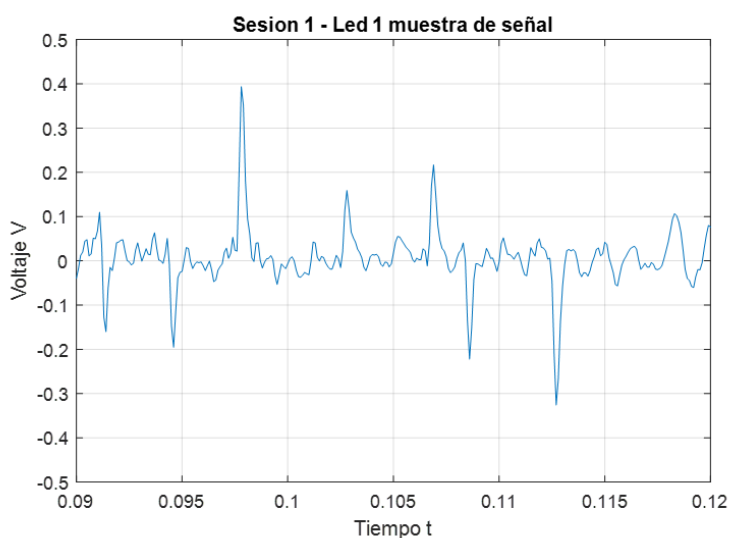


Figura 5-10 Muestra de señal, vista de actividad espontanea

Aquí, es posible observar que hay una serie de picos todos con diferentes amplitudes, pero de manera visual es posible distinguir una contribución de picos que sobrepasan los 0.3 V. Estos picos, relacionados a la actividad eléctrica de las células pueden ser diferenciados de ruidos o actividad menos significativa si se define un umbral de detección al valor mencionado de 0.3 V. Así mismo, es posible observar que los picos de actividad no solo contienen valores positivos si no también negativos. Estos picos de voltaje negativos están directamente relacionados a la etapa de hiperpolarización de la membrana, momento en el cual la membrana se hace demasiado negativa con la finalidad de evitar la nueva generación de potenciales de acción. En el área de la neurociencia, es posible ver que esta hiperpolarización es también efecto de la actividad de ciertos conjuntos de neuronas o terminales neuronales, que su principal función es evitar el paso de potenciales y por ende comunicación entre células. Por lo anterior, estos picos también deben ser considerados como actividad eléctrica celular, por lo cual un umbral negativo también debe ser definido para ellos. Este umbral negativo puede ser entonces definido al valor de -0.3 V considerando las características de las muestras.

Aun así, la definición y caracterización de un umbral puede ser arbitraria y conllevar siempre a un error aleatorio en la medición, por lo cual es necesario correr varias mediciones y hacer pruebas hasta encontrar un umbral aceptable. En general, un umbral es definido por sesión, y en las dos sesiones de estudio los umbrales obtenidos fueron los siguientes:

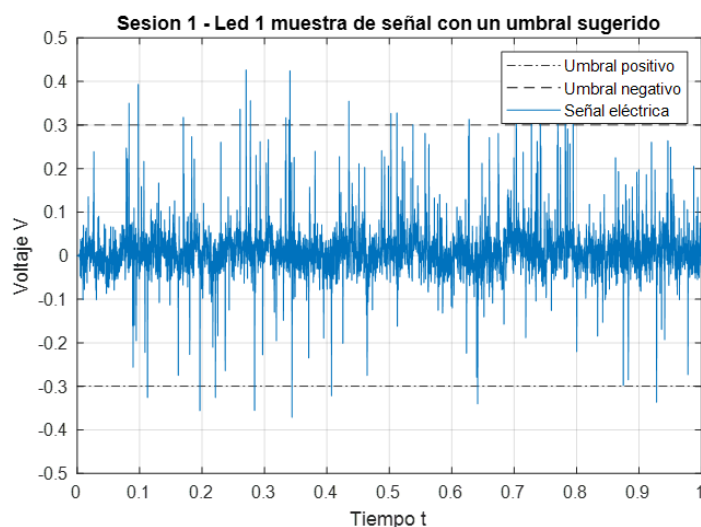


Figura 5-11 Umbrales de detección

- Sesión 1: 0.3 V
- Sesión 2: 0.2 V

En general, la identificación puede ser computada sin mucho problema por medio de un código de Matlab para la detección de máximos y mínimos locales en una curva, por medio de las funciones de `findpeaks()` y `islocalmin()`. Una vez detectados los máximos y mínimos respectivamente, se procede a identificar cuáles de estos realmente sobrepasan el umbral de ± 0.3 V definido con anterioridad.

El código de detección puede ser visto a continuación:

```
%maximos
TH = 0.3;
[signalFLmax,loc]= findpeaks(signaladj);
c = find(signalFLmax>TH);
%minimos
TF = islocalmin(signaladj);
locmin = find(TF==1);
cc = find(signaladj(locmin)<-TH);

minT = 60000;
dd = floor(length(signal)/minT);
locUT = loc(c);
locBT = locmin(cc);
cUT =zeros(1,dd);
cBT =zeros(1,dd);

for i = 0:dd-1
    cUTT = length(find((locUT>(i*minT+1))&(locUT<(i+1)*minT)));
    cUT(i+1) = cUTT;
    cBTT = length(find((locBT>(i*minT+1))&(locBT<(i+1)*minT)));
    cBT(i+1) = cBTT;
end

figure(3)
clf
plot(cUT,'LineWidth',2)
hold on
plot(cBT,'LineWidth',2)
plot(cUT+cBT,'LineWidth',2)
grid
ylabel('Cantidad de máximos')
xlabel('Minutos')
title(['Num. de máximos (potenciales) por ventanas de 10 seg en',
'Archivo,', ' umbral = ',num2str(TH)])
legend(['Picos Positivos \mu=',num2str(mean(cUT))], ['Picos Negativos',
'\mu=',num2str(mean(cBT))], ['Picos Total \mu=',num2str(mean(cBT+cUT))])
```

Una muestra de la caracterización de potenciales (picos de voltaje) positivos y negativo, considerando respectivamente la curva de ajuste del offset y potenciales de campo puede ser vista en la Figura 5-12.

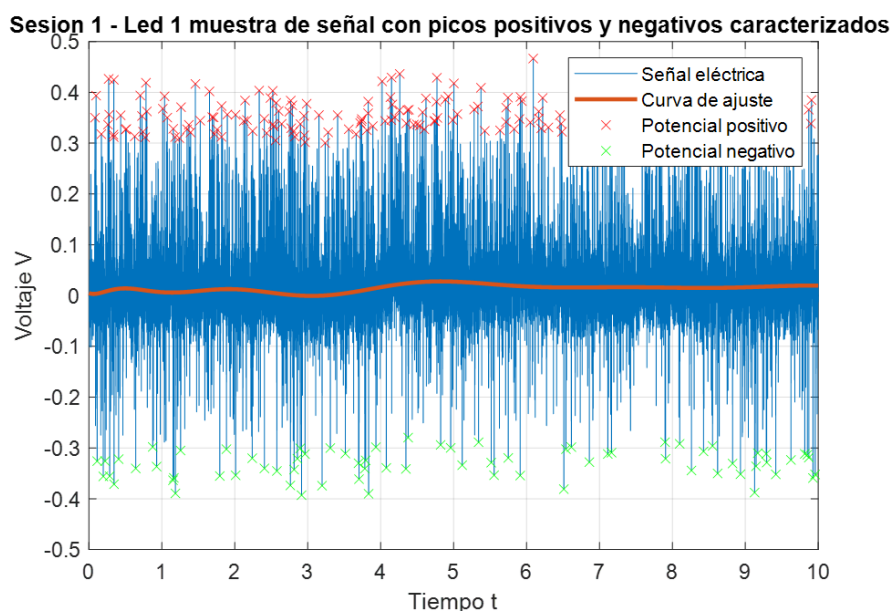


Figura 5-12 Muestra de señal, con filtro, ajuste de curva y detección de actividad con umbrales

5.1. Resultados

Aunado a la caracterización de los potenciales que sobresalen del umbral definido, se deben de contabilizar la cantidad de estos que concuerdas con esa característica. Al contabilizarlos, es posible considerar si realmente existe un aumento en la actividad eléctrica media en cada una de las fases de las sesiones de estudio. Lo anterior ya está implementando en el código de Matlab mostrado con anterioridad.

5.1.1. Actividad eléctrica media sesión 1

Recapitulando, la sesión 1 consistía en 4 fases: Reposo 1, Led 1, Reposo 2 y Led 2, cada con una duración aproximada de 5 minutos y llevadas a cabo de manera subsecuente en el orden presentado. A su vez, se contaba con una pipeta que alcanzo el sello de $3\text{ M}\Omega$, lo

cual lleva a la obtención de señales con características eléctricas únicas. De aquí, se adquirieron las siguientes graficas de actividad media calculadas en ventanas de 10 segundos cada una:

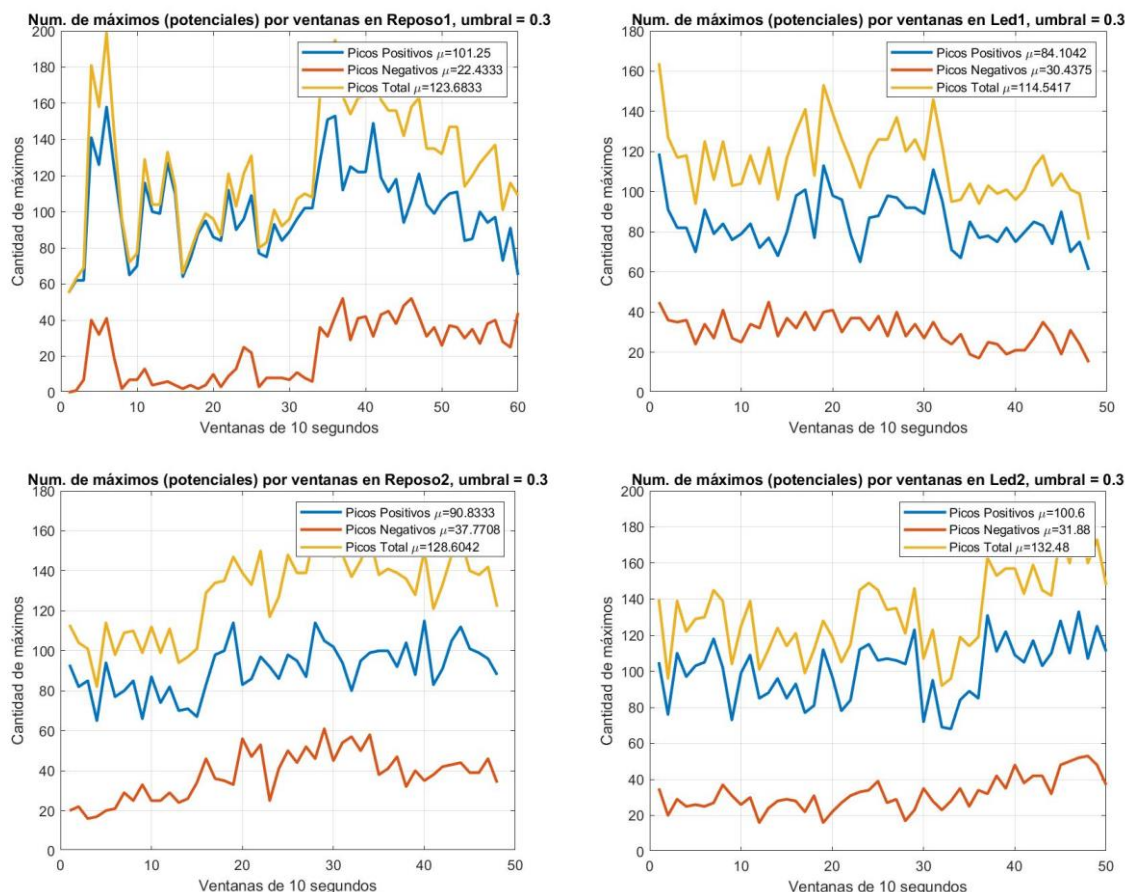


Figura 5-13 Resultados del conteo de detección de actividad Sesión 1

Analizando los resultados en las gráficas (v. Figura 5-13) se encuentran situaciones de gran interés. Un resultado interesante es el reposo 1, donde se obtiene la gráfica menos consistente de actividad eléctrica de las 4. Al interpretar esta gráfica se puede deducir que, en reposo y sin ningún tipo de estimulación, la actividad eléctrica aumento de manera considerable. Lo anterior no puede ser relacionado a la actividad espontanea de las células, si no que debe de tener otro factor que la haya producido. Analizando en el tiempo el reposo 1 aproximadamente a los 12 segundos se presenta un pico de voltaje a una amplitud muy por encima de las amplitudes medias de los potenciales eléctricos, el cual puede ser observado en la Figura 5-14.

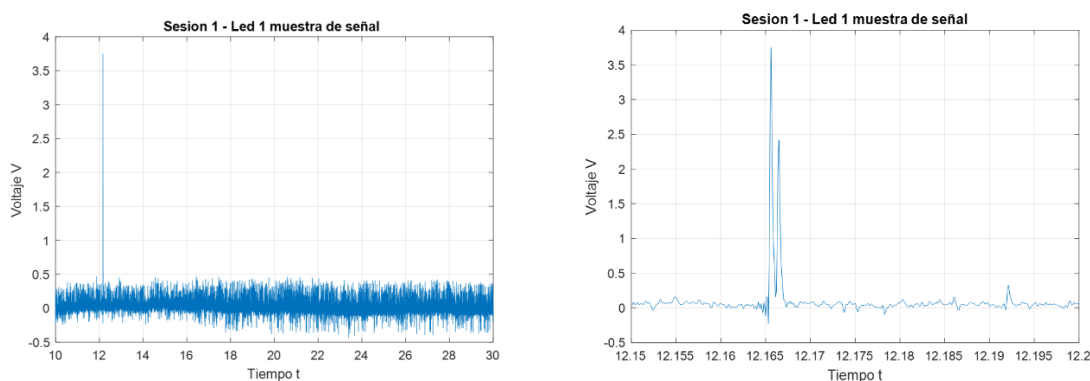


Figura 5-14 Ruido mecánico

Este pico no puede ser asociado a actividad eléctrica. La razón principal para la generación de este pico de amplitud superior puede ser a ruido mecánico en el sistema de instrumentación, *i.e.* un movimiento mecánico no controlado que movió el sello de la pipeta y cambio las características eléctricas de la señal de estudio. Esto puede corroborarse en la Figura 5-14, donde después del pico existe un cambio considerable en las magnitudes y formas de la señal eléctrica, más que nada una amplitud mayor de la señal en general.

En esta etapa no es posible visualizar de manera física cual fue la situación, pero el ruido mecánico si afecta de manera considerable la calidad de la señal eléctrica. Dos situaciones se pudieron presentar a partir del estudio de la señal eléctrica: el movimiento físico del sello o fracturación de la membrana. En la primera situación, espacialmente la pipeta se pudo haberse desplazado de forma tal que el valor de la resistencia del sello fue modificado[5]. Este valor, a mayores valores mejor calidad de señal se obtiene. En el segundo caso, el movimiento del sello pudo haber roto o atravesado la membrana celular. Esta situación no es perjudicial en general, ya que existen al menos 4 formas diferentes de estudio de Patch Clamp, y una de ellas es el estudio de los canales succionando completamente la membrana hasta romperla [6], [11].

Cualquiera de las dos situaciones, conlleva a evaluar el umbral empleado para la detección de potenciales de acción. Esto ya fue considerado con anterioridad al momento de definir los umbrales en esta misma sección.

Observando la actividad eléctrica media del resto de las células, es posible encontrar valores muy similares entre ellas. Como es posible observar, la mayor contribución de

actividad en las fases de reposo puede ser relacionada a la actividad espontanea del tejido del cérvix. De reposo 1 a led 1 no es posible ver un incremento en la actividad, pero esto puede ser causa de que en la fase de reposo 1 se presentó el movimiento mecánico del equipo de instrumentación. Entre la fase de led 1 a reposo 2 la actividad disminuyo, siguiendo una curva de actividad que puede ser vista de manera visual en las gráficas. Y en la fase de led 2 con respecto al resto existe un ligero aumento de la actividad eléctrica media.

Lo anterior, aunado a la prueba de fosforescencia de la opsina sobre el tejido, lleva a concluir que no existe estimulación óptica directa sobre el tejido estudiado. Aun así, la correcta sintetización del tejido no puede ser descarta con facilidad, por lo que es necesario seguir realizando pruebas y evaluaciones sobre la actividad, no solo con diferentes pipetas si no en diferentes regiones físicas del tejido.

5.1.1. Actividad eléctrica media sesión 2

Con motivo de estos resultados, una segunda sesión fue estudiada con el mismo protocolo de post-procesamiento y caracterización de actividad eléctrica media. Un punto importante que tomar en cuenta sobre esta sesión, aparte de la diferencia sustancial sobre las características eléctricas y mecánicas de la pipeta, es el área de succión. Son muchos los factores que entran en juego al momento de elaborar el protocolo de succión de la membrana, el más importante evaluado es la resistencia formada entre la membrana y la punta de la pipeta. Otro factor importante, segundo las características del estudio, es el área de succión.

El área de succión puede ser elegida de manera visual con el microscopio, pero obtener áreas precisas es una tarea complicada debido a las dimensiones de la pipeta, las cuales varían entre cada una aun con el mismo proceso de elaboración. Lo anterior conlleva a que en la sesión 2 el área en el tejido estudiado fue un área completamente diferente a la estudiada en la sesión 1, pudiéndose obtener nuevas e interesantes conclusiones estudiadas a continuación.

En la Figura 5-15 es posible observar los resultados de esta segunda sesión.

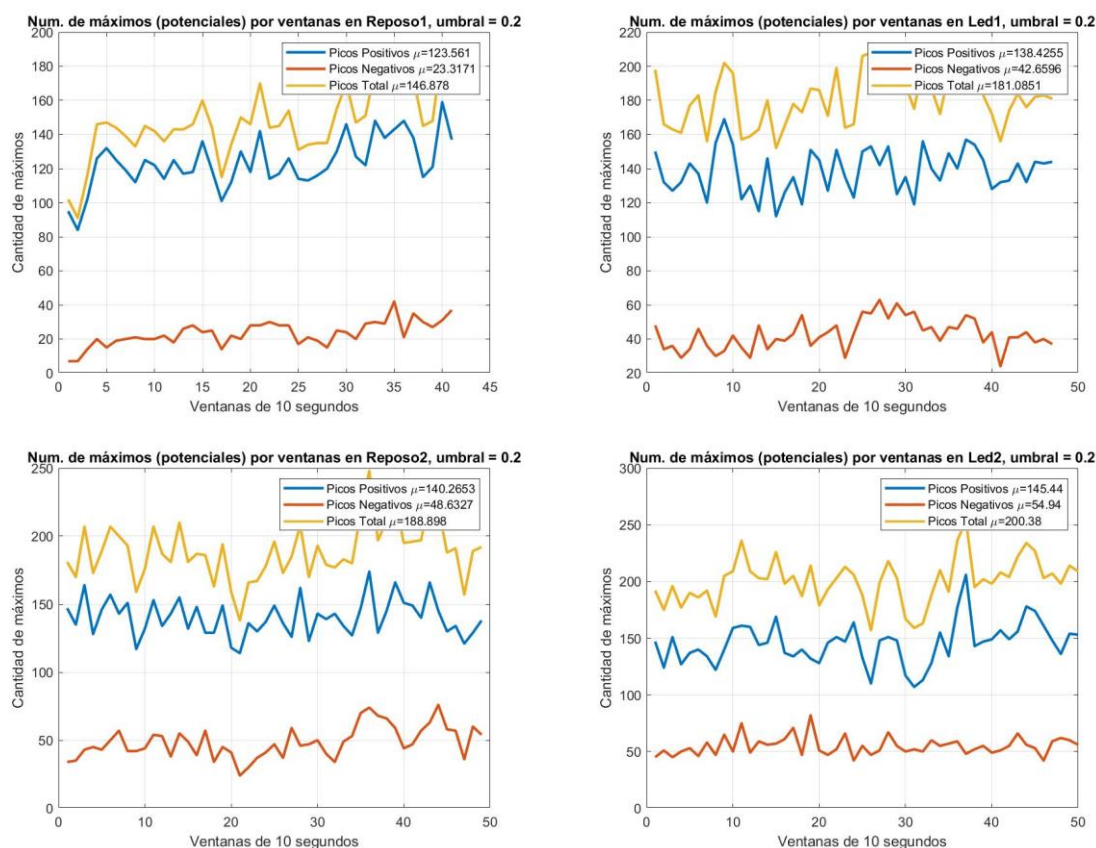


Figura 5-15 Resultados de conteo de detección actividad Sesión 2

Analizando la actividad eléctrica media, empezando por el Reposo 1, vemos que existe una mayor estabilidad a comparación de la sesión 1. Esto producto de la ausencia del ruido mecánico que pudiera interferir en las mediciones, situación que ocurrió en la sesión 1. Una situación muy interesante ocurre entre las fases de Reposo 1 y el Led 1, donde la actividad media aumenta de manera considerable de una fase a otra, de 146.77 a 181.01 picos/10 segundos. En un principio pudiera parecer producto de la aleatoriedad, pero la misma situación es vista entre la fase de Reposo 2 y Led 2, donde existe un incremento de 188.9 a 200 picos/10 segundos. Se puede asociar este incremento a varios factores:

Estimulación óptica por parte del led: en un principio, la hipótesis propuesta de que la opsina se encontraba dentro de la muestra, pero no a cantidades demostrables visualmente, es afirmada por el comportamiento de la actividad eléctrica media presentada en la sesión 2. De igual forma, es posible observar como después de la estimulación óptica (Fase de Led 1) la actividad no disminuye a los valores observados en la fase de Reposo 1. El no disminuir

descarta completamente que el aumento de actividad eléctrica media pueda ser producto de la aleatoriedad o ruido eléctrico debido del equipo de instrumentación. Un fenómeno que es directamente relacionado con este suceso es que, al estimular de alguna manera las células y hacer incrementar su actividad, existe un incremento de la actividad eléctrica espontánea. Lo anterior es debido a la compleja red eléctrica que forman todas las terminales nerviosas y el cómo se retroalimenta las señales eléctricas sobre esta completa red de comunicación.

Estimulación térmica por parte de los fotones emitidos: también, el tejido del cérvix que en condiciones normales se encuentra aislado de la incidencia de luz. Su comportamiento en condiciones ambientales de luz de cualquier tipo no puede ser el mismo que en las condiciones que se encuentra *in vivo*. Esto lleva a la hipótesis de que el aumento de actividad se ve relacionado a una estimulación óptica pero relacionada a la energía térmica transmitida por los fotones al contacto con el tejido. Aunque este tipo de estimulación se puede presumir mínima debido a que la fuente de luz solo se encuentra en un espectro definido y no es constante, no debe de ser rechazada su efecto en la actividad eléctrica media.

Hay un factor interesante que resaltar, y es que el área de grabación en la sesión 2 fue en un área del tejido completamente diferente. Esto ayuda a entender el porqué de la gran diferencia de comportamientos de la actividad eléctrica media entre cada una de las sesiones. Así también, sirve como evidencia sobre la hipótesis de que si existió una sintetización de la opsina, pero a niveles no comprobables visuales y que no puede afectar completamente toda la actividad eléctrica media de al menos la muestra de tejido de cérvix propuesto.

En cualquier hipótesis, aun cuando puede ser incierta la fuente del aumento de la actividad, este fenómeno no puede ser descartado por lo cual más trabajos de estudio sobre el tejido de cérvix son necesarios para poder corroborar alguna de las hipótesis planteadas en este trabajo.

Capítulo 6. Experimentación sobre un individuo *in vivo* y resultados.

Para este apartado, una serie de experimentaciones se llevaron a cabo sobre el sujeto de estudio *in vivo*, no solo el estudio de estimulación optogenética del cérvix. Estos estudios, sirvieron como evidencia para apoyar las afirmaciones propuestas en el apartado anterior. Mas específicamente, estos estudios tratan sobre la caracterización de la oxitocina en diferentes escenarios, tanto escenarios controlados como con estimulación manual y óptica.

6.1. Primer estudio de oxitocina, el reflejo de Ferguson.

Una primera aproximación sobre el estudio de este trabajo fue el trabajo directo sobre el hipotálamo para el control de la producción de Oxitocina. El hipotálamo, junto con la hipófisis, es como tal un conjunto de células neurosecretoras que conectan directamente las señales eléctricas del cerebro con el sistema endocrino. Su control directo podría proporcionar la capacidad de liberación de Oxitocina sobre el sistema sin ningún tipo de problema aumentando directamente los beneficios sobre el individuo. Al ser planteado esto sobre el ser vivo, se concluyó que existen una gran cantidad de factores que hacen que esta tarea no sea factible de llevarse a cabo, entre ellos, la posición del hipotálamo sobre el cerebro y su difícil acceso.

Aun cuando el acceso directo sobre el hipotálamo no era una tarea factible en este estudio, se buscaron alternativas de estimulación o puntos nerviosos directamente conectados al hipotálamo. De ahí, el cérvix es característico por tener una conexión directa, o arco reflejo, con el hipotálamo y que a su vez permite la liberación directa de oxitocina sobre el sistema. Este fenómeno ya ha sido muy estudiado en la medicina y recibe el nombre de reflejo de Ferguson.

Aprovechando este arco reflejo, se desarrolló un primer estudio para comprobar su efectividad para aumentar los niveles de oxitocina en la sangre del individuo de estudio. Este arco reflejo puede ser fácilmente estudiado al realizar una estimulación física directa sobre

el cérvix. Durante al menos 8 minutos se debe de ver un incremento sustancial en los niveles de oxitocina del individuo estudiado.

Entonces, para poder llevar a cabo este estudio se seleccionaron de manera aleatoria 10 vacas del Instituto de Ciencias Veterinarias. A cada una se le midieron sus niveles de oxitocina en dos momentos: antes de la estimulación para obtener un marco de control y 2 minutos después de la estimulación. Los niveles de oxitocina fueron medidos por medio de una prueba ELISA, específicamente el Bovien Oxitocyn EasyTest Competitive ELISA kit de BioAim Scientific Inc. De forma reducida, esta prueba mide los niveles de oxitocina mediante el apoyo de anticuerpos que hacen detectable la hormona por medio de espectrofotometría.

Este estudio fue desarrollado el día 17 de noviembre del 2016. Primeramente, las 10 vacas de estudio fueron situadas en un corralón especial, donde entonces a cada una se les fue extraída una muestra de sangre que serviría como la muestra de control. Subsecuente a esto, una estimulación manual y directa sobre el cérvix fue realizada sobre cada uno de los sujetos, a los cuales después de 2 minutos se les extrajo una segunda muestra de sangre. Las muestras entonces fueron estudiadas por medio de la prueba ELISA y se encontraron sus respectivos niveles de absorción lumínica con el espectrofotómetro.

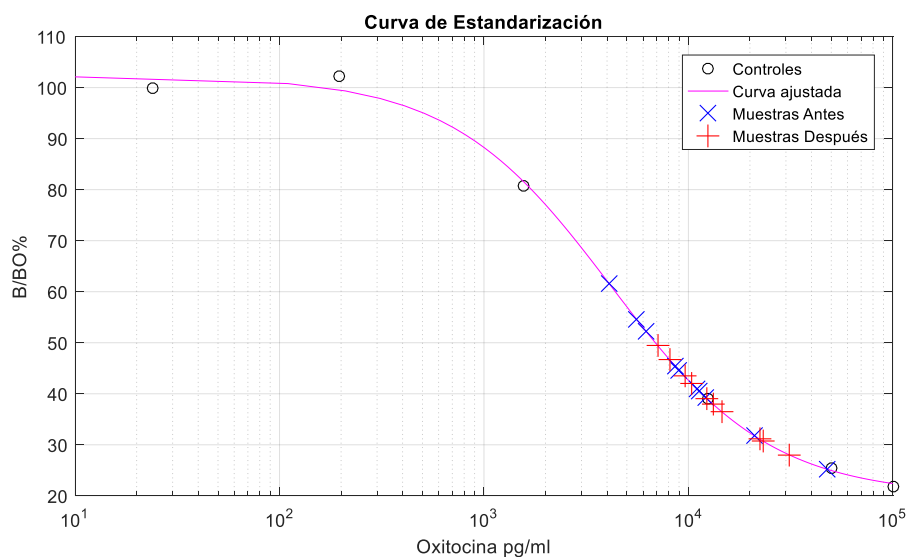


Figura 6-1 Curva de ajuste primer estudio

Para poder encontrar los niveles reales de oxitocina, es necesario transformar los valores de absorción lumínica de cada muestra por medio de una curva de ajuste, la cual

convierte valores de porcentaje de absorción a niveles de pg por ml en una muestra⁶. Esta curva es caracterizada a partir de los niveles de absorción de 6 muestras de control de ajuste (v. Figura 6-1).

Para poder tener una mejor visualización del comportamiento de los niveles de oxitocina en este primer estudio de desarrollo una gráfica de caja de los mismos (v. Figura 6-2), separando la muestra de control con respecto a la muestra con estimulación manual.

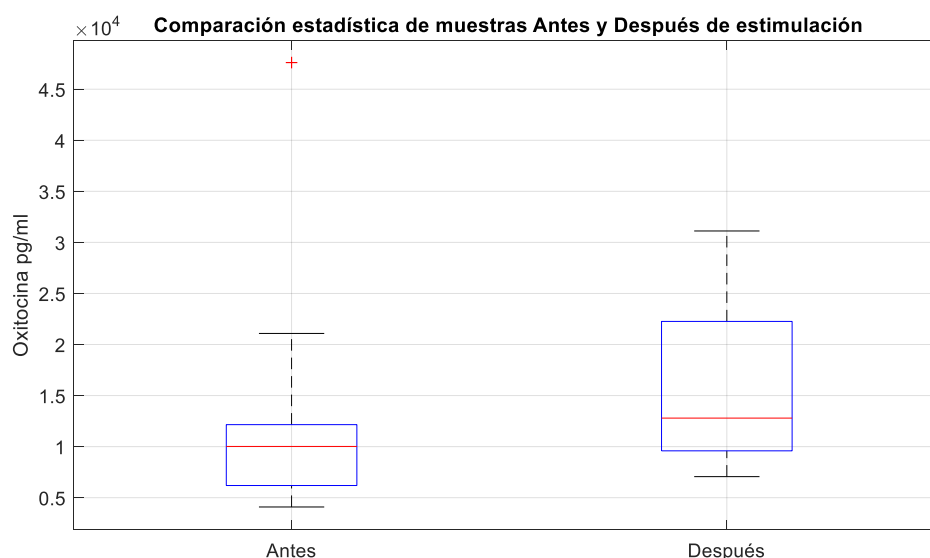


Figura 6-2 Diagrama de caja, primer estudio

Analizando los valores de oxitocina obtenidos en este estudio, es posible ver sin ninguna duda que los niveles entre la muestra de control y la muestra con estimulación aumentaron de manera considerable. Esto es una prueba concluyente de que la estimulación manual, la cual aprovecha el reflejo de Ferguson, sirve como un método directo para aumentar los niveles de oxitocina en la sangre del individuo.

En esta misma gráfica, en la muestra de control es posible observar un valor extremo en el diagrama de caja. No es una situación extraña debido a que toda distribución de datos presenta hasta cierto punto valores extremos que no deben de ser considerados en la estadística de esta. Un segundo diagrama con el desprendido de los niveles de oxitocina, pero

⁶ Cardillo G. (2012) Four parameters logistic regression - There and back again

correspondiente de cada individuo fue obtenido para poder comprender mejor el resultado mostrado por este diagrama de caja.

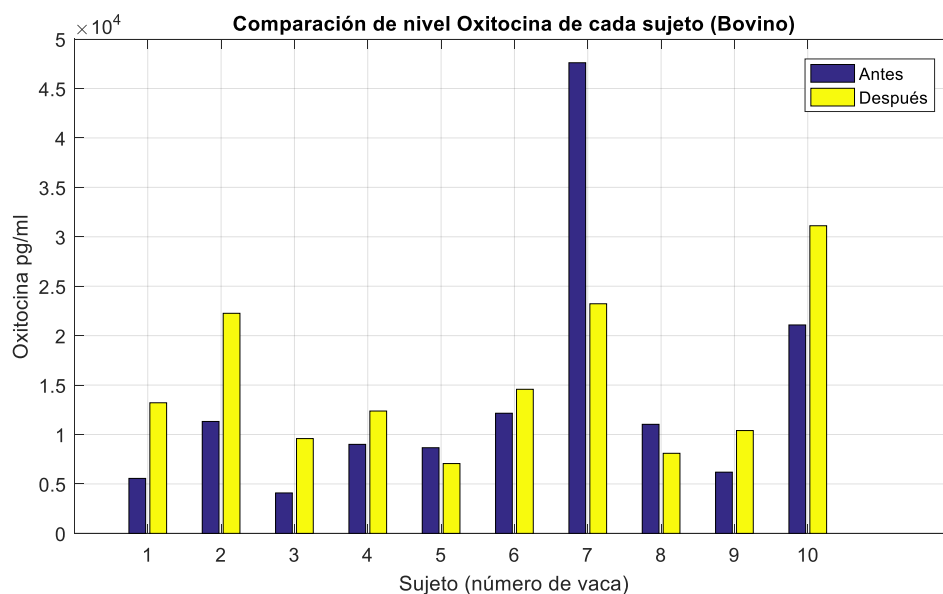


Figura 6-3 Nivel de Oxitocina por cada individuo, primer estudio

En este gráfico (Figura 6-3), dentro del cual se relacionan los niveles por individuo, es posible ver que de las 10 vacas estudiadas 7 presentan aumento en los niveles de oxitocina. Este aumento es producto de la estimulación manual sufrida por las mismas, conclusión ya mostrada con anterioridad. Así mismo, 3 de estas 10 vacas no presentaron un aumento en el nivel de oxitocina. Este fenómeno se puede presentar por muchas, razones, entre ellas podemos destacar:

- Mal condicionamiento del ambiente que rodea al sujeto de estudio.
- Estimulación deficiente.
- Mala sincronización entre estimulación y toma de muestra.
- Efectos secundarios del clima.
- Condiciones hormonales no favorables.

De igual forma, se observa que un caso muy particular es el del sujeto 7, el cual presenta de forma inicial un nivel de oxitocina muy por encima del resto de los sujetos. Este valor bien pudo haber sido de igual forma de alguna de las razones expresadas con anterioridad o bien una muestra deficiente la cual no pueda ser evaluada por medio del kit de

ELISA. Independientemente de los casos especiales, con las 7 de las 10 vacas se tiene una clara evidencia de la eficacia del reflejo de Ferguson para la liberación de oxitocina en la sangre.

Tabla 6-1 Nivel de Oxitocina por individuo

Sujeto	Arete de identificación	Nivel Oxitocina pg/ml	
		Antes	Después
1	112	5560.88582	13211.3163
2	151	11321.2056	22262.0278
3	190	4090.37994	9588.29586
4	145	9004.65818	12376.1378
5	228	8665.73511	7061.88236
6	179	12153.0151	14574.9101
7	104	47609.2949	23226.8034
8	216	11032.0778	8099.8642
9	207	6192.07674	10400.1253
10	142	21083.5693	31118.5996

6.2. Inserción de virus

Como se menciona en capítulos anteriores, el virus para la transfección genética fue el AVV9.CAG.hChR2(H134R)-mCherry.WPRE.SV40. Este virus del tipo adenoasociados setoritpo 9 es preparado a partir del plásmido pAAV.CAG.hChR2(H134R)-mCherry.WPRE.SV40. El plásmido realmente es quien contiene la información genética para ser introducida a la célula objetivo, mientras que el virus adenoasociados es un protocolo de preparación para que este sea introducido a la misma.

Este plásmido fue creando en los laboratorios del doctor Karl Deisseroth y puede ser encontrado en Addgene bajo el número de catálogo de 100054. Una vista del mapa de la secuencia puede ser encontrada en la Figura 6-4.

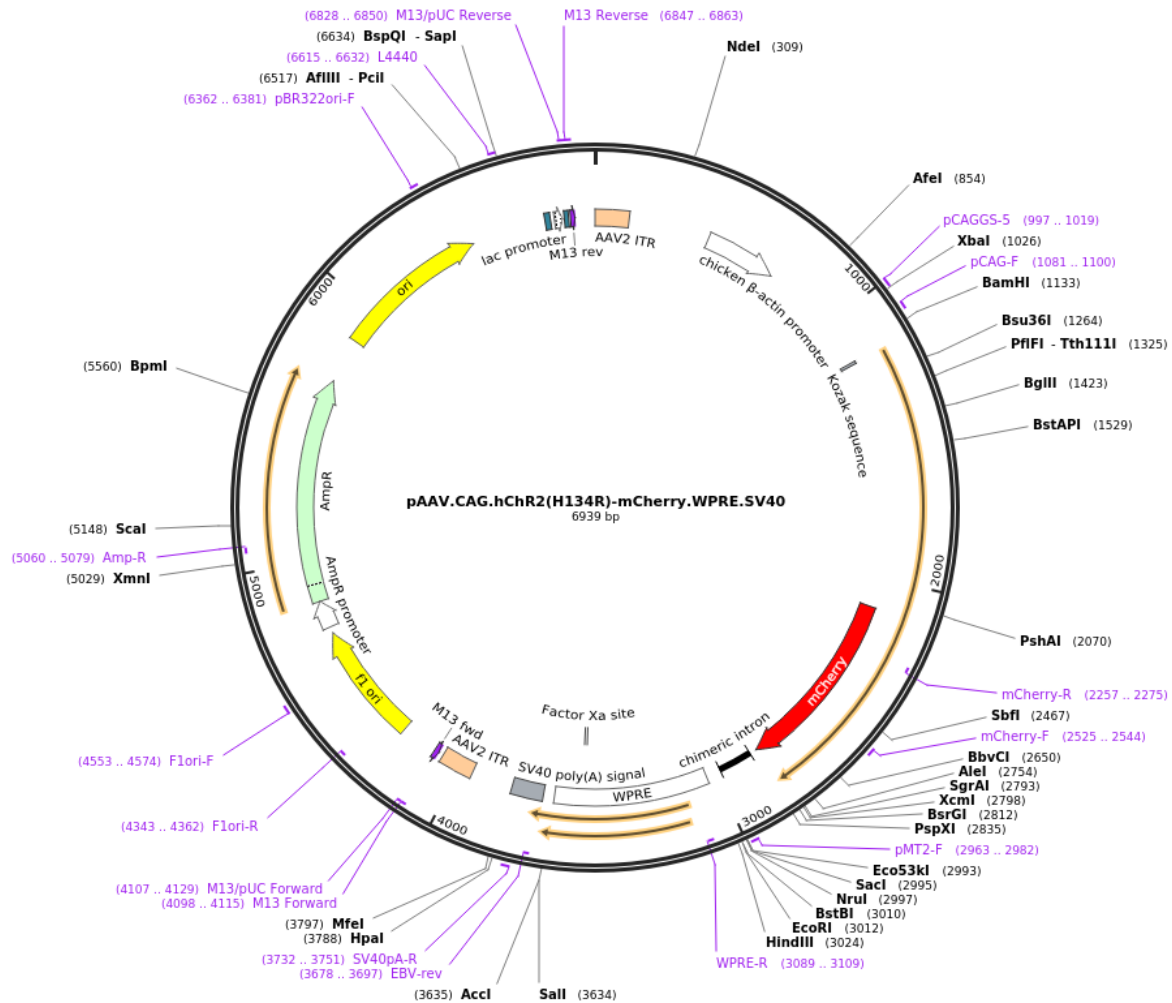


Figura 6-4 Mapa de secuencia del plásmido

La selección de este virus fue llevada a cabo después de un profundo estudio en la literatura sobre virus compatibles y aplicados a musculo liso. El virus adenoasociados serotipo 9 (AVV9) ha sido reportado en varios estudios como efectivo en la transfección de virus en ratones[49], [50]. Aunque una vaca es un organismo completamente diferente de un ratón, el cual cuenta con un ambiente más controlado y una gran cantidad de estudios característicos, se puede llegar la hipótesis de que al ser las dos especies mamíferas la transfección puede ocurrir de manera muy similar. Así mismo, como es también mencionado con anterioridad, el promotor CAG (Chicken β -actin en el mapa de secuencia) es elegido gracias a la facilidad con la que puede ser identificado por la mayoría e las células para su secuenciación[49], [51]–[53].

La opsina, elegida en esta situación, fue la Canaraldopsina hChR2(H134R), la cual es una de las opsina para depolarización de las células más empleadas en la literatura[7], [17], [22], a su vez que la proteína fosforescente mCherry.WPRE.SV40, que es una de las proteínas fosforescentes (para la identificación visual de la correcta transfección genética) que más comúnmente acompaña a la Canaraldopsina.

El virus, ya preparado y listo para su inserción fue obtenido directamente del repositorio de Virus de la Universidad de Pennsylvania, en Estados Unidos, y fue resguardado en el Instituto de Ingeniería hasta su empleo.

Un sujeto de estudio fue elegido sobre el resto en el Instituto de Ciencias Veterinarias. Este sujeto, una vaca del establo del instituto, cuenta con el número de arete identificación 120 que lo distingue del resto de las vacas en el lugar. El virus fue insertado sobre el cérvix en el sujeto el día 30 de noviembre del 2017 en el área mostrada en la Figura 5-4. El protocolo de inserción fue elaborado y llevado a cabo por el Doctor González Vizcarra apoyándose de su experiencia en el manejo de esta especie de bovinos. El virus, acorde a la literatura, necesita aproximadamente entre 2 a 3 semanas para su incubación y correcta sintentización dentro de las células objetivo del individuo. Una inspección visual fue programada el día 19 de enero del 2018 para verificar que el sujeto tuviera una respuesta favorable al virus insertado y probar si la prueba de fosforescencia pudiera ser aplicada sobre el sujeto *in vivo*. En la Figura 6-5 se puede observar con claridad la imagen de este estudio.



Figura 6-5 Imagen del cérvix 3 semanas después de la transfección

En esta inspección visual se puede notar que no existe ningún tipo de respuesta negativa del sujeto a la transfección genética de la opsina. Mas aun la prueba de fosforescencia, aplicada también al tejido extraído del mismo sujeto, tampoco mostro algún indicio de la opsina. Lo anterior tiene sentido debido a que la fosforescencia en general es detectada a nivel celular al solo estar presente en cierta cantidad de células, y propiamente dicho, sobre la membrana celular de las mismas. El no tener una respuesta negativa del sujeto a la inserción del virus sirve como indicio para poder proseguir con el siguiente proceso en la experimentación.

6.3. Segundo estudio de oxitocina, estimulación óptica del cérvix

Comprobado que la inserción no presentó efectos negativos sobre el sujeto de estudio, se programó un segundo estudio de oxitocina. Este fue separado en dos etapas principales: la estimulación óptica y la extracción de la biospia. Las dos se manejaron como un solo experimento por lo que fueron realizadas el mismo día, el 4 de mayo del 2018. En este experimento participaron los doctores Vizcarra, Carlos Villa y Ricardo Morales, así como estudiantes del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias.

6.3.1. Estimulación óptica

El protocolo de estimulación óptica fue el mismo que el presentado para la estimulación óptica el tejido extraído del sujeto de estudio, del cual se cuenta con más detalle en la sección anterior. Recapitulando, esta estimulación fue por medio de una fuente de luz intermitente, a una frecuencia de 30 Hz y una potencia de 1000 mA. La elección nuevamente de estos valores es basada a los valores actuales empleados en una gran cantidad de estudios donde existe una estimulación optogenética.

Esta estimulación óptica directa sobre el cérvix tuvo una duración aproximada de 10 minutos. Para medir la efectividad de la estimulación un segundo estudio sobre los niveles de oxitocina fue efectuado a la par de la estimulación.

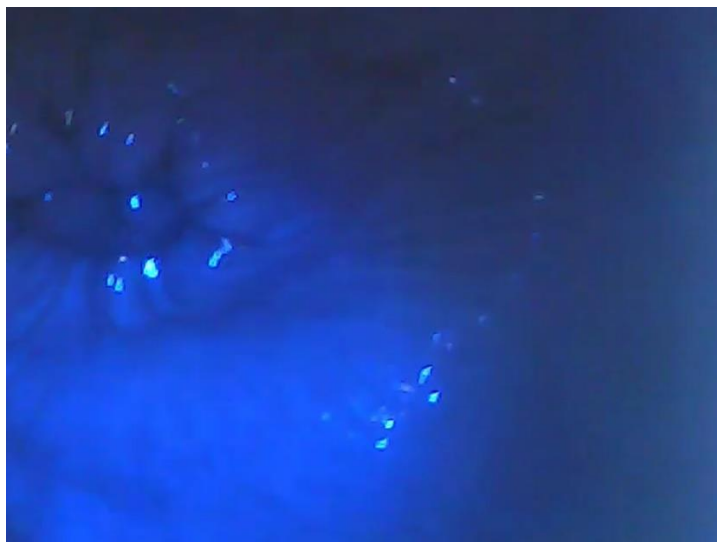


Figura 6-6 Estimulación óptica sobre el cérvix

6.3.2. Niveles de oxitocina relacionados a la estimulación óptica

Este segundo estudio consistió en medir los niveles de oxitocina del sujeto de estudio (con estimulación) y un sujeto de control (que no presentara estimulación óptica ni presencia de opsina en su organismo). A diferencia del primer estudio de oxitocina, en este se trató de caracterizar la curva de oxitocina que muchos otros estudios en la literatura ya han representado. Para poder tener la mejor representación posible, con la cantidad de pozos sobrantes de la primera prueba de ELISA, se llegó a la conclusión de usar 4 muestras por sujeto para formar la curva característica, las cuales de manera individual consisten en lo siguiente:

- Muestra 1: de referencia antes de la estimulación
- Muestra 2: 2 minutos después de la estimulación
- Muestra 3: 4 minutos después de la estimulación
- Muestra 4: 8 minutos después de la estimulación

Las cuales fueron repetidas tanto para el sujeto de control como el sujeto con la opsina. De la misma manera que en el primer estudio de oxitocina, una curva de control fue desarrollada con los controles proporcionados para esa sesión, curva que sirve para transformar los valores de nivel de absorción lumínica a nivel de oxitocina pg por cada ml. Esta segunda curva puede ser observada a continuación:

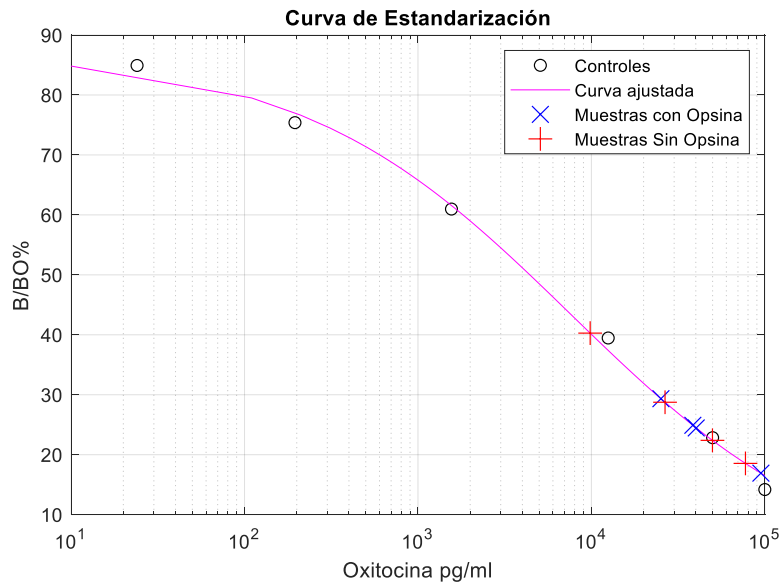


Figura 6-7 Curva de ajuste, segundo estudio

Aunque en la misma curva se pueden apreciar donde se sitúan las muestras con y sin opsina, estos niveles pueden ser mejor apreciados en un diagrama de caja elaborado con el software de Matlab, el cual es mostrado en la Figura 6-8.

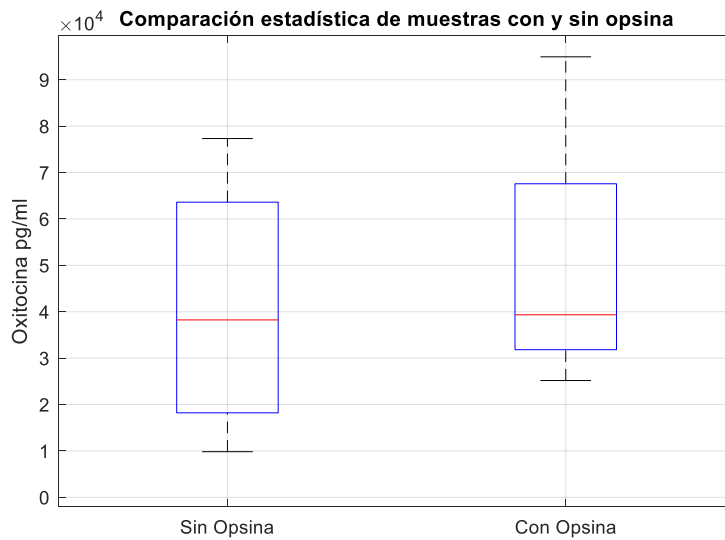


Figura 6-8 Diagrama de caja, segundo estudio

Tabla 6-2 Nivel de Oxitocina, segundo estudio

Sujeto	Nivel de Oxitocina pg/ml	
	Sin opsina	Con Opsina
1	25175.5	26584.11
2	40222.56	9839.283
3	94941.02	77330.38
4	38465.16	49891.22

Esta primera figura tiene como objetivo comparar los diferentes niveles de oxitocina entre los dos sujetos. En un principio se ve que los niveles de un sujeto están por encima del otro, específicamente la vaca con la opsina presenta niveles ligeramente superiores con respecto a la vaca sin la opsina. De aquí, hay que recordar que los niveles entre sujetos pueden variar, situación que fue observada en el primer estudio de oxitocina, así que en un principio puede ser que el sujeto con opsina pueda tener una tendencia a tener niveles literalmente mayores al sujeto sin opsina. Datos aún más relevantes pueden ser obtenidos del análisis de este gráfico, y es que es importante recalcar la gran variabilidad de los datos con respecto a su centro de la muestra sin opsina a comparación de la centralidad de los datos con respecto a la muestra con opsina.

Un segundo grafico fue obtenido y mostrado en la Figura 6-9 partiendo de los mismos datos, pero con una interpretación diferente, donde cada muestra es puesta con respecto al tiempo en que fueron tomadas. De esta figura otras conclusiones interesantes pueden ser obtenidas al estudiarla y combinarla con la información obtenida gracias al diagrama de caja.

Analizando primeramente los datos con respecto a la variable temporal de la muestra con opsina, es posible observar de manera muy clara el desenvolvimiento de una curva que va creciendo con respecto al tiempo, y que al alcanzar un valor máximo en los datos muestreados esta curva empieza a decaer. Este comportamiento es el esperado al momento de caracterizar la curva de oxitocina cuando una vaca es estimulada, y puede ser comparada a otras curvas características obtenidas en diferentes trabajos de la literatura [36].

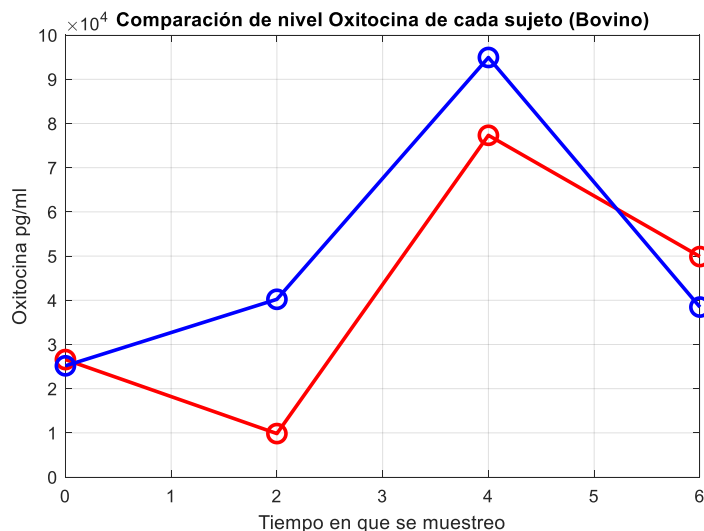


Figura 6-9 Curvas del nivel de Oxitocina del sujeto de estudio y control

Un caso interesante resulta en la vaca que sirve como control. En este sujeto los niveles con respecto a la variable temporal no presentan una curva característica. Su comportamiento puede ser visto más como efecto de la aleatoriedad producto de la misma inconsistencia de los niveles de oxitocina en los propios individuos. Lo anterior, se afirma con el primer estudio de oxitocina, donde entre cada individuo los niveles de oxitocina varían de manera considerable, y que no todos presentan un aumento propio o característico acorde a lo estipulado en las hipótesis de este trabajo. La aleatoriedad y poca consistencia de los niveles de oxitocina del sujeto es también evidenciada por la variabilidad de los datos presentada en el diagrama de caja de la Figura 6-8. Estas dos pruebas son evidencia suficiente para concluir que el comportamiento con respecto a la variable temporal de la muestra sin opsina es más producto de la aleatoriedad que un evento condicionado como es el caso de la muestra con opsina.

Los resultados obtenidos en esta sección se complementan con los obtenidos sobre el estudio electrofisiológico sobre el tejido de extracción. Retomando los resultados y conclusiones obtenidas anteriormente, se vio un ligero aumento en la actividad eléctrica del tejido de cérvix al estimular por medio de luz led durante la sesión 2. Este aumento, aunque no es sustancial, si puede ser significativo al complementarlo con los resultados obtenidos con los niveles de oxitocina. Al haber una curva característica de aumento en el nivel de oxitocina, indica que de alguna manera el virus sí se sintetizo sobre el tejido del cérvix, quizás

no en cantidades sustanciales o en el área exacta donde se realizó la biopsia, pero si a cantidades suficientes como para representar un cambio directo sobre los niveles hormonales del individuo estudiado.

6.3.3. Extracción de tejido

Paralelamente a lo experimento de estimulación óptica y a la medición de los niveles de oxitocina condicionados a esta estimulación, se programó una extracción de biopsia del cérvix. Esta biopsia fue el tejido con el cual se trabajó y se estudió en secciones anteriores, de tal forma que se pudiera obtener una caracterización eléctrica de la estimulación óptica.

El tejido fue extraído por parte del Doctor González Vizcarra del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. El tratamiento y manejo del tejido fue el ya estipulado en los inicios del capítulo 6, así como también es explicado a detalle todo el estudio y resultados que conllevaron al mismo.

Esta biopsia fue extraída posteriormente a la experimentación óptica y toma de sangre por parte del individuo de estudio. El orden de lo anterior fue acordado debido a que, para la extracción de la biopsia fuera realizada en las condiciones de seguridad adecuadas, el sujeto fue sometido a una anestesia local. Esta anestesia en un principio pudo afectar la forma y resultados de los experimentos de estimulación óptica, por lo que fue prescindible que fuese realizada hasta el final. La zona de extracción de la biopsia, aunque no puede ser manejada con exactitud, fue lo más próxima al área de inserción del virus.

Capítulo 7. Conclusiones y trabajos a futuro.

Varias fueron las discusiones realizadas a lo largo de este trabajo con respecto a la interpretación de los resultados obtenidos en cada fase de los procesos de experimentación. Por una parte, la actividad eléctrica en al menos una de las sesiones de medición aumento ligeramente por efecto de la estimulación por medio de luz, lo cual fue un indicativo de que la reproducibilidad del virus fue mínima pero significativa.

Por otra parte, el comportamiento de los niveles de oxitocina sobre el individuo con la opsina al momento de ser este estimulado por medio de la luz muestra que sí existe una relación directa entre el aumento de la oxitocina en la sangre con respecto a la estimulación óptica, y todo esto gracias a la opsina insertada en el cérvix, produciendo un arco reflejo hacia el hipotálamo.

Los resultados, estudiados como un conjunto, muestran la efectividad del uso de la opsina para la estimulación indirecta del hipotálamo. Sin embargo, mas estudios son necesarios para enriquecer el método científico presentado en este trabajo.

Entre los estudios a futuro previstos se cuenta con:

- Extracción de mas biopsias: mas biopsias son necesarias para poder fundamentar las conclusiones obtenidas en este trabajo. Contar con más datos llevará al estudio a conclusiones más robustas y objetivas.
- Empleo de mas virus: un efecto interesante sobre el sujeto de estudio es ver los efectos o no efectos que podrían traer los diferentes virus que existen en el mercado, así como el uso de diferentes opsinas que permiten extender las formas de control sobre las células (hiperpolarización, biestables, etc.)
- Ampliación de la muestra de sujetos de estudio y control: debido a las capacidades técnicas y económicas, el estudio de la inserción y control por medio de la opsina solo fue realizada sobre un sujeto. Una extensión interesante a este trabajo sería el análisis de varios sujetos con la misma opsina, y la comparación de los niveles de oxitocina y actividad eléctrica sobre cada uno.

- Equipo de estimulación in vivo: aunque en este trabajo se presentó una estimulación in vivo sobre el sujeto de estudio, es necesario en un futuro mejorar esta prueba al desarrollar un equipo de estimulación integrado sobre el sujeto de estudio. Esto puede ser logrado al desarrollar un equipo inalámbrico de baja potencia que pueda ser insertado de manera quirúrgica sobre el sujeto para estudiar los efectos de la estimulación en ambientes más realistas.

En general, este trabajo puede ser visto como un estudio preliminar sobre los efectos y las ventajas del uso de la optogenética para el control directo del sistema endocrino de los bovinos. Muchas son las vertientes que pueden nacer a partir de esta primera aproximación. Al ser el primer trabajo del área de optogenética no solo en la institución, si no un estado del arte en su área, se busca que sea el primero de muchos trabajos sobre el empleo de este tipos de metodologías interdisciplinarias, para encontrar la solución de los problemas a los cuales nos enfrentamos en la actualidad.

Referencias

- [1] G. Bylund and A. L. Gómez, *Manual de industrias lácteas*. Mundi-Prensa, 2003.
- [2] R. Gasqué Gómez, *Enciclopedia Bovina*, Primera Ed. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2008.
- [3] A. Correa-Calderon, L. Avendano-Reyes, A. Rubio-Villanueva, D. V. Armstrong, J. F. Smith, and S. K. Denise, “Efecto de un sistema de enfriamiento en la productividad de vacas lecheras bajo estrés calórico,” *Agrocencia*, vol. 36, no. 5, pp. 531–539, 2002.
- [4] D. Purves *et al.*, *Neuroscience*. 2007.
- [5] A. Molleman, *Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology*, no. 1949. John Wiley & Son, 2003.
- [6] R. Sherman-Gold, “The Axon Guide,” no. 2500, pp. 1–286, 2008.
- [7] K. Deisseroth, “Controlling the Brain with Light,” *Sci. Am.*, no. November, pp. 48–55, 2010.
- [8] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell, *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana de España, 2001.
- [9] B. Barbour, “Electronics for electrophysiologists,” *October*, pp. 1–23, 2011.
- [10] J. D. Louis, *Electrical properties of Cells. Patch Clamp for Biologists*. 1997.
- [11] Y. Okada, *Patch clamp techniques : from beginning to advanced protocols*. 2012.
- [12] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth, “Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches,” *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 391, no. 2, pp. 85–100, 1981.
- [13] K. Deisseroth, “Optogenetics,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 1, pp. 26–29, 2011.
- [14] O. Yizhar, L. E. Fenno, T. J. Davidson, M. Mogri, and K. Deisseroth, “Optogenetics in Neural Systems,” *Neuron*, vol. 71, no. 1, pp. 9–34, 2011.
- [15] K. M. Tye and K. Deisseroth, “Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 13, no. 4, pp. 251–266, 2012.
- [16] F. Zhang *et al.*, “The microbial opsin family of optogenetic tools,” *Cell*, vol. 147, no. 7, pp. 1446–1457, 2011.

- [17] K. Deisseroth and P. Hegemann, “The form and function of channelrhodopsin,” *Science* (80-.), vol. 357, no. 6356, Sep. 2017.
- [18] L. Fenno, O. Yizhar, and K. Deisseroth, “The Development and Application of Optogenetics,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 34, no. 1, pp. 389–412, 2011.
- [19] F. Zhang *et al.*, “Optogenetic interrogation of neural circuits: Technology for probing mammalian brain structures,” *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 3, pp. 439–456, 2010.
- [20] M. R. Warden, J. A. Cardin, and K. Deisseroth, “Optical Neural Interfaces,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 16, no. 1, pp. 103–129, 2014.
- [21] H. E. Kato *et al.*, “Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel,” *Nature*, vol. 482, no. 7385, pp. 369–374, 2012.
- [22] G. Nagel *et al.*, “Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 24, pp. 13940–13945, 2003.
- [23] J. Mattis *et al.*, “Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 2, pp. 159–172, 2012.
- [24] A. Berndt, O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann, and K. Deisseroth, “Bi-stable neural state switches,” *Nat. Neurosci.*, vol. 12, no. 2, pp. 229–234, 2009.
- [25] L. Paterson *et al.*, “Photoporation and cell transfection using a violet diode laser,” *Opt. Express*, vol. 13, no. 2, p. 595, 2005.
- [26] M. Tsukakoshi, S. Kurata, Y. Nomiya, Y. Ikawa, and T. Kasuya, “A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery,” *Appl. Phys. B Photophysics Laser Chem.*, vol. 35, no. 3, pp. 135–140, 1984.
- [27] A. G. Teschemacher *et al.*, “Targeting specific neuronal populations using adeno- and lentiviral vectors: Applications for imaging and studies of cell function,” *Exp. Physiol.*, vol. 90, no. 1, pp. 61–69, 2005.
- [28] M. Antkowiak, M. L. Torres-Mapa, E. C. Witts, G. B. Miles, K. Dholakia, and F. J. Gunn-Moore, “Fast targeted gene transfection and optogenetic modification of single neurons using femtosecond laser irradiation,” *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–8, 2013.
- [29] A. M. Aravanis *et al.*, “An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology,” *J. Neural Eng.*, vol. 4, no. 3, 2007.

- [30] C. M. Ambrosi and E. Entcheva, "Optogenetic Control of Cardiomyocytes via Viral Delivery," vol. 1181, pp. 215–228, 2014.
- [31] E. Entcheva, "A step closer to cardiac optogenetics in vivo," *Cardiovasc. Res.*, vol. 106, no. 2, pp. 180–181, 2015.
- [32] K. Deisseroth, "Optogenetics and psychiatry: Applications, challenges, and opportunities," *Biol. Psychiatry*, vol. 71, no. 12, pp. 1030–1032, 2012.
- [33] E. H. Wichmann, *Física Cuántica*. Reverté, 1972.
- [34] G. Gimpl and F. Fahrenholz, "The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation," *Regulation*, vol. 81, no. 2, pp. 629–683, 2009.
- [35] L. Dixon, J. Skinner, and M. Foureur, "The emotional and hormonal pathways of labour and birth : integrating mind , body and behaviour," *New Zeal. Coll. Midwives J.*, vol. 48, no. July, pp. 15–24, 2013.
- [36] M. A. Sutherland and M. Tops, "Possible involvement of oxytocin in modulating the stress response in lactating dairy cows," *Front. Psychol.*, vol. 5, no. AUG, pp. 1–7, 2014.
- [37] C. Cotea, O. Z. Oprean, P. B. O. I. Ș. Teanu, C. Solcan, and I. Cotea, "The Nuclei of the Hypothalamus in Cow," *Cercet. Agron. în Mold.*, vol. 4, no. 132, pp. 71–79, 2007.
- [38] A. M. Blanks and S. Thornton, "The role of oxytocin in parturition," *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 110, no. SUPPL. 20, pp. 46–51, 2003.
- [39] H. N. Aguilar and B. F. Mitchell, "Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility," *Hum. Reprod. Update*, vol. 16, no. 6, pp. 725–744, 2010.
- [40] L. Toro, E. Stefani, and S. Erulkart, "Hormonal Regulation Of Potassium Currents in Single Myometrial Cells," *Biophysics (Oxf).*, vol. 87, no. April, pp. 2892–2895, 1990.
- [41] K. Nakao, Y. Inoue, K. Okabe, T. Kawarabayashi, and K. Kitamura, "Oxytocin enhances action potentials in pregnant human myometrium - A study with microelectrodes," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 177, no. 1, pp. 222–228, 1997.
- [42] Y. Katz, O. Yizhar, J. Staiger, and I. Lampl, "Optopatcher-An electrode holder for simultaneous intracellular patch-clamp recording and optical manipulation," *J. Neurosci. Methods*, vol. 214, no. 1, pp. 113–117, 2013.
- [43] M. Instruments, "MAX44250 / MAX44251 / MAX44252 Absolute Maximum Ratings

20V , Ultra-Precision , Low-Noise Op Amps Package Thermal Characteristics (Note 1).” pp. 1–14.

- [44] M. Instruments, “CMOS Monolithic Voltage Converter,” *Current*. pp. 1–12.
- [45] D. M. Mathis, J. L. Furman, and C. M. Norris, “Preparation of Acute Hippocampal Slices from Rats and Transgenic Mice for the Study of Synaptic Alterations during Aging and Amyloid Pathology,” *J. Vis. Exp.*, no. 49, pp. 1–9, 2011.
- [46] J. R. Moyer and T. H. Brown, “Methods for whole-cell recording from visually preselected neurons of perirhinal cortex in brain slices from young and aging rats,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 86, no. 1, pp. 35–54, 1998.
- [47] W. Wolfgang, *Patch-Clamp Analysis*, Second. Human Press.
- [48] D. Ogden and P. Stanfield, “Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording,” *Currents*, vol. 2, no. 7, pp. 53–78, 1981.
- [49] T. Bruegmann, T. Van Bremen, C. C. Vogt, T. Send, B. K. Fleischmann, and P. Sasse, “Optogenetic control of contractile function in skeletal muscle,” *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–8, 2015.
- [50] R. Raman *et al.*, “Optogenetic skeletal muscle-powered adaptive biological machines,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 13, pp. 3497–3502, 2016.
- [51] Z. Jia *et al.*, “Stimulating cardiac muscle by light cardiac optogenetics by cell delivery,” *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.*, vol. 4, no. 5, pp. 753–760, 2011.
- [52] T. Bruegmann *et al.*, “Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo,” *Nat. Methods*, vol. 7, no. 11, pp. 897–900, 2010.
- [53] J. Yu and E. Entcheva, “Inscribing Optical Excitability to Non-Excitable Cardiac Cells: Viral Delivery of Optogenetic Tools in Primary Cardiac Fibroblasts,” vol. 1408, pp. 303–317, 2016.

Anexos

Programas de Matlab

ELISA

```
clear
clc

ELISA1 = xlsread('Elisa 2016-11-17.xlsx');
stdx = ELISA1(2:7,1);
stdy = ELISA1(2:7,3:4);
BLK = ELISA1(1,3:4);
BO = ELISA1(8,3:4);

BBO = ((mean(stdy,2)-mean(BLK))./(mean(BO,2)-mean(BLK)))*100;
[cf G] = L4P(stdx,BBO);

MA = zeros(10,2); i = 9;
for k=1:10
    MA(k,:) = ELISA1(i,3:4)*2;
    i = i + 2;
end

MD = zeros(10,2); i = 10;
for k=1:10
    MD(k,:) = ELISA1(i,3:4)*2;
    i = i + 2;
end

BBOMA = ((mean(MA,2)-mean(BLK))./(mean(BO)-mean(BLK)))*100;
BBOMD = ((mean(MD,2)-mean(BLK))./(mean(BO)-mean(BLK)))*100;

oMA = L4Pinv(cf,BBOMA);
oMD = L4Pinv(cf,BBOMD);

display('Niveles de Oxitocina, Muestras Antes')
display(oMA)

display('Niveles de Oxitocina, Muestras Después')
display(oMD)

figure(1)
clf
semilogx(stdx,BBO,'ko')
hold on
plot(cf,'m');
plot(oMA,BBOMA,'bx','MarkerSize',12)
plot(oMD,BBOMD,'r+', 'MarkerSize',12)
ylabel('B/BO%')
xlabel('Oxitocina pg/ml')
title('Curva de Estandarización')
grid
```

```

legend('Controles','Curva ajustada','Muestras Antes','Muestras
Después')

figure(2)
clf
boxplot([oMA,oMD], 'Labels',{ 'Antes', 'Después'})
ylabel('Oxitocina pg/ml')
grid
title('Comparación estadística de muestras Antes y Después de
estimulación')

figure(3)
clf
y = [oMA,oMD];
bar(y)
grid
xlabel('Sujeto (número de vaca)')
ylabel('Oxitocina pg/ml')
legend('Antes','Después')
title('Comparación de nivel Oxitocina de cada sujeto (Bovino)')

temp = [(1:10)',oMA,oMD];
xlswrite('OxMAD.xlsx',temp)

```

ELISA2

```

clear
clc

ELISA1 = xlsread('Elisa 2018-05-22.xlsx','Impresión 2');
stdx = ELISA1(2:7,1);
stdy = ELISA1(2:7,3:4);
BLK = ELISA1(1,3:4);
BO = ELISA1(8,3:4);

BBO = ((mean(stdy,2)-mean(BLK))./(mean(BO,2)-mean(BLK)))*100;
[cf, ~] = L4P(stdx,BBO);

MO = ELISA1(9:12,3:5);
MSO = ELISA1(13:16,3:5);

BBOMO = ((mean(MO,2)-mean(BLK))./(mean(BO)-mean(BLK)))*100;
BBOMSO = ((mean(MSO,2)-mean(BLK))./(mean(BO)-mean(BLK)))*100;

oMO = L4Pinv(cf,BBOMO);
oMSO = L4Pinv(cf,BBOMSO);

display('Niveles de Oxitocina, Muestras con Opsina')
display(oMO)

display('Niveles de Oxitocina, Muestras sin Opsina')
display(oMSO)

figure(1)

```

```

clf
semilogx(stdx,BBO,'ko')
hold on
plot(cf,'m');
plot(oMO,BBOMO,'bx','MarkerSize',12)
plot(oMSO,BBOMSO,'r+','MarkerSize',12)
ylabel('B/BO%')
xlabel('Oxitocina pg/ml')
title('Curva de Estandarización')
grid
legend('Controles','Curva ajustada','Muestras con Opsina','Muestras Sin Opsina')

figure(2)
clf
y = [oMO,oMSO];
bar(y)
grid
xlabel('Muestra')
ylabel('Oxitocina pg/ml')
legend('Con Opsina','Sin Opsina')
title('Comparación de nivel Oxitocina de cada sujeto (Bovino)')
%{
figure(2)
clf
boxplot([oMA,oMD],'Labels',{'Antes','Después'})
ylabel('Oxitocina pg/ml')
grid
title('Comparación estadística de muestras Antes y Después de estimulación')
%}

%{
plot([0 2 4 6],oMSO,'r-o','LineWidth',2,'MarkerSize',10)
hold on
plot([0 2 4 6],oMO,'b-o','LineWidth',2,'MarkerSize',10)
grid
xlabel('Tiempo en que se muestreo')
ylabel('Oxitocina pg/ml')
title('Comparación de nivel Oxitocina de cada sujeto (Bovino)')
%}
temp = [(1:4)',oMO,oMSO];
xlswrite('OxMAD.xlsx',temp)

```

CaracterizacionPA

```

clc
clf
clear
Direccion = 'C:\Users\Marco\Google Drive\Neurociencias\Pruebas de tejido 2018-04-05\Sesion1\';
Archivo = 'Reposol';
load([Direccion,Archivo,'\',Archivo,'.mat']);

%Diseño de Filtro Fir

```

```

N = 100; % Orden del filtro
Fp = 3e3; % 3 kHz Frecuencia de corte
Fs = 10e3; % 10 kHz Frecuencia de muestreo
Rp = 0.00057565; % Correspondiente a 0.01 dB peak-to-peak ripple
Rst = 1e-4; % Correspondiente a 80 dB de la banda de atenuación
eqnum = firceqrip(N,Fp/(Fs/2),[Rp Rst], 'passedge'); % eqnum = vec of
coeffs
lowpassFIR = dsp.FIRFilter('Numerator',eqnum);

%c = isnan(signal);
%signal(find(c(:,1)==1),:)=[];

signalFL = lowpassFIR(signal(:,2));

T = 1/Fs; % Sampling period
L = length(signalFL); % Length of signal
t = (0:L-1)*T; % Time vector

%%
%forma polinomial se secciona a 10 partes de la señal original para
poder
%computar un correcto polinomio que se ajuste a la curvatura de la
señal
numP = length(signal)/10;
px = [];
for i=0:9
    p =
polyfit(t(i*numP+1:(i+1)*numP),signalFL(i*numP+1:(i+1)*numP)',50);
    pxtemp = polyval(p,t(i*numP+1:(i+1)*numP))';
    px = [px;pxtemp];
end
%p = polyfit(t,signalFL',130);
%px = polyval(p,t)';
signaladj = signalFL-px; %subtracción del offset polinomial

figure(1)
clf
subplot(2,1,1)
plot(t,signalFL)
hold on
plot(t,px,'LineWidth',2)
subplot(2,1,2)
plot(t,signaladj)
%%
%maximos
TH = 0.2;
[signalFLmax,loc]= findpeaks(signaladj);
c = find(signalFLmax>TH);
%minimos
TF = islocalmin(signaladj);
locmin = find(TF==1);
cc = find(signaladj(locmin)<-TH);

%subplot(2,1,1)
%plot(t(loc(c)),signalFLmax(c),'rx')
%%

```

```

figure(2)
clf
plot(t,signalFL)
hold on
plot(t,px,'LineWidth',2)
plot(t(loc(c)),signalFL(loc(c)), 'rx')
plot(t(locmin(cc)),signalFL(locmin(cc)), 'gx')
grid

display([length(c)+length(cc)])
%%

minT = 60000;
dd = floor(length(signal)/minT);
locUT = loc(c);
locBT = locmin(cc);
cUT =zeros(1,dd);
cBT =zeros(1,dd);

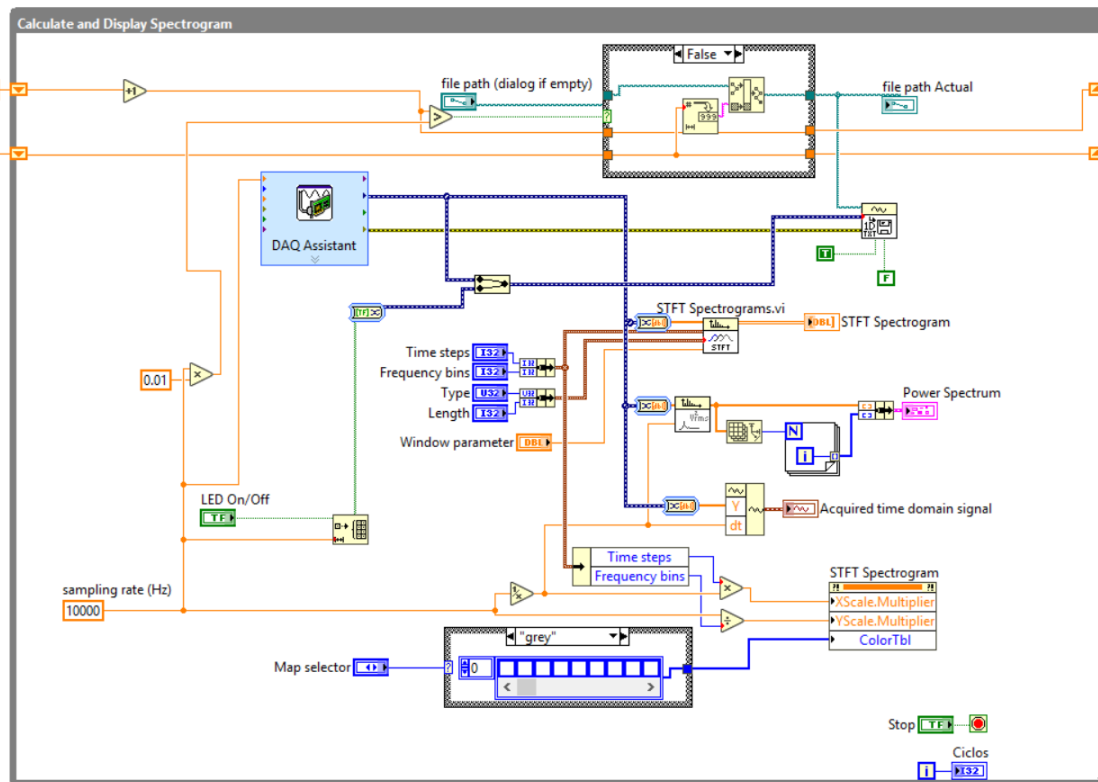
for i = 0:dd-1
    cUTT = length(find((locUT>(i*minT+1))&(locUT<(i+1)*minT)));
    cUT(i+1) = cUTT;
    cBTT = length(find((locBT>(i*minT+1))&(locBT<(i+1)*minT)));
    cBT(i+1) = cBTT;
end

figure(3)
clf
plot(cUT,'LineWidth',2)
hold on
plot(cBT,'LineWidth',2)
plot(cUT+cBT,'LineWidth',2)
grid
ylabel('Cantidad de máximos')
xlabel('Ventanas de 10 segundos')
title(['Num. de máximos (potenciales) por ventanas en ',Archivo,',',
umbra1 = ',num2str(TH)])
legend(['Picos Positivos \mu=',num2str(mean(cUT))], ['Picos Negativos
\mu=',num2str(mean(cBT))], ['Picos Total \mu=',num2str(mean(cBT+cUT))])
saveas(gcf,['Direccion','Resultados\ ',Archivo,num2str(TH),'EstadisticaPic
os.jpg'])
save(['Direccion','Resultados\ ',Archivo,num2str(TH),'.mat'], 'cBT', 'cUT')

```

Programas Labview

Toma de muestras – Diagrama de bloques



Toma de muestras – Panel de Control

