

● TITULARES

- **LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G ES SENSIBLE AL VOLTAJE.** *Juan Martínez Pinna y Martín Mahaut-Smith.*
- **ESTUDIO DE CAMBIOS CONFORMACIONALES EN CANALES IÓNICOS MEDIANTE PATCH-CLAMP Y FLUORESCENCIA POR TRANSFERENCIA RESONANTE DE ENERGÍA.** *Teresa Giráldez.*
- **TEST BAYESIANOS.** *Diógenes Laercio.*
- **NEUROFISIOLOGÍA APLICADA: USO DE MÉTODOS NO INVASIVOS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RETINIANA Y SUS ALTERACIONES.** *Román Blanco y Pedro de la Villa.*
- **ALTITUD SIMULADA Y DEPORTE: APLICACIÓN DE LA HIPOXIA INTERMITENTE A LA MEJORA DEL RENDIMIENTO DEPORTIVO.** *Ferrán A. Rodríguez.*
- **LA ENSEÑANZA DE LA FISIOLOGÍA EN LAS FACULTADES DE MEDICINA ESPAÑOLAS EN EL CONTEXTO DEL PROCESO DE CONVERGENCIA EUROPEO.** *Jorge Palés.*
- **DIVULGA, QUE ALGO QUEDA.** *Alberto Ferrús.*
- **EL GEN FOXP2 Y LA LENGUA PRIMIGENIA.** *Emilio Fernández Espejo.*

Si en el editorial del número anterior se criticaban las insuficiencias en política científica del gobierno saliente, aunque aún no haya motivos suficientes para aplicar similar tratamiento al entrante —tal vez porque no ha dado tiempo—, la realidad es que tampoco los hay para lo contrario. Estamos a la espera de que los poderes públicos asuman la necesidad de un Pacto por la Ciencia, se está elaborando un nuevo presupuesto que en modo alguno refleja las promesas electorales, y en el que la pugna entre dos ministerios arroja serias sombras de duda, y seguimos sin saber qué ocurrirá con los científicos contratados a través de los programas “Ramón y Cajal” o “Juan de la Cierva”, o de qué manera se producirá la continuidad de estas acciones. Más aún, en lo que se refiere a las disciplinas relacionadas con la SECF, se ha percibido una notoria reducción en el número de contratos, que nadie ha explicado y que no parece justificarse por la calidad científica de los solicitantes. Si a ello sumamos el hecho de que, una vez más, los gastos en I+D encubran la financiación de la industria militar, habrá que admitir que no queda demasiado sitio para la esperanza, y ello en un terreno en el que la secular sequía del país exige medidas drásticas y continuadas.

Por lo que se refiere a los contenidos de esta revista, hay que seguir agradeciendo el entusiasmo de los autores que colaboran en cada número. Y hay que sentirse satisfechos de que sean los más jóvenes quienes se animan a dedicar algo de su tiempo en el empeño. Aunque la aventura pueda parecer una osadía sin futuro, seguimos pensando que una publicación de este estilo en nuestra lengua tiene sentido, y que su viabilidad depende estrictamente de la colaboración de los fisiólogos españoles. Por eso continuamos animando a todos a enviar originales y proponer temas para los números siguientes. Por otra parte, y aprovechando el nuevo período electoral, es el momento adecuado para renovar parcialmente el equipo editorial, o para incorporar nuevos miembros dispuestos a colaborar en un trabajo no demasiado agradecido, pero absolutamente necesario.

Finalmente, es posible que a estas horas se conozcan las candidaturas a la nueva Junta Directiva, cuya composición se hará efectiva en el congreso de Sevilla. Sería deseable que hubiera variedad en las propuestas y que cada candidato tuviese la oportunidad de exponer sus puntos de vista antes durante el proceso electoral. La elección entre alternativas diferentes es un ejercicio saludable, y no necesariamente demostración de división. La comunidad científica no debería reproducir el invariante maniqueísmo de la clase política, pero tampoco sentir miedo por el contraste de pareceres.

• Editor •

Rafael Alonso Solís. Departamento de Fisiología, Universidad de La Laguna, 38071 Santa Cruz de Tenerife.
Teléfono: 922 319 356 / 319 409 • Fax: 922 648457 • E-mail: ralonso@ull.es.

• Comité editorial

Javier Cudeiro (A Coruña, fcud@unica.udc.es), Fernando de Castro (Salamanca, fedecastro@usal.es),
Mónica de la Fuente (Madrid, mondelaf@bio.ucm.es), Ángel Nadal (Alicante, nadal@umh.es), Javier Salazar (Murcia, salazar@um.es).

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

- **Presidente:** Salvador González Barón (sgonzalez@uma.es).
- **Presidente electo:** Rafael Alonso Solís (ralonso@ull.es).
- **Presidente saliente:** Manuel Mas García (mmas@ull.es).
- **Secretario:** Rafael Fernández Chacón (rfchacon@us.es).
- **Tesorero:** Javier Salazar Aparicio (salazar@um.es).
- **Vocales:** Ana Ilundáin Larrañeta (ilundain@us.es) / Mario Díaz González (madiaz@ull.es)

Direcciones de contacto en: www.secff.org • D.L.: SE-321-2000

● CARTA DEL PRESIDENTE



Queridos amigos y compañeros:

Me dirijo de nuevo a todos para ponerlos al corriente de la actividad que hemos desarrollado en estos meses y hacerlos llegar algunas inquietudes relacionadas con ciertas decisiones que afectan a nuestro colectivo.

En este sentido, he de recordar que, aunque se han incorporado progresivamente nuevos socios, el tema de las incorporaciones sigue siendo prioritario para el desarrollo de nuestra Sociedad. Por ello, todos debemos seguir trabajando en esta línea, animando, sobre todo, a que se incorporen jóvenes fisiólogos de nuestro entorno. Una meta asequible puede ser que cada uno de los actuales socios consiga la incorporación de al menos uno nuevo, como “socio junior”, antes de finalizar el año.

Este crecimiento tan deseable se podrá apreciar en la gran participación que esperamos en el próximo Congreso de la SECF, que tendrá lugar en Sevilla del 10 al 13 de Febrero del próximo año, y en cuya organización se viene trabajando a todo ritmo. Como sabéis, ya está elaborado el Programa Preliminar y el plazo para el envío de resúmenes se abre el 1 de Septiembre. Os animo a asistir. Junto al interés científico indudable que va a tener, en lo que se vienen esmerando los organizadores, es, a su vez, una ocasión excepcional para relacionarnos e intercambiar opiniones, y, por supuesto, disfrutar de esa maravillosa ciudad que es Sevilla. De ahí que estemos trabajando en obtener financiación con la que poder conseguir el mayor número de becas posibles para los más jóvenes.

A lo largo de estos meses hemos trabajado en distintos asuntos pendientes y tratado de estar atentos a todo aquello surgido de especial interés. Como recordáis estamos especialmente interesados en elaborar una GUÍA de GRUPOS de investigación en Fisiología. Para ello hemos considerado que era necesario disponer previamente de una información actualizada de cada socio. Por eso hemos colgado en la web de la SECF una página, “ACTUALIZACIÓN DE DATOS”, que todos debemos completar y enviar tan pronto sea posible, para poner al día y completar la información de cada uno. Con ello dispondremos de un buen punto de partida para la elaboración de la GUÍA, que esperamos sea de gran utilidad.

En orden a actuaciones institucionales os informo de que se ha constituido en meses pasados la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) en cuya constitución la SECF ha tenido un papel decisivo. Como sabéis, tratamos de unir esfuerzos con otras Sociedades Científicas, para así disponer de un amplio respaldo con el que exponer ante la Administración las carencias del mundo científico español y lograr así ofrecer soluciones.

En esa misma línea de actuación hemos suscrito el denominado “Pacto de Estado por la Ciencia”, en el que se solicita, para solucionar la precariedad de la situación, la implicación del Gobierno de la Nación y de los partidos políticos, las Comunidades Autónomas, los agentes económicos y sociales, así como la de los propios científicos. En él se establecen una serie de compromisos entre los que destacan: la necesidad de compromisos institucionales que lleven a una organización de la Ciencia a nivel ministerial, así como el esfuerzo de coordinación y planificación entre Gobierno Central y Comunidades Autónomas. Y como no, un compromiso serio de financiación para alcanzar en pocos años una financiación global para la investigación del 2% del PIB, actual media europea. Se recoge, del mismo modo, la necesidad de un compromiso con los grupos de investigación, así como un nuevo planteamiento en la promoción de los jóvenes investigadores, además de la adecuación de la cuantía de los proyectos de investigación a las necesidades reales.

Asimismo, en este orden de cosas, la Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE), que desde la SECF venimos apoyando, envió en su momento a los distintos partidos políticos un escrito, donde se hace un análisis crítico de la situación de los programas I + D en nuestro país, así como una serie de recomendaciones estratégicas para que se incorporen a los programas electorales y, sobre todo, al programa del nuevo Gobierno

En relación con otro asunto, considero necesario que conozcáis que en la última convocatoria del Programa Ramón y Cajal, al conjunto de las áreas de Fisiología y Farmacología les han correspondido inexplicablemente un número de plazas inferior al de años pasados. Esta situación no se debe a falta de calidad de los candidatos, ya que más de ochenta de ellos obtuvieron puntuación considerada suficiente para optar a una plaza. Igualmente, en el Programa Juan de la Cierva para investigadores más jóvenes, los resultados son poco satisfactorios para los aspirantes del área de Fisiología, en tanto que únicamente siete han conseguido obtener plazas, menos que en otras áreas cercanas. Aunque desde otras instancias se ha hecho llegar a la Dirección General correspondiente el tratamiento discriminatorio para nuestra área de esas distribuciones por no estar basadas en criterios científicos, también desde la SECF haremos notar nuestro desacuerdo, tratando de proponer medidas que puedan paliar, al menos parcialmente, las situaciones creadas. Cada uno dentro de sus posibilidades debe hacer las gestiones oportunas para conseguir cambiar tal proceder.

Seguimos tratando de incrementar los apoyos financieros, que nos permitan disponer de más recursos y así poder obtener nuevas posibilidades que nos ayuden a convocar nuevas becas y subvenciones, para que los más jóvenes puedan completar su formación.

Hemos iniciado una nueva campaña para incorporar nuevos patronos a la SECF. Todas las iniciativas que se os ocurran en este terreno serán muy bien recibidas. En breve os facilitaremos la posibilidad de canalizar hacia la directiva vuestras sugerencias.

En relación con la docencia, os comunico que en diversas titulaciones se están comenzando a elaborar “Libros Blancos” que sirven de base para la adaptación al Espacio Europeo de Enseñanza Superior, y, por consiguiente, para los nuevos Planes de Estudio. Considero de primera importancia que desde la SECF se pudieran coordinar las iniciativas y propuestas en relación con la enseñanza de Fisiología en las distintas Licenciaturas y Diplomaturas. Y con ello establecer objetivos comunes en cada titulación, lo que supondría indudables beneficios para todos. A principio del próximo curso nos pondremos en contacto con todos y avanzaremos algunas ideas para comenzar a trabajar en ello.

Nos alegra saber que se van a cambiar algunos apartados de la LOU, particularmente aquellos referidos a la habilitación del profesorado. Ya que hemos venido criticando y haciendo notar en diversas instancias la necesidad de modificar el actual sistema vigente que ha ocasionado tantas disfunciones, desacuerdos y gastos económicos.

Por último, como os decía en mi primera carta, os invito de nuevo a colaborar más activamente en la marcha de la Sociedad, en la seguridad de que daréis por bien empleado vuestro tiempo.

Salvador González Barón
Presidente de la SECF



● INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

A. Remisión de originales

La remisión de originales se hará exclusivamente por correo electrónico a la dirección del editor o de cualquiera de los miembros del comité editorial. Se puede utilizar cualquier procesador de texto, programa y formato gráfico, aunque es preferible remitir el manuscrito en formatos usuales. En todo caso deben indicarse en la carta de remisión los formatos empleados para texto, tablas, gráficos y fotografías. La utilización de formatos poco usuales retrasará la publicación. En caso de emplear algún sistema de compresión para fotografías o gráficos, debe comprobarse que la descompresión no deteriora la calidad de las imágenes. La carta de remisión debe incluirse en el cuerpo del mensaje electrónico y el original y las figuras en forma de archivos anexos. El texto del artículo debe adjuntarse como un único archivo, incluyendo la página con el título, el texto principal, bibliografía, etc. Cada tabla o figura debe remitirse en un anexo independiente, nombrando cada anexo con el nombre del primer autor y el número de tabla o figura que contenga (ejemplo: Cunqueiro-Fig.1).

Direcciones comité editorial:

Rafael Alonso (ralonso@ull.es), Javier Cudeiro (fcud@unica.udc.es), Fernando de Castro (fedecastro@usal.es), Mónica de la Fuente (mondela@bio.uam.es), Angel Nadal (nadal@umh.es), Javier Salazar (salazar@um.es).

B. Composición de los originales

1. Primera página.

- Título
- Autores
- Filiación de los autores
- Autor y dirección para correspondencia si procede (incluir números de teléfono y fax, y una dirección de correo electrónico).

2. Segunda página.

Sumario, si procede, en una extensión un superior a 200 palabras, en el mismo idioma que el resto del artículo.

3. Cuerpo del texto.

Los artículos no deberán sobrepasar las 2.500 palabras e irán en folios numerados. Deberán estar escritos en un estilo claro y con pretensión divulgativa, de forma que puedan ser entendidos por cualquier fisiólogo, independientemente de su área de especialización. El procedimiento más simple es tomar como ejemplo cualquier artículo publicado previamente en Fisiología. En caso de no disponer de ningún ejemplar, puede solicitarse a cualquiera de los miembros del comité editorial o a la Secretaría (rfchacon@us.es) para ser incluido en la lista de distribución. Alternativamente, pueden consultarse los artículos de los números anteriores en <http://www.seccff.org>

Los artículos podrán contener resultados ya publicados, siendo entonces responsabilidad exclusiva de los autores obtener los permisos correspondientes de las revistas o libros donde hayan sido publicados originalmente. Debido a la pretensión divulgativa, cada autor podrá organizar el texto en la forma que crea más oportuna, si bien se sugiere una división en secciones que facilite su lectura.

4. Otros.

- a. Notas (si las hubiere) y agradecimientos.
- b. Bibliografía. Las referencias, muy seleccionadas, se insertarán en el cuerpo del texto entre paréntesis (ejemplo: Chacón y Mairena, 1999). La relación completa de referencias bibliográficas deberá incluirse al final del texto, por orden alfabético y cronológico, de acuerdo a los formatos más habituales. Ejemplo: Gómez J, Belmonte J (1910) Deciphering bullfighting. J Taurom 57: 200-235.
- c. Pies de figuras. Deberán incluirse a continuación de la bibliografía y en páginas aparte.
- d. Figuras. Su número no deberá ser superior a 2-3 por artículo, y el tamaño máximo aceptado será el de una hoja impresa (DIN-A4). No se publicaran imágenes en color. En el caso de figuras previamente publicadas, si fuere necesario, deberá acompañarse autorización para su reproducción en Fisiología.
- e. Tablas (para consultar formatos ver el punto b.).

DESTELLOS *destellos*

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen la familia más numerosa de receptores de membrana, formando el sistema más abundante de transducción de señales extracelulares. Al no tratarse de canales iónicos, sino de receptores del tipo siete segmentos transmembrana, no solemos pensar que su activación pueda ser dependiente del voltaje. En el presente artículo, Juan Martínez-Pinna y Martyn Mahaut-Smith nos explican cómo el voltaje de la membrana puede llegar a ser muy importante en el funcionamiento de los GPCRs. Este es un fenómeno nuevo que en algunos sistemas celulares, como el megacariocito, se produce de manera espectacular. Aquí, despolarizaciones de la membrana plasmática de tan sólo 2-3 mV son capaces de potenciar la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. Dada la ubicuidad de este tipo de receptores, este mecanismo de regulación por voltaje puede llegar a tener una gran trascendencia en la fisiología celular.

LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G ES SENSIBLE AL VOLTAJE

Juan Martínez-Pinna y Martyn Mahaut-Smith



Multitud de hormonas, neurotransmisores y estímulos sensoriales ejercen su acción celular a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Estas moléculas especializadas en la transducción intracelular de señales externas son la familia más amplia de receptores de membrana. Una serie de resultados apoyan el concepto de que la transducción de señales mediada por la activación de GPCRs puede ser controlada por cambios en el potencial eléctrico transmembrana.

Todos los GPCRs tienen un plan estructural similar, con siete segmentos transmembrana y un dominio de unión a las proteínas G heterotriméricas situado en las secuencias intracelulares. La activación del receptor por un agonista cataliza la unión de GTP a la proteína G, induciendo así la separación de sus subunidades ($G\alpha\text{-GTP}$ y $G\beta\gamma$) y ejerciendo cada una su acción intracelular. Estas acciones incluyen la estimulación o inhibición de enzimas como la adenilato ciclasa o la fosfolipasa C, que median la síntesis de AMP cíclico y de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), respectivamente, y la regulación de la actividad de canales iónicos de K^+ y Ca^{2+} . Existen más de 1000 tipos diferentes de GPCRs y se descubren nuevos tipos constantemente. Los GPCRs constituyen la diana principal de la intervención terapéutica, con más del 50% de los fármacos utilizados (y 7 de los 10 más vendidos), ejerciendo su acción sobre ellos (Gether, 2000) y reflejando la importancia de estos receptores en numerosos aspectos de la fisiología celular.

Hace casi dos décadas, Vergara y colaboradores describieron que la estimulación eléctrica del músculo esquelético producía la elevación de los inositoles polifosfatos en el sarcoplasma (Vergara et al., 1985). Unos años más tarde, se propuso que la hiperpolarización de la membrana disminuía la síntesis de IP_3 inducida por noradrenalina en células de músculo liso arterial (Itoh et al., 1992). Sin embargo, fue en 1993 cuando Ganitkevich e Isenberg demostraron de manera directa la interacción entre el potencial de membrana y la liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3 . Estos investigadores utilizaron el músculo liso vascular de la arteria coronaria para demostrar que una despolarización de la membrana desde -60 hasta $+100$ mV producía un transitorio de Ca^{2+} cuando se activaban los receptores muscarínicos colinérgicos. Este transitorio de Ca^{2+} no se producía por la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje, al estar éstos bloqueados.

A pesar de la importancia potencial de este nuevo mecanismo -mediante el cual cambios del potencial de membrana modificarían el grado de activación de los GPCRs, y por tanto los niveles de segundos mensajeros- este concepto no se ha estudiado de forma exhaustiva hasta hace unos pocos años. Esta investigación se ha realizado fundamentalmente en el megacariocito, la célula precursora de las plaquetas, una preparación ideal debido a la ausencia de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la membrana plasmática y

también de receptores de rianodina (RyR) en los depósitos intracelulares. De esta forma se evita que los RyR pudiesen estar acoplados funcionalmente con un sensor de voltaje presente en la membrana plasmática, como ocurre en el músculo esquelético. En el megacariocito, se observó que el aumento de Ca^{2+} , evocado por el ADP y el tromboxano A_2 vía GPCRs (el receptor purinérgico P_2Y en el caso del ADP), exhibe una marcada dependencia de voltaje (Mahaut-Smith et al., 1999; Mason & Mahaut-Smith, 2001) (Fig. 1).

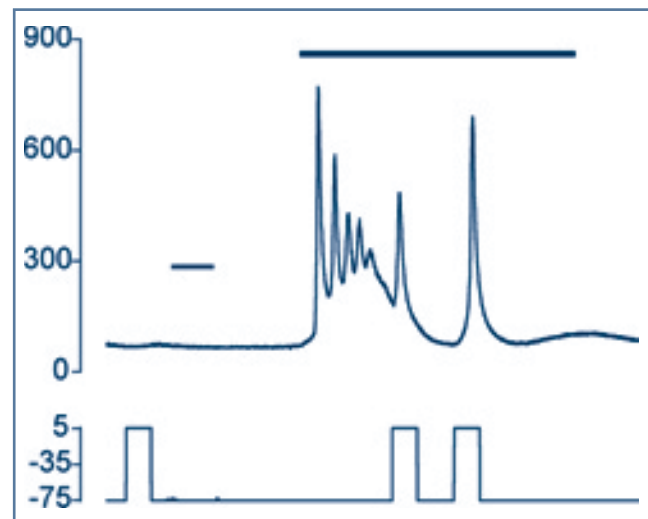


Figura 1.

Las características principales de este fenómeno son:

- 1) El transitorio de Ca^{2+} intracelular dependiente de voltaje se debe a la liberación de Ca^{2+} desde el reservorio intracelular, puesto que está presente en un medio extracelular sin Ca^{2+} o sin Na^+ (Mahaut-Smith et al., 1999).
- 2) Es de naturaleza bipolar, ya que la despolarización potencia la liberación de Ca^{2+} pero la hiperpolarización la inhibe (Mason et al., 2000).
- 3) La presencia de receptores de IP_3 funcionales en los depósitos de Ca^{2+} intracelulares es absolutamente necesaria (Mason & Mahaut-Smith, 2001).
- 4) El transitorio de Ca^{2+} tiene forma de onda que invade toda la célula y es similar al inducido por el propio agonista (Thomas et al., 2001).
- 5) Es extremadamente sensible al voltaje, de tal modo que una despolarización de tan sólo 2-3 mV de amplitud o de 25 ms de duración es capaz de potenciar la liberación de Ca^{2+} (Martínez-Pinna et al., 2004).

¿Cuál es el mecanismo por el que los cambios del potencial de membrana modulan las señales producidas por los GPCRs? Existen varias hipótesis que podrían contestar esta pregunta en el megacariocito: 1) la despolarización podría afectar a uno o más pasos de la vía de señalización, incluyendo el receptor, la proteína G o la fosfolipasa C; 2) algunas de las moléculas producidas o consumidas en el proceso de señalización pueden ser polares, como diferentes agonistas, el GTP o el fosfoinositol-3,4-bisfosfato (PIP₂, precursor del IP₃), de tal forma que el campo eléctrico a través de la membrana lipídica podría afectar a su unión o disponibilidad; y 3) podría existir un acoplamiento funcional entre los receptores de IP₃ de los depósitos intracelulares y alguna proteína de la membrana plasmática sensible al voltaje, como los canales TRP (Kiselyov et al., 1998). Estas hipótesis no son excluyentes entre sí, pudiendo existir más de un sensor de voltaje.

Actualmente, estamos estudiando la contribución relativa de los diferentes componentes de la vía de transducción de señales del receptor P2Y a la sensibilidad al voltaje de la respuesta. Dos resultados independientes apuntan a que la propia síntesis de IP₃ es dependiente de voltaje y no existiría un modelo de acoplamiento funcional. En primer lugar, el transitorio de Ca²⁺ inducido por el agonista (ADP) y por la despolarización de la membrana en presencia de ADP son idénticos (Thomas et al., 2001). En segundo lugar, existe un retraso de varios cientos de milisegundos entre la despolarización y el aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular, incluso a una temperatura fisiológica (Martínez-Pinna et al., 2004).

Existe también la posibilidad de que el sensor de voltaje sea el propio receptor o que resida en la unión receptor-proteína G, si bien las evidencias son indirectas (Ben Chaim et al., 2003). Estos autores combinan estudios de unión de ligandos con experimentos de fijación de voltaje para investigar si la corriente de K⁺ mediada por la estimulación del receptor muscarínico por la acetilcolina es sensible a cambios en el potencial de membrana. En este trabajo, dependiendo del tipo de receptor muscarínico expresado, la dependencia de voltaje en la activación de los canales de K⁺ es opuesta, por lo que la unión de ligando no parece ser el paso sensible al voltaje, a diferencia de los resultados obtenidos en las células acinares de la glándula lagrimal (Marty & Tan, 1989). A partir del estudio de las curvas dosis-respuesta, la unión de ligando a diferentes potenciales de membrana y la activación de la proteína G en ausencia de agonista, los autores concluyen que el paso sensible al voltaje es previo a la disociación de las subunidades de la proteína G heterotrimérica.

En los estudios realizados en megacariocitos y en músculo liso de la arteria coronaria, la sensibilidad al voltaje de la liberación de Ca²⁺ dependiente de IP₃ requiere de la estimulación del propio GPCR. Sin embargo, ésta no es una regla general; existen otros trabajos que indican que la señalización a través de las proteínas G heterotriméricas está modulada por el potencial de membrana de forma constitutiva, en ausencia de agonista. En el músculo esquelético, tanto la observación inicial de Vergara y colaboradores, como otra más reciente (Araya et al., 2003), indican que la despolarización induce la liberación de Ca²⁺ dependiente de IP₃ en ausencia de agonista exógeno. Este efecto es bloqueado por la toxina pertúsica, indicando la participación de proteínas G_i. Recientemente, Valle-Rodríguez y colaboradores han descrito que la despolarización de los miocitos de la arteria basilar induce la liberación de Ca²⁺ dependiente de IP₃ en ausencia de agonista y de Ca²⁺ extracelular, de forma graduada, pero suficiente para producir la contracción muscular. Este nuevo mecanismo comienza con la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje del tipo L, que estimulan la vía de señalización proteína G-fosfolipasa C-receptores de IP₃. El Ca²⁺ liberado a través de este mecanismo puede activar a los receptores de rianodina presentes en el retículo endoplásmico y amplificar así la señal

de Ca²⁺ en el citoplasma de estas células (Valle-Rodríguez et al., 2003). La generalidad de este mecanismo se evidencia por la existencia de activación de la síntesis de IP₃, dependiente de voltaje en ausencia de activación de GPCRs, en células del reino vegetal. La membrana celular del alga gigante Chara corallina es eléctricamente excitable y genera potenciales de acción. Este cambio en el potencial de membrana es capaz de inducir un aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ a través de un mecanismo dependiente de IP₃ (Wacke & Thiel, 2001).

En conjunto, estos resultados indican que la despolarización de la membrana celular puede generar IP₃ e inducir la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares en un amplio rango de tipos celulares. Este fenómeno puede ocurrir a través de múltiples vías de señalización que requieren de la estimulación de los GPCRs por agonistas o por vías independientes de ellos. La variedad y la complejidad de la naturaleza de los mecanismos de señalización celular son fascinantes. En el caso concreto del megacariocito, no está claro por qué la liberación de Ca²⁺ dependiente de IP₃ durante la estimulación de los receptores P2Y es extremadamente sensible al voltaje. Una posibilidad es que la estructura molecular de este tipo de receptores los haga especialmente sensibles al potencial eléctrico a través de la membrana. Alternativamente, el complejo sistema de invaginaciones de la membrana plasmática de esta célula para la producción de las plaquetas, podría amplificar la dependencia de voltaje innata de estos GPCRs al incrementar su número por volumen de citoplasma (Mahaut-Smith et al., 2003). Desde esta perspectiva, es tentador especular sobre la posibilidad de que el control por el voltaje de los GPCRs podría ser especialmente robusto en estructuras como las espinas dendríticas con una elevada relación entre la superficie de membrana y el volumen interno, en las que los neurotransmisores producen tanto la activación de GPCRs como cambios de voltaje en forma de potenciales postsinápticos.

Referencias:

- Araya R, Liberona J L, Cardenas J C, Riveros N, Estrada M, Powell J A, Carrasco M A, Jaimovich E (2003). Dihydropyridine Receptors as Voltage Sensors for a Depolarization- evoked, IP(3)R-mediated, Slow Calcium Signal in Skeletal Muscle Cells. *The Journal of General Physiology* 121: 3-16.
- Ben Chaim Y, Tour O, Dascal N, Parnas I, Parnas H (2003). The M2 muscarinic G-protein-coupled receptor is voltage-sensitive. *Journal of Biological Chemistry* 278: 22482-22491.
- Gether U (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein- coupled receptors. *Endocr.Rev.* 21: 90-113.
- Itoh T, Seki N, Suzuki S, Ito S, Kajikuri J, Kuriyama H (1992). Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J.Physiol.* 451: 307-328.
- Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396: 478-482.
- Mahaut-Smith M P, Hussain J F, Mason M J (1999). Depolarization-evoked Ca²⁺ release in a non-excitable cell, the rat megakaryocyte. *J.Physiol.* 515: 385-390.
- Mahaut-Smith M P, Thomas D, Higham A B, Usher-Smith J A, Hussain J F, Martínez-Pinna J, Skepper J N, Mason M J (2003) Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophysical journal* 84: 2646-2654.
- Martínez-Pinna J, Tolhurst G, Gurung I S, Vandenberg J I, Mahaut-Smith M P (2004). Sensitivity limits for voltage control of P2Y receptor-evoked Ca²⁺ mobilization in the rat megakaryocyte. *J.Physiol.* 555: 61-70.
- Marty A, Tan Y P (1989). The initiation of calcium release following muscarinic stimulation in rat lacrimal glands. *J.Physiol.* 419: 665-687.
- Mason M J, Hussain J F, Mahaut-Smith M P (2000). A novel role for membrane potential in the modulation of intracellular Ca²⁺ oscillations in rat megakaryocytes. *J.Physiol.* 524: 437-446.
- Mason M J, Mahaut-Smith M P (2001). Voltage-dependent Ca²⁺ release in megakaryocytes requires functional IP₃ receptors. *J.Physiol.* 533: 175-183.
- Thomas D, Mason M J, Mahaut-Smith M P (2001). Depolarization-evoked Ca²⁺ waves in the non-excitable rat megakaryocyte. *J.Physiol.* 537: 371-378.
- Valle-Rodríguez A, López-Barneo J, Ureña J (2003). Ca(2+) channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca(2+) influx. *EMBO J.* 22: 4337-4345.

- Vergara J, Tsien R Y, Delay M (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation- contraction coupling in muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82: 6352-6356.
 - Wacke M, Thiel G (2001). Electrically triggered all-or-none Ca^{2+} - liberation during action potential in the giant alga Chara. *The Journal of General Physiology* 118: 11-22.

Juan Martínez-Pinna¹ y Martyn Mahaut-Smith²

¹Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante. ²Department of Physiology, University of Cambridge, Reino Unido.

Autor para la correspondencia:

Juan Martínez-Pinna.

Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología. División de Fisiología. Universidad de Alicante. Campus de San Vicente. E-03080 Alicante. Teléfono: 96 590 38 56 • Fax: 96 590 39 43.

E-mail: juan.martinez-pinna@ua.es

LA IMPORTANCIA DEL MÉTODO *método*

El análisis funcional de las proteínas de membrana requiere la disponibilidad de técnicas cada vez más resolutivas, tanto espacial como temporalmente. El estudio de los canales iónicos, por ejemplo, se ha beneficiado a lo largo de su ya dilatada historia de diferentes aproximaciones metodológicas, a veces procedentes de campos diversos, como la mutagénesis dirigida o el patch-clamp. Más recientemente, la asociación entre registros eléctricos y fluorescentes está permitiendo relacionar de manera directa cambios en el flujo iónico a través de un determinado canal con las modificaciones conformacionales que sufre. En el presente artículo Teresa Giráldez nos introduce con claridad en las posibilidades de una técnica poderosa: el análisis de cambios en la fluorescencia por transferencia resonante de energía.

ESTUDIO DE CAMBIOS CONFORMACIONALES EN CANALES IÓNICOS MEDIANTE PATCH-CLAMP Y FLUORESCENCIA POR TRANSFERENCIA RESONANTE DE ENERGÍA (FRET). Teresa Giráldez



Introducción

La mayoría de las proteínas de membrana ejercen su función a través de cambios conformacionales que transmiten distintas señales entre el interior y el exterior de la célula. Un caso muy interesante es el de los canales iónicos, un tipo de proteínas de membrana que, en respuesta a señales químicas o eléctricas, permiten el paso de iones a favor de su gradiente electroquímico. Estas proteínas participan de forma crucial en procesos tan diversos como la secreción, la excitabilidad eléctrica, la contracción muscular, la diferenciación celular o la respuesta inmune, entre muchos otros (Hille, 2001). La clonación de un gran número de canales iónicos, unida a estudios de mutagénesis dirigida en sistemas de expresión heteróloga, el desarrollo de la técnica de patch-clamp para el registro de su actividad y, más recientemente, la descripción de su estructura tridimensional han permitido avanzar enormemente en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la actividad de estas interesantes proteínas. En la actualidad, la complementación de estas técnicas con el uso de marcadores fluorescentes unidos a sitios específicos está proporcionando resultados muy interesantes sobre los cambios conformacionales que ocurren en determinados dominios del canal (Bezaniilla, 2000). Los registros de corriente eléctrica (flujo de iones a través del canal) y de fluorescencia se realizan simultáneamente: el primero proporciona información sobre el estado funcional del canal, mientras que el segundo revela las modificaciones estructurales asociadas a dicho estado. Cualquier alteración estructural de la proteína en el entorno del fluoróforo puede producir cambios en las características de éste, como, por ejemplo, su eficiencia cuántica, movilidad, interacción con fluoróforos próximos, etc. La medida de fluorescencia proporciona información adicional sobre la redistribución estructural del canal, ya que permite estudiar estados funcionales no necesariamente asociados al flujo de iones a través del poro, como es el caso de la medida de corrientes mediante patch-clamp.

Los primeros estudios de fluorescencia en canales iónicos se centraron fundamentalmente en canales dependientes de

voltaje. Las medidas de fluorescencia y los registros de célula entera en clamp de voltaje de dos electrodos se realizaron simultáneamente en oocitos de *Xenopus laevis*. En estos experimentos, las proteínas se marcaron con fluoróforos unidos a cisteínas (ver más adelante) y los registros de fluorescencia se llevaron a cabo en el polo animal del oocito, donde la fluorescencia basal está significativamente reducida (Mannuzzi et al., 1996). El poder de esta técnica se vio enormemente reforzado al estudiar cambios en fluorescencia por transferencia resonante de energía (FRET). La eficiencia de FRET es indirectamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre fluoróforos, de modo que es un sistema muy sensible para estudiar distancias entre los puntos de la proteína donde los fluoróforos han sido insertados. Así, Bezaniilla y cols. pudieron describir a resolución atómica el movimiento de la cuarta hélice transmembranal (el supuesto sensor de voltaje) del canal de potasio Shaker (Cha and Bezaniilla, 1997).

Una desventaja del método descrito previamente reside en la imposibilidad de estudiar regiones del canal en la zona intracelular, donde generalmente residen los dominios implicados en la regulación del canal por distintos ligandos o proteínas reguladoras. Con este objeto, Zagotta y cols. han descrito recientemente una nueva aproximación en la que los registros de fluorescencia son realizados en un parche de membrana ("patch-fluorometry" o "fluorescencia en parches"; Zheng and Zagotta, 2003). Esta metodología permite el control del medio intracelular. Al medir únicamente la fluorescencia de un parche escindido de la célula se asegura el registro exclusivo de canales expresados en la membrana plasmática, eliminándose la contribución de canales en compartimentos intracelulares (cuya actividad no está siendo controlada). Además, no existe contaminación debida a autofluorescencia procedente de los componentes intracelulares, lo cual mejora la relación señal-ruido y permite una mayor sensibilidad en la medida. La utilización de sistemas de detección de fluorescencia convencionales, como cámaras CCD o tubos fotomultiplicadores, permite el registro de fluorescencia en parches conteniendo un número relativamente pequeño de canales.

Nuestro trabajo actual se centra en el estudio de los cambios conformacionales asociados a la función del canal iónico humano hsló, un canal de potasio sensible a calcio y voltaje. Para ello utilizamos la técnica de “fluorescencia en parches” descrita por Zagotta y cols. El propósito de este artículo es describir, de un modo general, el equipo, procedimiento experimental y análisis necesarios. Aunque centramos la descripción en su aplicación al estudio de canales iónicos, también se expondrán otras posibles aplicaciones de esta interesante técnica.

Fluorescencia por transferencia resonante de energía (FRET)

La transferencia resonante de energía es la transmisión no radiativa de energía de un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor. Para que tenga lugar FRET, deben cumplirse una serie de requisitos fundamentales (para una descripción exhaustiva, ver Van der Meer, 1994): 1) el espectro de emisión del donador debe solaparse con el espectro de excitación del aceptor; 2) el donador y el aceptor deben encontrarse a una distancia comprendida entre 10 y 100 Å; 3) el donador debe tener una alta eficiencia cuántica (gran número de fotones emitidos frente a de fotones absorbidos).

En la figura 1 se ilustra esquemáticamente el uso de FRET para el estudio de cambios conformacionales en proteínas. Si el donador y el aceptor han sido unidos a dos sitios distintos en la proteína de estudio que se encuentran a gran distancia (A), la iluminación con luz de longitud de onda que excite exclusivamente al donador producirá un espectro de emisión típico del mismo (B). Si la proteína sufre un cambio conformacional que produce un acercamiento de los fluoróforos (C), la excitación del donador producirá fotones que son capaces de excitar al aceptor, y se observará el espectro de emisión de éste junto con una emisión reducida del donador (E).

La cuantificación de FRET puede hacerse empleando distintos métodos. Muchos autores utilizan medidas de intensidad de fluorescencia emitida a longitudes de onda puntuales. No obstante, esta aproximación no elimina las contaminaciones debidas a la emisión del donador o a la excitación directa del aceptor a las longitudes de onda, e ignora el error debido a variaciones en la eficiencia cuántica del aceptor o

en la concentración total de moléculas fluorescentes (Selvin, 1995). Para evitar estos problemas, la solución ideal es medir espectros de emisión, cuyo análisis permite eliminar los errores mencionados. Existen varios sistemas para la obtención de espectros, que se describirán más adelante.

Marcaje fluorescente de las proteínas

Previamente a la realización de los experimentos de FRET, las proteínas deben ser marcadas con los fluoróforos. Actualmente existe una gran variedad de marcadores que pueden ser utilizados como parejas de FRET. Algunos de los más utilizados son la 6'-tetrametilrodamina (TMRM), derivados de maleimidados (como por ejemplo la Alexa Fluor 488 C5 maleimida de Molecular Probes) o derivados de yodo-ace-tamida. Todos ellos tienen en común que reaccionan con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas. Para utilizar estos fluoróforos son necesarios los siguientes pasos: 1) eliminar todas las cisteínas de la proteína de interés; 2) el sitio en el que se de-sea introducir el fluoróforo debe mutarse a una cisteína; 3) comprobar que dichas mutaciones no afectan a la función de la proteína; 4) en cada experimento, debe llevarse a cabo la reacción del fluoróforo con la cisteína para que el canal quede marcado en el lugar específico; 5) para evitar el aumento en la señal de fondo debido a la unión inespecífica de fluoróforo a otros grupos sulfhidrilo presentes en la membrana, es necesario un paso de bloqueo (mediante mutación u otros reactivos no fluorescentes, como la maleimida de tetraciclina; Gandhi et al., 2000).

Una alternativa a este sistema es el uso de marcadores derivados de la proteína verde fluorescente (GFP). Ésta presenta una estructura en forma de barril, con los extremos carboxilo y amino muy próximos, donde un grupo específico de residuos forma un fluoróforo en el interior, que se excita en el rango de 488 nm y presenta un pico de emisión a 502 nm. Mutaciones puntuales de la GFP han dado lugar a diversas variantes de esta proteína con distintas propiedades espectrales, que pueden ser usadas como pares de FRET. Uno de los pares más utilizados es el de las variantes azul (CFP) y amarilla (YFP) (que funcionan como donador y aceptor, respectivamente; Tsien, 1998). La secuencia de las proteínas fluorescentes puede ser insertada dentro de la secuencia codificante de la proteína de interés, dando lugar a una proteína de fusión fluorescente con el fluoróforo (GFP) insertado en un sitio específico. Estas proteínas de fusión pueden generarse mediante métodos convencionales de biología molecular. Por ejemplo, a través de la introducción de un sitio de restricción en la secuencia de la proteína objeto de estudio y posterior subclonaje de la proteína fluorescente. Alternativamente, las variantes de GFP pueden insertarse de forma aleatoria mediante el uso de un transposón, un método que permite la obtención rápida de un gran número de proteínas de fusión (Sheridan et al., 2002).

Esta última aproximación ha sido aplicada por nuestro grupo al canal iónico hsló, obteniendo con éxito una librería de subunidades _ marcadas fluorescentemente, que han sido utilizadas en nuestros experimentos de fluorescencia en parches. Los canales hsló se constituyen en la membrana como homotetrámeros de subunidades _. Nuestro diseño experimental consiste en la formación de heterotetrámeros formados por subunidades _ marcadas con CFP (donador) y YFP (aceptor) en sitios equivalentes dentro de la secuencia proteica. Las variaciones de FRET son estudiadas junto con la actividad del canal en distintas concentraciones de calcio y a distintos voltajes.

Equipo

El equipo necesario para este tipo de experimentos consiste en un sistema convencional de patch-clamp sobre un microscopio de fluorescencia, al que se acoplan los componentes necesarios para la obtención de imágenes espectrales del parche de membrana.

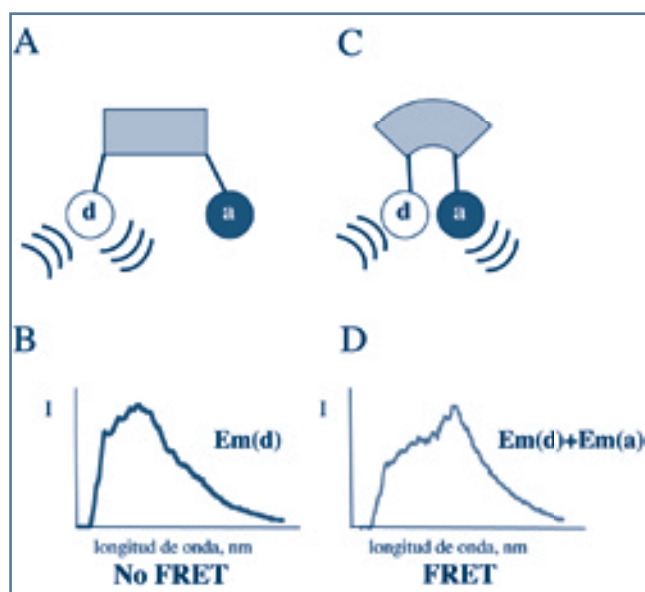


Figura 1. Mecanismo de FRET. A, representación esquemática de una proteína marcada con dos fluoróforos que forman un par FRET y se encuentran a gran distancia. d, donador; a, aceptor. B, al excitar el donador en ausencia de FRET se obtiene el espectro de emisión del mismo (Em(d)). C, un cambio conformacional podría producir un acercamiento de los fluoróforos, dando lugar a FRET. D, al excitar el donador en condiciones de FRET se obtiene una combinación de ambos espectros de emisión (Em(d)+Em(a)).

En términos generales, los componentes del equipo son los siguientes (indicando entre paréntesis los componentes concretos del equipo en nuestro laboratorio):

1. Cámara CCD (Roper Scientific).
2. Fuente de iluminación (láser o lámpara de Xenon).
3. Microscopio invertido de fluorescencia (Olympus X71), equipado con objetivos 10X y 60X (inmersión; 1,40 NA) y filtros de emisión y excitación adecuados a los fluoróforos empleados como marcadores.
4. Software para adquisición y análisis de imagen (Meta-morph, Universal Análisis; Igor software, Wavemetrics).
5. Equipo de patch-clamp, que incluye un amplificador (EPC-9, HEKA Elektronik), micromanipulador (Sutter) y software para la recogida de datos y análisis (Pulse/PulseFit, HEKA Elektronik).
6. Equipo de adquisición de espectros. Ésta puede ser realizada mediante un espectrógrafo (Acton Research) que, mediante una red de dispersión, permite obtener el espectro de emisión de la especie estudiada en una sola imagen. La resolución del espectro depende del tipo de red de dispersión utilizada. Alternativamente, se puede usar una rueda de filtros de emisión o un microscopio confocal espectral (Leica).

Diseño experimental y análisis

El método más adecuado de expresión es por inyección del mRNA correspondiente a la proteína de interés en oocitos de *Xenopus laevis*. El uso de líneas celulares de mamífero (como HEK293 o CHO) implica una dificultad técnica adicional, ya que para obtener suficiente señal de fluorescencia el tamaño óptimo del parche debe ser 10-15 μm , cercano al tamaño de una célula completa.

Las pipetas utilizadas no requieren un tipo de vidrio especial. En nuestro caso, utilizamos capilares comunes tipo

Drummond o Kimax. Aunque algunos autores sugieren que el uso de pipetas de cuarzo es más adecuado para evitar contaminación de la medida por autofluorescencia, en nuestros experimentos no se observó fluorescencia en pipetas que no contenían parches (Zheng and Zagotta, 2003). Las pipetas se fabrican en un estirador; ajustando los parámetros para conseguir aperturas de gran tamaño. A continuación se pulen mediante calor hasta ajustar dicha apertura a 10-15 μm . Estas pipetas, con bordes grandes y redondeados, permiten obtener parches muy estables en oocitos de *Xenopus*. Éste es un requisito importante, ya que los experimentos implican diversas manipulaciones en el entorno del microscopio (cambio de objetivos, filtros y ajuste del espectrógrafo) que muy probablemente destruirían el parche de membrana al usar otro tipo de pipeta.

La obtención de parches de membrana se realiza por el método de patch-clamp convencional (Hamill et al., 1981). Con el objetivo 10X se obtiene el sello en el oocito. A continuación, la pipeta se aleja del mismo lentamente para escindir el parche. Una vez obtenido el parche en la pipeta, el oocito se aleja del campo de visión y el objetivo se cambia al 60X. La altura de la pipeta se ajusta entonces hasta enfocar el parche de membrana, iluminando a la longitud de onda del fluoróforo utilizado (488 nm para la YFP; fig. 2A).

Para obtener el espectro del parche es necesario delimitar el área de luz de emisión, mediante una apertura a la entrada del espectrógrafo, a una franja conteniendo el parche de membrana. En las imágenes recogidas en la cámara CCD, el eje vertical corresponde a la coordenada espacial y el eje horizontal corresponde a las distintas longitudes de onda en las que la emisión ha sido dispersada. El espectro de emisión del parche se obtiene al representar la intensidad de cada píxel a lo largo de la coordenada horizontal, como se representa en la fig. 2C-E. Alternativamente, el espectro se puede obtener mediante un microscopio confocal espectral (fig. 2F).

El espectro de los parches conteniendo heterotetrámeros donador/aceptor (fig. 2E) está compuesto por la emisión del donador (CFP) y la emisión del aceptador, por excitación directa y por FRET. El análisis experimental requiere la extracción de los distintos componentes mediante el ajuste de los datos a la función más adecuada (en nuestro caso, utilizamos el método de los mínimos cuadrados). La emisión del donador se elimina mediante la sustracción de un espectro control de CFP (línea de puntos en fig. 3A), y el resultado (línea gruesa en fig. 3A) se normaliza respecto al espectro de emisión total del aceptador a la longitud de onda de excitación del mismo (fig. 3B). El componente debido a la excitación directa del aceptador se obtiene en parches conteniendo canales hsl-YFP (fig. 3C). Nuestros resultados preliminares indican movimientos conformacionales de la estructura del canal dependientes de calcio y voltaje, en distinta medida según el sitio de inserción de los fluoróforos (Giráldez, 2004).

Otras aplicaciones

Aunque este artículo se ha centrado en la aplicación de la fluorescencia en parches de membrana al estudio de cambios conformacionales en canales iónicos, es importante resaltar la enorme versatilidad que este método presenta. Así, puede ser aplicado a otras proteínas de membrana, como receptores o transportadores. Por otro lado, la medida de fluorescencia

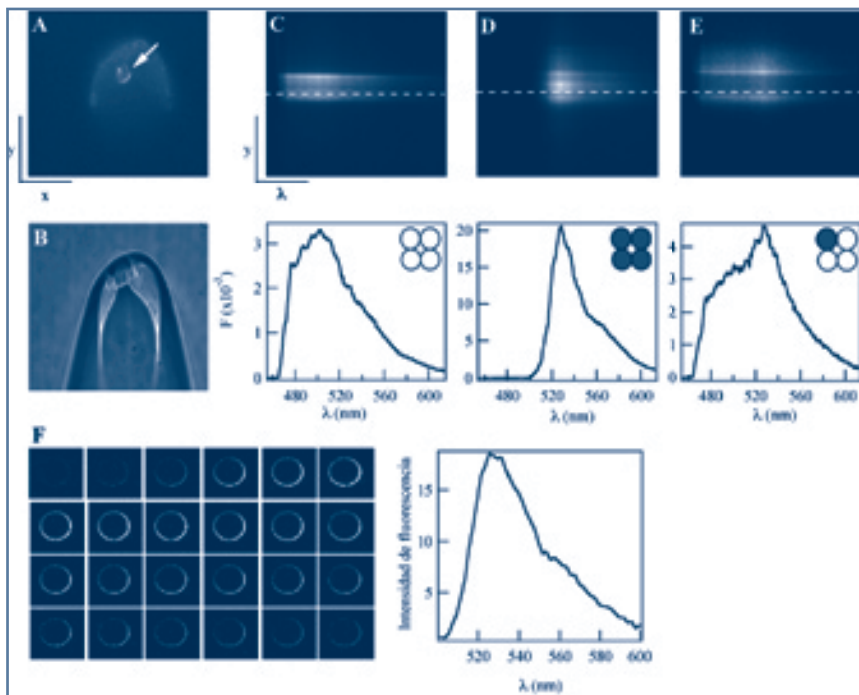


Figura 2. A-B Imágenes de la pipeta de patch-clamp. A, luz de excitación de 488 nm. El parche de membrana, expresando hsl-YFP, se ha señalado con una flecha. La fluorescencia que rodea la pipeta proviene de restos de membrana adheridos al parche durante los procesos de sellado y excisión. B, campo claro. C-E, espectros correspondientes a parches de membrana expresando combinaciones de subunidades marcadas con proteínas fluorescentes. C, homotetrámeros CFP. D, homotetrámeros YFP. E, heterotetrámeros YFP/CFP. F, obtención de espectros utilizando un microscopio confocal espectral. Izquierda: imágenes correspondientes a un oocito entero de *Xenopus* expresando hsl-YFP. Cada imagen corresponde a un rango de 4 nm de emisión. Derecha: espectro de emisión de la YFP obtenido a partir de las imágenes de la izquierda. Este método podría ser empleado análogamente con un parche de membrana.

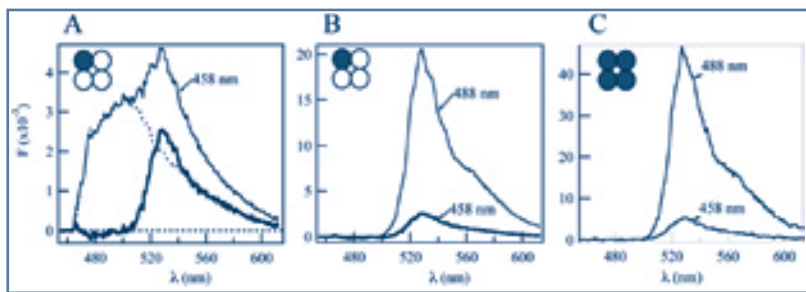


Figura 3. Análisis experimental. A, línea continua (“458 nm”), espectro correspondiente a un parche de membrana expresando heterotetrámeros donador/aceptor. Línea discontinua, espectro del donador. Línea gruesa, emisión del aceptor. B, La emisión es normalizada frente a la emisión total del aceptor. C, la excitación directa del aceptor se calcula en parches expresando homotetrámeros hsls-YFP. Las longitudes de onda de excitación a las que se obtuvo cada espectro se señalan con flechas sobre el registro. La combinación de las proteínas se representa esquemáticamente en cada gráfica. Círculos grises, YFP. Círculos blancos, CFP.

puede realizarse independientemente, y no necesariamente acoplada al registro de patch-clamp. Se ha empleado esta técnica para estudiar la estequiometría de complejos proteicos en la membrana plasmática (Zheng et al., 2002). Una aplicación aún más interesante sería el estudio de mecanismos de regulación. Las proteínas reguladoras podrían ser marcadas con diversos fluoróforos formando par de FRET con el marcador de la proteína de interés. El registro simultáneo de función y fluorescencia procurará información muy importante, espacial y temporal, acerca de los componentes y mecanismos moleculares implicados en la acción de las distintas proteínas reguladoras.

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a Fred Sigworth y Bill Zagotta, por sus útiles comentarios sobre el manuscrito.

Referencias:

- Bezanilla F (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80: 555-592.
- Cha A, Bezanilla F (1997). Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence. *Neuron* 19: 1127-1140.
- Gandhi CS, Loots E, Isacoff EY (2000). Reconstructing voltage sensor-pore interaction from a fluorescence scan of a voltage-gated K⁺ channel. *Neuron* 27: 585-595.
- Giráldez T, Islas LD, Zagottw WN, Sigworth FJ (2004). Random insertion of GFP variants into the hsls channel: expression and fluorescence. *Biophys J* 86.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
- Hille B (2001). Ion Channels of excitable membranes, 3 edn (Sunderland, MA, Sinauer Associates).
- Mannuzzo LM, Moronne MM, Isacoff EY (1996). Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 271: 213-216.
- Selvin P R (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol* 246, 300-334.
- Sheridan DL, Berlot CH, Robert A, Inglis FM, Jakobsdottir KB, Howe JR, Hughes, T E (2002). A new way to rapidly create functional, fluorescent fusion proteins: random insertion of GFP with an in vitro transposition reaction. *BMC Neurosci* 3, 7.
- Tsien RY (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.
- Van der Meer BW, Coker GI, Chen SY (1994). Resonance Energy transfer: Theory and data (New York, NY, VCH).
- Zheng J, Trudeau MC, Zagotta WN (2002). Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* 36: 891-896.
- Zheng J, Zagotta WN (2003). Patch-clamp fluorometry recording of conformational rearrangements of ion channels. *Sci STKE* 2003, PL7.

Teresa Giráldez

Department of cellular and molecular physiology. Yale University School of Medicine. 333 Cedar St, SHM BE30. New Haven, CT 06510 EEUU. Teléfono: +1-(203) 785-6402. FAX: +1-(203) 785-4951 E-mail: teresa.giraldez@cmp.yale.edu



EL RINCÓN DE HIPASO

En el último decenio han aumentado las voces que reclaman prestar más atención al enfoque bayesiano de los tests estadísticos. Un aspecto crucial de esta aproximación consiste en que, a diferencia de los tests clásicos, que sólo consideran el resultado del experimento actual, los análisis bayesianos incorporan la información previa disponible. En este artículo, Diógenes Laercio presenta, de manera intuitiva, la esencia de ese enfoque y algunos de los argumentos más relevantes a favor y en contra.

TESTS BAYESIANOS. Diógenes Laercio

La idea básica es que las tesis inicialmente poco probables requieren, para ser aceptadas, datos empíricos más favorables que las tesis inicialmente más probables. Así lo hacemos en la vida común y es a todas luces obligado desde el punto de vista de la lógica. La llamada Inferencia Bayesiana tiene en cuenta esa incuestionable verdad.

Veamos este ejemplo de la vida cotidiana: Juan otea el cielo, en espera de que haga un día soleado para salir al campo, y lo ve parcialmente nuboso. Si esto ocurre en Escocia (donde llueve el 82% de los días) se inclinará por no iniciar la excursión, ante el temor de que llueva. Pero si ocurre en Almería (donde llueve el 4% de los días) se pondrá en marcha, confiado en que las nubes dejarán paso a un radiante sol. Ante un mismo dato observado – cielo parcialmente nuboso – se emite un pronóstico muy distinto según sea la información previa que tengamos sobre ese tema. Y se puede demostrar que actuando de este modo la predicción del clima es a la larga más exitosa que si se ignorara la experiencia previa.

Pero la aplicación de la técnica bayesiana implica manejar

algunos valores que no siempre están claramente establecidos y ello crea dificultades y limitaciones prácticas considerables.

I. El examen final y el rendimiento previo

Para formarse opinión acerca de si una hipótesis de trabajo es o no cierta, los tests clásicos solo tienen en cuenta el resultado del experimento actual, mientras que los tests bayesianos incorporan, además, la información previa que haya sobre ello. Concretamente, empiezan estimando cuál es la probabilidad de que la hipótesis de trabajo sea cierta antes de hacer el experimento (probabilidad “a priori”) y luego calculan esa probabilidad teniendo en cuenta el resultado del experimento (Probabilidad “a posteriori”).

La mayor objeción que se hace al enfoque bayesiano es que la mayoría de las veces no se puede cuantificar como frecuencia relativa la probabilidad de que la hipótesis de trabajo sea cierta. Por ejemplo, si la hipótesis de trabajo es que un nuevo fármaco cura mayor porcentaje de pacientes que el

tratamiento clásico, no parece viable expresar la confianza que tenemos en que eso sea cierto mediante una frecuencia relativa.

Pero en defensa del enfoque bayesiano se puede alegar que los conceptos de “muy probable” y “poco probable” son válidos y utilizables aunque no se puedan cuantificar mediante frecuencias relativas.

Comenzaremos viendo un ejemplo que nos ayude a valorar si es lícito y útil cuantificar la noción de “grande” o “pequeño”, cuando no hay inicialmente un valor numérico asociado.

Si un alumno hace un examen final mediocre y sus notas parciales previas son altas, el profesor lo aprobará, pero si las notas previas son muy malas lo suspenderá. Puede demostrarse que con este criterio el profesor está optimizando sus probabilidades de hacer justicia, de modo que actuando siempre así, a la larga haría justicia más veces que si ignorara las notas previas. Llamemos NP a la nota media de los exámenes parciales y NF a la nota alcanzada en el examen final, ambas en una escala de 0 a 10.

Los tests clásicos equivaldrían a calificar al alumno teniendo en cuenta únicamente la NF, mientras que los tests bayesianos tienen en cuenta, además, la NP. Asumamos que, para tener en cuenta el rendimiento durante el curso, se pone como nota definitiva la media de NP y NF. Habrá acuerdo prácticamente unánime en que esta nota media reflejará mejor que la NF el nivel de conocimientos que tiene el alumno.

Ahora supongamos que la NP se ha perdido y no se puede proceder al cálculo de la media definitiva. El enfoque clásico de la inferencia equivale a decir que en este caso, debemos establecer la calificación definitiva basándonos únicamente la NF. El bayesiano equivale a decir que si el profesor recuerda que el alumno tenía muy buenas calificaciones previas, parece obligado tener en cuenta dicha información, aunque se haya perdido la calificación exacta. Ello podría hacerse atribuyendo al alumno una nota acorde con la impresión que el profesor tiene sobre su rendimiento durante el curso. Si recuerda que el alumno tenía un comportamiento brillante, se puede poner una nota de 9 y si recuerda que el alumno tenía un comportamiento muy pobre se puede poner una nota de 2. Estas aproximaciones, dicen los bayesianos – y el sentido común –, son menos malas que ignorar totalmente el rendimiento durante el curso.

Podemos ilustrar esto con números concretos. Supongamos que la NF ha sido 4.5. Si el alumno ha tenido muy buen rendimiento durante el curso y su nota se ha perdido y estimamos su NP en 8.5, la media definitiva será 6.5, mientras que si estimamos su NP en 9.5 la media definitiva será 7. En cualquier caso, el profesor puede argumentar que la NP del alumno sería superior a 8 y por tanto la nota definitiva debe ser superior a 6.25, lo que supone un aprobado holgado.

Pero si ha tenido muy bajo rendimiento durante el curso y se estima la NP en 2, la media es 3.25 y si se estima la NP en 2.5 la media es 3.5. También ahora parece razonable buscar una cifra máxima, argumentando, por ejemplo, que en todo caso la NP de ese alumno sería inferior a 3, y, por tanto, la definitiva sería inferior a 3.75, lo que implicaría un suspenso claro.

2. Un ejemplo del área médica donde la probabilidad a priori no puede establecerse como una frecuencia relativa.

Para la enfermedad D no hay tratamiento y se curan de forma espontánea el 70% de los pacientes. Nos proponen un nuevo tratamiento, A, del que su promotor dice que es eficaz, es decir, cura más del 70%.

En un estudio piloto, el tratamiento se prueba en N = 6 pacientes y si es inútil esperamos, teóricamente, que se curen 4, (el 70% de 6 es 4.2). En la práctica resultó que curaron los 6 pacientes tratados con A. El test clásico calcula el valor $P = P(\text{todos curados si A no es eficaz}) = 0.7^6 = 0.117$ (1). Por tanto los datos (6 curaciones de 6 tratados) sugieren que A podría curar más del 70%, pero no son una fuerte evidencia en ese sentido .

El test clásico se quedaría en esta duda, mientras que el enfoque bayesiano intenta llegar más allá teniendo en cuenta, además, la información previa que se tiene sobre el problema que se investiga.

En nuestro ejemplo, si A es propuesto por un laboratorio farmacéutico con largo historial de éxitos farmacológicos, nuestra sospecha de que A es eficaz se vería acentuada. Por el contrario, si el producto A es propuesto por un “para-médico” muy poco fiable por haber acumulado muchos fracasos previos, nos inclinaremos a pensar que A no es eficaz.

La inferencia Bayesiana incorpora los razonamientos que acabamos de exponer, pero cuantificando algunas magnitudes para intentar calcular la probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta. Y en ese proceso de cuantificación suelen aparecer ciertas dificultades que iremos viendo en nuestro ejemplo.

a) En primer lugar hay que cuantificar la probabilidad inicial, previa a nuestro experimento, de que A es útil. En la mayoría de los casos no hay información que permita cifrar esa probabilidad en una determinada cantidad, ni siquiera por aproximación. Si A es propuesto por un laboratorio muy acreditado, diremos que la probabilidad de que sea útil es “alta”, pero no la podremos especificar si es, por ejemplo, 78% u 87% o 96%, u otra cantidad próxima a la unidad.

Si por el contrario, lo propone el curandero poco fiable, diremos que la probabilidad de que sea útil es baja, pero, de nuevo, sin poder especificar si se trata de, por ejemplo, 0.1% o 2% o 7% o cualquier otro valor próximo a cero.

b) Los cálculos Bayesianos requieren, además, especificar la hipótesis de trabajo. En nuestro ejemplo tenemos que especificar cuál es la eficacia del tratamiento A, es decir, qué % de curaciones atribuimos al tratamiento. No basta con decir que confiamos en que A cure “más del 70%”, tenemos que concretar cuál sería ese % superior a 70%.

El siguiente cuadro indica los valores de la probabilidad de que “A” cure realmente cierto porcentaje para diferentes cantidades de las dos magnitudes que requieren ser especificadas (probabilidades “a posteriori”).

Sin tto. se curan 70%.				
En la muestra se curan los 6 tratados $P_{\text{test}} = 0.117$				
Si el fármaco realmente cura → Probab. “a priori” ↓	80%	85%	90%	95%
0.02	0.04	0.06	0.08	0.11
0.10	0.20	0.26	0.33	0.41
0.85	0.93	0.95	0.96	0.97
0.95	0.98	0.98	0.99	0.99

A modo de ejemplo interpretemos dos valores de esta tabla:

-Si sabemos que un fármaco realmente cura 70% u 80%, y si la confianza en que el % real de curaciones sea 80%, es $P = 0.02$, entonces la probabilidad de que el % real de curaciones sea 80% es $P = 0.04$

¹ Si ‘A’ es inútil, de cada 1000 grupos de 6 pacientes tratados con A en 117 se curarían los 6 pacientes.

-Si la confianza inicial en que cure 80% fuera 0.10, la probabilidad de que sea cierto es 0.20 y si la confianza inicial en que cure 80% fuera 0.85, la probabilidad de que sea cierto es 0.93

Pero si sabemos que un fármaco realmente cura 70% u 90%, y si la confianza en que el % real de curaciones sea 90% es $P = 0.02$, entonces la probabilidad de que el % real de curaciones sea 90% es $P = 0.08$

Resumiendo, el test clásico nos da valor $P = 0.117$, que es una evidencia muy modesta a favor de la eficacia. El enfoque bayesiano nos dice que si ciframos la eficacia del fármaco en que cure el 80% de los pacientes y es recomendado por un laboratorio fiable que tiene éxito en aproximadamente el 95%

de sus productos, la probabilidad de que éste sea eficaz es del 98%. Si, por el contrario, quien propone que el nuevo fármaco que cura el 80% de los pacientes es una persona poco fiable, del que se sabe que ha tenido éxito en sólo aproximadamente el 2% de sus propuestas, la probabilidad de que el fármaco sea eficaz estaría en torno al 4%. Vemos que el tener en cuenta la información previa, en este caso la fiabilidad del promotor, nos ayuda a describir mejor la realidad, lo cual redundará, llegado el caso, en acciones más correctas.

Diógenes Laercio
Departamento de Estadística. Universidad Complutense
E-mail: tatopv@med.ucm.es

ACTUALIZACIÓN *actualización*

Los Juegos Olímpicos, celebrados en la ciudad de México en 1968 (a 2227 m de altura), marcaron el inicio de la investigación sistemática de los efectos de la altitud en el rendimiento deportivo y de las posibilidades del entrenamiento en hipoxia con objeto de mejorar la capacidad de rendimiento físico en altitud y a nivel del mar. Actualmente, el entrenamiento en altitud real o simulada y la exposición a hipoxia intermitente constituyen prácticas habituales en deportistas de distintas modalidades. En el presente artículo se revisan algunos de los métodos y estrategias utilizados, así como los resultados publicados en la literatura científica acerca de la efectividad de dichos programas.



ALTITUD SIMULADA Y DEPORTE: APLICACIÓN DE LA HIPOXIA INTERMITENTE A LA MEJORA DEL RENDIMIENTO DEPORTIVO. Ferran A. Rodríguez

Métodos de aplicación de la hipoxia en el deporte

A pesar de que los beneficios del entrenamiento en altitud son objeto de controversia en la literatura científica, este método forma parte de la preparación de muchos deportistas de medio y alto nivel en todo el mundo. Se han creado centros de entrenamiento en altitud en muchos países que acogen un número creciente de deportistas de diferentes disciplinas. No obstante, dichos centros sólo pueden ubicarse en zonas de montaña y su uso comporta problemas médicos, técnicos, psicológicos, logísticos y financieros cuando deportistas, técnicos, médicos y fisiólogos deben desplazarse y permanecer durante el tiempo necesario en altura. En consecuencia, investigadores de países sin zonas elevadas o con un alto desarrollo deportivo han estudiado métodos alternativos de exposición a la altitud simulada que permitan reproducir las adaptaciones propias que se dan en condiciones de altitud real.

En fisiología distinguimos entre hipoxia hipobárica (PO_2 baja debido a la disminución de la presión barométrica) e hipoxia normobárica (baja concentración de la fracción de oxígeno en el aire o $F_I O_2$ a presión barométrica normal). La hipoxia de altitud o real (hipobárica) se produce al ascender a altitud moderada o elevada (montañas o vuelos atmosféricos) a medida que se reduce la presión al aumentar la elevación sobre el nivel del mar. Entendemos por altitud simulada la hipoxia hipobárica creada artificialmente mediante el uso de cámaras de baja presión o hipobáricas. La hipoxia normobárica puede crearse artificialmente mediante el uso de distintos procesos tecnológicos que permiten reducir la concentración de oxígeno en el aire ambiente. La tabla 1 resume los métodos hipoxicos y las estrategias más utilizados en el ámbito del deporte.

Tabla 1. Métodos hipoxicos en el ámbito del deporte (Rodríguez, 2002).

Método	Principio físico	Tipo de hipoxia	Instalaciones / Estrategias comunes ^a
Altitud moderada a elevada	Reducción natural de la presión atmosférica y de O_2 ($\downarrow PO_2$)	Hipobárica, continua o intermitente	Centros de entrenamiento en altitud (montañas) Estancias continuas o intermitentes en altitud (LH-TH, LH-TL, LL-TH)
Cámaras hipobáricas	Reducción artificial de la presión atmosférica y de O_2 ($\downarrow PO_2$)	Hipobárica, intermitente	Cámaras hipobáricas (de descompresión o de baja presión) Exposición intermitente, pasiva (LH-TL) o combinada con entrenamiento en hipoxia (LL-TH)
Mezclas de gases hipoxicos	Reducción artificial de la concentración de O_2 en el aire inspirado ($\downarrow F_I O_2$)	Normobárica, intermitente	Mezclas de gases hipoxicos (bombonas) Exposición intermitente, generalmente durante el entrenamiento (LL-TH)
Casas hipoxicas, cámaras portátiles y tiendas	$\downarrow F_I O_2$ artificial mediante adición de N_2 al aire atmosférico o uso de filtros de O_2	Normobárica, intermitente	Casas, apartamentos, cámaras portátiles o tiendas con sistema de adición de N_2 o membranas filtrantes de O_2 Exposición intermitente, generalmente durante el sueño o periodos de descanso (LH-TL)
Aparatos respiratorios hipoxicos	$\downarrow F_I O_2$ artificial mediante uso de filtros de O_2	Normobárica, intermitente	Aparatos portátiles (con máscaras respiratorias) que producen mezclas de gases hipoxicos Exposición intermitente, generalmente combinada con entrenamiento (LL-TH)

^a L = live; T = train; H = high; L = low (vg: "Live High-Train Low" = LH-TL). Se utiliza la terminología anglosajona por su amplia difusión.

La hipoxia intermitente (HI) puede definirse como la exposición a hipoxia durante periodos que varían entre unos pocos minutos y algunas horas, repetidos durante varios días e interrumpidos por periodos de normoxia o de exposición a niveles menores de hipoxia. Así, el término se utiliza. Por un lado, para diferenciar los estímulos hipóxicos intermitentes de un estímulo hipóxico aislado, y, por otro, de la exposición a la hipoxia crónica o continua (HC) (Powell and Garcia, 2000). Las razones prácticas para el uso de la HI como alternativa a la altitud “convencional” o al entrenamiento en altitud (HC en montañas) son: 1) la accesibilidad y disponibilidad de un ambiente artificial situado a baja altitud o a nivel del mar, y 2) la “dosis” del estímulo hipóxico, generalmente más intenso pero de menor duración, que se considera más segura y compatible con unas condiciones de vida normales y un riesgo menor de producir síntomas del llamado mal agudo de montaña (MAM) en sujetos no aclimatados. La expresión “HI de corta duración” fue utilizada por Richalet et al. (1992) para describir la exposición a HI durante unas pocas horas, en concreto de 3 a 13 h, con posterioridad a una semana de exposición a HC. Nosotros hemos ampliado la utilización de dicho término a la exposición a hipoxia intermitente de corta duración, compatible con una vida normal y acompañada de entrenamiento a nivel del mar, mantenida durante algunos días o semanas (Rodríguez et al. 1998, 2000).

Muchos de los efectos fisiológicos potenciales de la HI son comparables a los que produce la hipoxia crónica. Para más información al respecto el lector puede consultar el artículo de revisión de Powell y García (2000). Las adaptaciones a la HI que han sido objeto de estudio pueden resumirse en: 1) aclimatación a la altitud (ventilación, respuesta ventilatoria a la hipoxia, saturación arterial de oxígeno); 2) respuestas y adaptaciones hematológicas (EPO, eritropoyesis); y 3) efectos sobre el rendimiento físico y la capacidad aeróbica (rendimiento deportivo, tolerancia al esfuerzo, umbrales ventilatorios y de lactato, consumo máximo de oxígeno). Dichas adaptaciones dependen de diversos parámetros, algunos de los cuales caracterizan la “dosis” de HI mientras que, otros son relativos al entrenamiento físico y al estado clínico del los sujetos. Entre los parámetros mencionados se incluyen el grado de hipoxia (altitud simulada), la duración de las exposiciones agudas (estímulos hipóxicos aislados), la duración del programa de HI, el tipo de intervención y/o entrenamiento (exposición pasiva o entrenamiento hipóxico), las características de la carga de entrenamiento, el nivel de condición física y competitivo de los sujetos y su estado clínico, etc. La heterogeneidad que resulta de la combinación de dichos factores hace que la investigación en este campo sea particularmente compleja.

HI y rendimiento a nivel del mar

El entrenamiento en altitud ha sido incorporado ampliamente a los regímenes de preparación de un gran número de deportistas en las últimas décadas. No obstante, la cuestión de si dicho tipo de entrenamiento mejora o no el rendimiento a nivel del mar es aún objeto de controversia (Wolski et al. 1996). La razón puede encontrarse en el hecho de que la mayoría de beneficios potenciales que se derivan de los mecanismos de aclimatación a la altitud (por ejemplo, la estimulación de la eritropoyesis) se compensan con una reducción de la carga de entrenamiento impuesta por el mismo factor que produce las adaptaciones favorables: el ambiente hipóxico.

En general, en aquellos estudios en que se han utilizado grupos de control y diseños experimentales adecuados, no se ha demostrado que los deportistas que han vivido y entrenado a altitud moderada hayan experimentado ventajas sobre aquellos que han entrenado a nivel del mar (Adams et al. 1975). Más recientemente, un grupo de corredores entrenados y de élite que habitaron a altitud moderada (2500 m) y entrenaron a una

altitud menor (1250 m), estrategia conocida como “live high-train low” (LH-TL), mejoró su rendimiento en carrera a nivel del mar debido a un aumento del volumen eritrocitario y del consumo máximo de oxígeno ($VO_{2,max}$) después de una estancia en altitud de cuatro semanas (Levine y Stray-Gundersen 1997, Stray-Gundersen et al. 2001). En dichos estudios se observó una gran variabilidad en la respuesta de los sujetos, pero aquellos que respondieron mejor al programa LH-TL fueron los que mostraron la mayor respuesta eritropoyética, siendo el aumento de $VO_{2,max}$ proporcional al aumento del hematocrito (Chapman et al. 1998). No obstante, es objeto de debate si este tipo de intervención debe considerarse como hipoxia intermitente o crónica, dado que los sujetos estuvieron permanentemente expuestos a un cierto grado de hipoxia y pasan más de 20 horas diarias en hipoxia hipobárica moderada (2500 m).

De cualquier modo, el paradigma LH-TL ha estimulado el desarrollo de diversos nuevos métodos y aparatos diseñados para crear artificialmente condiciones hipóxicas en el laboratorio, e incluso en entornos deportivos o domésticos (tabla 1). En este breve artículo revisaremos someramente los resultados principales de los métodos utilizados más frecuentemente en el ámbito deportivo, especialmente los métodos de hipoxia normobárica e hipobárica intermitente y el entrenamiento hipóxico.

HI normobárica

El efecto de la HI normobárica utilizando los denominados casas o apartamentos hipóxicos ha sido investigado en deportistas de resistencia (corredores, ciclistas, triatletas y esquiadores) en conjunción con entrenamiento a nivel del mar. Dichos estudios, que pueden considerarse como métodos artificiales que se ajustan al paradigma LH-TL, simulan típicamente altitudes entre 2000 y 3000 m en las que los deportistas permanecen de 8 a 18 horas diarias, completando su entrenamiento a nivel del mar o a muy baja altitud (<600 m). En una revisión reciente de doce estudios realizados fundamentalmente en Finlandia, Suecia y Australia, Wilber (2001) concluye que sólo algunos mostraron cambios en los niveles de EPO, recuento de reticulocitos y masa eritrocitaria, mientras que la mayoría no mostraron cambios significativos en los indicadores hematológicos (tabla 2). Sólo un estudio mostró un pequeño pero significativo aumento del $VO_{2,max}$ (3%). No obstante, dos de los estudios pusieron de manifiesto mejoras significativas del rendimiento en pruebas de 40 km en bicicleta y de 400 m en natación, respectivamente, aunque conviene tener en cuenta que sólo éste último incluyó un grupo control a nivel del mar. Wilber concluyó que estas amplias discrepancias pueden ser debidas en parte a diferencias en la metodología empleada, en el estímulo hipóxico a que se sometió a los deportistas y/o al nivel de entrenamiento previo de los mismos. Además, dicho autor subraya la inconsistencia de los resultados derivados de esta estrategia en particular.

HI hipobárica

El uso de la HI hipobárica se basa en la observación de que breves exposiciones a niveles relativamente elevados de hipoxia estimulan la secreción endógena de EPO (Eckardt et al. 1989). Se presume que dicha respuesta al estímulo hipóxico, mantenida durante un periodo de tiempo apropiado, estimularía la eritropoyesis y, en última instancia, aumentaría el $VO_{2,max}$ y/o el rendimiento en pruebas de resistencia.

En una serie de estudios realizados en nuestro laboratorio hemos ensayado un modelo de HI de corta duración, con niveles elevados de hipoxia en comparación con la mayoría de estudios que emplearon HI normobárica (de 1.5 a 5 h de

exposición a una altitud simulada equivalente a 4000-5000 m) y exposición crónica de menor duración (2-3 semanas). En un estudio con 17 alpinistas entrenados a los que se expuso a HI en cámara hipobárica, 2 a 5 h diarias durante 9 días, a una altitud simulada de 4000 a 5500 m (Rodríguez et al. 1999), observamos un aumento significativo del tiempo máximo de ejercicio (3,9%), de la ventilación máxima (5,5%) y del umbral de lactato, indicando una mejora de la resistencia aeróbica, paralelamente a un aumento del hematocrito, del recuento eritrocitario y reticulocitario y de la concentración de hemoglobina ([Hb]). Resultados similares obtuvimos utilizando un periodo más largo de exposición (17 días), acompañados en este caso de un aumento no significativo (6,2 %, $p=0.07$) del $VO_{2\max}$ (Casas et al. 2000). En un tercer estudio en que se ensayó una duración del estímulo hipóxico menor (90 min, 3 días semanales durante 3 semanas) detectamos adaptaciones hematológicas comparables, atribuibles al efecto disparo del estímulo hipóxico sobre la secreción de EPO endógena, pero sin cambios significativos en la potencia aeróbica máxima ($VO_{2\max}$) o el rendimiento (Rodríguez et al. 2000). Más recientemente, en un estudio controlado (Rodríguez et al. 2003), 16 nadadores entrenados de alto nivel nacional, incluidos 8 controles a nivel del mar, combinaron la misma carga de entrenamiento a nivel del mar con la exposición a HI durante 10 días en cámara hipobárica (3 h diarias a 4000 a 5500 m de altitud simulada). Sólo el grupo expuesto a HI mejoró significativamente su $VO_{2\max}$ (4 y 7% de aumento en hombres y mujeres, respectivamente), así como su rendimiento, $VO_{2\text{ pico}}$ y cinética de oxígeno en una prueba de 200 m. También en este caso dichos cambios se acompañaron de un aumento del hematocrito (5%) y de la concentración de hemoglobina.

Atendiendo a dichos estudios puede concluirse que una "dosis" adecuada de estímulo hipóxico capaz de estimular la eritropoyesis y de aumentar el rendimiento aeróbico en sujetos entrenados requiere niveles de hipoxia relativamente elevados (por encima de 5000 m) de duración suficiente (por encima de 3 h diarias durante 2-4 semanas), en combinación con entrenamiento a nivel del mar.

No obstante, en un estudio muy reciente y aún en fase de publicación definitiva, en el que un equipo internacional de investigadores realizó el primer estudio controlado a doble ciego sobre los efectos de un programa de exposición de 3 h diarias a 4000-5500 m, 5 días por semana durante un periodo de 4 semanas en nadadores y corredores entrenados, no se observaron mejoras en el rendimiento, economía de carrera o nado ni en parámetros hematológicos, apreciándose sólo mejoras del $VO_{2\max}$ y la ventilación pulmonar máxima, sólo significativas en el grupo de nadadores (Rodríguez et al. 2004). Resultados muy similares, en este caso acompañados de una mejora del umbral ventilatorio, se han obtenido también recientemente en un estudio controlado sin enmascaramiento en triatletas entrenados utilizando el mismo protocolo de exposición (Rodríguez et al., datos no publicados).

Entrenamiento hipóxico intermitente (EHI)

Un método opuesto a la estrategia LH-TL consiste en vivir a nivel del mar y, de forma intermitente, entrenar en condiciones de hipoxia. Este método ha sido denominado "live low, train high" (LL-TH) y, más recientemente, entrenamiento hipóxico intermitente (EHI).

Sólo unos pocos estudios han investigado dicha estrategia y arrojan resultados poco consistentes. Un estudio comparó un modelo de EHI con un entrenamiento en normoxia (Terrados et al. 1988). Un grupo de ciclistas de ruta entrenaron durante 3-4 semanas, 4-5 sesiones por semana, durante 105-150 min, combinando pedaleo continuo e intermitente a una altitud simulada de 2300 m en cámara hipobárica. La capacidad de

trabajo en altitud y a nivel del mar aumentó más en el grupo sometido a EHI que en el grupo que entrenó a nivel del mar. Dicha mejora se acompañó de menor concentración sanguínea de lactato durante el esfuerzo, aumento de la capilarización y menor capacidad glicolítica en la musculatura de los miembros inferiores, pero el $VO_{2\max}$ permaneció invariable en ambos grupos.

En otro estudio con triatletas de competición no se observaron efectos sobre la capacidad aeróbica máxima, el $VO_{2\max}$ ni la eritropoyesis después de 3 semanas de entrenamiento convencional combinado con 3 sesiones semanales de 1,5 h de entrenamiento a una altitud simulada de 4000 m (Vallier et al. 1996). En un estudio similar (Meeuwssen et al. 2000), 16 triatletas de élite entrenaron a una altitud de 2500 m durante 2 horas al 60-70% de la frecuencia cardiaca de reserva durante 10 días. No se observaron incrementos significativos de la concentración de Hb, hematocrito o $VO_{2\max}$. Sin embargo, se pusieron de manifiesto mejoras significativas de la potencia anaeróbica (5%) y de la capacidad anaeróbica (40%), medidas ambas en una prueba de Wingate de 30 segundos, sólo en el grupo sometido a EHI en una segunda prueba de valoración realizada 9 días con posterioridad a la intervención. En cambio, en alpinistas entrenados sometidos a HI en cámara hipobárica durante 9 días (4000-5500 m) no se detectaron diferencias significativas entre un grupo que combinó dicha exposición en reposo con ejercicio de baja intensidad en cicloergómetro y otro grupo que sólo se sometió a hipoxia pasiva y permaneció en reposo durante las sesiones (Rodríguez et al. 1999). Dichos resultados indicaron que cambios observados eran debidos sólo al estímulo hipóxico y no al entrenamiento adicional.

Conclusiones

Los efectos de la HI sobre el rendimiento no son concluyentes para cualquier método y estrategia investigados hasta el momento, quizá debido a diferencias en los métodos de valoración, en la "dosis" del estímulo hipóxico, en el grado de entrenamiento y nivel de rendimiento de los sujetos estudiados y en su respuesta individual al estímulo hipóxico. Se precisan nuevos estudios que investiguen las adaptaciones fisiológicas subyacentes y las estrategias dosis-respuesta óptimas para deportistas, especialmente los de alto nivel. La mayoría de los efectos potenciales que prometen las marcas que comercializan aparatos o instalaciones hipóxicas no han sido corroborados en estudios científicos sólidos. No obstante, la evidencia que va acumulándose mejora nuestra comprensión de los mecanismos fisiológicos de las adaptaciones y los efectos de la HI y abre nuevas posibilidades para su uso en el deporte de competición. Si la hipoxia intermitente es o no una alternativa válida al entrenamiento en altitud convencional, e incluso si dicho entrenamiento es o no efectivo en diversas circunstancias como medio de preparación para la competición a nivel del mar, son cuestiones que permanecen abiertas.

Referencias:

- Adams WC, Bernauer EM, Dill DB, Bomar JB (1975). Effects of equivalent sea-level and altitude training on $VO_{2\max}$ and running performance. *J Appl Physiol* 39: 262-265.
- Casas M, Casas H, Pagès T, Rama R, Ricart A, Ventura JL, Ibáñez J, Rodríguez FA, Viscor G (2000). Intermittent hypobaric hypoxia induces altitude acclimation and improves the lactate threshold. *Aviat Space Environ Med*, 71 (2): 125-130.
- Chapman RF, Stray-Gundersen J, Levine BD (1998). Individual variation in response to altitude training. *J Appl Physiol* 85: 1448-1456.
- Eckardt KU, Boutelier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C (1989). Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 66(4): 1785-1788.
- Levine BD, Stray-Gundersen J (1997). "Living high-training-low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol* 83: 102-112.

Tabla 2. Sinopsis comparativa de los resultados obtenidos mediante el entrenamiento combinado con diversos modelos de exposición a hipoxia intermitente (HI). Ver texto para explicaciones y referencias.

	Entrenamiento a nivel del mar		Entrenamiento hipóxico
	HI normobárica (12-18 h/d, 10-25 d, 2000-3000 m)	HI hipobárica (1.5-5 h/d, 9-21 d, 4000-5500 m)	EHI (1-2 h/d, 9-21 d, 2300-5500 m)
Secreción de EPO	↑	↑↑	?
Reticulocitos	↑=	↑↑=	↑=
Hematocrito	↑=	↑	↑=
[Hb]	=	↑	↑=
Masa eritrocitaria	↑=	=	?
VO ₂ max	=	↑=	=
Umbral anaeróbico	?	↑	↑=
P/capacidad anaeróbica	?	?	↑
Rendimiento ^a	=↑	↑=	↑=
Notas	Modelo LH-TL Gradientes de tiempo/hipoxia/ nivel de entrenamiento?		Modelo LL-TH Volumen e intensidad del entrenamiento reducidos
↑: Aumento; =: Sin cambios; ?: No especificado/medido ^a Rendimiento post-altitud a nivel del mar			

- Powell FL, Garcia N (2000). Physiological effects of intermittent hypoxia. *High Alt Med Biol* 1: 125-136.
- Richalet JP, Bittel J, Herry JP, Savourey G, Le Trong JL, Auvert JF, Janin C (1992). Use of a hypobaric chamber for pre-acclimatization before climbing Mount Everest. *Int J Sports Med* 13 (suppl 1): S216-S220.
- Rodríguez FA (2002). Intermittent hypoxia: an alternative to acclimatization to high altitude and enhancement of athletic performance? *Am J Med Sports* 4(5): 385-391.
- Rodríguez FA, Casas H, Casas M, Ibáñez J, Narro F, Pagés T, Rama R, Ricart A, Ventura JL, Viscor G (1998). Effect of short-term intermittent exposure to hypobaric hypoxia on aerobic performance capacity and erythropoiesis. *Abstract. J Sports Sci* 16(5): 483-484.
- Rodríguez FA, Casas H, Casas M, Pagés T, Rama R, Ricart A, Ventura JL, Ibáñez J, Viscor G (1999). Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc* 31: 264-268.
- Rodríguez FA, Ventura JL, Casas M, Casas H, Pagés T, Rama R, Ricart A, Palacios L, Viscor G (2000). Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 82(3): 170-177.
- Rodríguez FA, Murio J, Ventura JL (2003). Effects of intermittent hypobaric hypoxia and altitude training on physiological and performance parameters in swimmers. *Abstract. Med Sci Sports Exerc* 35(5): S115.
- Rodríguez FA, Truijens M, Townsend NE, Martini ER, Stray-Gundersen J,

- Gore CJ, Levine BD (2004). Effects of four weeks of intermittent hypobaric hypoxia on sea-level running and swimming performance. *Abstract. Med Sci Sports Exerc* 35(5): S115.
- Stray-Gundersen J, Chapman RF, Levine BD (2001). "Living high-training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. *J Appl Physiol* 91(3): 1113-1120.
- Terrados N, Melichna J, Sylven C, Jansson E, Kaijser L (1988) Effects of training at simulated altitude on performance and muscle metabolic capacity in competitive road cyclists. *Eur J Appl Physiol* 57: 203-209.
- Vallier JM, Chateau P, Guezennec CY (1996). Effects of physical training in a hypobaric chamber on the physical performance of competitive triathletes. *Eur J Appl Physiol* 73: 471-478.
- Wilber RL (2001). Current trends in altitude training. *Sports Med* 31(4): 249-265.
- Wolski LA, McKenzie DC, Wenger HA (1996). Altitude training for improvements in sea level performance. Is there scientific evidence of benefit? *Sports Med* 22: 251-263.

Ferran A. Rodríguez

Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya, Universitat de Barcelona. Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya, Av. de l'Estadi, s/n (Anella Olímpica de Montjuïc), 08038 Barcelona. Teléfono: 93 4255445. FAX: 93 4263617. E-mail: farodriguez@gencat.net

Las técnicas electrofisiológicas más ampliamente empleadas para el estudio de la función visual en el humano son el electroretinograma y los potenciales evocados visuales. El electroretinograma (ERG) consiste en una técnica no invasiva de exploración de la función retiniana, que está teniendo un creciente auge en el momento actual. El presente trabajo pretende hacer una revisión de algunos de los métodos electroretinográficos más recientemente estandarizados, haciendo un análisis de su aplicación actual para el estudio de funciones retinianas en condiciones fisiológicas y en enfermedades que conllevan una degeneración de fotorreceptores.

NEUROFISIOLOGÍA APLICADA: USO DE MÉTODOS NO INVASIVOS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RETINIANA Y SUS ALTERACIONES. Román Blanco y Pedro de la Villa

La electrofisiología ha desarrollado una serie de métodos más o menos sofisticados para el estudio de las funciones desempeñadas por el sistema nervioso. Los avances tecnológicos han permitido que muchos de dichos métodos puedan ser aplicados de forma no invasiva al estudio de las funciones del sistema nervioso humano. Entre las distintas técnicas de la

neurofisiología no invasiva, las más desarrolladas son aquellas utilizadas para el estudio de las funciones sensoriales, esto es, del sistema visual, auditivo y somatosensorial.

Quizás por la gran accesibilidad funcional del sistema visual, o quizá por la gran dependencia que los humanos tenemos de la vista, son muchos los investigadores que han

dedicado sus esfuerzos al estudio funcional del sistema visual. Si a ello sumamos la gran discapacidad que padecen los humanos que presentan cualquier tipo de afectación degenerativa de la retina, se entiende mejor la gran labor desarrollada por profesionales de distintos campos de la ciencia y de la técnica para mejorar los métodos que permitan una completa evaluación de la función visual, tanto en sus elementos periféricos (retina) como los elementos más centrales (corteza visual). Con tal propósito, las técnicas electrofisiológicas más ampliamente empleadas en el momento actual para el estudio de la función visual son el electroretinograma (ERG) y los potenciales evocados visuales (PEV) en sus distintas formas.

Las técnicas de registro electrofisiológico han permitido conocer, en animales de experimentación, cómo responde a estímulos lumínicos cada tipo celular del sistema visual y cómo cada célula contribuye al mecanismo de visión. La visión comienza con el proceso de fototransducción que tiene lugar en los fotorreceptores, conos y bastones. Los fotorreceptores traducen la energía lumínica recibida en una serie de señales eléctricas (variaciones lentas del potencial de la membrana). Dichas señales son transmitidas en la primera sinapsis de la vía visual a las células bipolares y de éstas, en la segunda sinapsis de dicha vía, a las células ganglionares. Las células ganglionares conducirán la información recibida, más o menos codificada, hacia el Núcleo Genuculado Lateral (NGL), mediante un código de frecuencias de descarga de potenciales de acción. Las células de relevo del NGL enviarán a su vez la información recibida a la corteza visual primaria, donde comienza la percepción visual. En cada estación de relevo de la vía visual tienen lugar mecanismos de codificación sensorial mediados fundamentalmente por interneuronas. Dichos mecanismos son responsables de los procesos de amplificación, filtrado y codificación de la información recibida.

En la retina existen dos sistemas de detección lumínica; aquél mediado por los bastones, sensibles a mínimas intensidades de luz; y el mediado por los conos, de menor sensibilidad, pero mayor resolución temporal. Por otra parte, es conocido que en la retina humana los conos tienen una localización fundamentalmente central, en la fóvea, mientras que los bastones tienen una disposición más periférica. Asimismo, cada uno de estos tipos de fotorreceptores establece conexiones sinápticas con tipos característicos de células bipolares; las células bipolares de bastón, sufren una despolarización de su membrana en respuesta a un estímulo luminoso; las células bipolares de cono pueden ser de respuesta despolarizante o hiperpolarizante ante un estímulo luminoso. Ambos sistemas de células bipolares, de cono y de bastón, convergen en las mismas células ganglionares, que pueden aumentar o disminuir la frecuencia de descarga de potenciales de acción en respuesta a estímulos lumínicos. Una de las principales propiedades de las células ganglionares de la retina es que responden mejor ante estímulos contrastados (contraste espacial) que ante iluminaciones difusas.

La posibilidad de registrar la actividad eléctrica de la retina en humanos se remonta a los trabajos clásicos de Holmgren, realizados hace más de un siglo. Fueron necesarios muchos años de experimentación y sustanciales mejoras metodológicas para llegar a desarrollar una técnica que pudiese utilizarse sobre humanos de forma segura y que ofreciese unos resultados cuyo análisis posibilitara la evaluación de la función visual. La técnica electroretinográfica en su versión actual consiste en un registro bipolar de la actividad eléctrica de la retina en su conjunto. Para la obtención de dicho registro, se dispone un electrodo en la superficie corneal (o bien en la conjuntiva ocular) y otro en la proximidad de la órbita. Ambos electrodos, conectados a un sistema de amplificación y filtrado, permiten el registro "integral" de la actividad eléctrica generada por los

elementos celulares de la retina. El estudio comparado de la respuesta electroretinográfica en humanos y animales de experimentación ha permitido además saber cuál es la contribución de cada tipo celular de la retina a las deflexiones positivas y negativas de un trazado electroretinográfico patrón en condiciones fisiológicas.

A pesar de que las bases del registro electroretinográfico fueron establecidas hace años, son diversas las formas de registro electroretinográfico utilizadas por los distintos investigadores o clínicos: ERG de campo completo, ERG focal o macular, ERG multifocal, Potencial temprano de fotorreceptor, Respuesta umbral escotópica, ERG de doble flash, ERG de estímulo cromático... Tal diversidad en la técnica de registro llevó a los miembros de la International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) a buscar unas normas internacionales de realización de pruebas de función visual que pudieran ser comparables, independientemente de donde se realicen las mismas (Marmor and Zrenner, 1994; Marmor et al, 2003). De esta forma, la ISCEV establece una serie de protocolos de registro electroretinográfico, ajustados a unos criterios concretos de difusión e intensidad de luz, estado de adaptación, posición de los electrodos de registro, equipo electrónico empleado, secuencia de realización del registro y representación final de trazados electroretinográficos. Por tanto, un electroretinograma estándar, debe incluir cinco trazados (Figura 1), con los que se podrán analizar las siguientes funciones:

1. Sensibilidad de los bastones: corresponde al trazado electroretinográfico obtenido en condiciones de adaptación a la oscuridad (condiciones escotópicas), cuando se aplica un estímulo luminoso de pocos milisegundos de duración, campo completo y de tal intensidad que no llega a inducir respuesta alguna en los conos. El trazado electroretinográfico muestra tan solo una deflexión positiva (denominada onda b) de cientos de μV , que es generada fundamentalmente en las células bipolares de bastón. Dicha onda, de curso temporal lento se ve seriamente disminuida en aquellos pacientes que sufren una degeneración específica de bastones, como ocurre en ciertas formas de retinosis pigmentaria.

2. Respuesta mixta máxima de conos y bastones: consiste en el trazado electroretinográfico que se registra ante un flash de luz blanca, de gran intensidad, que es capaz de activar completamente tanto conos como bastones, obtenido también en condiciones escotópicas. El registro consiste en una deflexión negativa (onda a), generada por la activación eléctrica de los fotorreceptores, seguida de una deflexión positiva (onda b), generada como en el caso anterior, por la activación eléctrica de las células bipolares despolarizantes. Estas ondas se ven disminuidas de amplitud en enfermedades de naturaleza degenerativa que afectan tanto a conos como a bastones y a otros elementos celulares de la retina.

3. Potenciales oscilatorios: consisten en una serie de deflexiones positivas y negativas de curso temporal rápido, que se obtienen al filtrar eléctricamente el registro de la respuesta mixta máxima de conos y bastones. Una vez filtrados los componentes lentos de la respuesta electroretinográfica (generados en fotorreceptores y células bipolares), las deflexiones del trazado corresponderán a la actividad eléctrica generada en neuronas retinianas con capacidad de producir potenciales de acción, células amacrinas y ganglionares. Aunque no exista consenso respecto a su significación definitiva, los potenciales oscilatorios pueden verse afectados en degeneraciones retinianas que afecten específicamente a las células ganglionares, como ocurre en el glaucoma.

4. Respuesta de conos a un flash de luz: consiste en el trazado electroretinográfico que se registra ante un flash de luz blanca de gran intensidad, obtenido tras haber adaptado la

retina a la luz (condiciones fotópicas), que es capaz de activar los conos. El registro consiste en una deflexión negativa (onda a), generada por la activación eléctrica de los conos, seguida de una serie de deflexiones positivas y negativas generadas por activación de células bipolares despolarizantes e hiperpolarizantes. Estas ondas se ven disminuidas en amplitud en enfermedades de naturaleza degenerativa que afectan exclusivamente a conos, como ocurre en ciertas formas específicas de retinosis pigmentaria o en la degeneración macular asociada a la edad.

5. Respuesta estímulos repetidos ("flicker") de 30 Hz: consiste en el trazado electroretinográfico que se registra ante una serie de flashes de luz blanca de gran intensidad, capaces de activar los conos, aplicados con una frecuencia de 30 Hz en condiciones fotópicas. El registro consiste en una serie de deflexiones positivas y negativas, generadas por la activación de los conos y sus células postsinápticas. La alteración de este trazado es frecuente en enfermedades retinianas que conllevan un déficit funcional de los conos en su capacidad de respuesta temporal.

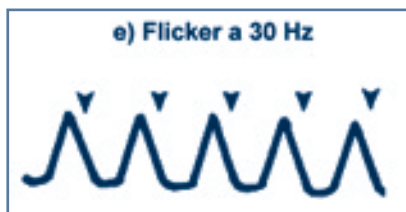


Figura 1. Registros electroretinográficos estándares propuestos por la ISCEV. (Modificado de Marmor et al, 2003). Véase texto.

Los patrones de registro electroretinográfico propuestos por la ISCEV, descritos más arriba, se siguen en la mayoría de los centros clínicos que practican técnicas de neurofisiología no invasiva y sirven para el diagnóstico del grado de afectación funcional en enfermedades degenerativas de la retina. No obstante, recientemente, se han puesto de manifiesto casos de pacientes que sufren un grado importante de déficit visual, sin que los registros electroretinográficos recomendados por la ISCEV muestren alteraciones significativas. Esto ocurre generalmente cuando las lesiones retinianas no afectan a toda la retina en su conjunto, sino que existe una distribución regional de la degeneración retiniana. Tal es el caso de enfermedades como la degeneración macular asociada a la edad o como el glaucoma incipiente. En la primera, la degeneración afecta solamente a los conos, por lo que la lesión será puramente central, conservando el resto del parénquima retiniano un funcionamiento perfecto. En el glaucoma, la degeneración retiniana afecta a regiones paracentrales, sin que exista una gran afectación foveolar ni periférica.

Con el fin de poder llevar a cabo una evaluación funcional en estos pacientes, se diseñó el electroretinograma multifocal (mf-ERG) (Sutter & Tran, 1992). En esta prueba se utiliza un estímulo compuesto por múltiples hexágonos dispuestos en una malla concéntrica, que es capaz de estimular específicamente áreas retinianas centrales (maculares) o periféricas (campos retinianos nasales y temporales, superiores e inferiores), al tiempo que se realiza un registro de la actividad eléctrica retiniana (similar al ERG convencional). Mediante el uso de recursos informáticos y herramientas de computación se pueden estimular distintas áreas retinianas, registrar y promediar las respuestas locales, obteniéndose con ello trazados electroretinográficos de áreas precisas, que informan del estado funcional de cada área de la retina. La disposición espacial de los conos en la retina, con una mayor densidad en la mácula y menor en retina periférica, determina que los trazados electroretinográficos registrados en cada área sean de distinta

magnitud. Esto permite una representación tridimensional de las respuestas electroretinográficas (Figura 2), lo que permite realizar una evaluación funcional de la retina, no sólo en lo que respecta a sus elementos celulares, sino a su afectación espacial. Este tipo de registro está permitiendo en el momento actual llegar a diagnosticar lesiones retinianas de tan solo unos pocos milímetros cuadrados de superficie, en fases precoces de enfermedades degenerativas, que hasta hace pocos años únicamente era posible evidenciar cuando el grado de lesión había producido una discapacidad severa. Como en el caso de la electroretinografía convencional, el mf-ERG también ha sido sometido a unos criterios de estandarización, resumidos recientemente por la ISCEV (Marmor et al, 2003).

Por último, hemos de señalar que las técnicas de registro neurofisiológico no invasivas están en constante evolución, y que cada año se disponen de nuevas técnicas de exploración funcional aplicables a humanos. Esperamos que en un futuro no muy lejano, la mayor disposición de recursos metodológicos permita llevar a cabo una exploración de la actividad funcional de todo el sistema visual, así como que la exploración de centros y vías visuales, que nació con el uso de los VEP (Harding et al, 1996), pueda evolucionar y permitir una evaluación más precisa de la función de regiones concretas de las áreas visuales. Igual que el ERG evolucionó al mf-ERG, los PEV también están ya evolucionando hacia los PEV multifocales (mf-VEP) (Hood & Greenstein, 2003) y esto posiblemente nos permitirá explorar funcionalmente el sistema visual central de los humanos con la misma resolución que ahora se consigue en la retina.

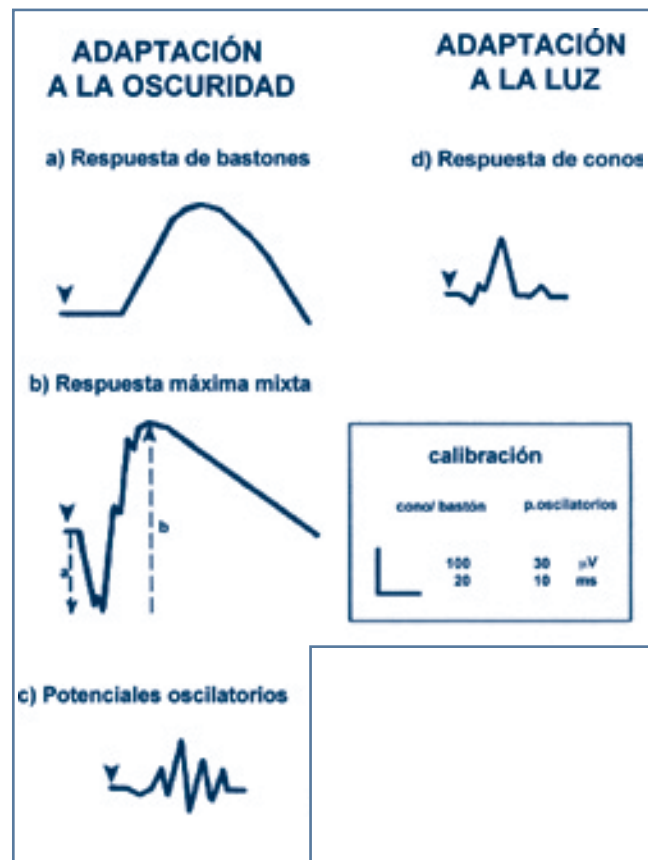


Figura 2. Registro electroretinográfico multifocal (mf-ERG). A. Patrón de estímulo luminoso utilizado para inducir respuestas eléctricas en múltiples regiones retinianas. El estímulo, formado por múltiples hexágonos, se proyecta sobre la retina, fijando el punto central con la fovea. B. Trazados electroretinográficos característicos obtenidos mediante el promediado de señales eléctricas de las distintas regiones retinianas que reciben los estímulos luminosos mostrados en A. C. Representación tridimensional de las respuestas electroretinográficas. El área central corresponde a las zonas retinianas centrales, donde la amplitud de las respuestas eléctricas es mayor (en las representaciones originales se utiliza un código de colores).

Referencias:

- Harding GFA, Odom JV, Spileers W, Spekreijse (1996) Standard for visual evoked potentials. *Vision Res* 23: 3567-3572 .
 - Hood DC, Greenstein VC (2003). Multifocal VEP and ganglion cell damage: applications and limitations for the study of glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 22: 201-251.
 - Marmor MF, Zrenner E (1994) Standard for Clinical Electroretinography. *Doc Ophthalmol* 1995 89: 199-210.
 - Marmor MF, Holder GE, Sellinger MW, Yamamoto S (2003) Standard for Clinical Electroretinography. <www.isceve.org>.
 - Marmor MF, Hood DC, Keating D, Kondo M, Sellinger MW, Miyake Y (2003) Guidelines for basic multifocal electroretinography (mfERG). *Doc Ophthalmol* 106: 105-115.

- Sutter EE, Tran D (1992) The field topography of ERG components in man-I. The photopic luminance response. *Vision Res* 32: 433-466.

Román Blanco¹ y Pedro de la Villa²

¹Smith Kettelwell Eye Research Institute, USA. ²Universidad de Alcalá, España. Dirección de correspondencia: Pedro de la Villa. Departamento de Fisiología. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. 28871 Madrid, Spain. Teléfono: 91 885 4522. FAX: 91 885 4525. E-mail: pedro.villa@uah.es

DOCENCIA *docencia*

Los fisiólogos hemos pasado parte de nuestra vida profesional adaptándonos a cambios en los planes docentes. En algunos casos el cambio nunca se llega a aplicar. En otros, el cambio llega tarde, porque antes de su implantación la turbadora y cambiante realidad nos obliga a iniciar un nuevo proceso revisionista. En este artículo se hace un análisis de la situación actual de la enseñanza de la Medicina en general, y de la Fisiología en especial, en nuestras facultades, y se discuten aquellos cambios que, en opinión del autor, se hace necesario introducir ante el próximo proceso de reforma curricular que habrá de producirse como consecuencia del proceso de convergencia europea en la educación superior.



LA ENSEÑANZA DE LA FISIOLOGÍA EN LAS FACULTADES DE MEDICINA ESPAÑOLAS EN EL CONTEXTO DEL PROCESO DE CONVERGENCIA EUROPEA. *Jorge Palés*

Introducción

Hoy en día, un tema de actualidad en la Universidad Española y en nuestras Facultades de Medicina es el proceso de la Convergencia Europea en la Enseñanza Superior. Este proceso es considerado como una nueva oportunidad para llevar a cabo modificaciones substanciales en nuestros planes de estudios. Por ello, las Universidades en general y las Facultades de Medicina en particular están dando los primeros pasos en este proceso. Dado que la situación actual de la enseñanza de la Fisiología en nuestras Facultades de Medicina sólo puede entenderse dentro del contexto de la situación general de la enseñanza de la medicina en el pregrado, parece oportuno hacer una revisión de la situación, analizando algunos aspectos, que en mi opinión, han de tenerse en cuenta en este proceso que ahora iniciamos.

Situación general de la enseñanza de la medicina en nuestras facultades

En 1990 se inició una reforma de los planes de estudio de pregrado. Esta reforma, basada en unas directrices nacionales algo restrictivas en ciertos aspectos, debió haber sido mejor aprovechada para introducir cambios substanciales en nuestros currícula, habida cuenta de que dichas directivas no incidían en las metodologías y estrategias a utilizar. Sin embargo, los cambios en la mayoría de nuestras facultades de Medicina fueron de tipo cosmético y prácticamente en ninguna de ellas se introdujo modificaciones de gran calado. Pasados 14 años se mantienen en la enseñanza del pregrado diversos problemas entre los que cabe citar (1):

1) Se siguen impartiendo excesivos contenidos teóricos y en muchos casos irrelevantes, de escasa utilidad para

nuestros alumnos en el momento de iniciar su práctica profesional, sobre todo si tenemos en cuenta la velocidad con la que se generan nuevos conocimientos científicos.

2) La enseñanza impartida sigue estando orientada sobre todo a dar información. Es una enseñanza todavía centrada en el profesor, en lugar de estarlo en el alumno y en la necesidad de que éste sea capaz de adquirir el hábito del aprendizaje autónomo.

3) Se sigue empleando una metodología poco activa y basada en la lección magistral.

4) Las metodologías de evaluación que se utilizan no son totalmente adecuadas.

5) Sigue persistiendo una frontera infranqueable entre el período preclínico y clínico que impide una integración real básica-clínica.

6) Sigue existiendo, a la hora de gestionar la docencia de pregrado, una excesiva autonomía de los departamentos.

7) No se han creado Unidades de Educación Médica a través de las cuales, expertos en Educación Médica, pudieran brindar a los docentes la ayuda necesaria en temas educativos.

8) Existe una falta evidente de recursos humanos y materiales para introducir cambios reales.

9) La función docente es en general poco valorada en comparación con la investigación.

Situación actual de la enseñanza de la Fisiología en las facultades de Medicina

La docencia de la Fisiología no es ajena a los problemas antes referidos (2). A pesar de que en promedio existe una buena ratio profesor/alumno (1/16), la lección magistral sigue siendo el principal método docente en la totalidad de las facultades

(50-65% de toda la docencia). Los seminarios tradicionales es el otro método docente utilizado mayoritariamente en la mayoría de las facultades (90% de los centros). Otras actividades que permitan una implicación más participativa del estudiante, como las sesiones de discusión de casos clínicos elementales y de problemas, sólo se realizan en un 37% de las facultades. Por su parte el aprendizaje basado en problemas no se utiliza en ninguna facultad. En la docencia práctica, además de la falta de recursos, las metodologías mayoritariamente utilizadas son las actividades de laboratorio sin animales (92% de las facultades), las sesiones prácticas de exploraciones funcionales (82% de las facultades) y simulaciones (74% de las Facultades). La utilización de Internet para las prácticas, las exploraciones funcionales en ambientes clínicos y las prácticas con animales son actividades minoritarias (11%, 11% y 7% de las facultades, respectivamente).

Por lo que respecta a la estrategia pedagógica utilizada, en el 66% de las facultades, la Fisiología se imparte de forma independiente de otras materias, sin ningún tipo de coordinación cronológica ni de integración, ya sea horizontal o vertical. En el 18% de las facultades, su docencia se basa en sistemas, pero sin integración con otras ciencias básicas. Sólo en un 15% de las facultades, nuestra disciplina se enseña de forma más o menos integrada con otras ciencias básicas.

Recomendaciones para la reforma y sus posibles implicaciones en la enseñanza de la Fisiología ¿Qué y cómo hemos de enseñar?

La World Federation for Medical Education (WFME) definió en el año 2000 y completó en el año 2003 los estándares para la mejora de la calidad en la educación médica en el pregrado (3,4). Otras instituciones internacionales han elaborado también recomendaciones para el pregrado y entre ellas figuran las referentes a las ciencias básicas (5,6). Expondremos sucintamente algunas de ellas y las discutiremos a la vista de nuestra realidad.

La WFME en el apartado de Misión y Objetivos señala:

Las Facultades de Medicina deben definir las competencias que los estudiantes deberían de mostrar en el momento de la graduación y éstas estar relacionadas con su subsiguiente formación y sus roles futuros dentro del sistema sanitario. Debería especificarse la relación de las competencias que deben adquirir al graduarse con las que se adquirirán en la formación de postgrado.

Existe actualmente en el mundo anglo-sajón un concepto plenamente aceptado que es el de la educación médica basada en los resultados (7,8) ("Outcome-based medical education"). Dicho concepto propugna que la definición previa de competencias de nuestros licenciados, o sea, las características de nuestro producto (el licenciado en Medicina) han de determinar la estructura y los contenidos del currículum, las estrategias y metodologías docentes, los recursos y la evaluación. En otras palabras, el producto ha de definir el proceso y no a la inversa. De hecho, nuestros planes de estudio se han elaborado, por lo general, pensando más en el proceso (horas, créditos, horarios, intereses personales, etc.) que en las características del producto que queremos formar. Por el contrario, prácticamente en ninguna de nuestras facultades se han definido específicamente dichas competencias, siendo difícil establecer por ello la contribución de todas las áreas implicadas en su adquisición.

Determinadas instancias internacionales han definido los requerimientos mínimos globales que han de reunir todos los médicos independientemente de donde se formen (5) y a nivel nacional se han iniciado ya procesos de especificación de competencias específicas (9,10). Si analizamos estas experiencias, constataremos que existen una serie de competencias de tipo transversal, que afectan a varias o a todas las áreas

de conocimiento y que deben adquirirse a lo largo de toda la licenciatura. La Fisiología, juntamente con otras áreas de conocimiento, ha de contribuir a la adquisición de las mismas.

Algunos ejemplos serían:

- a) Utilizar la información de forma racional aplicándola a la resolución de los problemas que se le puedan plantear en cualquier momento.
- b) Adquirir habilidades de comunicación oral, escrita y gráfica.
- c) Adquirir habilidades de consulta bibliográfica.
- d) Conocer el método científico y utilizarlo.
- e) Ser consciente de la importancia de aprender autónomamente y de forma continuada.
- f) Adquirir el hábito de trabajar en equipo.

Por otra parte, hay competencias que dependen específicamente de la Fisiología como disciplina. Estas competencias podrían resumirse de forma general como la adquisición de conocimientos y comprensión sobre:

- a) Las funciones normales del organismo humano como sistema biológico complejo adaptativo.
- b) Los mecanismos que mantienen la homeostasis del organismo humano a los diferentes niveles (molecular, celular y orgánico).
- c) El ciclo vital humano y los efectos del crecimiento y el desarrollo y el envejecimiento sobre el individuo.
- d) Las bases y los métodos de la exploración funcional de los diferentes sistemas.

¿De qué manera la Fisiología ha de contribuir a la adquisición de estas competencias? Para ello debemos abordar cuáles son los contenidos que ha de impartir la Fisiología y, sobre todo, cómo se han de impartir.

En el apartado de las Ciencias Biomédicas Básicas, de las cuales forma parte la Fisiología, los estándares de la WFME explicitan:

La facultad de Medicina debe identificar e incorporar en los currícula las contribuciones de las ciencias biomédicas básicas que permitan la comprensión del conocimiento científico y de conceptos y los métodos necesarios para adquirir y aplicar las ciencias clínicas.

Las contribuciones de los programas de las ciencias biomédicas básicas en el currículum deberían adaptarse a los nuevos desarrollos tecnológicos y clínicos así como también a las necesidades de salud de la población.

Tradicionalmente, la Fisiología Humana, incluida en el currículum de las Facultades de Medicina, era y sigue siendo considerada como una ciencia básica que define las características del hombre sano, en estado de salud y sirve de base para el estudio de las desviaciones anormales en el estado de enfermedad. Entendida así, la enseñanza de la Fisiología persigue el conocimiento de las funciones del organismo, la adquisición de la metodología necesaria para su estudio, el desarrollo de actitudes frente al mantenimiento de la salud de los individuos y de la comunidad, y el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, la Fisiología, en el contexto de la licenciatura de Medicina, además de ser la base de la Fisiopatología y un soporte para entender la enfermedad, es también una base cuantitativa para determinar el grado de salud/enfermedad de un individuo o de un colectivo y de su respuesta a los determinantes externos que amenazan su salud. Asimismo, es soporte de la salud pública, al servir para el establecimiento de criterios diagnósticos y preventivos, a la vez que del desarrollo de los elementos de salud individual y colectiva.

Este énfasis que se hace en la necesidad de formar profesionales sanitarios cuya función sea el cuidado de la salud, la prevención y el tratamiento de la enfermedad, obliga a definir con más exactitud las competencias de nuestros licenciados, a demarcar con precisión los objetivos de aprendizaje y a integrar

la enseñanza de la Medicina con la de las ciencias sociales y de la conducta. Entendida de esta forma la enseñanza de la Medicina, la Fisiología adquiere una importancia decisiva, de acción directa, por su estudio del hombre sano, en el cuidado de la salud, además de cumplir su función clásica como ciencia básica para el estudio de la medicina preventiva y curativa.

Por otra parte, la Fisiología, junto con la Bioquímica, ha comenzado a recibir el tipo de críticas que hasta ahora eran exclusivas de áreas como las morfológicas. Se pone en duda la pertinencia de alguno de los contenidos enseñados y se critica la excesiva carga de información a la que se ven sometidos los alumnos. El problema tiene, en parte, su origen en el rápido desarrollo de la Fisiología en los últimos años. Ello ha determinado, no sólo un aumento masivo de conocimientos, sino también la delimitación de problemas y de objetivos propios, independientes y no subsidiarios de una Licenciatura o enseñanza específicas. Este fenómeno se ha concretado en diferentes actitudes a la hora de enseñar Fisiología. Si bien las clasificaciones demasiado esquemáticas no se ajustan a la realidad, me permitiré caracterizar estas actitudes en dos extremas con la intención de hacerlas más comprensibles. Una, consistente en enseñar una Fisiología "dura", tal y como se está generando en la investigación y de la cual los futuros licenciados tendrán que sacar lo que puedan para su provecho. La otra sería la de enseñar una Fisiología aplicada, es decir, aquella que se propone hacer hincapié en los aspectos más prácticos para el futuro profesional, lo que podríamos llamar una Fisiología "útil".

Y ello incide tanto en las competencias transversales como en las específicamente dependientes de la Fisiología. Si cogemos, por ejemplo, la competencia transversal de formar al estudiante en el método científico y proveer de principios y datos sobre los que se fundan las diferentes enseñanzas, es claro que hacer ver a los estudiantes cómo se genera el conocimiento científico y enseñar a formular hipótesis razonables acerca de los fenómenos observados, requiere cierta libertad para entrar en profundidad en aquellos temas sobre los que existe controversia y poder discutir así en detalle los datos y las observaciones que a primera vista pueden aparecer como irrelevantes. Pero, por otra parte, la constatación de la utilidad práctica de los conocimientos es una motivación potente en los futuros licenciados y ello obliga también a tener en cuenta la enseñanza de los aspectos aplicados. Por ello, sería deseable considerar ambos aspectos en condiciones de igualdad a nivel del pregrado. En cualquier caso, los aspectos que se impartan han de ser en todo caso coherentes con las competencias que se esperan adquieran los estudiantes al final de sus estudios.

En su apartado de Estructura Curricular, la WFME explicita:

Las ciencias biomédicas básicas deben enseñarse de forma integrada con otras ciencias clínicas incluyendo tanto la integración horizontal o concurrente y la integración vertical (secuencial).

El currículum y los métodos educativos deberían asegurar que los estudiantes se responsabilizasen de su proceso de aprendizaje y los deberían preparar para un proceso de aprendizaje autónomo de por vida.

Estos mismos aspectos son expresados claramente por el documento *Tomorrow's doctors. Recommendations on undergraduate medical education* (11), elaborado por el General Medical Council británico (2002).

Estos puntos inciden sobre el tema de cómo se ha de impartir la enseñanza. Dado que las ciencias básicas y especialmente la Fisiología es utilizada en el periodo clínico en mayor medida de lo que parece, hay que considerar la doble integración horizontal y vertical como una muy buena opción de estructura curricular. Ventajas de esta opción serían asegurar una mayor percepción de la relevancia de la Fisiología por los estudiantes, una mayor valoración del papel del científico básico o del fisiólogo en particular y una mayor percepción por

parte del estudiante de la importancia de las ciencias básicas. Sin embargo, frente a éstas y otras claras ventajas que comporta la integración (reducción de la fragmentación, eliminación de repeticiones innecesarias, dar una visión más global y favorecer el contacto entre profesores y departamentos), siguen pesando más los inconvenientes, como pueden ser la exigencia de más dedicación, la conflictividad que subyace en la distribución de temas, la exigencia de un horario estricto, una evaluación más compleja y la sensación de pérdida de capacidad de decisión. Por todo ello, hemos de admitir que, en nuestro entorno, la cultura de la integración está poco extendida, no solo entre los profesores, sino también entre los estudiantes. Además, si bien las directivas nacionales vigentes permiten la integración horizontal, no contemplan la posibilidad de la integración vertical, dada la separación persistente entre el período básico y clínico.

A pesar de lo expuesto, existen alternativas, que sin ser la solución ideal, pueden ayudar paliar este problema. Incorporar elementos clínicos tan pronto como sea posible y conseguir que tanto los científicos básicos como los clínicos se involucren de alguna manera en la enseñanza de temas específicos constituye una de ellas. Otra alternativa consistiría en impartir materias optativas con participación conjunta de clínicos y básicos, situación que se da en algunas de nuestras facultades. Finalmente otra posibilidad sería incorporar en alguna medida la metodología de la enseñanza basada en la solución de problemas, que además facilitaría un tipo de enseñanza más activa por parte de los estudiantes. Aplicar esta metodología, como se hace en muchas facultades europeas, se hace bastante difícil en nuestras facultades al menos de forma estricta. Sin embargo, es posible adoptar sistemas mixtos en los que se utilice dicho enfoque conjuntamente con otras metodologías o estrategias docentes (12). Asimismo, experiencias realizadas hace ya algún tiempo (12) o actualmente vigentes en alguna facultad de medicina española (13), ponen de manifiesto que es posible reducir el peso de la clase magistral tradicional por sesiones de discusión de objetivos por parte de los estudiantes y potenciar una enseñanza más activa, estimulando el aprendizaje autónomo, aunque ello supone tener muy bien definidos estos objetivos, así como facilitar bibliografía adecuada y otros recursos educativos y, sobre todo, cambiar la mentalidad de profesores y alumnos.

Conclusiones

Sin duda el proceso de la Convergencia Europea constituye una magnífica oportunidad para introducir cambios significativos en nuestros planes de estudio. Sin embargo, debemos tener en cuenta que pasar de un sistema como el actual basado en horas/profesor a otro basado en horas/alumnos supone introducir cambios en las estrategias y metodologías educativas muy importantes. Si no, corremos el riesgo de quedarnos con meros cambios cosméticos como en anteriores ocasiones. La convergencia real debe hacerse en aspectos conceptuales y metodológicos con facultades de medicina europeas punteras en docencia (Reino Unido, Países Escandinavos). Muchos de estos aspectos, que hoy nos pueden parecer novedosos, se están aplicando en estas facultades con éxito desde finales de los años 90. Ello requiere sin duda un cambio profundo de mentalidad de los profesores y también de los alumnos. Disponemos de un buen instrumento para renovarnos, pero hemos de ser conscientes de que todo dependerá de cómo se utilice.

Referencias:

- Palés J (1999). Análisis del proceso de implantación de los nuevos planes de estudio de la Licenciatura de Medicina. *Educación Médica*, 2,3: 102-104.

- Palés J (2003). Teaching Physiology in Spanish Medical Schools. XXII Congress of Spanish Society of Physiological Sciences. *International Joint Meeting with the Physiological Society*. Puerto de la Cruz, 13-17 February

- WFME (2000). Estándares internacionales de la educación médica en el pregrado. *Educación Médica* 5: 76-81, 2002.

- WFME (2004). Estándares internacionales de la educación médica en el pregrado. *Educación Médica* 7: supl. I (en prensa)

- Institut for International Medical Education, 2002. (Global Minimum Essential requirements in Medical Education). *Medical Teacher*, 24,2 pp 130-135.

- Good Medical Practice (General Medical Council).(2001) www.gmc-uk.org/standards/good.htm

- Harden R, Crosby JR, Davis MH, Friedman M (1999). AMEE guide nº14: Outcome-based education: Part 5- From competency to meta competency: a model for the specification of learning outcomes. *Medical Teacher* 21, 6: 546-552.

- Scottish doctor-learning outcomes for the medical undergraduate in Scotland: a foundation for competent and reflective practitioners. *Medical Teacher* 2002 24, 2: 136-143

- Palés J, Cardellach F, Estrach MT, Gomar C, Gual A, Pons F, Bombí JA (2004). Defining the learning outcomes of graduates from the medical school at the University of Barcelona. (Catalonia, Spain). *Medical Teacher* (en prensa)

- Competències a adquirir pel llicenciat de Medicina a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona, 2003.

- Tomorrow's Doctors. Recommendations on undergraduate medical education (www.gmc-uk.org/med_ed/tomdoc.htm)

- Palés J, Gual A. (1992). Active and problem-based learning: two year's experience in physiology in the Medical School of the University of Barcelona. *Med. Education*, 26, 466-472.

- Aprendizaje por módulo de objetivos. Página web de la Facultad de Medicina de Albacete. Universidad de Castilla La Mancha. www.med-ad.uclm.es/publico/docencia/fasesmn.htm

Jorge Palés

Departamento de Ciencias Fisiológicas I. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. Sociedad Española de Educación Médica. E-mail: jpales@medicina.ub.es

OPINIÓN *opinión*

La necesidad de divulgar, la forma de hacerlo y los contenidos de esa divulgación son tres cuestiones importantes que Alberto Ferrús aborda con elegancia y fina ironía. Como él dice, y dice bien, las razones para la divulgación son muchas, y la lista no se acaba en las que propone, pero malo sería que una sola no bastase. Sin embargo, a pesar de la abundancia de motivos no parece que los científicos seamos demasiado aficionados al sano ejercicio de la divulgación. ¿Por falta de sensibilidad social? ¿Por incapacidad? ¿Por carencia de virtudes expositivas? Como Ferrús también sugiere, explicar algo con claridad no es tarea sencilla, el ego es más dañino que el tabaco, y no siempre se sabe de lo que se habla.



DIVULGA, QUE ALGO QUEDA. Alberto Ferrús

El 7 de Septiembre de 1558, bajo el reinado de Felipe II, se publicaba una pragmática por la que se prohibía la importación de libros extranjeros en todos los dominios de su cristiana Majestad. Durante los siguientes trescientos años puede decirse que España fue un territorio poco propicio para el cultivo de las ciencias naturales, especialmente en todo aquello que podía hacer referencia a la condición humana. Es cierto que fueron muchas y muy profesionales las expediciones de naturalistas al Nuevo Mundo y que su labor recopiladora fue inestimable. Con todo, el foco de atención fue siempre el de la búsqueda de plantas y minerales de posible utilidad práctica para organizar su explotación. Para detectar las causas de los procesos naturales era preciso haber tenido una educación muy diferente de la ofrecida por un sistema que primaba la fe ante la duda. Resulta difícil de entender porqué no hay una sola ley o principio en cualquier ciencia natural que lleve el nombre de un sabio español, un pueblo que mantuvo el mayor Imperio de la Historia durante tres siglos.

Para entender eso y muchas cosas más es preciso recordar que hasta 1794 estuvo vigente en España el brazo armado del fundamentalismo católico, el Tribunal de la Santa Inquisición. El siglo XIX representó una refrescante brisa de innovación y es aquí cuando floreció la más significada contribución española a la ciencia: Santiago Ramón y Cajal. Cabría esperar que la talla de sus aportaciones y la singularidad del hecho hubieran convertido su caso en el más detallado y ampliamente conocido por, al menos, todos los escolares del país. La realidad, sin embargo, es muy diferente. Ni siquiera existe un Museo con su nombre y los pocos ciudadanos, profesionales de la ciencia incluidos, que identifican su nombre difícilmente conocen algunas de las muchas aportaciones intelectuales que hizo más allá del neuronismo. Es cierto que tras su muerte en

1934, el país entró en un sombrío período de cuarenta años, en el que los Torquemada de la época, con otros uniformes, pero con el mismo cerebro, dominaron la vida y la obra de los españoles en su totalidad. No obstante, han pasado ya una buena veintena de años desde la salida del túnel y es hora de plantear seriamente una solución al problema de la difusión de la ciencia en España.

Esta breve introducción histórica es necesaria porque, de la misma forma que "nada en biología tiene sentido si no es desde el punto de vista evolutivo", también es cierto que ningún proyecto social tiene sentido si no incluye su contexto histórico. Conscientes de ese pasado, cabe ahora hacerse algunas preguntas básicas.

¿Por qué divulgar?

Las razones son múltiples y todas de tal importancia que no pueden ordenarse jerárquicamente. Para empezar, porque es la sociedad la que sostiene el coste de la investigación. Actualmente, las instituciones públicas en cualquier país son las que aportan el volumen más grande de conocimientos nuevos. Es una regla de elemental transparencia administrativa informar al ciudadano sobre el uso que se hace de sus impuestos. Otra razón de peso es porque es necesario no olvidar. Todo progreso en el conocimiento descansa necesariamente en el trabajo anterior. Puede parecer trivial que el conocimiento logrado se mantiene de forma que la sociedad siempre progresa. La Historia, sin embargo, demuestra que esa suposición es errónea. Como ejemplo de que el retroceso es posible, permítaseme evocar la sensación de incredulidad al escuchar al Rector de una universidad de Shangai durante una conferencia en el Instituto Tecnológico de California en 1979 al describir

cómo su equipo de técnicos había aprendido *de nuevo* la técnica de la centrifugación. Sólo al completar el relato con su experiencia personal como genetista quedó evidente la razón del retroceso en el conocimiento. La Revolución Cultural había borrado, manu militari, todo conocimiento sobre técnicas burguesas, enviado a los genetistas a los campos de algodón para apreciar el trabajo manual, buscar estirpes coloreadas de forma natural, etc., etc. No es que sólo sea posible el retroceso, sino que la estupidez humana no conoce límites ni fronteras.

Otra razón de peso para divulgar es la de que el conocimiento hace libre a la persona. La historia de la Humanidad está repleta de ejemplos en los que la sociedad ha tomado decisiones contraproducentes para ella misma al dejarse guiar por interpretaciones mágicas de los fenómenos naturales en lugar de atender a la luz de la razón. Muchos enfermos de epilepsia fueron pasto de hoguera bajo la acusación de posesión diabólica pero, aún hoy, en África, los familiares de esos pacientes acuden con más probabilidad a un brujo que a un hospital. No es necesario abundar en el hecho de que el conocimiento no está homogéneamente distribuido a pesar de los cantos de sirena sobre la globalización y la instantaneidad de las comunicaciones modernas. Hay más razones para divulgar, pero si ninguna de las anteriores parece suficiente por sí sola resulta inútil proseguir la relación.

¿Cómo divulgar?

Con frecuencia he oído quejarse a colegas de profesión sobre la amarga experiencia de transmitir a un periodista los descubrimientos propios o ajenos. “Tengo pánico a los periodistas porque lo tergiversan todo y acaban diciendo barbaridades” es la frase habitual en esas quejas. El problema es que cuando los periodistas piden al científico que escriba su propio texto, la actitud sigue siendo negativa en muchos casos. Cabe pues preguntarse ¿no será que uno tiene miedo a tener que explicarse ante el público general? Ciertamente no es fácil divulgar. Ejercer la enseñanza ayuda, sin embargo, no suele ser suficiente. Hay que hacer algunos ejercicios preparatorios entre los que cabe mencionar: 1) Saber realmente de qué se habla. Ilustres maestros han dicho en repetidas ocasiones que no es posible enseñar (o explicar) aquello que no se conoce. El refranero popular es aún más gráfico: “Antes se coge a un mentiroso que a un cojo”. 2) Dejar a un lado el ego. En este concepto queda incluido el vocabulario iniciático y la motivación por destacar. Por mucho que nuestros colegas se rasguen las vestiduras, una cefalea es un dolor de cabeza y la diferencia entre usar un término u otro para una audiencia general es la que hay entre ser escuchado o ignorado. Puede decirse que no hay concepto que no pueda ser explicado en términos comunes. 3) Ajustarse estrictamente a los hechos sobre los que se quiere divulgar. Esto es preciso, no solamente por relatar sólo la verdad, sino porque en el proceso de modificación del vocabulario para hacerse comprensible es muy fácil deslizarse a terrenos totalmente ajenos y, en ciertas ocasiones, inducir al oyente a generalizaciones extravagantes. Conviene recordar que la audiencia general no es estúpida y, si detecta una conclusión absurda en lo que oye, juzgará el mensaje y al mensajero de la misma forma. Por último, 4) siempre ayuda demostrar cierta pasión en lo que se cuenta. Puede que la audiencia no comprenda todo lo que oye, pero sí sabe detectar en muy pocos minutos si el relator se cree lo que dice o no.

¿Qué divulgar?

Esta pregunta es particularmente relevante para los organizadores de actividades divulgativas. Con harta frecuencia suele oírse el decisivo argumento: “este tema es de actualidad y seguro que atrae a una gran audiencia”. Lo que en realidad

sucede es que el referido tema ha sido tratado en los medios de comunicación recientemente y el organizador del acto conoce a alguien que puede hablar de eso con lo que espera llenar la sala. Esta forma de actuar puede salir bien (en términos de tamaño de la audiencia) o no. Hay un procedimiento mucho más fiable y simple: escuchar lo que la audiencia quiere preguntar. El éxito de un acto no se mide por el número de asistentes, sino por el grado de satisfacción de los mismos al salir. Tanto en los actos de divulgación como en las sesiones de enseñanza en todas sus modalidades, el componente más importante, por sus efectos, es el turno de preguntas. Después de todo: ¿no es mediante preguntas como organizamos nuestra actividad investigadora? La respuesta debería ser unánimemente sí. Si no lo es, hay motivo para revisar nuestra propia profesión.

Los efectos de la divulgación

Hay varios patrones con los que medir esos efectos, pero quizás el más importante es precisamente uno que no es cuantificable: el grado de libertad que adquiere la audiencia. Aún cuando el conocimiento difundido obligue a formarse una idea pesimista sobre un determinado aspecto de la vida, es evidente que el conocimiento proporciona libertad. No es casual que la prioridad por excelencia de todos los regímenes dictatoriales es controlar la difusión del conocimiento y la información. No hay mejor forma de obtener un pueblo obediente que forjar un pueblo ignorante. Este asunto debe servir de llamada de atención a quienes deseen probar la práctica de la divulgación.

Llegados a cierto punto o tratándose de ciertos temas, no cabe esperar demasiada colaboración de organizaciones y poderes públicos en general. Hay entidades que actúan como celosos guardianes del pensamiento único sobre ciertos aspectos del conocimiento. Entidades que, en el pasado, quemaban a los disidentes y hoy dificultan de cualquier modo posible, especialmente la asfixia económica, los intentos de difundir, debatir, enseñar y estudiar libremente, siguen vigentes y llegan a dictar el contenido de los programas de enseñanza, supervisar el nombre de un rector, sancionar las prioridades de investigación, etc. Estos ejemplos no son del pasado ni de un solo país. Han sido seleccionados dos casos de países del llamado Primer Mundo: los estados del MidWest en USA y el estado federal de Baviera en Alemania. Si hubiéramos de describir la situación de varios países de Iberoamérica, el área islámica o el Mediterráneo, la situación es aún peor. He aquí algunos temas que inquietan particularmente a los cancerberos de la ortodoxia, especialmente cuando se hacen relativos a la condición humana: fundamentos de la consciencia, percepción sensorial, patrones de conducta, relación mente-cerebro, origen del lenguaje, bases neurales del libre albedrío, etc.

Tras estas reflexiones sobre la divulgación del conocimiento puede uno preguntarse si es una tarea que merezca el esfuerzo. La respuesta ha de ser personal, pero, a modo de reflexión final, quizás sería bueno responder a esta pregunta: ¿qué sentido tiene la existencia individual si no es en función de la de los demás?

Alberto Ferrús

Instituto Cajal. CSIC. Madrid (Miembro de la Alianza Dana para la Difusión de los Estudios sobre el Cerebro).

E-mail: aferrus@cajal.csic.es

LIBROS

libros



Best & Taylor BASES FISIOLÓGICAS DE LA PRÁCTICA MÉDICA, M.A. Dvorkin y D.P. Cardinali (eds.), Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. ISBN: 950-06-0243-1, 84-7903-902-7

José M. Delgado-García. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla. E-mail: jmdelgar@dex.upo.es

Para mí, que realicé mis estudios de Fisiología durante el curso segundo de la Licenciatura de Medicina y Cirugía con la ayuda del magnífico manual dirigido por Bernardo A. Houssay (eran los años 60), es una satisfacción encontrar otro libro de texto orientado al estudio de las Ciencias Fisiológicas escrito enteramente también por autores argentinos. Este manual presenta una visión panorámica de los aspectos fundamentales de la Fisiología, con un particular interés (sin llegar a convertirse en una Fisiopatología) en la correcta interpretación de los cambios funcionales que ocurren en pacientes con patologías definidas. En este particular, el libro parece diseñado para estudiantes de Medicina y de Licenciaturas próximas a aquélla. Se abordan los aspectos fisiológicos fundamentales referentes a los distintos órganos, aparatos y sistemas. El contenido es suficiente para un estudiante que aborda por primera vez el estudio de los procesos fisiológicos que acontecen en el ser humano (ya que de una Fisiología Humana se trata) y se presentan casos clínicos paradigmáticos para ayudar/obligar al estudiante a realizar un esfuerzo de integración de los conocimientos que va adquiriendo con la lectura.

Los tiempos han cambiado en estas cuatro últimas décadas y los libros también, no únicamente en contenido, sino en la manera de presentarlos al lector. Ojeando este que nos ocupa, llama la atención el esfuerzo realizado por los Dres. Dvorkin y Cardinali para enseñar el contenido de la Fisiología de una forma amena y asequible. En ello debe haber influido la tendencia actual de editar este tipo de manuales a todo color, con profusión de ilustraciones preparadas al efecto y una redacción fácilmente digerible. Pero la mayor disponibilidad de medios técnicos de impresión debe usarse de un modo parsimonioso. Por ejemplo, siempre es mejor mostrar una fotografía de la ultraestructura celular realizada al microscopio electrónico

que un dibujo coloreado de la misma, aunque sólo sea por la desvirtuación que supone la interpretación (imparcial hemos de suponer) del dibujante. Así, algunas ilustraciones de este buen libro, imagino que en el afán de facilitar su entendimiento al lector, son demasiado simples, con el peligro que esto puede tener de trivialización de los procesos fisiológicos que se tratan de ilustrar. Por el contrario, me parece una iniciativa excelente la incorporación de un CD, el cual debería ser ampliado en contenido en ediciones sucesivas.

Como todas las obras de esta envergadura, hay aspectos que se deben considerar para su posible modificación en ediciones futuras. Por ejemplo, el capítulo 0 de introducción a los conceptos fisiológicos debe tomar mayor entidad, sobre todo pensando en un libro de esta naturaleza, que será básico en la formación del futuro médico clínico. Algo similar ocurre con el epílogo sobre la muerte, el cual requiere una mayor concreción en los aspectos fisiológicos del éxito vital y una reducción de las (abundantes) referencias literarias. Ya sabemos que los escritores se preocupan también de la muerte, se trata aquí de explicar la fisiología del asunto. Algunos capítulos están magníficamente redactados e ilustrados, pero otros adolecen de una escritura demasiado esquemática, de guión casi. Por último, debería unificarse el número y la selección de las referencias bibliográficas que siguen a cada capítulo, para dar mayor unidad a la obra.

En resumen, hay que felicitar a tanto a los directores como a los demás autores de esta obra, mezcla armónica de fisiólogos y clínicos, así como a la Editorial Panamericana que ha realizado un esfuerzo notable para la edición de este manual con ayuda de las modernas técnicas disponibles. Espero que la obra fructifique y se prolongue en ediciones por venir.

Alfredo Córdova. FISIOLÓGIA DINÁMICA. Editorial Masson, 2003, 781 páginas ISBN: 84-458-1270X

Rubén V. Rial Planas. Universidad de Las Islas Baleares.

Para escribir un texto de Fisiología es necesario que un editor reúna una serie de personas de reconocido prestigio en los diferentes campos de la fisiología, establezca una serie de normas editoriales y obligue a un mínimo nivel de calidad. Pero parece que algunas veces no es necesaria tanta precaución: basta con que unos cuantos amigos del editor convengan a la editorial y se lancen a escribir un tomo de varios centenares de páginas. Cada uno elige su o sus capítulos, lee dos o tres textos generales y con esto hace una síntesis.

La estrategia descrita en el párrafo anterior parece ser la que ha seguido el editor del libro que comentamos. Basta ver la distribución de capítulos para observar que, por ejemplo, uno de los autores parece ser un especialista en temas tan heterogéneos como la hematología, el sistema circulatorio, el riñón, la endocrinología, la bioenergética, el envejecimiento y la fatiga. Otro escribe capítulos sobre la hemostasia y coagulación, el sistema respiratorio y la reproducción... Ni por un momento

ponemos en duda la capacidad de estos autores, sin embargo, de entrada, la amplitud de sus conocimientos sorprende. Naturalmente, también hay honrosas excepciones, en forma de capítulos escritos por profesionales muy cualificados, pero su excelente trabajo queda oscurecido por la cantidad de "aficionados" que se han reunido como autores en la presente Fisiología Dinámica.

Empezando por el título ya aparece una paradoja: si se presenta un texto de Fisiología Dinámica cabría suponer que en algún otro sitio debe haber una Fisiología Estática, de la cual el presente texto intentaría diferenciarse. La pena es que no conozco ningún fisiólogo que haya visto alguna vez tal Fisiología Estática. O sea que, o bien el editor ha sido capaz de plasmar en su libro un dinamismo adicional al que indudablemente tiene la Fisiología, o el nombre no es más que un infortunado pleonismo.

Pero más allá del título, los errores que se acumulan en el texto son excesivos. Por ejemplo, en el apéndice I se presenta una descripción del equilibrio Donnan totalmente errónea. Igualmente, y muy lejos del dinamismo que sugiere el nombre, un anacronismo muy corriente en los más obsoletos textos de Fisiología es el ignorar la Fisiología del sueño, a pesar de que este estado ocupa una tercera parte de la vida humana. En la Fisiología Dinámica, esta no muy honrosa tradición se sigue en gran medida, porque de las casi ochocientas páginas del libro, se dedica poco más de una a este estado. Y, lamentablemente, dentro de esta página se incluye una igualmente obsoleta revisión sobre las teorías que hace ya muchos años intentaron explicar las causas del sueño, estando hoy completamente olvidadas. En realidad, la revisión no solo es obsoleta, sino que además está mal citada, porque se expone la teoría de la deaferenciación de Bremer y Moruzzi como si no fuera una más entre las teorías pasivas. Error que se reafirma en el cuadro resumen ostentadamente firmado por el editor al final del capítulo.

En otra parte del libro, al hablar de las adaptaciones del sistema respiratorio, se explica cómo en el buceo con escafandra autónoma, el buceador recibe aire comprimido “a una presión equivalente a la presión atmosférica”. Lo cual constituye un error múltiple, porque, en primer lugar, solo a dos metros de profundidad, el esfuerzo de los músculos respiratorios nunca podría vencer la presión de 0.2 K.cm^{-2} que ejerce la columna de agua sobre la caja torácica del buceador.

La historia del buceo está llena de incidentes con resultados fatales como consecuencia de desequilibrios entre presiones del pulmón y del medio interno, historia que el autor del capítulo parece ignorar. Pero las cosas son más graves, porque cualquier estudiante de fisiología debería ser capaz de describir el edema pulmonar agudo que sobrevendrá a un buceador a los pocos segundos de mantener tal desequilibrio entre la presión del medio interno y las del pulmón mantenido “a una presión equivalente a la atmosférica”. Lo cual no dice mucho de los conocimientos del autor, no ya sobre la fisiología de la respiración, sino de Fisiología Básica.

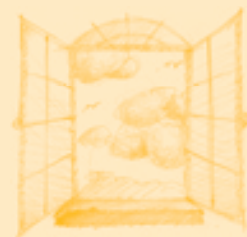
El texto acaba con dos páginas de bibliografía en las que no se alcanzan las setenta referencias. Puesto que el libro tiene 56 capítulos y cinco apéndices, parece que apenas se presenta un promedio de una referencia por capítulo. Lo cual es un indicador más de la calidad del contenido.

Lo que se ha expuesto en las líneas anteriores es la crítica de un lector que presume de tener unos conocimientos bastante limitados y solamente en unas pocas ramas de la fisiología, una persona que, por simple humildad, está muy lejos de atreverse a hacer una crítica de todo cuanto aparece en el libro. Pero si en una lectura limitada se han encontrado algunos errores (juzgue el lector sobre lo graves que son), cabe imaginar que el texto debe ocultar algunos más. Probablemente, los errores de este tipo son inevitables cuando se recurre a autores de escasa experiencia acerca de las materias sobre las que han escrito.

LA VENTANA DEL FISIÓLOGO

EL GEN FOXP2 Y LA LENGUA PRIMIGENIA

Emilio Fernández Espejo



Lo único que realmente diferencia nuestro cerebro del de otros primates, además del tamaño, es nuestra habilidad para el lenguaje. Y no conozco nada más que sea especial en nuestra especie: el 99% de nuestro ADN es el mismo que el de un chimpancé, y nuestro cerebro bajo el microscopio es como el de un chimpancé. No será un único gen el responsable del lenguaje, sino alguna propiedad compleja emergente de la red genética que lo hace posible (Chuck Stevens, Salk Institute, California).

El estudio neurobiológico del lenguaje como substrato de la conciencia, de nuestra capacidad de ser homo sapiens, cobra cada vez mayor importancia en la neurociencia actual. Siempre nos ha sorprendido la innata capacidad de los niños para aprender el entramado de un lenguaje con el conocimiento de algunas reglas gramaticales y sintácticas. Chomsky ya dedujo la existencia de un mecanismo neurológico innato que permite dicha capacidad. Dicha teoría ha sido cuestionada por diversos lingüistas, pero los modernos estudios antropológicos, lingüísticos y neurobiológicos vienen a dar la razón a Chomsky.

Desde el punto de vista antropológico evolutivo, se sabe que el lenguaje debió aparecer hace más de unos 60.000 años, que fue el momento de la incursión del homo sapiens en Australia, para lo cual tuvo que emplear embarcaciones, lo que supone una portentosa habilidad técnica que presupone la existencia del lenguaje. También se sabe que los homínidos anteriores al sapiens no emplearon un lenguaje complejo, pues el tipo de utensilios que manejaban se mantuvo invariable para cada especie, incluso durante casi un millón de años en el caso del homo erectus. El mismo hombre de Neanderthal empleaba utensilios rudimentarios, algo más avanzados, pero todavía toscos. Todo esto podría indicar que no utilizaban un lenguaje complejo para transmitir información. El homo sapiens apareció hace unos 160.000 años, fecha de la que datan los restos más antiguos localizados en Sudáfrica. A partir de este registro, estalla la complejidad de las formas de los utensilios y de las manifestaciones culturales, muestra clara de la existencia real de un “salto” evolutivo importante. El antropólogo Richard Klein lo resume así: “Al principio, las capacidades de comportamiento del Homo sapiens se diferenciaban muy poco de las del hombre de Neanderthal, pero finalmente, quizás debido a un cambio neurológico no detectable en el registro fósil, desarrolló una capacidad para la cultura que le dio una clara ventaja de adaptación sobre el hombre de Neanderthal y sobre todos los demás pueblos no modernos”.

Los estudios lingüísticos evolutivos apoyan cada vez más la existencia de un lenguaje primigenio del que partieron las lenguas hasta la actualidad. Los lingüistas han deducido la existencia de una lengua “protomundial”, que hablarían los primeros seres humanos modernos. Esta lengua protomundial sería propia del Homo sapiens, ya que estudios de los cráneos de sapiens muy

antiguos revelan la existencia del área de Broca, zona del lenguaje, a diferencia de los cráneos de hombre de Neanderthal. El lingüista Joseph Greenberg descubrió similitudes enigmáticas entre lenguas muy dispares entre sí. En África Central se emplea la palabra dik para decir uno. La raíz tik aparece en lenguas asiáticas indicando la unidad. Las lenguas esquimales también utilizan la raíz tik, pero para indicar el dedo índice, lo que es, sin duda, una lógica imagen del uno. En el lenguaje ancestral indoeuropeo, “señalar con el dedo índice” se dice deik. De deik derivan los términos daktulos (griego), y digitus (latín). De ahí proceden “dedo” y “dígito” (como el uno) en castellano. Según el estudio del árbol genealógico lingüístico, la lengua primigenia, antes de Babel, tuvo que existir alrededor de hace unos 160.000 años, y desde ahí se diversificó hasta generar las más de 5.000 lenguas actuales. Esa fecha coincide con el registro fósil más antiguo de homo sapiens ¿Es sólo una causalidad?

El neurocientífico Anthony Monaco y su equipo, de la Universidad de Oxford, descubrieron un gen cuyas mutaciones alteran la capacidad del desarrollo del lenguaje sin afectar otras funciones intelectuales. Hay familias con mutaciones en dicho gen donde sus miembros son incapaces de distinguir fonemas, de entender raíces y tiempos verbales y no pueden comprender los fundamentos de la gramática. Este gen se ha denominado FOXP2. El mismo Anthony Monaco y el profesor Svante Pääbo, de Leipzig, han estudiado dicho gen desde un punto de vista evolutivo. El gen codifica una proteína de 715 aminoácidos, que se ha mantenido constante durante millones de años. En los mamíferos superiores hay pequeños cambios: la proteína humana se diferencia de la del ratón en tres aminoácidos, y en dos del chimpancé y del gorila. Esto quiere decir que sólo dos aminoácidos nos separan de los monos prehomínidos. Los autores estudiaron el momento preciso de la mutación, o mutaciones, que dio lugar al cambio de dos aminoácidos: calcularon que fue alrededor de hace 160.000 años. Esta fecha coincide de nuevo con el registro fósil más antiguo de homo sapiens ¿Otra casualidad? Más bien no, ya que nos está indicando algo profundo sobre nuestro origen como especie y nuestras capacidades.

Probablemente, mutaciones en el gen FOXP2 (y acaso otros más) alteraron el mensaje genético en homo pre-sapiens más avanzado, quizás de la especie erectus, de tal modo que apareció la capacidad lingüística, y con ello lo que nos hace verdaderamente humanos. Para todo científico es evidente que no hubo un solo cambio génico que causase dicha extraordinaria habilidad en el Homo, pero, sin duda, los cambios sí fueron rápidos en unidades de tiempo antropológico. Si estamos de acuerdo con Stevens, esta capacidad es la que formó la conciencia y con ella la capacidad de dar nombres a nuestros sentimientos, emociones y deseos. En ese momento perdimos nuestra inocencia y apareció la conciencia de sí, la moral y la cultura, por el notable hecho de que podíamos nombrar conceptos. O tal vez el concepto apareció unido a la aparición de la palabra que nombraba conceptos, eso es algo que no podemos saber.