

El cerebro transparente

Fernando López Casillas^a

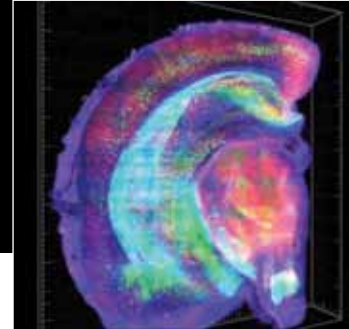


Foto: Archivo

“It must be a strange world not being a scientist, going through life not knowing –or maybe not caring about where the air came from, where the stars at night came from or how far they are from us. I want to know”.

MICHIO KAKU, FÍSICO ESTADOUNIDENSE

En esta entrega de “Desde las trincheras de las ciencias básicas” comentaremos un artículo que seguramente llegará a ser un clásico en las neurociencias, pues describe una metodología llamada *Clarity*, la cual permite hacer transparente un cerebro, preservando la estructura del órgano intacto. La descripción de *Clarity*, trabajo del grupo de Karl Deisseroth¹, de la Universidad de Stanford en California, Estados Unidos, se publicó en la edición del pasado 10 de abril de la revista *Nature*² en internet, e inmediatamente llamo la atención de los principales periódicos del mundo, por ejemplo, el *New York Times* y *El País* publicaron excelentes reseñas sobre el tema³.

Tanto alboroto se debe a que desde que Santiago Ramón y Cajal y Camilo Golgi usaron sus tinciones de plata, no se había innovado una técnica con tanto potencial para el estudio anatómico del cerebro. Para ilustrar este potencial, si la pudiésemos aplicar a una casa, *Clarity* nos permitiría ver los

cables, interruptores y conexiones de su instalación eléctrica con el sólo hecho de suministrar corriente a la instalación, sin necesidad de derribar un muro. Sería como si tuviésemos un edificio de cristal a través del cual se pueden observar las tuberías, las varillas, el mobiliario, etc., que están en su interior. O como si tuviésemos un cuerpo humano invisible, en el cual se pudieran hacer aparecer a voluntad, por ejemplo, el sistema circulatorio, visualizando hasta el más fino capilar. *Clarity* promete ofrecernos la posibilidad de observar de la misma manera órganos tan fascinantes como el cerebro.

Cuando se piensa en el cerebro, la idea que emerge comúnmente es la de su complejidad estructural y funcional. Cualquier estudiante del primer año de Medicina sabrá lo complicadas que son todas las vías que unen a los núcleos cerebrales en sistemas aferentes y eferentes de haces nerviosos. Y los fisiólogos nos dirán que eso no es nada comparado con los circuitos y microcircuitos sinápticos que forman las neuronas aun dentro de un mismo núcleo. Tal complejidad es el sustrato necesario de lo que en el humano llamamos mente, conciencia, pensamiento abstracto, etc. Es decir, las actividades que permiten a los organismos una vida de relación con sus congéneres y con el mundo. Cuando esa complejidad se deteriora ocurren enfermedades catastróficas, desde una parálisis hasta un estado autista o psicótico. De ahí que uno de los más ambiciosos retos científicos de hoy en día sea el “mapear”, es decir, determinar las conexiones que hacen todas y cada

^aInstituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.

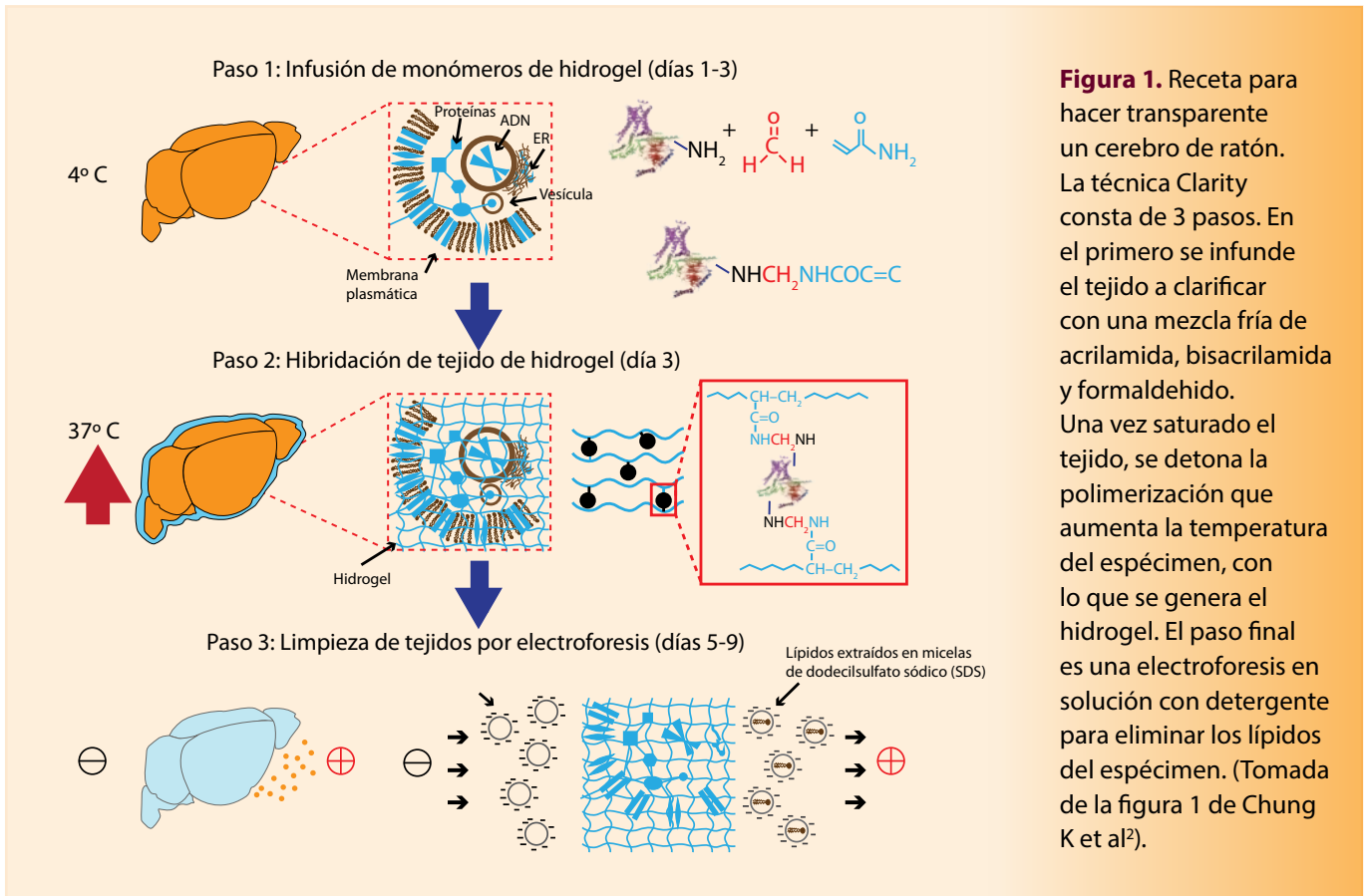


Figura 1. Receta para hacer transparente un cerebro de ratón. La técnica *Clarity* consta de 3 pasos. En el primero se infunde el tejido a clarificar con una mezcla fría de acrilamida, bisacrilamida y formaldehído. Una vez saturado el tejido, se detona la polimerización que aumenta la temperatura del espécimen, con lo que se genera el hidrogel. El paso final es una electroforesis en solución con detergente para eliminar los lípidos del espécimen. (Tomada de la figura 1 de Chung K et al²).

una de nuestras neuronas, la llamada “conectómica” del proyecto de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. Es razonable suponer que al descifrar la conectómica del sistema nervioso humano sabremos mucho de cómo funciona en la salud y la enfermedad.

Sin embargo, el cerebro, así como prácticamente todos los órganos, tiene el grave inconveniente de ser opaco e inaccesible a nuestras sondas moleculares, como los anticuerpos. Gracias a diversas técnicas histológicas y poderosos microscopios se han podido superar algunas de estas dificultades. Por ejemplo, es posible hacer rebanadas muy delgadas (micrométricas) de tejido nervioso, las cuales ya son accesibles a la luz de nuestros microscopios y a nuestras sondas, con lo cual podemos teñir estructuras específicas y retratarlas. El análisis por sobreposición de las imágenes de estos cortes microscópicos

seriados ha permitido reconstruir una visión tridimensional de la organización cerebral. Sin embargo, esta visión es necesariamente fragmentaria, incompleta y de baja resolución. *Clarity* abre la posibilidad de analizar integralmente grandes porciones del cerebro humano (y aun en su totalidad, cerebros pequeños como los de los ratones), preservando su integridad y organización original.

Dicho de forma muy sencilla, *Clarity* consiste en convertir el cerebro en un armazón o entramado poroso, desprovisto de lípidos y que sin embargo preserve todas las demás moléculas (proteínas, ácidos nucleicos y neurotransmisores) fijas al entramado, en el lugar donde residían en el tejido y célula original (**figura 1**). Esto convertiría al cerebro en una estructura transparente, pues son los lípidos los principales causantes de la opacidad de un órgano. Además, al eliminar las bicapas lipídicas de la mem-

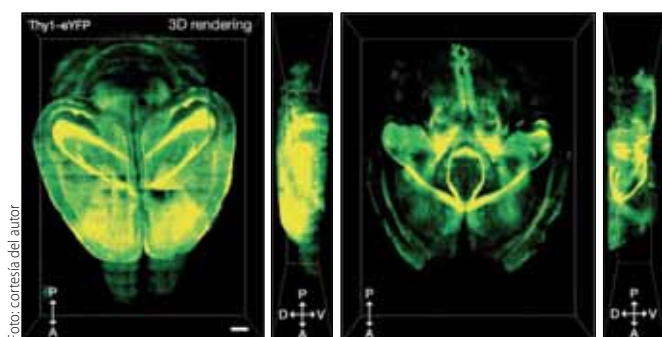


Figura 2. Visualización de un “reportero fluorescente” en un cerebro completo. Fotos de vistas dorsal, derecha, ventral e izquierda de la imagen tridimensional del cerebro de un ratón transgénico Thy1-eYFP de 3 meses de edad el cual, después de haber sido “clarificado” mediante *Clarity*, ha sido observado en un microscopio de fluorescencia. Las células en las cuales está activo el promotor del gene *Thy1* expresan a la proteína reportera YFP, que se revela en color amarillo. Nótese que la barra blanca corresponde a un milímetro, indicando que el espécimen se analizó en 2 “rebanadas ópticas” de 3 milímetros cada una. (Tomada de la figura 2 de Chung K et al²).

branas celulares, todas las otras moléculas se hacen accesibles por simple difusión a sondas moleculares, como anticuerpos o ácidos nucleicos marcados ópticamente (con fluorescencia, por ejemplo) y por ello detectables por microscopía. En principio, esto permitiría mirar hasta el último rincón de cada una de las células que componen al cerebro, y detectar de manera específica su repertorio fenotípico, es decir las proteínas y ácido ribonucleico mensajero (mARN) que las constituyen. Y todo esto preservando la estructura y disposición original de cada célula y sus componentes en el tejido. De un solo vistazo sería posible observar integralmente, por ejemplo, un circuito neuronal.

Clarity tiene una gran similitud con la electroforesis en geles de poliacrilamida, una técnica usada en los laboratorios de bioquímica desde hace decenios. Estos geles se hacen mediante la polimerización de precursores monoméricos pequeños (acrilamida y bisacrilamida) en gelatinas de polia-

crilamida con diversos grados de porosidad, según la concentración inicial de los monómeros. Una vez hecho el gel y usando la fuerza de un campo eléctrico, se pasan por sus poros macromoléculas, consiguiendo con ello separarlas. La gran diferencia es que mientras que el bioquímico hace su gel y después añade las moléculas que va a “correr” o separar usando el campo eléctrico, quien usa *Clarity* difunde los monómeros en el tejido y una vez adentro los polimeriza, dejando que la gelatina de poliacrilamida se forme alrededor y dentro de las estructuras celulares. Y mejor aún, si se añaden a la mezcla de acrilamida y poliacrilamida un poco de formaldehído, la malla de poliacrilamida se “entrecruza” con toda macromolécula que tenga accesible un grupo amino, como las proteínas, el ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN) y aún muchos neurotransmisores. Por ello un primer paso de la técnica es infundir el tejido con una mezcla de acrilamida, bisacrilamida y formaldehído y cuando ya esté saturado, desencadenar la polimerización (**figura 1**, paso 1). El efecto final es que prácticamente todas las moléculas (excepto los lípidos, que carecen de grupos amino) quedan fijadas de manera covalente a la malla tridimensional de poliacrilamida en que se ha embebido todo el tejido, formando lo que los autores llaman un hidrogel (**figura 1**, paso 2). El paso final (y otro “truco” clave de la técnica) es poner este hidrogel en una bañera circulante de una solución con detergente (dodecilsulfato sódico [SDS], también usado en los geles bioquímicos) y someterlo a un campo eléctrico (electroforesis). El efecto de este truco es que los lípidos serán disueltos en el detergente, formando micelas jabonosas que al tener carga eléctrica y no estar entrecruzadas al hidrogel, serán removidas de su localización original en el tejido (**figura 1**, paso 3). El resultado final es que el tejido original se ha convertido un hidrogel clarificado el cual, al no tener lípidos será transparente y mantendrá las estructuras celulares y macromoleculares (las formadas por proteínas y ácidos nucleicos principalmente) en su arreglo y posición tridimensional original, aun a pesar de haber perdido las membranas celulares. De hecho, esta pérdida es de gran utilidad pues permite el paso libre de sondas, cosa

que las membranas celulares impiden. Otra ventaja de *Clarity* es que sólo ocasiona una pérdida mínima de las proteínas celulares (~8%) y preserva sus estructuras. Esto conserva la fluorescencia natural de proteínas como la *yellow fluorescent protein* (YFP). Este tipo de proteínas, al no estar presentes en organismos como el ratón y el humano, se han usado como “reporteros” en organismos transgénicos. Por ejemplo, el espécimen mostrado en la **figura 2** es el cerebro de un ratón transgénico Thy1-eYFP de 3 meses de edad el cual, después de haber sido “clarificado” mediante *Clarity*, ha sido observado en un microscopio de fluorescencia que revela la presencia de la YFP. En este transgénico la expresión de la YFP está bajo el control del promotor del gene de la Thy1, una proteína que se expresa en cerebro principalmente en capas de corteza cerebral que proyectan a los haces piramidales. En el cerebro de este ratón transgénico la expresión de la proteína reportera (YFP) reproduce el patrón espacio-temporal de expresión de la proteína endógena (Thy1) de ahí que se puedan visualizar estos haces nerviosos, desde su origen cortical hasta sus proyecciones hacia médula espinal.

Otra aplicación de *Clarity* es que, al hacer poroso el tejido, éste se vuelve permeable a anticuerpos y ribosondas que detectan específicamente a sus antígenos o mRNA correspondientes. Un ejemplo se muestra en la **figura 3**, la cual muestra una representación tridimensional del hipocampo de un ratón Thy1-eYFP (la YFP es observada ahora en el canal fluorescente verde), el cual ha sido teñido con anticuerpos para parvalbumina (fluorescencia en el canal rojo) y para la proteína ácida glial (canal azul). Como se podrá constatar, la imagen muestra cada una de las neuronas que expresan estos antígenos sobrepuestos en las que expresan a la YFP, dando una mejor representación de sus relaciones espaciales¹. Finalmente, *Clarity* también puede usarse en bloques de tejido nervioso que han sido almacenados por años en formol. Esto es muy afortunado pues permitirá sacar valiosa información de los bancos de tejido nervioso que se han almacenado en los departamentos de patología de muchas instituciones de investigación médica.

Por supuesto, *Clarity* no es exclusiva para el ce-

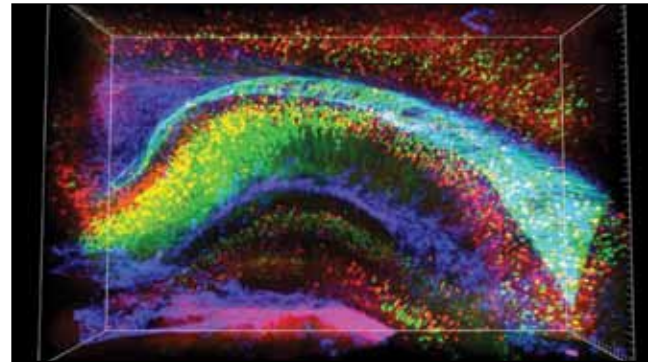


Foto: cortesía del autor

Figura 3. Visualización de múltiples antígenos y reporteros en un cerebro completo. Imagen tridimensional del hipocampo de un ratón transgénico Thy1-eYFP. El cual se tiñó con anticuerpos fluorescentes dirigidos contra la parvalbumina (rojo) y para la proteína ácida glial (azul). (Tomada de la figura 4 de Chung K et al^{1,2}).

rebro. En principio se podría aplicar a cualquier órgano o tejido, pues los principios y procedimientos que la sustentan son muy sencillos y universales. Los autores han puesto a disposición del público toda la información necesaria para ponerla en práctica⁴. Además de poder disponer de las recetas para *Clarity*, una visita a los sitios de Internet de los autores es altamente recomendable por el sólo hecho de contemplar las bellas imágenes, fotos y películas, que con *Clarity* han obtenido (ver referencias 1, 2, 4). ¡Todo un agasajo! ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.nature.com/news/neuroscience-method-man-1.13077>. En este sitio se puede ver una reseña del trabajo y trayectoria académica de Karl Deisseroth, el inventor de *Clarity*, un MD-PhD con entrenamiento en psiquiatría. En este sitio también se puede ver el video de donde salió la figura 3 de esta reseña.
2. Chung K, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 2013;497:332-7 (doi: 10.1038/nature12107).
3. Gorman J. “Brain as clear as Jell-O for scientists to explore”. *New York Times*. 10 de abril. Disponible en: http://www.nytimes.com/2013/04/11/science/brains-as-clear-as-jell-o-for-scientists-to-explore.html?ref=science&_r=0.
4. Chung K, Deisseroth K. CLARITY for mapping the nervous system. *Nature Methods*. 2013;10:508-13 (doi: 10.1038/nmeth.2481).