



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE TRANSDUCTORES BIOLÓGICOS OLFATORIOS
PARA FINES INDUSTRIALES**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL ELECTRICISTA

PEDRO DAIRE LETELIER

**PROFESOR GUÍA:
MANUEL DUARTE MERMOUD**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
RODRIGO PALMA BEHNKE
MAGDALENA SANHUEZA TOHÁ**

**SANTIAGO DE CHILE
MARZO 2007**

**RESUMEN DE LA MEMORIA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL ELECTRICISTA
POR: PEDRO DAIRE L.
FECHA: 06/03/2007
PROF. GUÍA: Sr. MANUEL DUARTE**

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE TRANSDUCTORES BIOLÓGICOS OLFATORIOS PARA FINES INDUSTRIALES”

Los sensores biológicos (SB) aparecen como una de las últimas tendencias en cuanto al desarrollo de dispositivos sensoriales. Se estima que los SB sean de gran utilidad en diversos procesos industriales, pues presentan competencias que les otorgan una valiosa ventaja comparativa respecto de otro tipo de sensores. Son de especial interés los sensores biológicos olfatorios (SBO), ya que la información olfativa está siendo incorporada cada vez más en múltiples procesos industriales, pero aún no existen sensores que cumplan con las cualidades necesarias para que su inclusión sea sencilla y efectiva. Los SBO podrían ser los que satisfagan estos requerimientos.

El objetivo general de este trabajo consiste en realizar un análisis comparativo de diferentes técnicas que son un potencial aporte en el desarrollo de SBO, y sus posibles aplicaciones industriales. Por otra parte, intenta también aportar concretamente en la determinación del valor de la conductancia unitaria del canal iónico de Cl^- activado por Ca^{2+} presente en los cilios de las neuronas receptoras olfatorias, que constituye un elemento fundamental en el proceso de transducción olfatoria; cuyo entendimiento cabal incide en el progreso de los conocimientos que permiten la creación de SBO.

Se recopila y analiza el material bibliográfico relativo a la transducción biológica olfatoria, seleccionando lo más destacable desde el punto de vista del desarrollo de un SBO, incluyendo interfaz bioeléctrica, codificación olfativa y aplicaciones que constituyen el mercado de esta tecnología. Entre los métodos más promisorios para aplicaciones en las próximas décadas se pueden mencionar la combinación de osciladores de cuarzo con proteínas receptoras olfatorias, entregando alta sensibilidad en detección específica; para la clasificación de distintos olores a diferentes concentraciones, el análisis de patrones espaciotemporales de la actividad neuronal en los glomérulos del Bulbo Olfatorio puede ser una técnica alto rendimiento.

Además, se realiza un estudio de la conductancia del canal iónico, desarrollando un simulador computacional en MATLAB, que genera datos equivalentes a los obtenidos experimentalmente por Larsson et al. (1997), pero que permite acceder al valor de la conductancia del canal asociada a los datos generados. De esta manera, se puede contrastar el valor obtenido con la metodología propuesta por Larsson et al. (1997), con el valor real de la conductancia que produjo dichos datos. Se determinó que la metodología examinada no considera los efectos producidos por la conductancia basal de la membrana del cilio, ni la dependencia del potencial de membrana ante aperturas y cierres marginales de los canales en torno al valor promedio. Los ensayos realizados con el simulador indican que los factores no considerados en la metodología antecedente pueden provocar subestimaciones de hasta un 50% en el valor de la conductancia, sugiriendo una reevaluación de los valores publicados, realizando experimentos y modelos que consideren los efectos encontrados.

Agradezco a todos los que han participado en lo que he vivido hasta ahora, a quienes me incentivan a mantenerme firme en mis convicciones y a disfrutar la existencia.

La realización de este trabajo contó con el apoyo del Proyecto Anillo de Ciencias y Tecnología (ACT 54) y del Programa Bicentenario CONICYT (Juan Bacigalupo).

Tabla de Contenidos

1	Introducción	- 5 -
2	Antecedentes Generales	- 10 -
3	Sensores Biológicos	- 15 -
3.1	Investigación	- 15 -
3.1.1	Interfaz Bioeléctrica	- 15 -
3.1.1.1	FET	- 16 -
3.1.1.2	LAPS	- 18 -
3.1.2	Codificación y Procesamiento	- 23 -
3.1.3	Arreglos Biotecnológicos	- 32 -
3.1.3.1	Arreglo de Antenas	- 32 -
3.1.3.2	Revestimiento Proteico Específico	- 42 -
3.2	Aplicaciones	- 48 -
3.2.1	Industria de Alimentos	- 48 -
3.2.2	Medicina	- 50 -
3.2.3	Control Ambiental y Calidad de Vida	- 53 -
3.2.4	Seguridad y Control	- 54 -
3.2.5	Cosmética	- 55 -
3.2.6	Investigación	- 56 -
4	Desarrollo de Simulador	- 57 -
4.1	Motivación	- 57 -
4.2	Análisis de Ruido Básico	- 62 -
4.3	Revisión del Modelo de Cable Finito	- 68 -
4.4	Revisión de Larsson et al. 1997	- 70 -
4.4.1	Análisis de Ruido Modificado	- 70 -
4.4.2	Experimento de Cilio Escindido	- 74 -
4.5	Adopción de Modelo Circuitual del Cilio	- 76 -
4.6	Modo de Operación	- 79 -
4.7	Validación y Generación de Datos	- 82 -
4.8	Diferencia de Supuestos	- 87 -
4.9	Corrección de Conductancia Basal	- 97 -
5	Discusión y Conclusiones	- 103 -
5.1	Sensores Biológicos	- 103 -
5.2	Simulaciones y Conductancia de Canal	- 105 -
6	Bibliografía	- 109 -
7	Anexos	- 122 -

1 Introducción

Siempre, durante su historia, la humanidad ha procurado hacerse de herramientas que faciliten nuestra estadía en el mundo. Ya sea fortaleciendo estructuras, aligerando cargas, reduciendo tiempo, modificando maneras o con cualquier otra función se puede encontrar toda clase de adminículos, herramientas, sistemas, protocolos, vehículos, etc. Desde semáforos a cortaúñas, de trenes a videograbadoras, en general los inventos del hombre han tenido como motivación inicial facilitar el logro de un objetivo. Dentro de esta motivación universal, la ciencia ha tomado el rol de generadora de conocimiento, para que luego sea transformado en aplicaciones, es decir, pasar de ciencia a tecnología. En el ámbito de la ciencia y la tecnología desde hace varias décadas ha habido innumerables esfuerzos, con excelentes resultados, por emular, para luego controlar, habilidades o características propias de la naturaleza, o de entes biológicos. La línea de desarrollo de sensores de todo tipo es una rama fundamental para la integración de herramientas computacionales en procesos materiales-reales, pues los sensores son los sentidos de la máquina. En los sensores se realiza la *transducción*, es decir, la traducción del estado de una variable física, química o de otro tipo, a un formato manejable por una máquina (u organismo). Por esta razón el desarrollo de nuevos sensores permite casi directamente la automatización de nuevos procesos, o al menos el avance en precisión o la apertura en campos de aplicación de procesos ya existentes.

El científico francés Nicéphore Niepce, el año 1816 obtuvo las primeras fotografías permanentes. En 1877 Thomas Alva Edison realizó la primera grabación y reproducción de voz. Con estos dos inventos ya se cubren tres de las habilidades humanas más básicas para interactuar con el ambiente: la Voz, el Oído y la vista. Los cinco sentidos primarios que posee el ser humano comenzaban a emularse. Y por más de 100 años se ha profundizado, especializado, masificado y perfeccionado las tecnologías relacionadas a estos sentidos, consiguiendo imágenes móviles de alta definición (HDTV, DVD, etc.), cámaras infrarrojas, equipos de sonido de alta fidelidad, reproductores portátiles, etc. En definitiva un universo de inventos vinculados a estos sentidos, muchos de los cuales son sensores. ¿Pero qué pasó con los otros sentidos?, por diversos motivos han quedado relegados; actualmente se está experimentando un alza en la valoración de estos sentidos *secundarios* (olfato, gusto y tacto), y naturalmente aumentan también las investigaciones relativas a ellos, ampliando y profundizando los conocimientos adquiridos.

En este sentido, el olfato está siendo investigado desde varios puntos de vista, muchos de ellos complementarios. Pero en este trabajo se centrará la atención del

en los avances y logros referentes a la posibilidad de conseguir que exista, para el olfato, un universo de inventos que sean un aporte, ayuden, faciliten y/o entretengan a la humanidad. Para que este universo exista, debe generarse un conjunto de sensores olfatorios satisfactorios, que se desempeñen adecuadamente en diversas tareas.

En la actualidad ya existe un mini-universo de sensores olfatorios; son dispositivos electrónicos de alta tecnología que, aprovechando complejas propiedades químicas y físicas, pueden reaccionar ante estímulos olorosos. Estos dispositivos se conocen como E-noses¹. Por más de 15 años que estas e-noses han evolucionado, incrementado la sensibilidad, reduciendo costos, descubriendo nuevos principios físicos y químicos que permitan *transducir*. Pero hace algunos lustros, también surgió en la comunidad científica la idea de incorporar a los principios físicos y químicos las propiedades biológicas, dando paso a un nuevo espacio de posibilidades, donde los sensores biológicos tienen un lugar destacado.

Si la intención es crear un sensor capaz de detectar olores, una pregunta muy natural es ¿por qué no usar sensores de olores que llevan millones de años funcionando y perfeccionándose, con resultados muy satisfactorios? La pregunta es muy válida ¿por qué no aprovechar los sistemas olfatorios de las miles de especies que existen en el reino animal? Desde ese momento existen investigadores dedicándose a recorrer, paso a paso, la senda hacia los sensores biológicos olfatorios.

Es muy interesante el desarrollo de sensores biológicos olfatorios, ya que son un elemento fundamental para poder construir un universo de inventos relativos al olfato. Y lo importante es, que paralelo al universo de inventos, existe también el universo de necesidades satisfechas con dichos inventos. ¿Cuántos de los inventos desarrollados en el último siglo se basan directa o indirectamente en los de Niepce y Edison mencionados al comienzo de esa introducción? La impactante revolución multimedial que ha experimentado el mundo civilizado, posee, sin duda, uno de sus pilares sobre Niepce y Edison. La posibilidad de que sólo una fracción de los avances conseguidos en base a esos inventos, pudiesen ser provocados por un invento equivalente en el universo del olfato, es suficiente para motivar profundamente el desarrollo y la investigación en esta área.

El Departamento de Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Chile, siempre atento al desarrollo de nuevas tecnologías, ha estado trabajando y experimentando con sensores olfatorios (e-noses) desde hace algunos años, pero

¹ E-nose, del inglés *Electronic nose*, que literalmente significa nariz electrónica.

con la intención de mantenerse vigente en las tendencias científicas, desea iniciar una rama de investigación dentro del departamento dedicada a los sensores biológicos. Con esa idea como norte, y su intrínseco carácter iniciático, el presente trabajo tiene como un objetivo específico entregar la información necesaria y representativa del estado actual de la investigación mundial relativa al tema de los sensores biológicos olfatorios. Y de esta manera, servir de guía a los ingenieros, investigadores e inventores que se interesen y continúen esta línea de investigación, es decir, pretende ser un punto de partida para quienes conformen el grupo de investigación del departamento. Se presenta una revisión bibliográfica de los avances recientes en tópicos que parecieron relevantes en la eventual construcción de un sensor biológico olfatorio.

Para la revisión bibliográfica se recopiló información y se ordenó en dos secciones principales. En la primera, de investigación, se presentan los avances y los conocimientos existentes en temas que apuntan o que son necesarios para elaborar un sensor biológico olfatorio. Y en la segunda, de aplicaciones, se exponen las posibles áreas de aplicación de un sensor biológico olfatorio operativo, y cuáles son los actuales requerimientos de los sensores olfativos. Además, la selección de referencias (Bibliografía) constituye en sí misma un aporte para quien se adentra en este campo de investigación.

Por otra parte, de manera suplementaria al trabajo compilatorio, estableciendo un segundo objetivo específico, en conjunto con el Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, se procura esclarecer el valor de uno de los parámetros elementales de la maquinaria de transducción olfatoria: la conductancia unitaria del canal de cloruro activado por calcio; presente en los cilios de las neuronas receptoras olfatorias (ver Sección 2 Antecedentes Generales). Para eso se examina la metodología utilizada por Larsson et al. (1997) en el cálculo de dicho parámetro, valiéndose de un simulador computacional desarrollado especialmente para este cometido. Contribuyendo así a los avances científicos que permitan entender el funcionamiento del sistema olfatorio, que indirectamente repercuten en la creación de sensores biológicos olfatorios.

Del problema del cálculo de la conductancia unitaria del canal de cloruro activado por calcio, no existen muchos reportes en los que se publique un resultado del valor de esta conductancia (Pifferi et al., 2006; Reisert et al., 2003). Los escasos resultados publicados son similares al publicado por Larsson et al. (1997), además, se basan en el mismo tipo de metodología que allí se propone (en la Sección 4.4.1 se explica detalladamente dicha metodología).

La revisión de la metodología que condujo a la estimación del valor de la conductancia, es motivada por mediciones directas de este parámetro, realizadas en el Laboratorio de Fisiología Celular (Delgado y Bacigalupo, Resultados no publicados), que discrepan con el valor publicado por Larsson et al. (1997). Los resultados preliminares de estas mediciones indican una conductancia 8 veces mayor que los resultados publicados.

Para la evaluación de la metodología de Larsson et al. (1997) se construyó un simulador de corrientes de cilio, el cual -se estima- puede generar datos equivalentes a los obtenidos experimentalmente, y así aplicar la metodología propuesta por Larsson et al. (1997) a los datos simulados, para contrastar las conclusiones que de ésta se desprenden, con los parámetros que fueron introducidos al momento de ejecutar la simulación. Los resultados obtenidos indican que existen factores no contemplados o menospreciados en Larsson et al. (1997), que pueden inducir a una subestimación de la conductancia unitaria de hasta un 50%. Hecho que siembra incertidumbre respecto de la validez de las conclusiones publicadas por Larsson et al. (1997).

El documento se estructura en seis capítulos principales, más un capítulo de anexos:

1. Introducción: aquí se motiva al lector, señalando la importancia de la transducción olfatoria y los sensores biológicos; se le presenta una descripción del trabajo realizado, destacando los elementos relevantes, de modo que le sea posible hacerse una idea de lo que la lectura del documento puede entregarle.
2. Antecedentes generales: consiste en una sección donde se presenta la información básica que describe la estructura del sistema olfatorio, para facilitar la comprensión de los temas tratados en el núcleo de la memoria.
3. Sensores Biológicos: Constituye una de las secciones medulares de la memoria. En esta sección se presentan los resultados de la revisión bibliográfica que pretende informar al lector del estado del arte en materia de sensores biológicos olfatorios.
4. Desarrollo de Simulador: Es la segunda mitad del núcleo de la memoria. Se presenta aquí lo relativo a la evaluación del valor de la conductancia unitaria del canal de cloruro activado por calcio; revisando detalladamente la metodología propuesta, y la forma de abordar el problema por medio de un simulador computacional de un cilio de una neurona receptora olfatoria.

5. **Discusión y Conclusiones:** Se entregan las conclusiones que se desprenden del trabajo realizado, su importancia dentro del tema, las limitaciones del trabajo realizado, y finalmente se propone futuras consideraciones que podrían mejorar lo realizado.
6. **Bibliografía:** Consiste en la lista completa y detallada de las referencias y fuentes que componen y apoyan lo expresado en esta memoria.
7. **Anexos:** Se adjunta un disco (CD) donde se encuentran los archivos de código fuente en Matlab®, generados para la construcción del simulador. También se incluye una versión digital de este documento.

2 Antecedentes Generales

El sistema olfatorio es un caso muy destacable de posible convergencia evolutiva (no homología²) (Eisthen, 2002). Para muchos animales, este sistema presenta la misma estructura circuital con estructuras equivalentes entre los filos³. Se presenta en esta sección la estructura anatómica del sistema olfatorio de los insectos y los vertebrados; ambos filos han sido profundamente estudiados para describir el funcionamiento de este sistema.

La primera etapa de procesamiento del sistema olfatorio tiene lugar en las neuronas receptoras olfatorias (NRO). Estas células están expuestas al medio externo, pudiendo hacer contacto directo con las moléculas odorantes. Las neuronas sensitivas, tanto en insectos como en vertebrados, están dispuestas en epitelios especializados, compuestos por decenas a centenas de miles de células receptoras además de otras células de sostén (o soporte estructural).

Las NRO de los vertebrados presentan una sola dendrita, de cuyo extremo (botón dendrítico) se proyectan los cilios (un rango aproximado de 5-10 cilios), que son estructuras especializadas, donde se ubican los receptores moleculares de odorantes (ver Ilustración 2-1A). En los cilios está instalada la maquinaria de transducción que desencadena el impulso nervioso (Lowe y Gold, 1991).

Hay evidencia que sugiere que la transducción puede ser tanto excitatoria (la célula se despolariza, produciéndose un aumento en la frecuencia de la descarga de potenciales de acción) como también inhibitoria (se inhibe la descarga de potenciales de acción) (Delgado et al., 2003; Madrid et al., 2005). La maquinaria de transducción mayormente estudiada es la de efecto excitatorio. En la Ilustración 2-1B se muestra un esquema de operación de esta maquinaria. Al recibir moléculas odorantes, el receptor específico (Buck y Axel, 1991), mediante una proteína G, induce la activación de la enzima adenilil ciclasa. Con esto se produce un aumento en la concentración del nucleótido adenosín monofostato cíclico (cAMP), el cual activa a un canal que permite el ingreso del ión calcio (Ca^{2+}), además de un intercambio de sodio y potasio. El calcio a su vez activa un segundo canal a través del cual se produce una salida de Cl^- , despolarizando aún más la

² Homología es la similitud entre características de distintas especies debido a que comparten un antepasado común.

³ Filo es una categoría taxonómica fundamental de la clasificación biológica, que agrupa a los organismos de ascendencia común y que responden a un mismo modelo de organización, como los moluscos, los cordados o los anélidos.

célula (Schild y Restrepo, 1998). La conductancia de este último canal es el objetivo de estudio, tratado en la sección Desarrollo de Simulador.

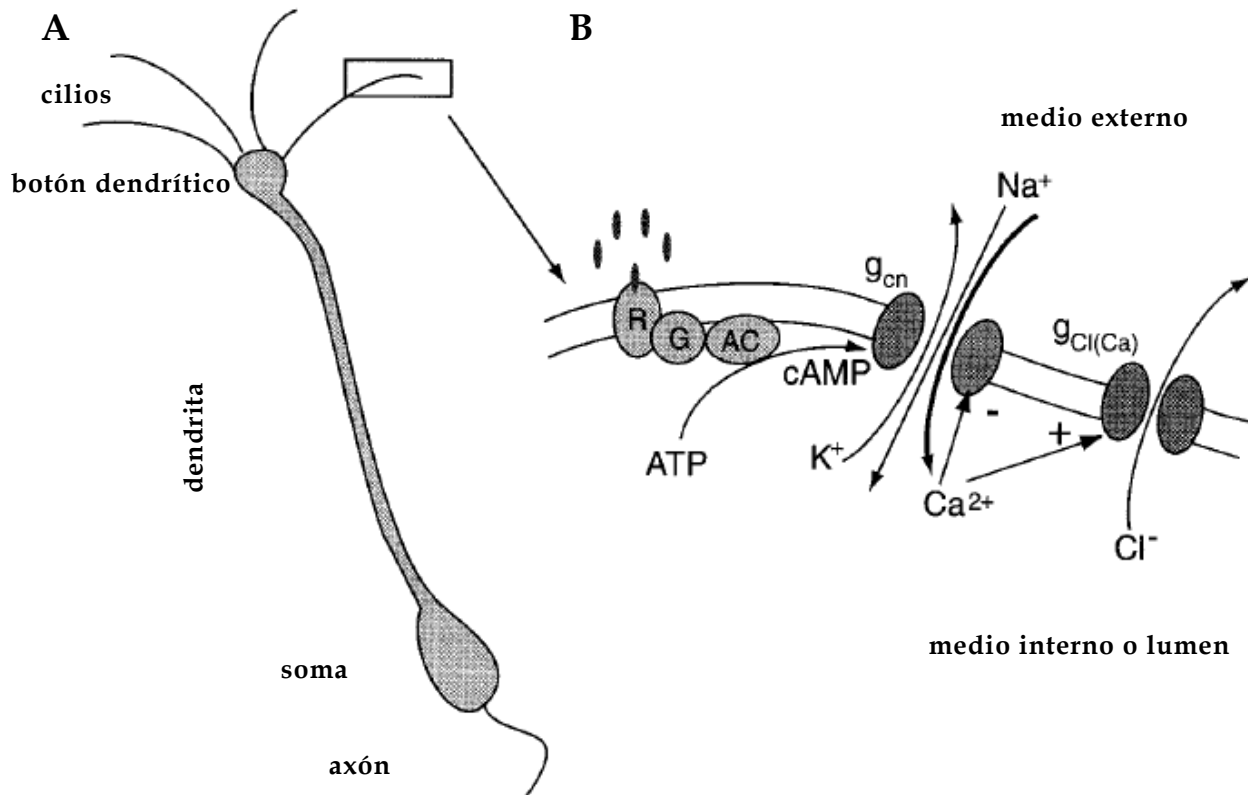



Ilustración 2-1: (Schild y Restrepo, 1998) A: Esquema de neurona receptora olfatoria. B: Diagrama explicativo de una sección de membrana del cilio, con los componentes de la maquinaria de transducción. *R*, receptor de moléculas odorantes; *G*, proteína *G*; *AC*, Adenilil ciclasa; *ATP*, adenosín trifosfato; *cAMP*, adenosín monofosfato cíclico; *g_{cn}*, conductancia de canal activado por nucleótido cíclico; *g_{Cl(Ca)}*, conductancia de canal de cloruro activado por calcio; *Na⁺*, *K⁺*, *Ca²⁺* y *Cl⁻* son los iones de sodio, potasio, calcio y cloro respectivamente.

En los insectos, esta primera fase, si bien es similar, presenta algunas diferencias. Los órganos sensitivos olfatorios cuentan con estructuras cuya complejión es semejante a los cilios, llamadas *sensilla*. Éstas se distribuyen por la antena y el palpo xilar del insecto. Las *sensilla* son estructuras que consisten en una pared cuticular con múltiples poros (ver Ilustración 2-2), a través de los cuales ingresan las moléculas odorantes, una vez allí no pueden salir, por lo que cuentan con mecanismos enzimáticos que las degradan. Típicamente las *sensilla* contienen las dendritas de 1 a 5 NRO. Las NRO, al igual que en los vertebrados, son específicas, respondiendo sólo a algunas moléculas del espectro de odorantes, también con respuestas excitatorias e inhibitorias (Hallem et al., 2006).

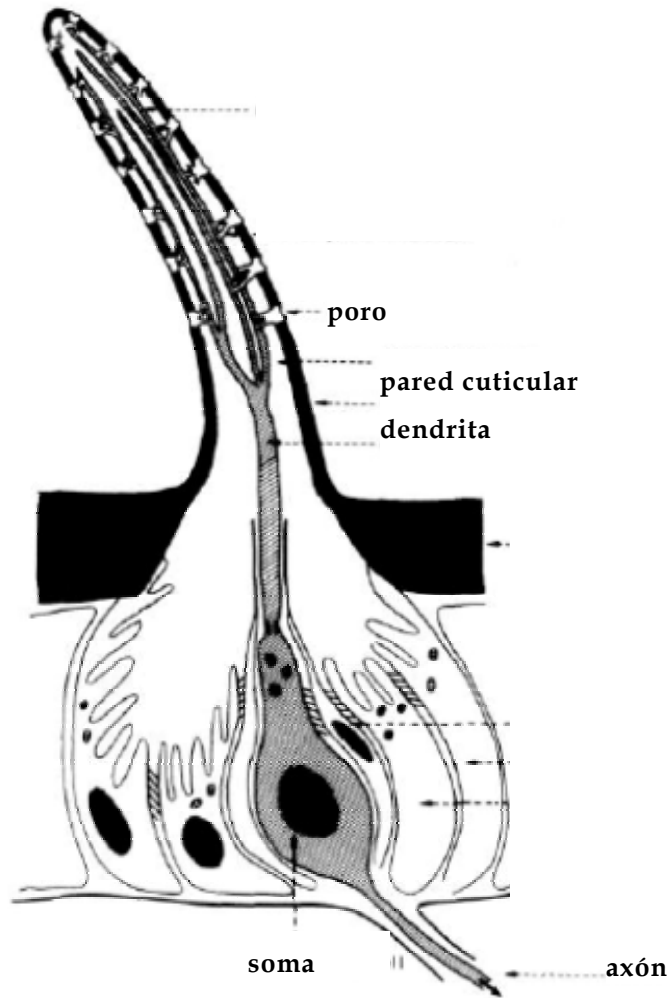


Ilustración 2-2: (Mustaparta, 1990) Dibujo de un segmento de la antena del insecto, con una sensilla sobresaliendo y la estructura que subyace. La sensilla posee poros en la pared cuticular, por donde entran las partículas odorantes, haciendo contacto con las dendritas de las NRO (una sola en el dibujo).

Las siguientes fases del sistema olfatorio de ambos filos son casi completamente análogas. Los axones de las NRO se dirigen hacia el cerebro, específicamente a una estructura especializada denominada Bulbo Olfatorio (BO) en el caso de los vertebrados y Lóbulo Antenarío (LA) en el caso de los insectos. En estos órganos especializados se alberga, en ambos filos, a los glomérulos, lugar de llegada de los axones de las NRO. Los glomérulos son una aglomeración de numerosos axones y dendritas que allí convergen.

El ordenamiento de los axones en los diferentes glomérulos es dirigido por la expresión de genes de receptores comunes en las neuronas receptoras olfatorias, convergiendo, éstas, a los mismos glomérulos.

En el BO y el LA, además de los glomérulos, existen otras células que conforman una red en torno a éstos (interneuronas). El grado de entramado es menor en los insectos que en los vertebrados, pero operativamente son equivalentes. Son redes que sirven para interconectar los glomérulos, distribuyendo la información transversalmente, de maneras que no están elucidadas; y para transmitir la información hacia la corteza cerebral, la etapa siguiente del sistema olfatorio, por medio de las Neuronas Principales (NP).

En el Bulbo Olfatorio, los glomérulos reciben conexiones de variadas neuronas (ver Ilustración 2-3A), generándose un alto grado de interconectividad entre los glomérulos y las células aledañas. En la sección 3.1.2 Codificación y Procesamiento se señalan detalladamente las neuronas participantes.

En el Lóbulo Antenarario se ha observado una menor variedad de interneuronas, pero igualmente la información se distribuye por las Neuronas Principales (ver Ilustración 2-3B).

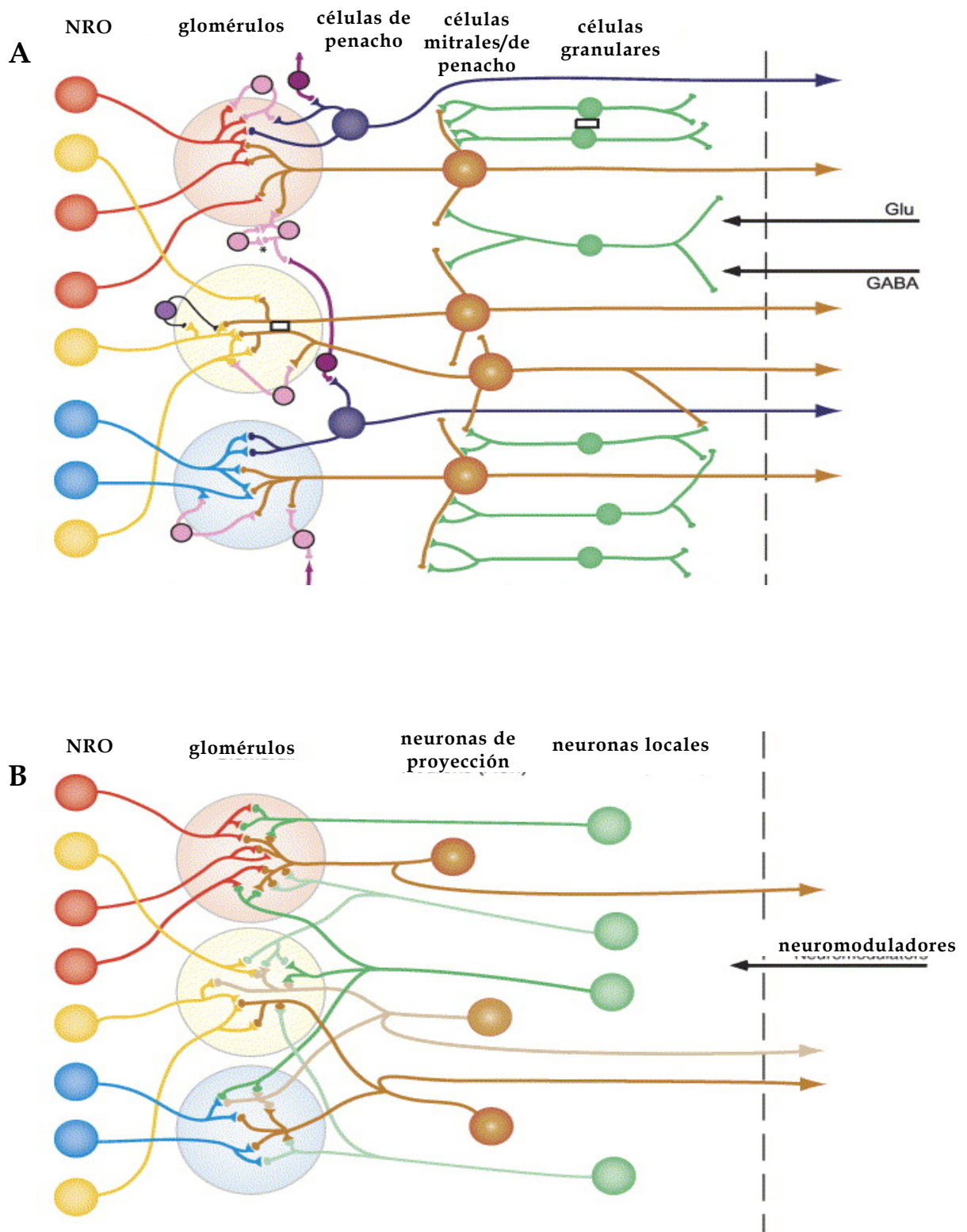


Ilustración 2-3: (Kay y Stopfer, 2006) Diagrama esquemático de las neuronas constituyentes del sistema olfatorio, sus agrupaciones y sus conexiones. Se puede ver que en vertebrados (A) existe una alta interconectividad entre diversas células, y por variados modos, sobre todo en el sector de los glomérulos y la Neuronas Principales. En cambio en insectos (B) se han encontrado menos tipos de células, pero igualmente hay interconectividad entre los glomérulos.

3 Sensores Biológicos

En esta sección se presentan los resultados de una recopilación bibliográfica, que pretende ser un buen punto de partida para quien comienza a interesarse en la transducción olfatoria y su eventual devenir en sensores biológicos olfatorios.

3.1 Investigación

3.1.1 Interfaz Bioeléctrica

Dentro de la potencial creación de un sensor biológico, son varias las condiciones que deben alcanzarse para que el dispositivo funcione. No sólo debe haber claridad en cuál será el fenómeno que ocurre al percibir un olor, ni de qué modo está codificada la información de dicho olor en el organismo vivo. Una parte muy importante, y fundamental en cualquier dispositivo bioelectrónico, es poder mantener los elementos biológicos (e.g. neuronas) en las condiciones adecuadas para que sean funcionales, y, quizás lo más difícil, poder medir las variables de interés sin perturbar el sistema. En definitiva, hacer una medición válida de una variable, de manera pasiva.

En lo medular hay que tener en cuenta que las soluciones extra e intracelular de las neuronas son conductoras de iones, y los semiconductores de electrones, para solucionar esto se usa, como intermediarios, electrolitos (que también intercambian iones). En la zona de contacto se produce una juntura. Son muchos los fenómenos, y las reacciones muy complejas, producidas en este espacio de interacción. Es posible, y existen modelos que permiten hacer las consideraciones pertinentes, para lograr una *buena conexión* (Vassanelli y Fromherz, 1998).

Desarrollar esta interfaz o puente tiene muchas aplicaciones que no son sólo de interés de los sensores biológicos, también sería un aporte extraordinario para la construcción de prótesis neuronales o medición de efectos en las células para pruebas farmacológicas (Stein et al., 2004; Wang et al., 2005).

Si bien es factible que un semiconductor sense la corriente o el potencial de una célula, hay que lograr que esta medición sea *cómoda* para la aplicación que se desea implementar. Por esto han surgido técnicas que, a diferencia del *patch-clamp*⁴, pueden medir sin tener que *entrar* en la célula.

⁴ Técnica de electrofisiología que consiste, básicamente, en acceder a la célula, o una parte de ella, con una pipeta de vidrio -llena con una solución conductora- que contiene un electrodo, registrando de esta manera el potencial o la corriente que circula. Actualmente es la técnica que entrega los mejores resultados de registros electrofisiológicos.

3.1.1.1 FET

El uso de dispositivos FET⁵ está ampliamente masificado para un sinnúmero de aplicaciones electrónicas. La biología no es la excepción. Una posible solución para realizar buenas y cómodas mediciones de potenciales de membrana es montar las células en un dispositivo FET. Permitiendo una medición pasiva y en tiempo real, pero confinado a una posición específica. Para poder medir los iones existe una adaptación especialmente diseñada de un FET denominada ISFET (Ion Sensitive Fiel Effect Transistor). Los ISFET son simplemente un MOSFET⁶ cuyo terminal *puerta* (*gate*) está separado del chip, sumergido en una solución acuosa como electrodo de referencia (ver Ilustración 3-1).

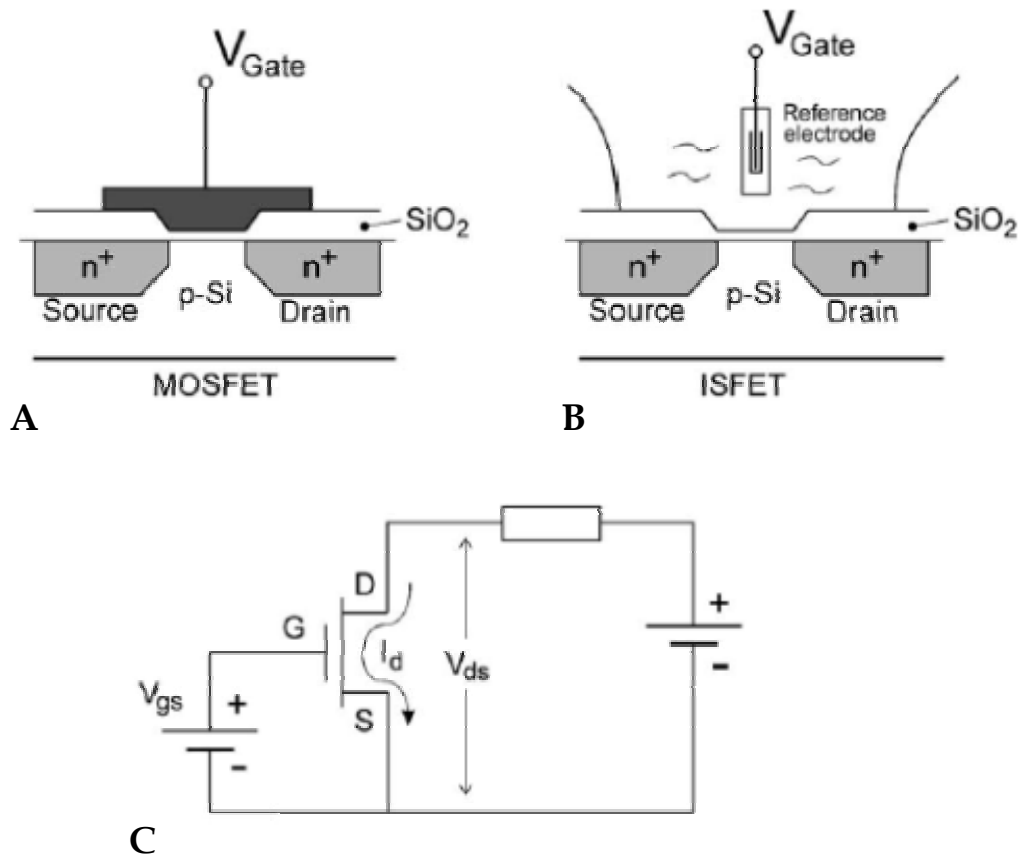


Ilustración 3-1: (Bergveld, 2003) Representación esquemática de (A) un MOSFET, (B) un ISFET y (C) la equivalencia circuital común a ambos. Un ISFET es simplemente un FET con un agregado sensible a iones.

Al ser equivalente al MOSFET, el ISFET también responde a las ecuaciones características para cada modo de operación. Tanto para el modo *triode* y

⁵ FET: Acrónimo de *field effect transistor*, en español transistor de efecto de campo.

⁶ MOSFET: del inglés *Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*.

saturación la corriente de drenaje está fuertemente determinada con la relación entre el ancho (W) y el largo (L) de la *puerta*, como se muestra en las siguientes ecuaciones de la transconductancia (Wang et al., 2005):

Ecuación 3-1, modo triode:

$$g_m = \frac{W}{L} C_{ox} \mu_n V_{ds}$$

Ecuación 3-2, modo saturación:

$$g_m = \frac{W}{L} C_{ox} \mu_n (V_{gs} - V_t)$$

Donde los parámetros son: la movilidad del portador de carga (μ_n), el ancho del *gate* (W), el largo del *gate* (L) y la capacitancia por unidad de área del óxido. En la Ecuación 3-1 V_{ds} es el voltaje entre la fuente y el drenaje. En la Ecuación 3-2, aparece otro parámetro: el voltaje de *pinch-off* (V_t). V_{gs} es el voltaje entre la puerta y la fuente.

Teniendo en cuenta esto es deseable que la razón entre el ancho y el largo de la puerta sea lo más grande posible, pero a la vez no pueden superar el tamaño de una neurona (diámetro aproximado: $15\text{-}24 \mu\text{m}$), pues, no funcionaría como registro de célula única.

En (Wang et al., 2005) muestran el diseño de su arreglo de ISFET con una fuente común (ver Ilustración 3-2), con puertas de diferentes tamaños entre $10 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$.

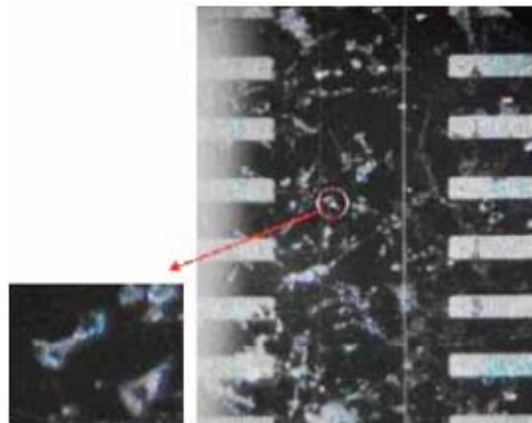


Ilustración 3-2: (Wang et al., 2005) Dispositivo de arreglo de ISFET con un cultivo de células (miocitos cardiacos). El potencial de las células que se ubican sobre los pines de puerta es susceptible de ser medido con el arreglo de ISFET.

Resulta evidente que existe una limitación espacial: no se pueden medir las células que no están sobre los electrodos. Al carecer de este control sobre cuál es la célula de interés, se puede perder fenómenos importantes dentro del experimento. Es muy deseable un sistema que permita medir interacción de neuronas, que sea selectivo en cuanto a la neurona que desea medirse, etc.

3.1.1.2 LAPS

La tecnología LAPS (*Ligh-Addressable Potentiometric Sensor*) se presenta como una alternativa -emergente- muy interesante para superar alguna de las limitaciones que los FET no pueden. Uno de los aspectos más destacables de esta tecnología es la posibilidad de seleccionar el punto específico sobre el cual se quiere medir el potencial. Pudiéndose seleccionar, eventualmente, la neurona que quiere registrarse.

El funcionamiento de esta tecnología se basa en el uso de un haz de luz que excita una zona puntual del semiconductor generando un par electrón-hueco, dando origen a una *fotocorriente* proporcional al ancho de la capa de *depletion*⁷ establecida en el semiconductor. A su vez, el ancho de la capa depende del potencial local que haya en el punto que fue iluminado. Finalmente, a través de esta cadena de relaciones, se puede deducir el potencial existente en el punto iluminado, con el dato de la corriente registrada (Hafeman et al., 1988; Ismail et al., 2003; Liu et al., 2006; Owicki et al., 1994; Stein et al., 2004; Xu et al., 2005).

Otra cualidad favorable del dispositivo, es que, lateralmente, no posee estructuras que restrinjan la distribución espacial ni el crecimiento de las células que se cultiven. En otras palabras, la superficie de cultivo se presenta simplemente como una plataforma lisa, sin pines ni estructuras. Con esta característica las redes neuronales se pueden formar libremente, y luego con la especificidad de selección de cualquier punto en la superficie del chip, no hay problema para registrar cualquiera de las neuronas esparcidas sobre éste.

En (Liu et al., 2006) se describe un modelo circuital, basado en las ecuaciones de corrientes iónicas de Hodgkin y Huxley, y en la juntura célula-semiconductor (Fromherz, 2002), para el caso de los registros realizados con dispositivos LAPS:

⁷ *depletion layer* se refiere a lo que en español se le dice indistintamente zona de depleción o agotamiento o juntura.

Ecuación 3-3

$$\frac{V_J}{R_J} = C_M \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + I_{ionica}$$

La Ecuación 3-3 corresponde al circuito presentado en la Ilustración 3-3C.

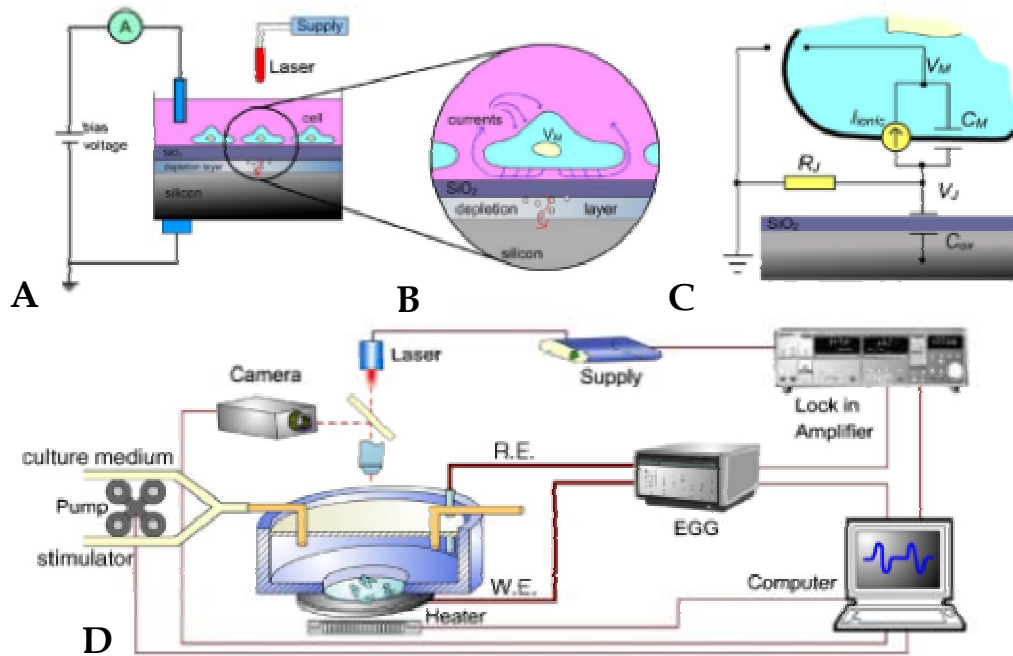


Ilustración 3-3: (Liu et al., 2006) Diagrama esquemático del sistema a de LAPS para sensores de respuestas de neuronas olfatorias. A: esquema del biosensor usando LAPS. B: detalle de la interfaz célula-semiconductor. C: modelo circuital del sistema. D: esquema del montaje experimental.

Si bien esta tecnología parece ser muy apropiada para la realización de mediciones no invasivas, donde las neuronas crezcan libremente, en la práctica es muy cierta la frase que Erwin Neher⁸ publicó abriendo su artículo *“Molecular Biology Meets Microelectronics”* (Neher, 2001), la cual decía: *“The marriage of living cells and silicon devices is not without practical difficulties”*⁹.

En el estudio publicado por (Stein et al., 2004) se realizan experimentos para evaluar la calidad del registro de la actividad celular utilizando LAPS, cuando la

⁸ Erwin Neher: Premio Nobel de medicina/fisiología 1991 junto a Bert Sakmann por sus descubrimientos del funcionamiento de canales únicos de iones. Utilizando su invento conocido como técnica de registro de *patch-clamp*.

⁹ Literalmente: *“La unión entre las células vivas y los dispositivos de silicio no carece de dificultades prácticas”*

estimulación se hace directamente con *patch-clamp*, pudiendo comparar la actividad registrada con *patch-clamp* con la registrada con LAPS.

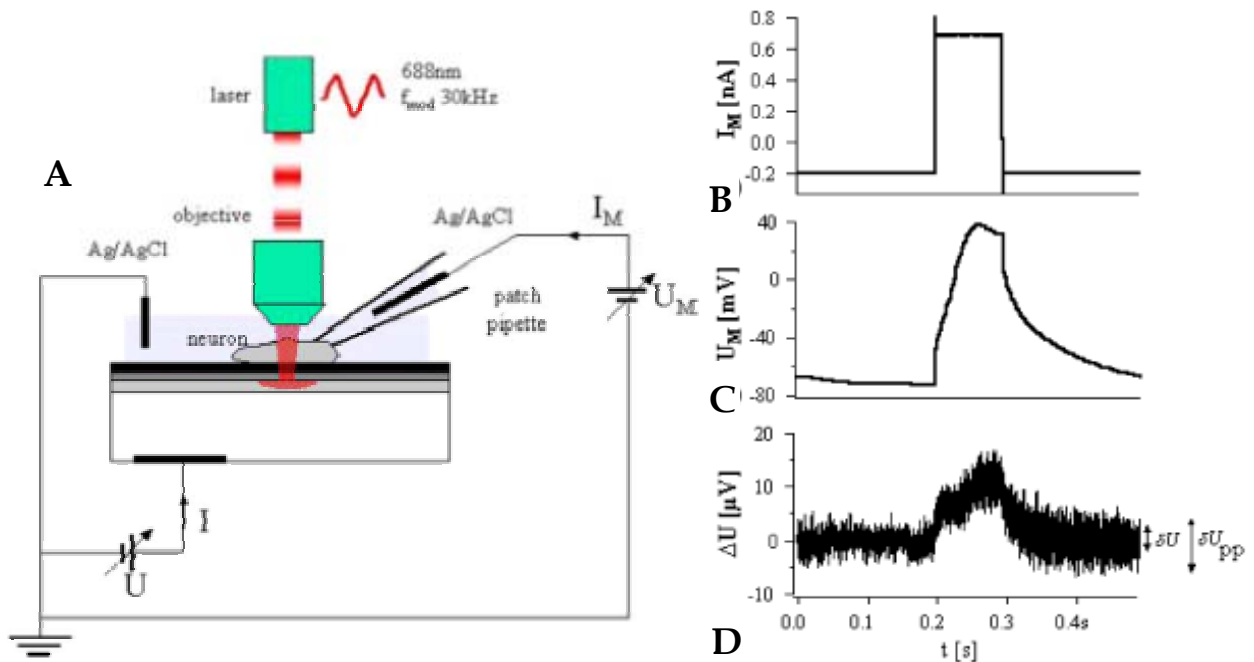


Ilustración 3-4: (Stein et al., 2004) A: Esquema del montaje del experimento, en que una misma célula es registrada por LAPS y *patch-clamp* a la vez. B: gráfico de la corriente introducida en la célula a través de la pipeta. C: registro (*patch-clamp*) del potencial generado por la corriente (A), se nota, en la curvatura, los efectos capacitivos de la membrana. D: registro (LAPS) para la misma situación. Notar la escala en D, la razón señal a ruido muy limitante para llevar a cabo una buena medición.

En la Ilustración 3-4D se aprecia que la razón señal a ruido lograda con LAPS está lejos de permitir un análisis fino de la actividad celular. Las conclusiones que pueden sacarse de datos como ese no serían de mucha confianza. Para superar esto -concluyen (Stein et al., 2004)- es necesario establecer un sistema de registro con LAPS, cuyo nivel de ruido sea varias veces menor que $10 \mu V$, que es el nivel en que se registran los cambios de potencial extracelular.

A pesar de las *dificultades prácticas* existe gente en distintas partes del mundo trabajando en desarrollar sensores biológicos usando LAPS, justamente tratando de eliminar esas *dificultades prácticas*.

Recientemente, uno de estos grupos (Liu et al., 2006) publicó los resultados de cultivar, estimular y registrar el potencial de células del sistema olfatorio.

El montaje del experimento es el presentado en la Ilustración 3-3D. El experimento fue realizado con células mitrales del BO y con células receptoras olfatorias.

En ambos casos las neuronas eran emplazadas sobre el chip con los revestimientos adecuados para una buena adherencia y buen contacto. Esto dentro de una cámara con solución de cultivo, con los componentes necesarios para el correcto mantenimiento de la célula. En la Ilustración 3-5 se muestra las células después de 7 días de cultivo sobre el chip; incluso se formó una red con conexiones entre células mitrales y granulares.

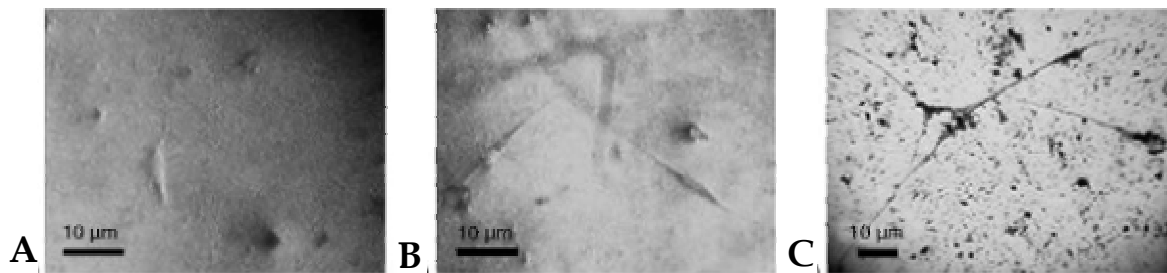


Ilustración 3-5: (Liu et al., 2006) Fotografía de el cultivo de las células en el chip LAPS, después de 7 días. A: Célula mitral del bulbo olfatorio. B: neurona olfatoria receptora del epitelio olfatorio. C: red neuronal del bulbo olfatorio, con conexiones entre células mitrales y granulares.

Las células mitrales fueron estimuladas con ácido glutámico o glutamato (Glu), uno de los neurotransmisores más importantes en el bulbo olfatorio. El estimulante es bombeado a la cámara de cultivo en repetidas ocasiones, con diferentes concentraciones. Para Glu $1\mu M$ la respuesta registrada por el LAPS no cambió con respecto a la basal, pero al aumentar la concentración de Glu a $25\mu M$ aparecen unos marcados *peaks* ($10-25\mu V$) que reflejan la estimulación de la célula (ver Ilustración 3-6A). Con esto se demuestra que el LAPS es sensible a cambios en el potencial extracelular.

Análogamente, en células receptoras olfatorias, se estimuló con ácido acético (CH_3COOH , un ácido orgánico con un distintivo olor pungente). Se usó nuevamente 3 concentraciones: $1\mu M$, $25\mu M$ y $50\mu M$. En la Ilustración 3-6B se aprecia claramente la aparición de espigas en la presencia de olor. Se reporta en la publicación que la frecuencia de $24 Hz$ era la primordial (ver Ilustración 3-6C) y que la amplitud aumentaba con la concentración.

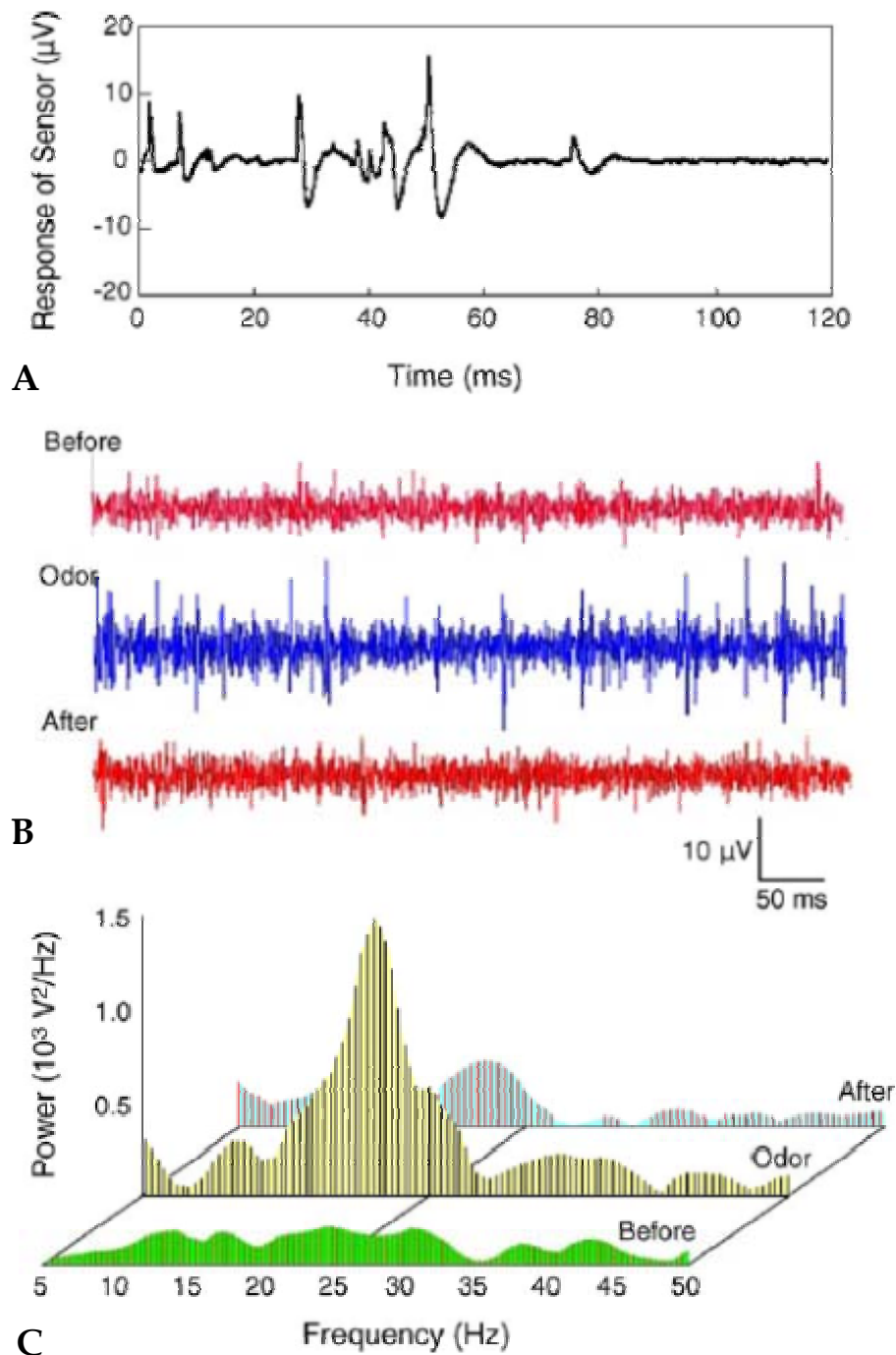


Ilustración 3-6: (Liu et al., 2006) Resultados de las estimulaciones registradas con LAPS. A: respuesta de la célula mitral a Glu $25 \mu\text{M}$. B: registro de la respuesta de célula receptora olfatoria antes, durante y después de ser estimulada con ácido acético. C: Espectro de potencia de los datos de B, se destaca un *peak* en los 24 Hz aproximadamente. Notar que en A y B las respuestas son del orden de $10\mu\text{V}$ igual que los obtenido en (Stein et al., 2004).

Finalmente, concluyen que las células cultivadas en este sistema son susceptibles a cambios en el medio, y, que como experimento exploratorio, éste sugiere que el

sistema (LAPS) puede ser usado como un novedoso sistema híbrido con miras a una nariz bioelectrónica.

3.1.2 Codificación y Procesamiento

Los estudios sobre la estructura del sistema olfatorio han dilucidado en gran medida sus elementos constituyentes desde el *mucus* hasta la corteza cerebral. No obstante el conocimiento de la estructura, la claridad en cuanto al funcionamiento y el modo en que la información de odorantes es tratada, aún no es alcanzada.

El olfato, como sentido, posee varias cualidades que guían la investigación en torno de él. En esta revisión se excluyen los procesos relativos al aprendizaje y la memoria en el sistema olfativo. Aquí se examinará el olfato con sus cualidades de sentido, es decir, de medio de información sobre el exterior.

Las propiedades del olfato son muy claras; y también muy similares en diversas especies (Eisthen, 2002). El olfato es un sentido que recibe una enorme variedad de estímulos, debido al enorme número de moléculas odorantes que existen, y además sus posibles combinaciones convierten el espectro de olores prácticamente en una infinidad de posibles estímulos.

Como se vio anteriormente, las muestras de olor son recibidas por una gran cantidad de células receptoras, que ordenadamente convergen en un número mucho menor de Neuronas Principales en los glomérulos. Allí ocurren varias conexiones y procesos que transforman los impulsos que portan la información olorosa. Dichas transformaciones permiten, posteriormente, una correcta identificación, discriminación y memorización en niveles más elevados de percepción, lo que, por ejemplo, nos permite a los seres humanos reconocer miles de olores diferentes (Buck y Axel, 1991) en un amplio rango de concentraciones. La presentación que aquí se hace de algunas evidencias y modelos relativos a los factores concernientes a este tratamiento de la información en el sistema olfatorio, pretende que el lector quede informado del estado actual de la investigación, y de las tendencias y nociones que se manejan en este ámbito de la fisiología celular, y, así, hacerse una idea de lo que queda por hacer, para lograr un buen sensor biológico olfatorio.

En primera instancia las moléculas odorantes llegan a las neuronas receptoras, las cuales responden con cambios en la frecuencia de descarga de potenciales de acción (impulsos eléctricos). La codificación que a este nivel ocurre sólo puede tener relación con los dos atributos que poseen estas neuronas: sensibilidad específica y posición. Un receptor dado responde a un rango de odorantes

determinado, por lo tanto posee una selectividad al momento de responder, pues no todos los odorantes suscitan respuesta. Además, los receptores están ubicados en ciertas zonas del epitelio olfatorio; gracias a la multiplicidad de receptores que responden a un mismo odorante se configura un mapa de respuesta a un determinado odorante (ver Ilustración 3-7). Existe evidencia de que al aumentar la concentración de odorante más receptores responden a dicho compuesto (Hallem et al., 2004; Ma y Shepherd, 2000; Malnic et al., 1999; Rospars et al., 2003). Interesantemente, la capacidad de discriminación de odorantes, en los insectos, aumenta con la concentración (Pelz et al., 1997; Wright y Smith, 2004).

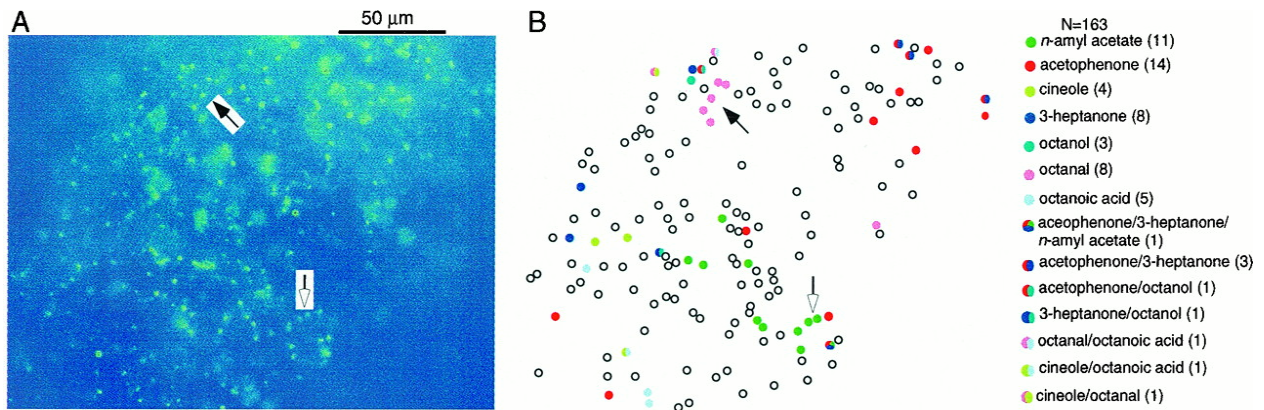


Ilustración 3-7: (Ma y Shepherd, 2000) A: Imagen obtenida con fluorescencia de Calcio, del epitelio olfatorio estimulado con numerosos odorantes. B: Selección de 163 células etiquetadas según responden a determinados odorantes.

No se ha encontrado evidencia de un procesamiento mayor en este nivel del sistema olfatorio.

Las neuronas receptoras envían sus axones a lugares muy específicos dentro del bulbo olfatorio de los vertebrados (o Lóbulo antenarior de los insectos), los glomérulos. A los glomérulos convergen muchos axones, de neuronas que expresan un gen de receptor olfatorio común. De esta forma se relacionan las neuronas que responden a los mismos odorantes. La combinación de la salida de varias neuronas receptoras distribuidas espacialmente (ver Ilustración 3-7) aumenta la potencia de la señal, entrega redundancia en caso de daño de alguna zona del epitelio y también provoca una reducción del ruido producido por fluctuaciones locales de concentración de odorante (Laurent, 1999). El número de glomérulos varía entre 50-1000 dependiendo de la especie, y se tiende a relacionar con la capacidad de identificar olores.

Una vez en los glomérulos, el sistema se complica notablemente en cuanto a su conectividad, sobre todo en los vertebrados. Como se aprecia en la Ilustración 2-3,

en cada glomérulo convergen dendritas y axones de varias células. Tanto en el Lóbulo Antenariorio como en el Bulbo Olfatorio, las Neuronas Principales pueden ser mayormente uniglomerulares o multiglomerulares dependiendo de la especie (Dryer y Graziadei, 1994). Aún más, en los vertebrados los glomérulos poseen diversas formas de interconectarse, generalmente reciben dendritas de muchas células diferentes, muchas de las cuales realizan sinapsis recíprocas (ejemplo marcado con asterisco en la Ilustración 2-3A). En la Ilustración 2-3A se ejemplifican, para el BO, las neuronas que participan y sus conexiones, éstas son: células de axón corto, células en penacho, algunos tipos de células periglomerulares, ramas distantes de células mitrales y proyecciones de neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas provenientes de de variadas zonas del cerebro. Todas dispuestas para coordinar la actividad interglomerular de maneras que han sido parcialmente elucidadas (Aungst et al., 2003; Hayar et al., 2004; Scott et al., 1993). En mamíferos, además hay conexión entre las células mitrales por medio de *spillover* y *gap junctions* (Kosaka y Kosaka, 2004; Schoppa y Westbrook, 2001; Urban y Sakmann, 2002).

Tanto en el bulbo olfatorio como en el lóbulo antenariorio existe una densa red de neuronas GABAérgicas inhibitorias (neuronas locales en insectos y en vertebrados células granulares) que establecen sinapsis dendrodendríticas con las Neuronas Principales.

Como consecuencia de la interconectividad glomerular se produce una distribución de la información olfatoria en las Neuronas Principales. Lo que en insectos se apoya en el hecho que las Neuronas Principales poseen un rango de respuestas más amplio que sus neuronas inmediatamente presinápticas (Wilson et al., 2004). A su vez, las células mitrales de los vertebrados pueden responder de maneras diferentes que sus entradas, también responden distinto de sus vecinos inmediatos, y muchas veces tienen respuesta a estructuras químicas diferentes (Egana et al., 2005; Kashiwadani et al., 1999; Mori et al., 1992; Motokizawa, 1996). Aunque la distribución de la información es bien esparcida en este nivel del sistema olfatorio, no es uniforme. Mediante varias técnicas de obtención de imágenes, se ha estimado el mapa de actividad de respuesta evocada en las Neuronas Principales. Típicamente estos mapas están segmentados, y se traslapan para diferentes odorantes. Los traslapes aumentan a mayor concentración (Friedrich y Korsching, 1997; Johnson y Leon, 2000; Meister y Bonhoeffer, 2001; Okada et al., 1996; Wang et al., 2003).

La etapa recién descrita del sistema olfatorio, con esta gran cantidad de interconexiones e inhibiciones, es uno de los puntos de mayor intriga para los investigadores, y se mantienen bastantes incógnitas sobre los circuitos y mecanismos de conexión que allí existen (Schoppa y Urban, 2003).

Hasta el momento los únicos atributos que se han descrito en este trabajo como posibles factores codificadores son qué células responden y dónde se ubican dichas células. Es decir, la variable espacial, hasta ahora es la única que puede codificar la información olfativa. Pero al examinar con mayor resolución espacial y temporal surge la variable temporal de las respuestas. Se agrega así una nueva dimensión al proceso de codificación.

El aspecto temporal de las respuestas olfativas se ha estudiado por medio de exámenes directas de las Neuronas Principales del BO, registrando los potenciales o las corrientes, principalmente con electrodos de mayor resolución temporal que las técnicas de captura de imágenes. Se ha encontrado que cuando un animal se expone a un estímulo odorante, en las Neuronas Principales susceptibles a dicho estímulo, se generan complejos patrones de disparo en el potencial de acción. Estos patrones pueden consistir, por ejemplo, en un período de espigas rápidas, seguido por un lapso de inhibición sucedido otra vez por espigas rápidas. (Friedrich y Laurent, 2001; Giraudet et al., 2002; Kashiwadani et al., 1999; Laurent y Davidowitz, 1994; Stopfer et al., 2003; Wellis et al., 1989). En la Ilustración 3-8 se presentan varias situaciones que reflejan la actividad de patrones temporales en las Neuronas Principales.

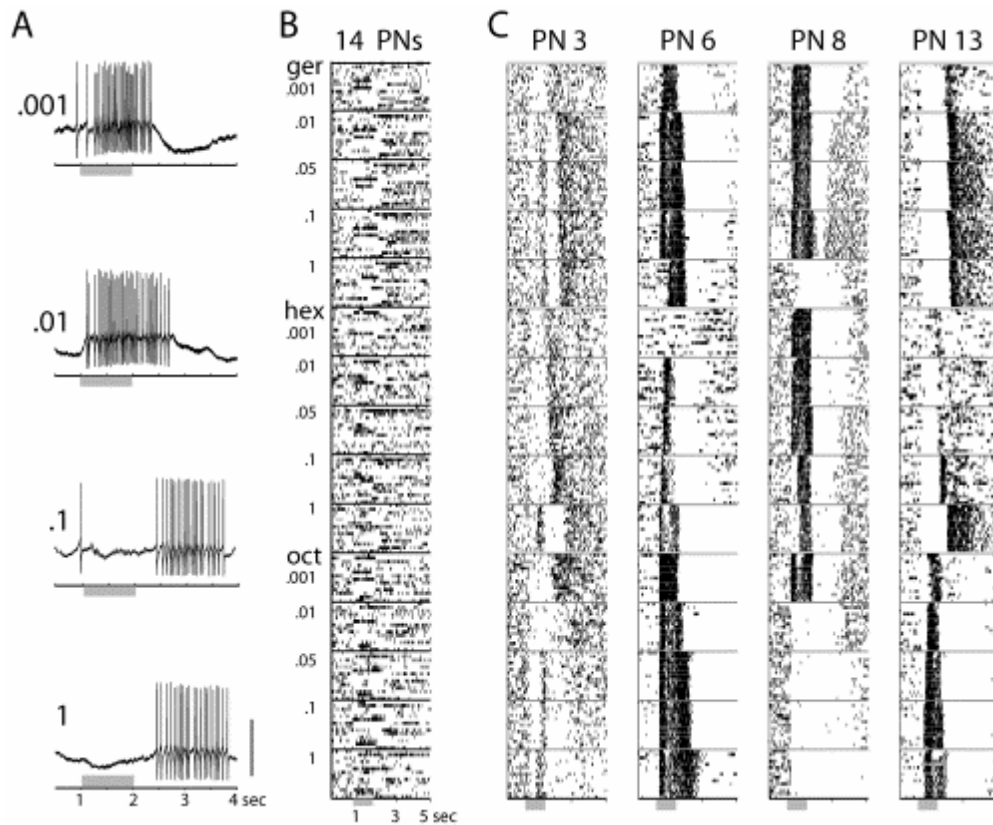


Ilustración 3-8: (Stopfer et al., 2003) A: Respuesta de una neurona de proyección a diferentes concentraciones de olor a guinda por un segundo (barra horizontal gris). Se aprecia que el cambio en el patrón de disparo de la neurona es leve para ciertos cambios de concentración del odorante y para otros es sustancial. **B:** Vista global de la respuesta de 14 neuronas de proyección registradas simultáneamente, para cinco concentraciones diferentes de tres odorantes distintos. Cada uno de los quince bloques verticales contiene el registro simultáneo de actividad temporal (las zonas más oscuras es actividad de mayor frecuencia) de las 14 neuronas (cada fila dentro de un bloque representa una neurona). Aparece una respuesta bien distribuida por las Neuronas Principales. **C:** Cuatro neuronas elegidas de las 14 de B (neuronas: 3, 6, 8 y 13), sometidas a 15 repeticiones para las mismas condiciones estimulantes de B (5 concentraciones, 3 odorantes). Las 15 repeticiones son muy consistentes en todas las combinaciones odor-concentración. En general las respuestas varían con los odorantes, pero también varían con la concentración (e.g. PN 13-hex).

En este hecho (existencia de patrones temporales) hay mucho interés por parte de los investigadores, ya que considerando la variable espacial, más los patrones temporales, se conforma una representación espaciotemporal que parece tener más posibilidades de ser capaz de codificar toda la información necesaria respecto de la identidad y concentración de un olor.

En los mamíferos, estos patrones temporales de las células mitrales son relativamente breves, ya que están supeditadas al período de inhalación del ciclo respiratorio (Buonviso et al., 2006; Cang y Isaacson, 2003).

Los patrones temporales de respuesta de las Neuronas Principales, pueden cambiar cuando un olor diferente se presenta, o cuando la concentración de un mismo olor varía, como se muestra en la Ilustración 3-8 (Friedrich, 2006; Harrison y Scott, 1986; Stopfer et al., 2003; Wellis et al., 1989). Los patrones de respuesta temporal no son característicos de un olor y una concentración. Diferentes Neuronas Principales pueden responder con diferentes patrones para el mismo estímulo (Kay y Stopfer, 2006).

Los patrones temporales surgen principalmente desde los circuitos formados por las redes neuronales del bulbo olfatorio o del lóbulo antenarior según sean vertebrados o insectos. Estos patrones temporales pueden formarse por una composición entre segmentos excitatorios e inhibitorios. Aparentemente los circuitos transversales que existen en el bulbo olfatorio (o lóbulo antenarior) que interconectan las células son los responsables de los períodos de inhibición (Bazhenov et al., 2001a; De Bruyne et al., 2001; Hallem et al., 2006; MacLeod y Laurent, 1996; Spors et al., 2006; Wilson y Laurent, 2005), pero también existe evidencia de neuronas receptoras que se inhiben al recibir ciertos odorantes (en peces estas respuestas son muy comunes).



Con esta evidencia se aclara la existencia de patrones espaciotemporales en las Neuronas Principales. Y son estos patrones los que se transmiten a las siguientes etapas del sistema olfatorio.

De estas representaciones espaciotemporales que se forman en el Bulbo Olfatorio o Lóbulo Antenarior, se han obtenido resultados favorables acerca del procesamiento de señales y reconocimiento de patrones (Brown et al., 2005; Galan et al., 2004; Harrison y Scott, 1986; Stopfer et al., 2003). Una hipótesis muy interesante, que se evalúa hace algunos años, es que existen trayectorias específicas para los estímulos olorosos, dentro del espacio de características de las representaciones espaciotemporales, a través de la actividad de las Neuronas Principales o los glomérulos.

Esta hipótesis es evaluada realizando experimentos en los que se registran los patrones temporales de muchas Neuronas Principales (o glomérulos), cuantificando de alguna manera la intensidad de la respuesta (número de espigas, intensidad de la fluorescencia del calcio, etc.) de cada neurona (o glomérulo) en cada instante de tiempo, donde el intervalo de tiempo puede definirse arbitrariamente o de acuerdo a registros de ondas generales del sistema olfatorio. Con esto se forma un vector *k-dimensional*, en que *k* es el número de elementos registrados (e.g. 18 Neuronas Principales). Este vector tiene una posición de acuerdo a las *k* coordenadas, en un espacio de alta dimensionalidad (*k* dimensiones), pero dicha posición varía a medida que pasa el tiempo. Este cambio

de posición determina una trayectoria específica para los elementos registrados durante esos intervalos de tiempo. Se ha encontrado que estas trayectorias están determinadas por el estímulo olor-concentración, como se muestra (usando alguna técnica de visualización/reducción de dimensionalidad como PCA¹⁰) en la Ilustración 3-9C, en que partiendo del mismo punto de reposo (*fase 1*), las trayectorias se alejan determinadas por el odorante, alcanzando la máxima lejanía (o diferenciación) en la *fase 2*. Posteriormente, en la *fase 3*, las trayectorias son de retorno al punto de reposo. Resultados aún más interesantes sobre esta hipótesis indican que la amplitud de la trayectoria depende de la concentración del odorante, manteniendo la orientación y la forma (Galan et al., 2004; Stopfer et al., 2003).

De acuerdo a la diferenciación de los patrones espaciotemporales se ha estimado que la capacidad de diferenciar exitosamente los estímulos responde a la curva de la Ilustración 3-9D, en que se presenta la *fase 2* como el punto de mayor factibilidad de discriminación exitosa (Mazor y Laurent, 2005; Perez-Orive et al., 2002).

Los resultados de estos trabajos son muy favorables para pensar en desarrollar un sensor olfatorio biológico, pues indican que es posible detectar y discriminar olores en diferentes concentraciones.

Existen numerosos trabajos en que se plantean modelos globales de procesamiento de la información del sistema olfatorio, y particulares del funcionamiento de algún elemento específico (Bazhenov et al., 2001a; Bazhenov et al., 2001b; Brody y Hopfield, 2003; Getz y Lutz, 1999; Hopfield, 1999; Rospars et al., en prensa; Sivan y Kopell, 2004; Tuckwell et al., 1996; Vermeulen et al., 1997; Vermeulen y Rospars, 2001; Vermeulen et al., 1996). Estos modelos se basan en la estructura anatómica del sistema, y cumplen con las competencias reconocidas en el olfato (Identificación, invariable a un amplio rango de concentraciones, segmentación). En ellos se proponen mecanismos muy inteligentes de procesamiento, que vale la pena evaluar en la medida que se tengan las técnicas que lo permitan, para así descubrir por completo el funcionamiento del sistema olfatorio.

¹⁰ PCA, del inglés *Principal Component Analysis*, técnica que permite reducir la dimensionalidad de un espacio conservando las posiciones más representativas.

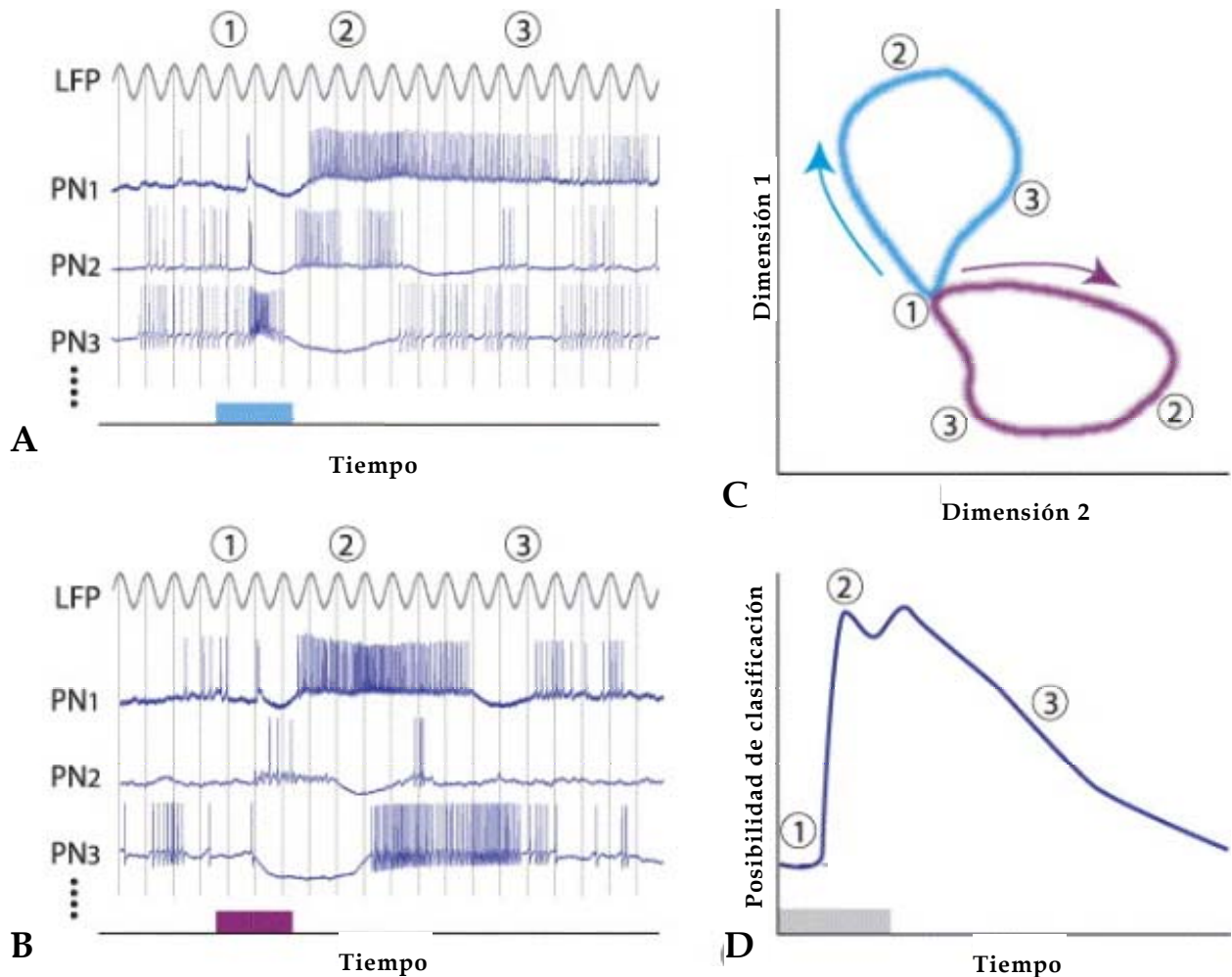


Ilustración 3-9: (Kay y Stopfer, 2006) A y B: Respuestas de varias Neuronas Principales (se muestran 3: PN1, PN2 y PN3) al odorante determinado, señalado con la barra celeste (A) y barra violeta (B). Al exponer las neuronas al odorante, se generan los patrones temporales de respuesta de cada una para ese estímulo olor-concentración. Se destacan tres zonas dentro del patrón de respuesta (1, 2 y 3), el 1 es la primera fase de respuesta, cuando aún no se han caracterizado distintivamente cada una de las respuestas de cada neurona; el 2 es cuando la respuesta expresa los patrones más distintivos de acuerdo al estímulo; y el 3 corresponde a la fase en que los patrones, suavemente, dejan de expresarse, volviendo al reposo. El período de oscilación de la señal LFP¹¹ determina un *lapso unitario* o *casilla temporal* que permite definir la variación temporal (de acuerdo a esas casillas) de los patrones de respuesta. C: Trayectorias de las variaciones de los vectores de respuesta cuantificada, de acuerdo al estímulo olor-concentración. También se indican las *fases* de las respuestas. D: Curva de posibilidad de clasificación exitosa de las representaciones espaciotemporales a lo largo del curso temporal de éstas; la segunda fase es la óptima.

Las estructuras de las redes neuronales establecidas en el bulbo olfatorio y en el lóbulo antenarior, implementan formas de control de ganancia o control de potencia de las señales transmitidas. Cuando un estímulo llega a alguna de estas

¹¹ LFP, del inglés *Local Field Potential*, en castellano potencial de campo local, en que se registra la actividad conjunta de un grupo de neuronas.

dos estructuras, se genera una combinación excitatoria-inhibitoria, como la de la Ilustración 3-8A. Si la concentración cambia esta combinación también cambia en un nuevo patrón espaciotemporal, pero, igualmente el número de espigas que en total se generan, es similar en el arreglo de neuronas completo. Así, el bulbo olfatorio y el lóbulo antenarario regulan el número de espigas de salida que transmiten la información sobre el estímulo (Cang y Isaacson, 2003; Harrison y Scott, 1986; Stopfer et al., 2003).

Se ha descrito que existe inhibición presináptica debido a receptores GABA_B en los terminales de las células receptoras, que reducen la liberación de glutamato hacia las células mitrales postsinápticas, a modo de retroalimentación negativa (McGann et al., 2005; Wachowiak y Cohen, 1999). Asimismo, Las células periglomerulares que son excitadas por las neuronas receptoras, liberan dopamina, que activa a receptores D₂¹² presinápticos, disminuyendo también la liberación de glutamato (Ennis et al., 2001; Tillerson et al., 2006). Por el contrario, la acetilcolina liberada por el prosencéfalo puede servir como amplificador de las entradas de las neuronas receptoras en las células mitrales (Kay y Stopfer, 2006).

Tanto en insectos como en vertebrados, la estimulación olorosa provoca sincronización oscilatoria (Kashiwadani et al., 1999; Lam et al., 2000; Laurent y Naraghi, 1994; Perez-Orive et al., 2002; Schoppa y Westbrook, 2001; Wehr y Laurent, 1996). Estas oscilaciones pueden detectarse con registros LFP en las células del bulbo y en las del lóbulo. Posiblemente estas oscilaciones se deben a las interacciones circuitales, ocasionadas por las sinapsis dendrodendríticas excitatoria-inhibitorias recíprocas entre las Neuronas Principales y las interneuronas GABAérgicas (Bazhenov et al., 2001b; Freeman, 1972; Neville y Haberly, 2003), y por el enclavamiento en fase de estas neuronas con las oscilaciones locales (Eeckman y Freeman, 1990; Laurent y Davidowitz, 1994; MacLeod y Laurent, 1996).

La utilidad de estas oscilaciones aún no ha sido dilucidada. Existen varias hipótesis sobre la función de estas oscilaciones, tanto en insectos como en vertebrados. Una hipótesis es la definición de un parámetro temporal (análogo a un *clock* de los sistemas digitales), que permitiría verificar los cambios de los patrones temporales de las neuronas, lo cual ya se revisó, con resultados favorables en los párrafos anteriores. Otras proponen que la sincronización de las oscilaciones es necesaria para la discriminación fina de los olores, y que podría modularse la intensidad de estas oscilaciones para lograr en ocasiones una discriminación fina (e.g. olor a guinda) y otras veces una discriminación más gruesa (e.g. olor a comida). (Kay y Stopfer, 2006).

¹² Un tipo de receptores de dopamina.

Posteriormente, en el sistema olfatorio la información llega a la corteza cerebral, donde la información es procesada y analizada, más asociativamente, involucrando procesos de aprendizaje y memoria, pero donde también parece haber cierta organización en la distribución de la información de acuerdo al estímulo (Haberly, 2001; Illig y Haberly, 2003), pero estos estudios escapan del alcance de esta revisión.

3.1.3 Reglos Biotecnológicos

Los trabajos revisados que aquí se exponen, corresponden al desarrollo de algunas técnicas que permiten sensar olores, que no necesariamente se basan en el funcionamiento ni en la codificación del sistema olfatorio, sino que son investigaciones en las que se incorporan y/o utilizan algunos elementos particulares del sistema olfatorio, que permiten o mejoran la *sensación* de olores, pudiendo, eventualmente, transformarse una línea de desarrollo de sensores biológicos olfatorios.

3.1.3.1 Arreglo de Antenas

Los insectos poseen un sistema olfativo ampliamente desarrollado. Alrededor de 250 especies de insectos, de las más de 1000000 conocidas, han sido investigadas por sus habilidades olfativas (Schroth et al., 2001), encontrándose alta sensibilidad a las feromonas y a olores de aproximadamente 400 especies de plantas huéspedes. Las concentraciones mínimas pueden alcanzar el orden de partes por millardo (Schutz et al., 2000), lo que es mil veces más sensible que las narices electrónicas (Myrick et al., 2005).

Las antenas son un elemento fundamental en la captación de olores, realizándose la transducción en unos pequeños pelos denominados *sensilla*. Luego la suma de miles de respuestas de diferentes neuronas compone la respuesta de toda la antena al olor, esto se conoce como Electroantenograma (EAG).

Algunos grupos de investigación han experimentado en la construcción de prototipos de biosensores de olor utilizando la información de los EAG. Utilizando insectos de diferentes especies y distinto sexo, cada uno con sensibilidades específicas, se conforma un arreglo de antenas cuya respuesta, en conjunto, puede servir para discriminar entre olores.

A continuación se presenta un resumen de dos reportes en los que se trabajó de manera similar.

En (Park et al., 2002) y en (Myrick et al., 2005) configuran el arreglo con 4 antenas dispuestas en un electrodo cuádruple con referencia común. Las antenas de cada especie se ubican entre una de las puntas de prueba de electrodo y la referencia común, adheridas con un gel conductor (ver Ilustración 3-10).

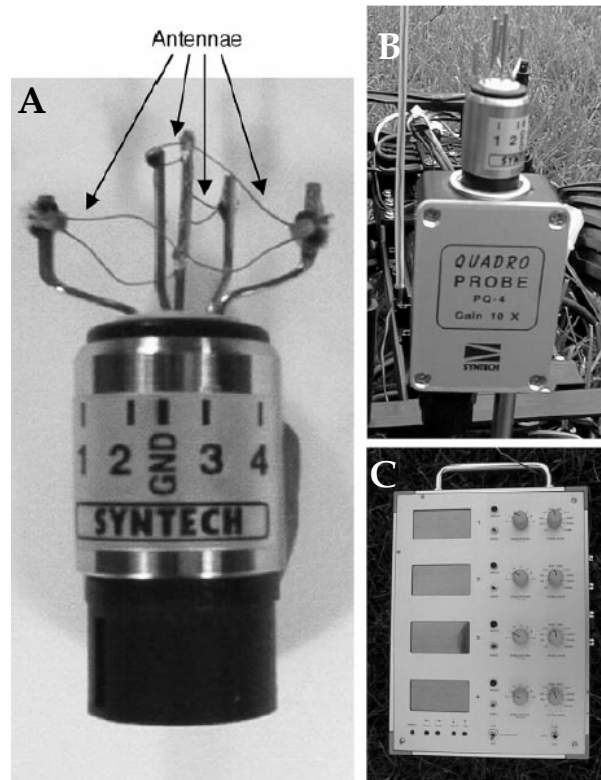


Ilustración 3-10: (Park et al., 2002) A: Montaje de las antenas en el electrodo cuádruple. B: Electrodo inserto en el cabezal preamplificador. C: Segundo amplificador y monitor de las cuatro puntas de prueba.

Las antenas, ya montadas en el electrodo, son situadas en contra flujo en un túnel de viento, en el cual a una distancia aproximada de $3m$ se ubica un papel de filtro humedecido con el estimulante a una concentración determinada. También se suministran ráfagas de olor con pipetas, para las pruebas que requieren una estimulación más controlada.

La idea de utilizar un arreglo de antenas es que tengan diferentes respuestas a los olores de manera que se forme una respuesta, del conjunto, distintiva, para cada olor.

En (Park et al., 2002) probaron la respuesta de 5 especies¹³ a 20 compuestos (además del control), de esta manera se puede ver cuáles son las respuestas más adecuadas de las especies en pos de crear un arreglo de antenas funcional para la aplicación deseada. En la Ilustración 3-11 se muestran las respuestas de cada especie a los diferentes compuestos, se puede ver que hay algunas muy disímiles y otras menos.

¹³ *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), y *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)

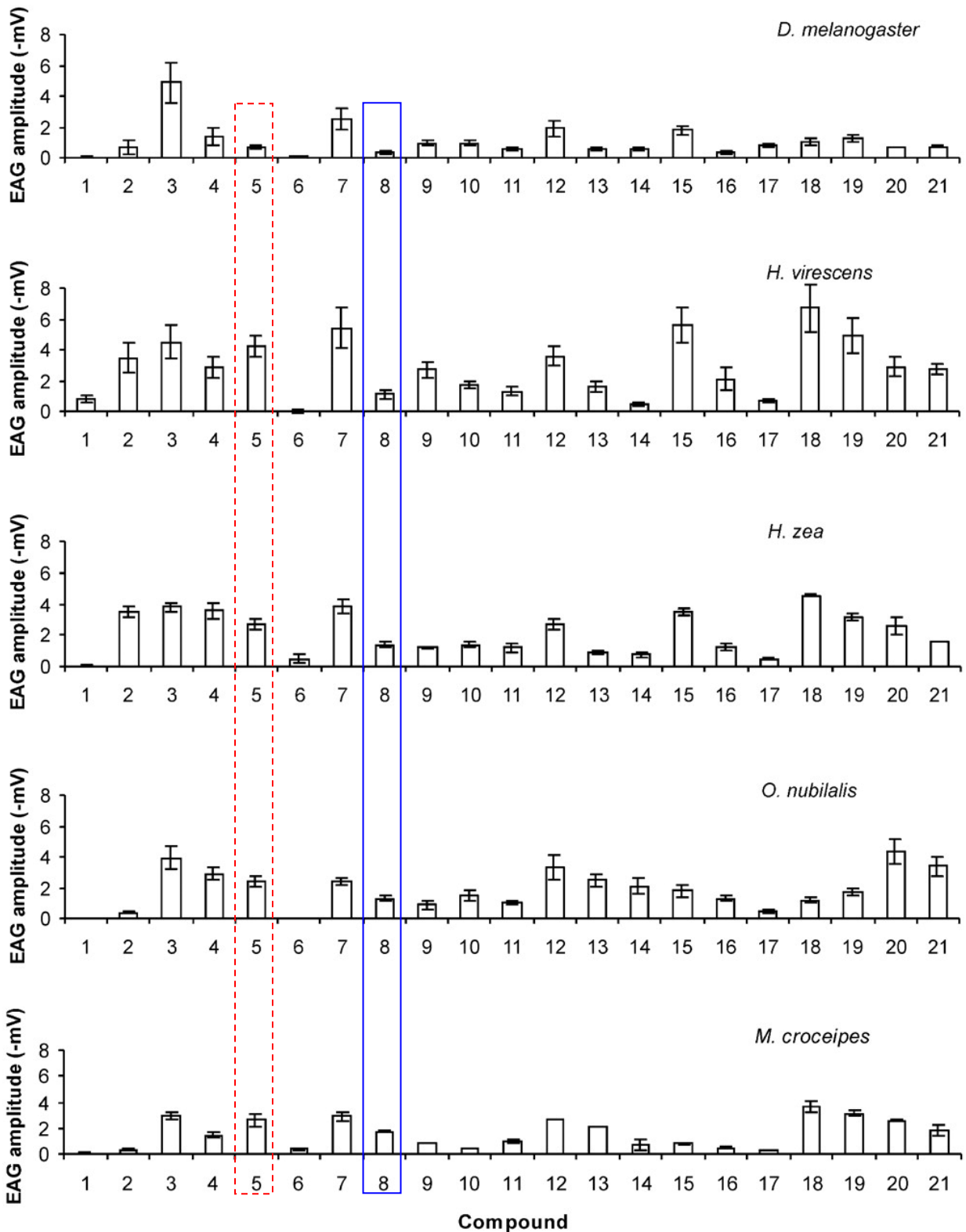


Ilustración 3-11: (Park et al., 2002) Cada gráfico corresponde a la respuesta de una especie a una lista de 20 compuestos, más el primero que es el control (sin estímulo). Examinando la figura de manera vertical se puede encontrar el *pseudocódigo* que genera el arreglo para cada compuesto. Comparar recuadro rojo punteado (compuesto 5) con el azul continuo (compuesto 8), la respuesta de la especie *H. Virescens* es un factor discriminante entre estos dos compuestos.

En la Ilustración 3-12 se muestran ejemplos de los *pseudocódigos* que se forman con el arreglo de antenas y sus diferentes respuestas para algunos¹⁴ de los compuestos utilizados, a través de las 5 especies.

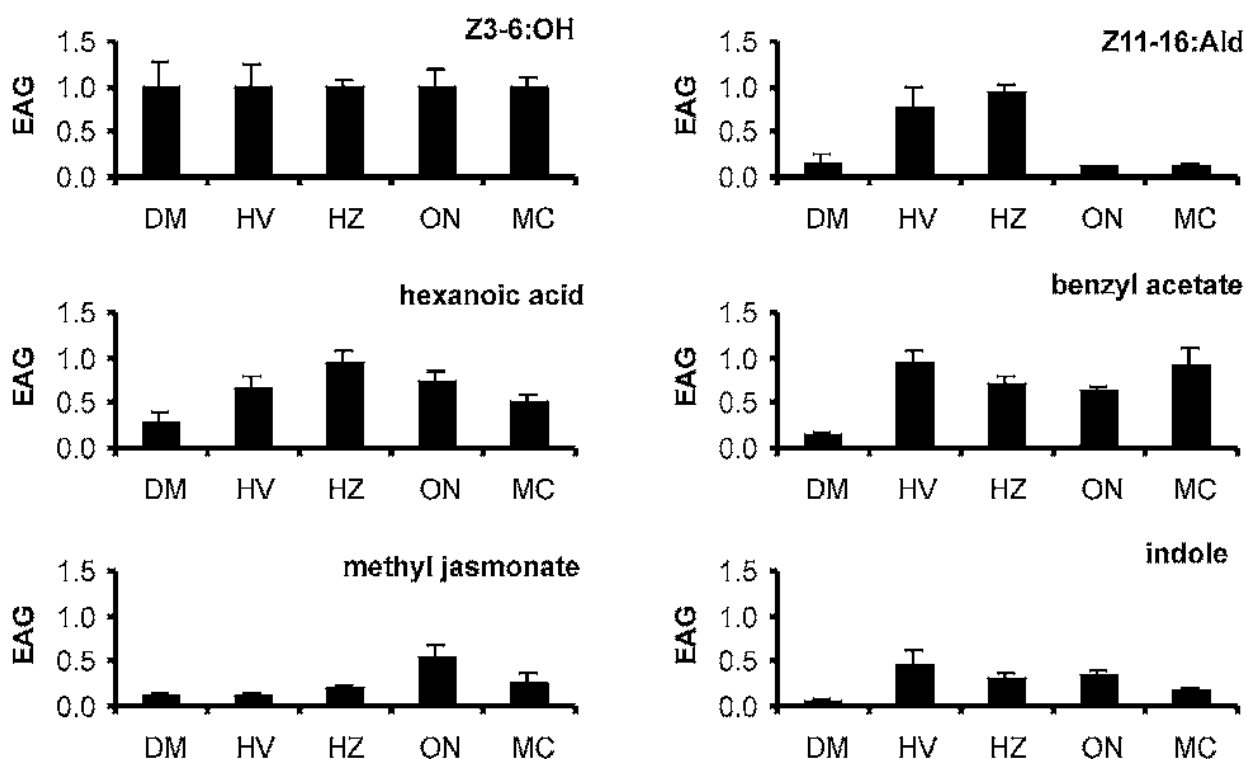


Ilustración 3-12: (Park et al., 2002) Gráfico de seis compuestos y las respectivas respuestas en cada una de las especies. Las respuestas están normalizadas para cada especie de acuerdo al primer gráfico, por eso su respuesta es unitaria.

Los datos recopilados con este experimento sugieren que la clasificación de los odorantes es posible, pues la respuesta del arreglo es particular para cada compuesto.

Al realizar un análisis de grupos, con un árbol jerárquico, (Park et al., 2002) encontraron resultados favorables tanto para la clasificación de odorantes, como para la de especies. Para la construcción del árbol se utilizó la distancia euclidiana. Los resultados se exhiben en la Ilustración 3-13.

¹⁴ Z3-6:OH, alcohol volátil de hoja verde; Z11-16:Ald, feromona sexual de *H. zea* y *H. virescens*; ácido hexanoico, ácido carboxílico alifático; benzil acetato, compuesto aromático; metil jasmonato, compuesto volátil común, liberado por plantas; indole, olor nitrogenado de animal

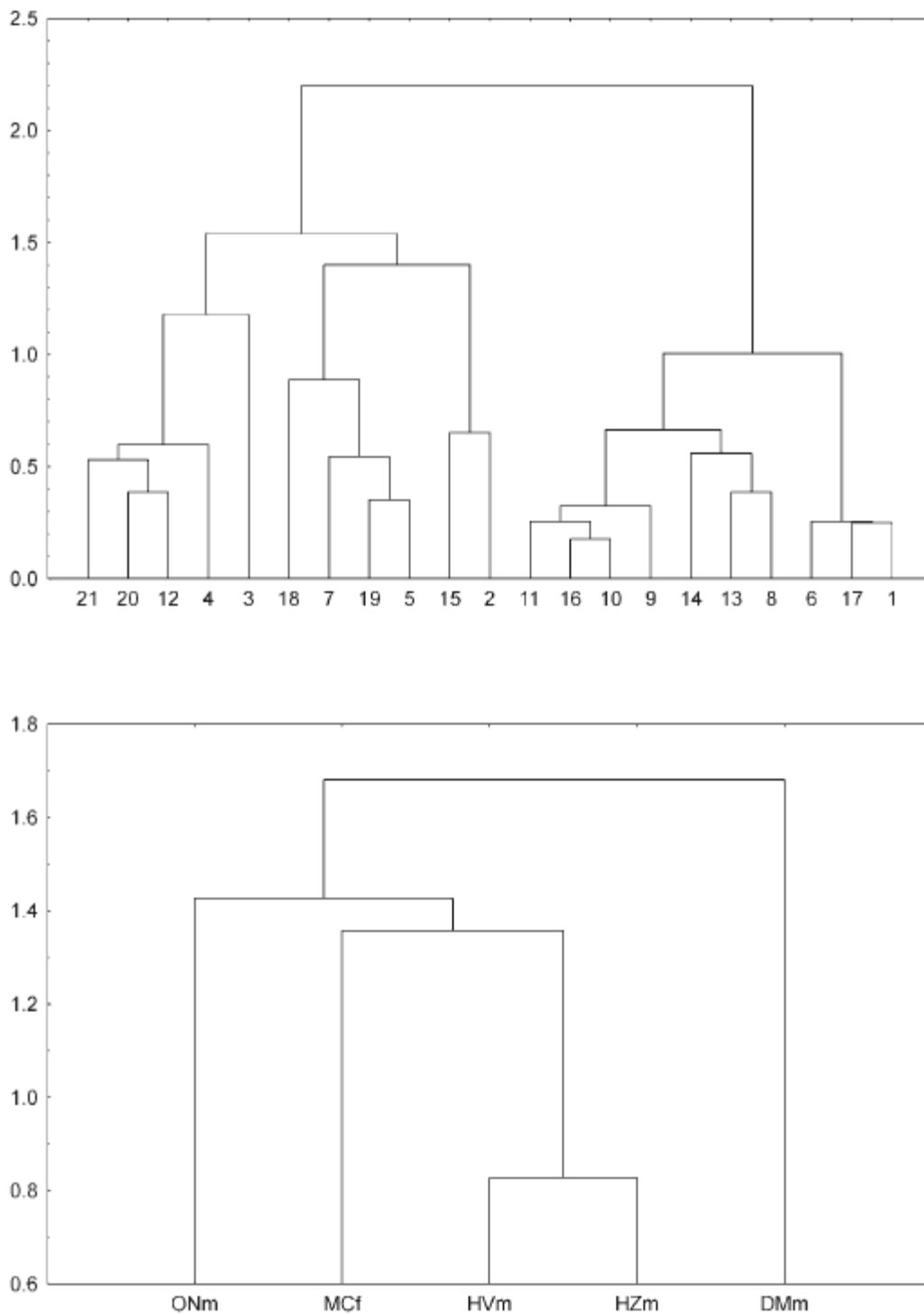


Ilustración 3-13: (Park et al., 2002) Arriba: árbol jerárquico para la clasificación de compuestos, donde los elementos están vinculados por ser los más parecidos. Abajo: el mismo análisis pero para clasificar las especies; estas agrupaciones aproximadamente coinciden con la cercanía evolutiva.

Además de los prósperos resultados del análisis anterior, (Park et al., 2002) lograron un sistema muy robusto y estable de registro para 4 especies (en 4

electrodos) simultáneas. Con un sistema así, los registros en tiempo real pueden ser de la calidad necesaria para que el análisis también sea en tiempo real. En la Ilustración 3-14 se muestran algunos registros simultáneos, con las antenas puestas en el túnel de viento.

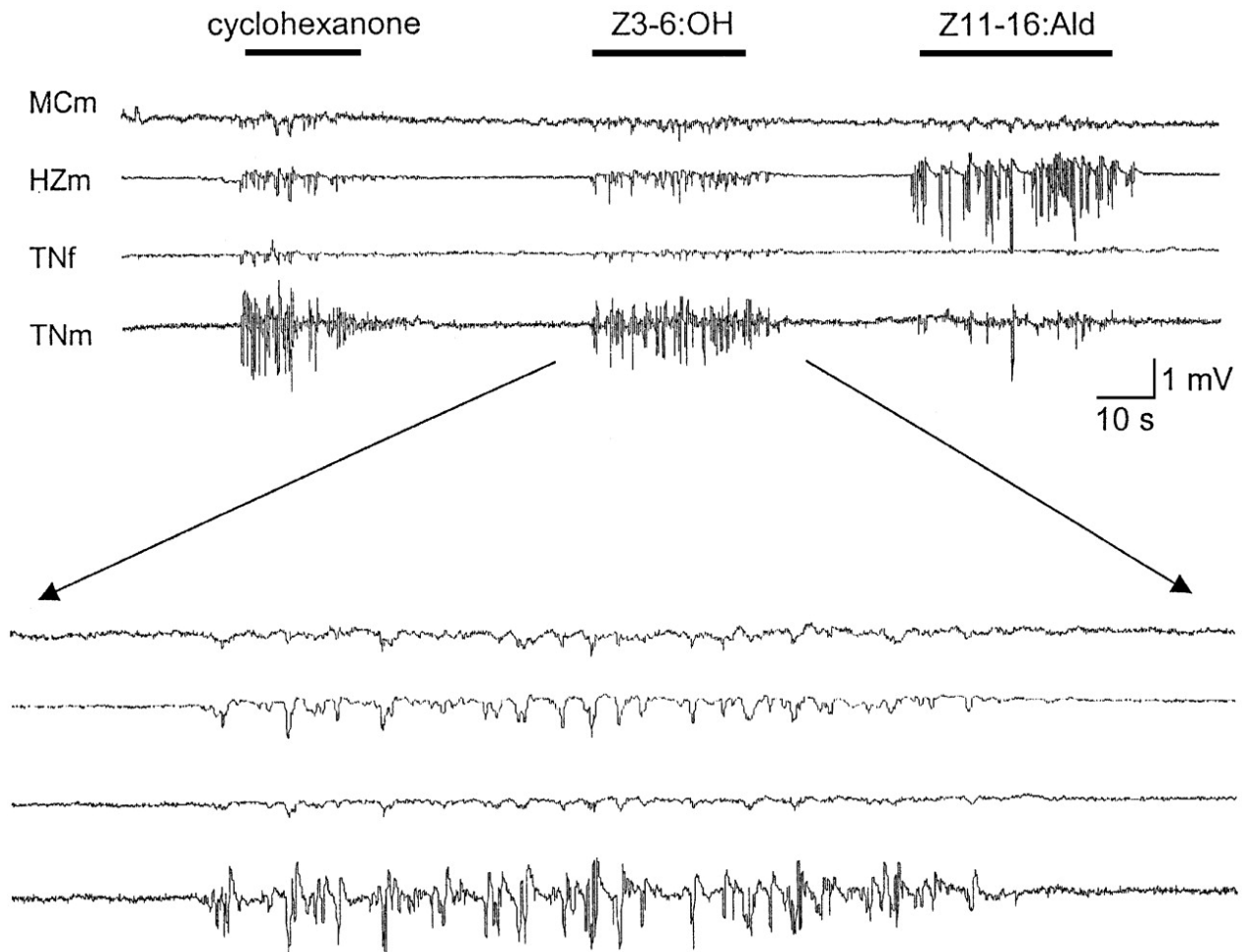


Ilustración 3-14: (Park et al., 2002) Registro crudo obtenido para tres odorantes en cuatro antenas simultáneamente. En los momentos señalizados con las barras negras se sometía el arreglo al odorante determinado. En la respuesta cruda igual es muy marcada la intensidad de la respuesta. Se utiliza acá otra especie en ambos sexos: *Trichoplusia ni* (TN).

La calidad de los registros obtenidos pronostica una factible operación en tiempo real.

Con esto como antecedente, el grupo de (Myrick et al., 2005) recientemente comunicó los resultados de su trabajo. Usando el mismo montaje antes descrito (4 antenas registrando simultáneamente), pero con un procesamiento de datos en tiempo real.

La adquisición de datos se hizo de manera convencional, primero con un amplificador de bajo ruido, luego un filtro pasa altos, a continuación el segundo amplificador, y finalmente un filtro pasa bajos, cuya salida se conecta al conversor análogo-digital en el computador. Todo a través de cables apantallados para evitar el ruido.

Una vez en el computador, implementaron en Labview 6.1 un algoritmo de extracción de características y luego un clasificador.

(Myrick et al., 2005) definieron como característica fundamental la amplitud sima-cima de la despolarización del EAG, este es comparado con un umbral (que define el usuario), si no supera el umbral el evento se desecha, si lo supera es considerado como válido. Las otras dos características usadas son: la pendiente de inicio, y la segunda derivada en el máximo.

Con las 3 características para cada uno de los 4 registros para cada olor, resulta, finalmente, un vector de características de 12 elementos.

Como clasificador se utilizó el principio de “los K vecinos más cercanos” (KNN¹⁵). Con este principio se determina la probabilidad de que una muestra pertenezca a una clase de acuerdo a su cercanía a datos rotulados previamente evaluados (entrenamiento). Para medir la cercanía utilizaron la distancia *manhattan*, en la Ecuación 3-4 se muestra la fórmula que indica la distancia entre un punto q de prueba y uno x de entrenamiento, donde q_i y x_i son cada uno de los elementos del vector de características:

Ecuación 3-4

$$d_{qx} = \sum_i |q_i - x_i|$$

Y como estimador de la probabilidad de pertenencia a la clase c del punto de prueba q emplearon la siguiente expresión:

Ecuación 3-5

$$P(q \in c) = \frac{\sum_{x \in K \wedge x \in c} 1/(d_{qx} + \alpha)}{\sum_{x \in K} 1/(d_{qx} + \alpha)}$$

Donde a es un número pequeño para evitar la división por cero, y K es el conjunto de los k vecinos más cercanos, y c es la clase que se está evaluando.

¹⁵ KNN, del inglés K Nearest Neighbor.

El programa además admite el ingreso de un umbral de confianza, que en caso de no ser superado, el sistema entrega como respuesta *olor desconocido*.

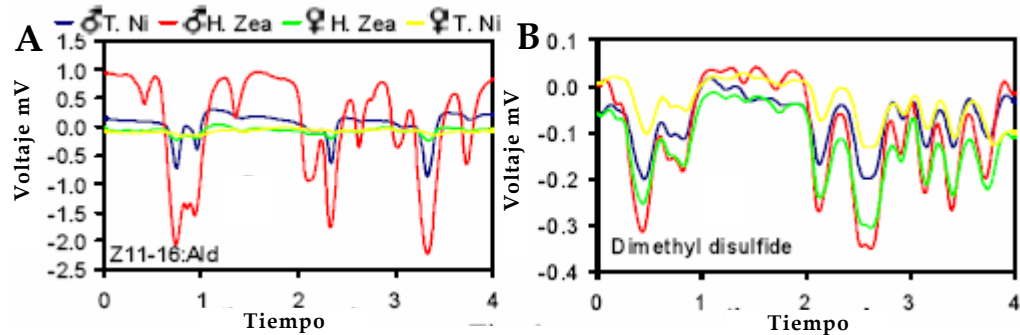


Ilustración 3-15: (Myrick et al., 2005) Registros crudos de EAG. En A se muestran las respuestas a una feromona, y en B a un olor no feromónico. Las respuestas no feromónicas son cerca de un orden de magnitud menores (notar la escala). Estos son los datos que luego son procesados para la clasificación. La característica *amplitud sima-cima* es la primordial en la diferenciación de los datos.

Las pruebas de robustez y precisión presentadas en la publicación consisten en variar 4 parámetros con supuesto de *ceteris paribus*, y graficar la precisión en función de los cambios del parámetro en cuestión. Los parámetros variados son: umbral de amplitud sima-cima, número de puntos de entrenamiento, número de K vecinos cercanos por olor, y valor de confianza. Cuando un parámetro era variable, los otros permanecían en su valor predeterminado, $100\mu V$ para el umbral de amplitud, 100 para el número de puntos de entrenamiento, 10 para los vecinos, y 0.8 para la confianza.

Al igual que como se muestra en la Ilustración 3-15, se hizo 2 tipos de experimentos, uno para feromonas y otro para olores feromónicos (tipo 1) y no feromónicos (tipo 2); el tipo 2 fue hecho 2 veces.

La Ilustración 3-16 muestra el gráfico de precisión versus cada uno de los parámetros variados. Se aprecia claramente la gran habilidad que naturalmente poseen los insectos para percibir feromonas (exp 1), reflejada en el nivel en que se mueve la precisión para esos olores.

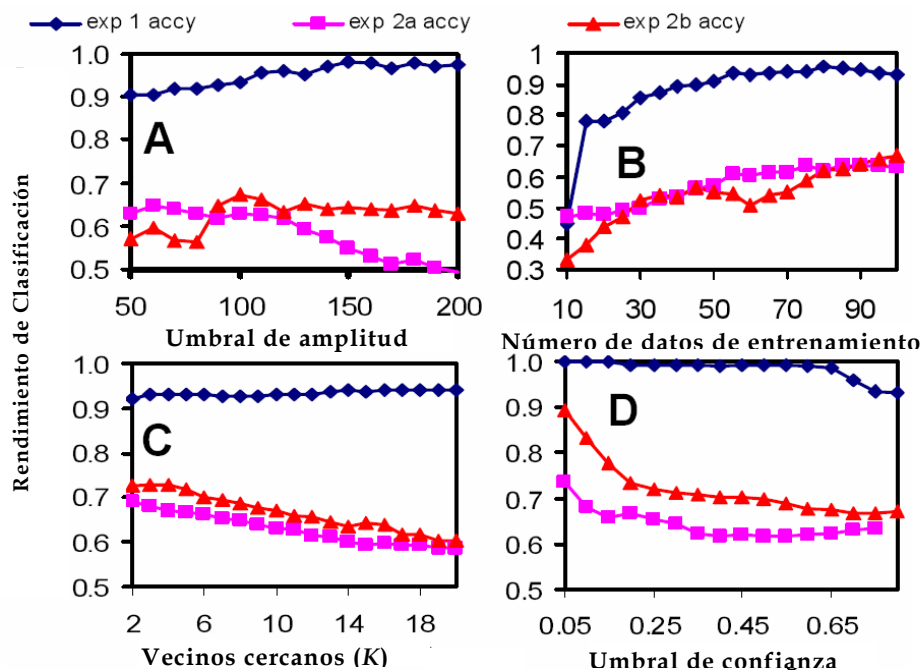


Ilustración 3-16: (Myrick et al., 2005) Gráfico de rendimiento del sistema ante la variación de un parámetro. A: variación umbral de amplitud. B: variación cantidad de puntos de entrenamiento. C: variación de cantidad de vecinos más cercanos. D: variación del parámetro de confianza.

En la Ilustración 3-16A parece ser que el óptimo para los experimentos tipo 2 está cerca de los $100\mu V$, al aumentar el umbral se desechan las actividades más pequeñas, propias de los olores no feromónicos. En la Ilustración 3-16B evidentemente el rendimiento mejora mientras mejor entrenado esté el sistema, pero más allá de 70 puntos de entrenamiento la mejora parece mínima. La Ilustración 3-16C muestra que para menos vecinos cercanos considerados en la estimación de la probabilidad el rendimiento es mejor para los datos evaluados. Finalmente la Ilustración 3-16D también presenta un decaimiento del rendimiento, ya que es cada vez más exigente, y con menores diferencias responde *olor desconocido*, cosa que para las pruebas es errónea.

En definitiva, (Myrick et al., 2005) implementaron, de hecho, una nariz bioelectrónica, con un parámetro de confianza configurable de acuerdo al costo que impliquen los falsos positivos en la aplicación que se implemente. Los resultados de rendimiento están en general en el rango de 50-100%, Destacándose la precisión para la clasificación de feromonas, pero en cuanto a los olores no feromónicos, está aún lejos de poder satisfacer la mayoría de los requerimientos exigidos en un sensor de olores.

3.1.3.2 Revestimiento Proteico Específico

Dentro de las incursiones de la biología en la detección electrónica de olores, una muy destacable consiste en utilizar la capacidad selectiva de los receptores de las neuronas olfatorias. Ya que dentro de la maquinaria de transducción olfatoria existe ese primer paso, en que la molécula de olor se adosa a una proteína receptora específica (Buck y Axel, 1991; Levy et al., 1991; Malnic et al., 1999), algunos intentos se han hecho, para utilizar esa cualidad, y así, incrementar la especificidad de dispositivos electrónicos sensores de moléculas, ya existentes.

Los cristales de cuarzo microbalanceados (QCM¹⁶) son dispositivos piezoeléctricos que oscilan a una determinada frecuencia, y al adsorber una partícula en la superficie receptora, modifican la frecuencia de oscilación de acuerdo a la masa de dicha partícula según la Ecuación 3-6, donde f_0 es la frecuencia inicial, A es el área de la superficie, ρ es la densidad del cristal, t es el grosor del mismo, y, Δm y Δf son los cambios en la masa y la frecuencia.

Ecuación 3-6

$$\Delta f = -f_0 \frac{\Delta m}{A\rho t}$$

La ventaja de usar QCM es que se puede conseguir fácilmente porque ya es un producto existente en el mercado, de relativo bajo costo, que logra una sensibilidad de **100 pg**, lo cual alcanzaría para percibir, por ejemplo, diacetil (masa molar: **86 g/mol**) en una concentración de **1 pM**, lo que supera ampliamente la sensibilidad humana (Sung et al., 2006).

A continuación se revisarán dos reportes de trabajo experimental que consiguen combinar la especificidad de las proteínas receptoras con la sensibilidad de los QCM.

Las publicaciones de (Ko y Park, 2005) y (Sung et al., 2006) trabajan básicamente con el mismo principio, pero con algunas diferencias experimentales. En el primero utilizan la proteína receptora olfatoria de rata **I7**, y la cultivan en células de riñón humano embriónico (HEK-293); en el segundo la proteína es la **ODR-10** del gusano (*C. Elegans*), y el cultivo es en la bacteria *Escherichia coli*.

El procedimiento consiste en usar técnicas de ingeniería genética, para expresar una proteína receptora del sistema olfatorio, y luego bañar el QCM, de modo que se forme un revestimiento proteico, cuya capacidad de adsorción sea específica gracias a la proteína receptora.

¹⁶ QCM, del inglés *Quartz Crystal Microbalanced*.

Se explicará el procedimiento de (Sung et al., 2006), pero es completamente análogo para el otro, sólo que con los elementos correspondientes a esas proteínas y células.

La amplificación del gen para la clonación se hizo usando PCR¹⁷, marcando el gen de la proteína con **6×His-tag** en el terminal C. Luego se insertó en el vector de expresión pGEX 4T-1, que a su vez posee el gen **GST**¹⁸ en el lugar de clonación. En definitiva el gen de la proteína queda marcado con **6×His-tag** por el terminal C y con **GST** por el terminal N. El vector de expresión resultante se muestra en la Ilustración 3-17.



Ilustración 3-17: (Sung et al., 2006) Diagrama del vector de expresión resultante. El gen de *ODR-10* está marcado por ambos flancos con *GST* y *6 His*. Además está, lo primero, el promotor.

Ambas etiquetas fueron utilizadas en la purificación, y luego se verificó la proteína con Western blot. Luego se cultivó las células y se obtuvo la membrana donde se expresó la proteína.

Finalmente se realizó el recubrimiento de la superficie del QCM, se dejó secar, y se midió la nueva frecuencia de resonancia. Porque al agregar el revestimiento, inevitablemente se produce un cambio en la frecuencia debido a que se agregó material, y la frecuencia varía de acuerdo a la Ecuación 3-6.

Para comprobar la eficacia del recubrimiento con la proteína receptora específica, se hizo una prueba en la que se sometía a la presencia del olor estipulado un QCM cuyo revestimiento fue hecho con membrana del mismo tipo de células de cultivo, pero que no se les indujo la expresión del gen, y se comparó con las que sí se indujo la expresión. En la Ilustración 3-18 se muestran los resultados para los dos experimentos revisados (Ko y Park, 2005) y (Sung et al., 2006).

¹⁷ PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*.

¹⁸ GST, del inglés *Glutathione S-transferase*, gen utilizado en sistemas de fusión en *Escherichia coli*.

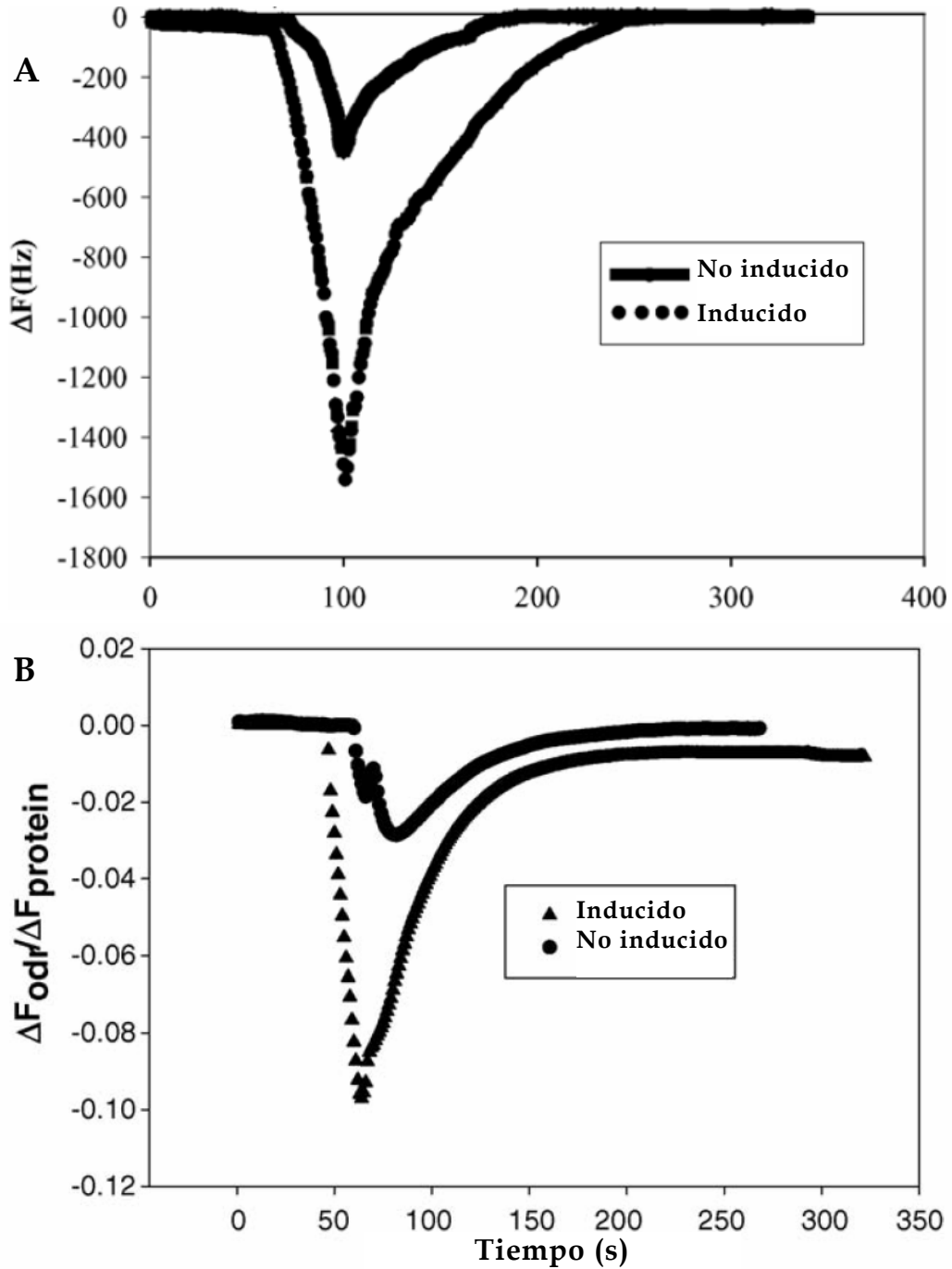


Ilustración 3-18 Respuesta de cambio de frecuencia del QCM ante el olor específico de la proteína clonada. Como control se recubrió el QCM con membrana de célula en la cual no se indujo la expresión de la proteína, y se compara la respuesta del QCM que sí fue revestido con membrana inducida a expresar la proteína. La respuesta es mucho mayor en la inducida para ambos experimentos. A: (Ko y Park, 2005) Proteína *I7*, inducida en células *HEK-293*. B: (Sung et al., 2006) Proteína *ODR-10*, inducida en *E. coli*.

Los resultados son muy favorables, demostrando el éxito del revestimiento con la proteína específica, y enseñando la magnitud del cambio producido. En conclusión el QCM revestido es más sensible, pero ahora hay que comprobar que dicha sensibilidad es específica para el odorante de interés.

La siguiente prueba consistió en exponer el QCM a diferentes compuestos odorantes. Estos odorantes eran todos aldehídos (desde C₆-C₁₀, o hexanal a decanal), donde la única diferencia entre uno y otro es un grupo metilo (CH₂), de los cuales el octanal es el ligando para la proteína *I7*; para el experimento con *ODR-10* además se expuso a diacetil, ligando de dicha proteína.

En la Ilustración 3-19 se presenta los resultados de exponer el QCM a los diferentes compuestos. La especificidad es notable, en algunos casos la respuesta al ligando llega a ser hasta 8 veces mayor que a otro compuesto.

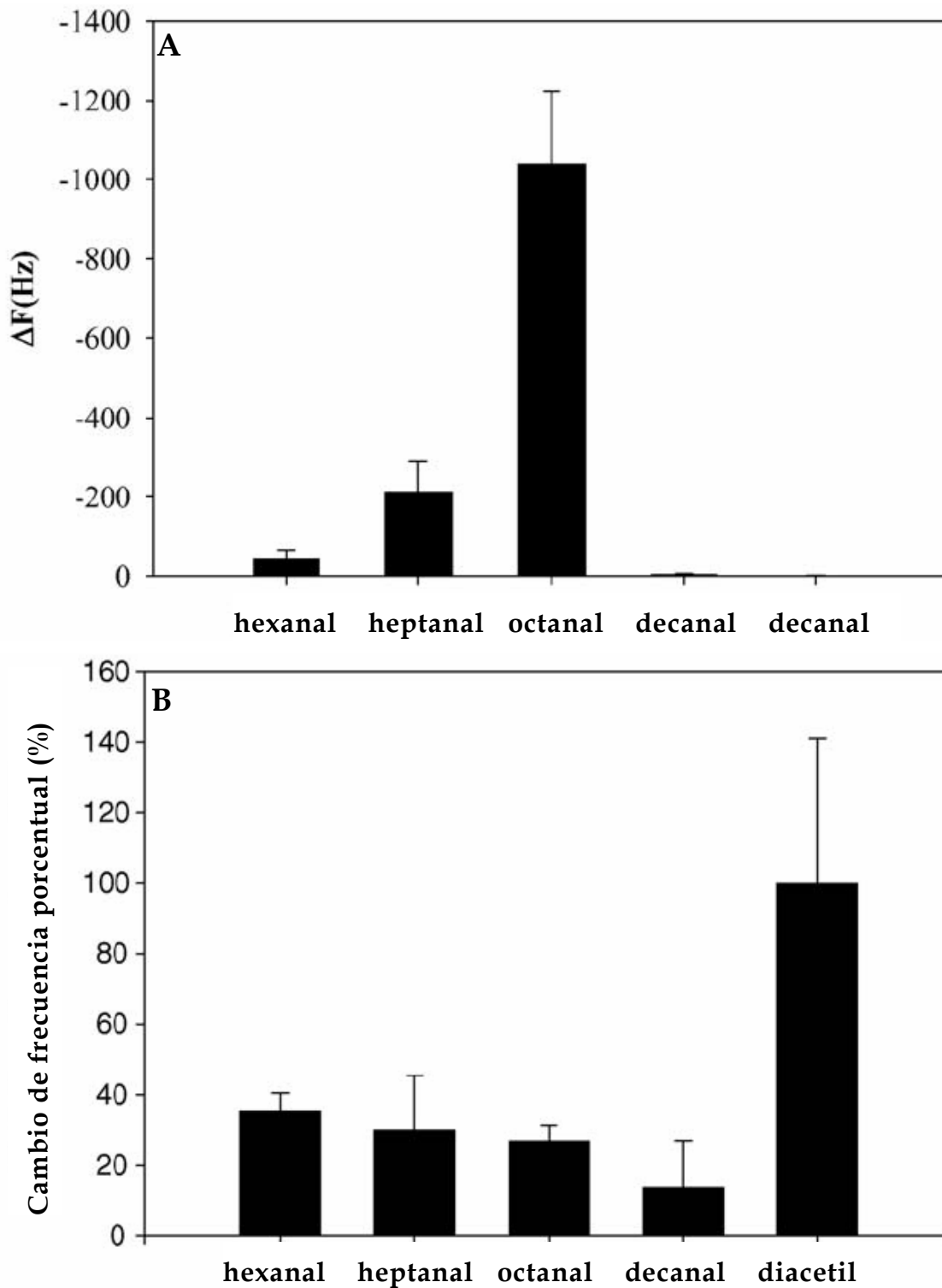


Ilustración 3-19: Gráfico de barras de respuestas a diferentes compuestos. Se aprecia que el cambio de frecuencia es notablemente mayor para el compuesto ligando de la proteína del revestimiento. A:(Ko y Park, 2005) ligando octanal. B: (Sung et al., 2006) ligando diacetil.

Además del incremento en el cambio de frecuencia y de la especificidad, el QCM con revestimiento proteico presenta un amplio rango de detección, cuya respuesta varía linealmente con el logaritmo de la concentración.

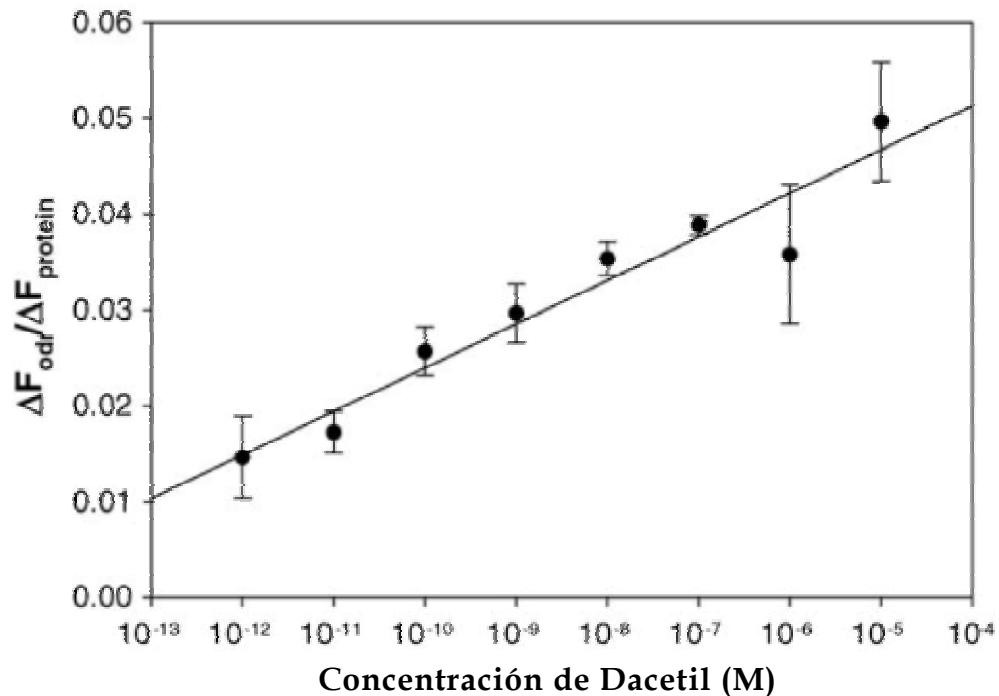


Ilustración 3-20: (Sung et al., 2006) Respuesta del QCM con proteína receptora a diferentes concentraciones del ligando. La relación entre el cambio de frecuencia y la dosis parece ser lineal con el logaritmo de la concentración, igual relación fue reportada por (Ko y Park, 2005). El umbral de detección es $1\mu M$, valor muy inferior al límite humano.

Al aumentar la concentración, por sobre el rango presentado en la Ilustración 3-20, la respuesta no continúa aumentando, aparentemente la proteína se satura y no captura más ligando.

Un aspecto muy destacable de los resultados obtenidos por (Ko y Park, 2005), es la durabilidad del biosensor. Según lo publicado el QCM, revestido mantuvo las respuestas anteriormente expuestas por al menos 3 meses, con almacenamiento de espacio abierto. Lapso que supera ampliamente los periodos de cultivos de las células y antenas antes revisadas.

Muchos grupos de investigadores han secuenciado y clonado varios genes de receptores olfatorios humanos, este sistema puede ser una herramienta de gran utilidad para dilucidar la función de esos genes dentro de la recepción de olores.

3.2 Aplicaciones

En la presente sección se revisa algunas de las aplicaciones existentes para sensores de olores, y los resultados logrados en estas incursiones. Además, se propone ámbitos de aplicación aún no explorados por razones de incompatibilidad de los sensores utilizados con el nicho señalado, pero que se estima que la información de olores es un aporte valioso para dicho proceso.

La revisión tiene como fin entregar una idea del universo en el cual se insertarán los sensores biológicos olfatorios cuando pasen la etapa de investigación, prototipo y, finalmente, lleguen a ser un producto de mercado. Asimismo, esta revisión da cuenta de las líneas generales de los requisitos que se espera que cumplan los sensores olfatorios en los mercados que existe demanda.

Naturalmente, los campos de aplicación para los sensores biológicos olfatorios son, de antemano, los mismos que los de las narices electrónicas, ya que es muy básico concebirlos como una competencia de éstas. Por eso es interesante examinar las participaciones y los resultados logrados por parte de la e-noses en procesos industriales, médicos, ambientales, de seguridad, etc.

3.2.1 Industria de Alimentos

La industria de alimentos es un mercado muy grande para los sensores de olores. Son muchas la etapas, y variados los productos en los que la variable olorosa posee un peso a la hora de la valoración del producto. Actualmente en la mayoría de las industrias alimenticias existe personal de planta, cuya misión es monitorear o evaluar el estado de los elementos producidos. Dentro de esta evaluación, el olor es un indicador muy relevante, y muy considerado, pero de manera subjetiva, y un tanto primitiva comparada con otras etapas del control de calidad de la producción. El hecho de tener un plantel monitoreando el olor, dentro de una línea de producción donde la presión, temperatura y muchas otras variables son controladas automáticamente, implica un costo mucho mayor al que si hubiese una máquina, un retardo en la línea de producción, y un componente subjetivo insoslayable cuando la evaluación es realizada por personas, en que naturalmente cada una tiene una apreciación diferente de un mismo fenómeno. Por todo lo anterior es adecuada la inserción de sensores de olor en las líneas de producción, y las empresas no titubearían en incorporar un sensor que cumpla con la función requerida de manera rápida, segura, económica y objetiva.

Por otra parte, el olor no sólo es un indicador de la calidad o estado del producto, sino que también es una característica particular y distintiva de cada producto (e.g. cepa de vino, sabor de helado, maduración del queso, etc.), y como tal, es un

factor clasificatorio importante. Por lo tanto, la clasificación de los productos puede ser facilitada usando la información olfativa, es decir, es otro campo de aplicación de los sensores de olor dentro de la industria alimenticia.

En estos dos sentidos -monitoreo y clasificación- las e-noses han tenido, desde hace más de una década, numerosas intervenciones en la industria. Claramente, con el tiempo y la consecuente modernización de los instrumentos y las mejoras de los algoritmos de procesamiento, son más los campos de aplicación, y mejores los resultados logrados.

Se presentan a continuación algunos de los reportes publicados sobre estas incursiones de las e-noses en la industria alimenticia, con la intención de entregar una idea representativa de los trabajos existentes en este ámbito.

Desde los albores de las e-noses se les introdujo en tareas como las mencionadas. Hace casi 15 años se publicó sobre el uso de una e-nose en la clasificación de cervezas (Pearce et al., 1993). El sistema se basa en un arreglo de polímeros conductores, en que cada uno de los polímeros es sensible a ciertos compuestos volátiles de la cerveza. Aun en los inicios los resultados eran promisorios. Se clasificó con éxito varias cervezas comerciales, y se discriminó entre las de tinción natural y las de tinción artificial.

Desde entonces los intentos de introducir las e-noses en la industria alimenticia han sido muy regulares. Como se mencionó anteriormente, las tareas asignadas son preferencialmente de monitoreo y clasificación. Lo que sí son bastante variados, son los rubros de la industria alimenticia en los que se prueba las e-noses.

Se han publicado usos de las e-noses para la clasificación de miel (Benedetti et al., 2004); como indicador del período de almacenaje de manzanas (Brezmes et al., 2001; Saevels et al., 2004); como detector de la ranciedad de la leche (Capone et al., 2001); como calificador de la calidad de manzanas y naranjas luego de la cosecha (Di Natale et al., 2001); como estimador de la calidad del té (Dutta et al., 2003; Yu y Wang, aun no publicado); detector de podredumbre de bananas no destructivo (Eduard et al., 1999); indicador de adulteración del aceite de sésamo (Hai y Wang, 2006); para clasificación de la calidad del grano de maíz (Jonsson et al., 1997); como clasificador de vinos (McKellar et al., 2005); para monitoreo de calidad de productos lácteos (Schaller et al., 1999); como evaluador de la calidad de tomates (Sinesio et al., 2000); y como detector de ranciedad de papas fritas (Vinaixa et al., 2005). Las incursiones son numerosas, aquí se nombran sólo algunas, pero estas entregan una idea de lo variados que pueden ser los rubros, pero también también

que la labor es básicamente la misma, más aún si se considera que monitorear y clasificar resultan tareas diferentes de acuerdo al uso que se haga de la información sobre las cualidades del producto o la etapa del proceso productivo en que se realicen las observaciones.

En cada una de estas aplicaciones de las e-noses, deben converger tres elementos para que el resultado sea el mejor posible: el tipo de sensor, el procesamiento de los datos (reconocimiento de patrones) y, lo primero, el tipo de odorantes. Como típicamente el tipo de odorantes está determinado por la aplicación en la cual se desea implementar el sistema, son los otros dos factores los que deben manejarse en pos de un buen resultado.

Generalmente, en las publicaciones revisadas se entregan los resultados para las técnicas usadas, casi todos los grupos de investigación realizan múltiples pruebas buscando el procesamiento que mejor se ajuste a las condiciones de la aplicación en la que se implementa el sistema.

Probablemente sucederá lo mismo con los sensores olfatorios biológicos. Habrá que buscar los algoritmos y tipos de sensor más apropiados para los odorantes propios de la aplicación.

3.2.2 Medicina

Desde los orígenes de la medicina el olfato (y el gusto) del médico, o mejor dicho el olor del enfermo, constituía un factor importante para el diagnóstico. Por ejemplo *Diabetes mellitus* significa literalmente orina dulce, esta denominación surge cuando los médicos griegos utilizaban la gustación y el olfato para sus diagnósticos. Con el paso del tiempo, y la expansión del positivismo (siglo XIX) es cuando se desestiman la mayoría de las técnicas cualitativas, y sólo lo *medible* es lo real. Surgieron entonces todas las técnicas de química analítica, y el olfato dejó de ser un elemento decidor en los diagnósticos.

Pero con la aparición de las e-noses, y la posibilidad de poder cuantificar la información de olores, emerge otra vez la posibilidad de usar el factor odorante como información válida y útil en el diagnóstico de algunas enfermedades.

Los compuestos volátiles pueden ser elementos característicos, muy distintivos de algunas enfermedades, y en general el aporte de las e-noses es simplemente detectar estos compuestos. Si la aplicación lo permite, el sistema puede estar basado en la detección de los odorantes. En este sentido ya existen sistemas

patentados para el diagnóstico de ciertas enfermedades, siendo en algunos casos los mismos investigadores de las universidades los inventores, y las universidades las que se asignan las patentes (US pat: 6461306; 5698089; 6620109), lo cual constituye un gran incentivo para el desarrollo de nuevos sistemas, además, del aliciente científico.

La función que desempeñan los sensores de olor en estas tareas médicas son básicamente un complemento que se suma al resto de los factores que le indican al médico cuál puede ser la afección que aqueja al paciente. Pero al tratarse de una medición de odorantes, tiene la ventaja de muchas veces ser no invasiva, como en los casos de análisis de aliento, o de infección de heridas. Además es una herramienta de monitoreo para situaciones de cirugía o similares, pudiendo indicar los compuestos presentes y sus concentraciones, pudiendo evitarse análisis químicos que pueden demorar mucho.

A continuación se enuncian algunas de las aplicaciones que han tenido las e-noses en la medicina.

Un resultado muy relevante para la mayoría de las aplicaciones médicas de las e-noses es demostrar que éstas son sensibles de algún modo a la actividad bacterial. Un trabajo que aborda esta inquietud intentó clasificar el tipo y etapa de desarrollo de dos microorganismos potencialmente patógenos: *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). La detección de *S. aureus* alcanzó el **100%** de efectividad, y la de *E. coli* el **92%**. Además, la predicción del desarrollo de los cultivos logró un **81%** de precisión (Gardner et al., 1998).

Este tipo de experimentos siguen realizandose, tratando de ser más específicos y más sensibles. Un grupo de investigadores se propuso identificar 13 tipos de bacterias *in vitro*, y lo mismo para infecciones urinarias *in vivo* (Kodogiannis et al., 2002). Los resultados apuntan a la futura utilidad que tendrán estas mediciones una vez que se logre la calidad necesaria en estas técnicas.

Esto es un excelente antecedente para promover el desarrollo y la incorporación de sistemas basados en odorantes para las aplicaciones médicas.

La Universidad de Pennsylvania, EE.UU. utilizó una e-nose para analizar la neumonía de algunos pacientes, dando una puntuación al grado de infección sufrida (CPIS¹⁹). Esta estimación hecha por la información de odorantes se

¹⁹ CPIS, del inglés *Clinical Pulmonary Infection Score*

contrastó con la medición del grado de infección utilizando el procedimiento regular basado en el análisis bacteriológico del lavado broncopulmonar. La correlación entre la estimación de CPIS hecha por la sistema basado en la e-nose, con el valor real de CPIS obtenido con la técnica tradicional, fue de $R^2=0.81$. El grupo de investigación continuó trabajando con la e-nose intentando clasificar las bacterias que producen la infección.

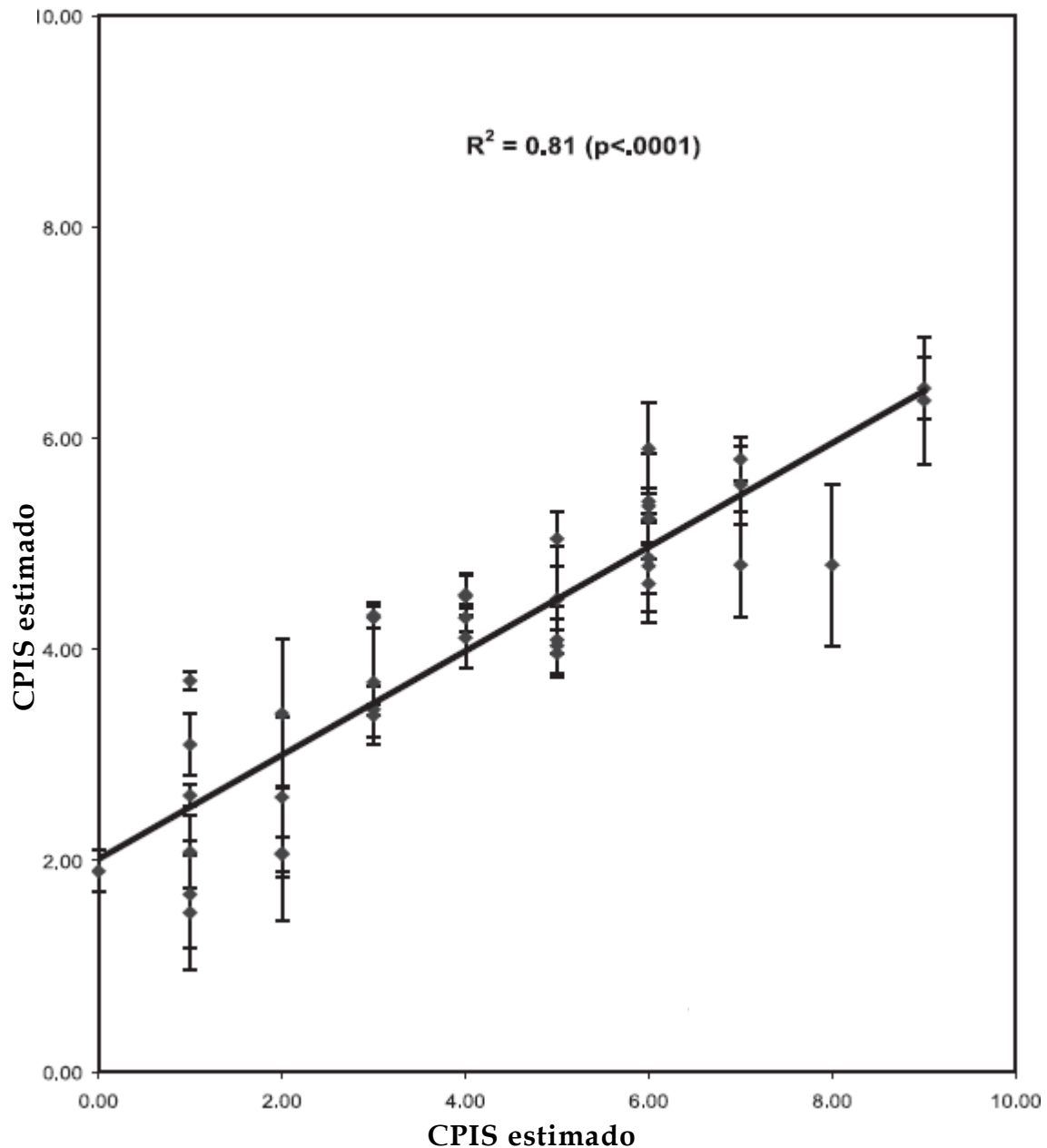


Ilustración 3-21: (Hanson y Thaler, 2005) Relación entre el CPIS estimado con el sistema basado en la e-nose y el real obtenido con las técnicas tradicionales. La correlación entre los valores tiene un $R^2=0.81$, lo que es un resultado bastante promisorio.

Otros trabajos se han publicado en la misma línea de análisis del estado pulmonar. La idea es lograr un sistema no invasivo para identificar el cáncer pulmonar, utilizando muestras del aire exhalado por los pacientes (Di Natale et al., 2003; Xing et al., 2005). Los resultados obtenidos por los grupos han sido muy alentadores, mostrando que el sistema de detección de cáncer, utilizando la información de los compuestos volátiles, puede ser muy efectivo, además de ventajoso comparado con los tediosos exámenes tradicionales. Los grupos de investigadores siguen trabajando tratando de mejorar la sensibilidad, para poder realizar un diagnóstico preciso, a temprana maduración de la enfermedad.

Otros trabajos relativos al sistema respiratorio han sido explorados. Algunos de ellos intentan identificar enfermedades como rinosinusitis crónica y otras afecciones rinológicas (Mohamed et al., 2003; Thaler, 2002). Los resultados de estas investigaciones preliminares, de aplicación y uso de esta tecnología basada en e-noses son muy satisfactorios. En ellos se demuestra que la información de odorantes es muy valiosa para el diagnóstico de rinosinusitis crónica, alcanzando una clasificación correcta del **80%** (Mohamed et al., 2003). El procedimiento de examinación elaborado es muy simple, obteniendo las muestras en bolsas plásticas herméticas, con el aire exhalado haciendo más fácil y cómoda su ejecución.

Los investigadores señalan que con un sistema maduro y robusto de clasificación de estas enfermedades, más los exámenes actuales, se lograría un diagnóstico mucho más preciso y temprano.

También se ha utilizado sistemas basados en e-noses para la evaluación de halitosis (Tanaka et al., 2004), diagnóstico de vaginosis bacterial (Hay et al., 2003), diagnóstico de uremia (Lin et al., 2001) y discriminación entre fluido cefalorraquídeo y suero (Thaler et al., 2000).

En general los resultados obtenidos son promisorios, y por ahora puede ser un buen complemento para las técnicas de diagnóstico de la medicina tradicional.

3.2.3 Control Ambiental y Calidad de Vida

Otra área de aplicación de los sensores de olor está en el control y monitoreo del medioambiente, tanto a pequeña escala, calidad del aire de una oficina, o gran escala monitoreo de contaminantes de sectores o ciudades industriales.

En este ámbito las intervenciones de las e-noses han sido menos frecuentes que los anteriores, pero la labor que les espera es, igualmente, muy clara. La calidad del aire es sobre todo una preocupación gubernamental, que debe ser fiscalizada, pues al ser un bien público, nadie se hace cargo. Hace ya tiempo que se evalúa la calidad del aire en tanto contaminantes dañinos para la salud, pero hay lugares donde ciertas industrias intervienen, y si bien el aire no supera los niveles de toxicidad que actualmente se miden, si contaminan con olores molestos, muchas veces de carácter permanente, por ejemplo plantas celulósicas, refinadoras de alimentos, etc., alteran muchas veces de manera brutal las características aromáticas de sus ciudades huéspedes.

Países como EE.UU., Canadá y Alemania ya poseen regulaciones en este sentido, con estatutos establecidos y organismos de fiscalización (Yuwono y Lammers, 2004).

Para poder fiscalizar es necesario poder cuantificar el mal olor, y definir un umbral de manera que si se supera, las empresas responsables deban rebajar sus actividades, del mismo modo que se hace con los contaminantes tóxicos. Los sensores de olores son el instrumento preciso para poder definir los niveles antes mencionados.

Con este principio se ha implementado en algunas partes del mundo planes reguladores que consideran la variable olorosa para mantener la calidad de vida, enfocados principalmente en el problema local de olores objetables. Así es que la Universidad de Texas, EE.UU. desarrolló un sistema que identifica olores objetables relativos a la agricultura (Ryan et al., 1997).

El conseguir detectores de olores objetables es muy útil para la calidad del aire en las ciudades, pero también es muy interesante para la industria del turismo, el potencial uso de detectores de malos olores en hoteles, casinos, restaurantes, etc. es un área muy apropiada para el uso de estas tecnologías. Asimismo en oficinas y centros comerciales, cines, hospitales, en general cualquier espacio público.

Existen trabajos en el monitoreo de aguas usando sensores de olores, tanto de agua potable (Gardner et al., 2000), como de aguas servidas (Baby et al., 2000).

3.2.4 Seguridad y Control

Una aplicación muy requerida y específica de los sensores olfatorios es la detección de compuestos peligrosos, sobre todo por la actitud que las autoridades

gubernamentales han tomado frente al tema de la seguridad nacional. Actualmente existe un estricto control en aeropuertos y aduanas del transporte de cualquier elemento que pudiese tener algún fin dañino. Pero también son cada día más los pasajeros que realizan viajes y transbordos, haciendo más difícil la labor del personal de policía internacional. Por estas razones, y considerando que la mayoría de los compuestos explosivos, tóxicos, corrosivos, reactivos, inflamables, etc. liberan compuestos volátiles característicos, que podrían detectarse con un buen sensor olfatorio (o *sniffer*, como habitualmente se denota a estos dispositivos), facilitando y mejorando el control.

Actualmente existen e-noses capacitadas y habilitadas para estas tareas, formando parte del sistema de control de algunas aduanas.

Estos dispositivos ya están presentes en el mercado, como un producto confiable, disponible para cualquiera que desee implementar un detector de olores. Están diseñadas para utilizarse en un punto fijo y también para portarlas (ver www.znose.com).

Los sensores biológicos olfatorios podrían entrar en esta área de aplicaciones con mucho éxito, pues *a priori*, presentan cualidades muy apropiadas para estas prestaciones (Alta sensibilidad, selectividad, etc.).

En la misma línea de seguridad, se ha investigado el desempeño de las e-noses para detección de minas antipersonales (Settles y Kester, 2001).

Otra aplicación en este ámbito es la detección de drogas, sustancias ilícitas y tóxicas. Los sensores olfatorios encajan perfectamente en estas tareas, pudiendo reemplazar a los tradicionales perros sabuesos.

Además, así como varias de las aplicaciones médicas, el análisis del aire exhalado puede ser un valioso indicador del consumo de estas sustancias, o el caso más común, para detectar la ingesta de alcohol (Minamide et al., 2005; Mitsubayashi et al., 2003; Mitsubayashi et al., 2005; Mitsubayashi et al., 2006).

3.2.5 Cosmética

En cosmética no se han reportado muchos trabajos, pero se concibe también como un área de aplicación de los sensores olfatorios. Tanto aquí como en la industria alimenticia, es usual el agregar una impronta aromática a los productos. Para esto

la utilización de sensores olfatorios puede ser una herramienta valiosa, que permita cuantificar confiable y rápidamente las características aromáticas del producto, permitiendo igualar aromas, perfeccionar mezclas, etc. (Hudewenz, 2002), pero esta labor no puede reemplazar la evaluación humana, porque las e-noses perciben cualquier compuesto que haya en su espacio de detección, sea fragante o no. Esta podría ser una oportunidad exclusiva para los sensores biológicos olfatorios, que puedan sentir los compuestos que biológicamente son relevantes al momento de percibir un aroma.

Además, pueden los sensores ayudar en las tareas de clasificación, como en muchas de las áreas de aplicación (Carrasco et al., 1998).

3.2.6 Investigación

Los sensores biológicos, además de tener, como todo sensor, la utilidad de detectar el estado de algunas variables fuera de ellos mismos (olor, presión, luz, etc.), algunos de ellos -dependiendo del principio de funcionamiento- pueden utilizarse también como monitores de la actividad celular. Esta es una capacidad exclusiva de los sensores biológicos, por lo tanto no compiten con las e-noses.

Esto permitiría, como se señaló en la sección de Interfaz Bioeléctrica, registrar la actividad de conjuntos celulares ante la presencia de alguna droga, lo cual constituye una herramienta muy poderosa para los ensayos biológicos de la industria farmacéutica. También podría medirse la actividad de una red neuronal en formación, etc. Por otra parte, si se consigue un buen acoplamiento entre la parte eléctrica y la biológica es un gran aporte en el desarrollo de prótesis sensoriales.

En definitiva, los sensores biológicos tendrían numerosas aplicaciones, tanto en mediciones del entorno, como en desarrollo científico, farmacéutico, biomedicina, neurociencia, etc.

4 Desarrollo de Simulador

4.1 Motivación

Se ha mostrado en las secciones anteriores que, a nivel de Investigación y Desarrollo, el panorama de los avances muestra gran cantidad de incógnitas y suposiciones que necesitan ser corroboradas por una comunidad científica madura y responsable. Es muy claro que los distintos y variados acercamientos al problema de la codificación y la transducción son señal de que el campo de investigación aún es nebuloso. Si bien hay tendencias marcadas, ninguna línea de experimentos o trabajo de laboratorio ha podido dar un salto cualitativo en el conocimiento, en pos de afirmar que las cosas suceden de una forma u otra, y tampoco han podido invalidar alguna de las otras maneras de abordar el problema. Es decir, todas las actuales investigaciones pueden en algún momento *dar el salto* y aclarar e iluminar el camino a seguir para poder desarrollar técnicas y dispositivos que permitan que la información de odorantes sea accesible y valorada para los numerosos intereses y campos de aplicación actuales y futuros.

Considerando lo anterior, es claro que cualquier aporte, ya sea con alguna hipótesis exitosa, o descarte, con una hipótesis desechada, será muy bienvenido por la comunidad científica pertinente y un elemento valioso para adelantar el momento en que el olfato se comprenda cabalmente, pasando a ser tanto una potente herramienta para ayudar a la humanidad -como otras veces ha sucedido-, como permitiendo una mejor comprensión del funcionamiento de los organismos vivos.

Una de las incógnitas, dentro de todas las etapas o fases que constituyen la transducción, codificación, identificación y discriminación de olores, está en el primer eslabón de la cadena de procesamiento. Específicamente en la fase de transducción, cuyas corrientes iónicas desencadenan el impulso nervioso que posteriormente se procesará e identificará como un tipo y/o cantidad de olor.

Está demostrado que las corrientes iónicas que desencadenan el impulso nervioso en las neuronas sensitivas del olfato, son producidas en los cilios ubicados en el botón dendrítico de la neurona. Esto se mostró en un experimento realizado por (Lowe y Gold, 1991). El experimento consiste en poner una neurona olfatoria separando dos compartimientos y medir la corriente que circula a través de la neurona de un compartimiento al otro. El arreglo experimental se muestra en la Ilustración 4-1, donde aparece la neurona con su soma dentro de una pipeta de vidrio y la dendrita y los cilios fuera de la misma. Los compartimientos están

lentos de una solución que contiene sales, por lo que son buenos conductores de corriente eléctrica. Esta solución contiene iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- en concentraciones que imitan las del medio interno del animal de donde se obtuvo la célula. A estas soluciones se les llama Ringer, en honor al Sr. Sydney Ringer que la describió para anfibios (Ringer, 1882). En la zona de contacto entre la pipeta y la célula se produce un sello de alta resistencia eléctrica. Por lo tanto la corriente que circule desde o hacia el interior de la pipeta debe pasar obligatoriamente por el interior de la célula. Mediante un servomecanismo electrónico se mantiene iguales los potenciales eléctricos dentro y fuera de la pipeta. El sistema registra la intensidad de la corriente necesaria para mantener esta igualdad de potenciales eléctricos. En ausencia de un estímulo, esta intensidad de corriente es cero, pero se registra una corriente eléctrica al agregar un odorante a la solución que baña los cilios y la dendrita. Para conocer el lugar donde se genera esta corriente eléctrica se hace fluir la solución Ringer sobre la dendrita y los cilios, y se aplica una solución rica en odorante mediante una segunda pipeta. El flujo de esta solución se aplica de forma tal, que la dendrita con sus cilios se extienden en sentido paralelo al flujo como se ve en la Ilustración 4-1A. Una vez establecida esta disposición de la neurona, se aplica a través de la pipeta de estímulo una solución rica en odorante. Esta solución de odorante se aleja del punto de aplicación debido al flujo de la solución Ringer. Manteniendo una aplicación constante de odorante se puede estimular selectivamente la neurona desde la parte distal de los cilios, y desplazándose en dirección al soma se abarca mayormente la estructura expuesta, hasta estimular tanto los cilios como el botón dendrítico y dendrita (ver Ilustración 4-1B).

Para las diferentes etapas de estimulación se registra la corriente que circula por la neurona. Los resultados exhibidos en la Ilustración 4-2 son muy claros; a medida que se involucra más sección de los cilios, la corriente de respuesta va creciendo, pero una vez completada esta sección, y prosiguiendo con el estímulo, incluyendo la dendrita, la corriente de respuesta ya no aumenta, permaneciendo igual a la correspondiente sólo a los cilios.

Con esto se demuestra que dentro de los cilios se realiza la transducción propiamente tal. Es comprensible entonces que sea necesario avocar la mirada hacia ellos si se quiere conocer el proceso desde la base. En este proceso, si bien hay cierta claridad en la maquinaria que funciona para generar corrientes cuando llega una molécula de odorante, no están absolutamente definidos algunos de los valores de las características o propiedades físicas de los elementos que conforman esta maquinaria. Una de estas magnitudes de cuyo valor no hay certeza, pues no se ha medido directamente, sino que sólo se ha estimado, es la conductancia unitaria del canal de Cloruro activado por Calcio, que puede considerarse, dentro de la maquinaria, como un amplificador de alta ganancia operando a continuación de un amplificador de bajo ruido (Kleene, 1997; Lowe y

Gold, 1993). La conductancia unitaria de estos canales presentes en el cilio, no ha podido ser medida directamente con técnicas de *patch-clamp* debido al diminuto tamaño que poseen. La única forma con la que se ha estimado su conductancia es utilizando la metodología de análisis de ruido. Esta metodología fue desarrollada ampliamente usada en los '70, cuando aún no era posible realizar mediciones directas, las cuales son ahora posibles con *patch-clamp*. Muchos de los resultados obtenidos con el análisis de ruido fueron corroborados posteriormente con mediciones directas, como se muestra, por ejemplo, en (Neher y Zingsheim, 1974).

En esta sección del documento se introduce al lector en la técnica de análisis de ruido, y se exponen los procedimientos y resultados del desarrollo de un simulador computacional de corrientes macroscópicas del cilio; que pretende aportar en el conocimiento de los parámetros que constituyen la maquinaria de transducción olfatoria. Específicamente se analiza la metodología propuesta, y las conclusiones del valor de la conductancia del canal de Cloruro activado por Calcio publicadas en Larsson et al. (1997), motivado por discrepancias numéricas con mediciones realizadas en el laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad de Chile, por (Delgado y Bacigalupo, Resultados no publicados).

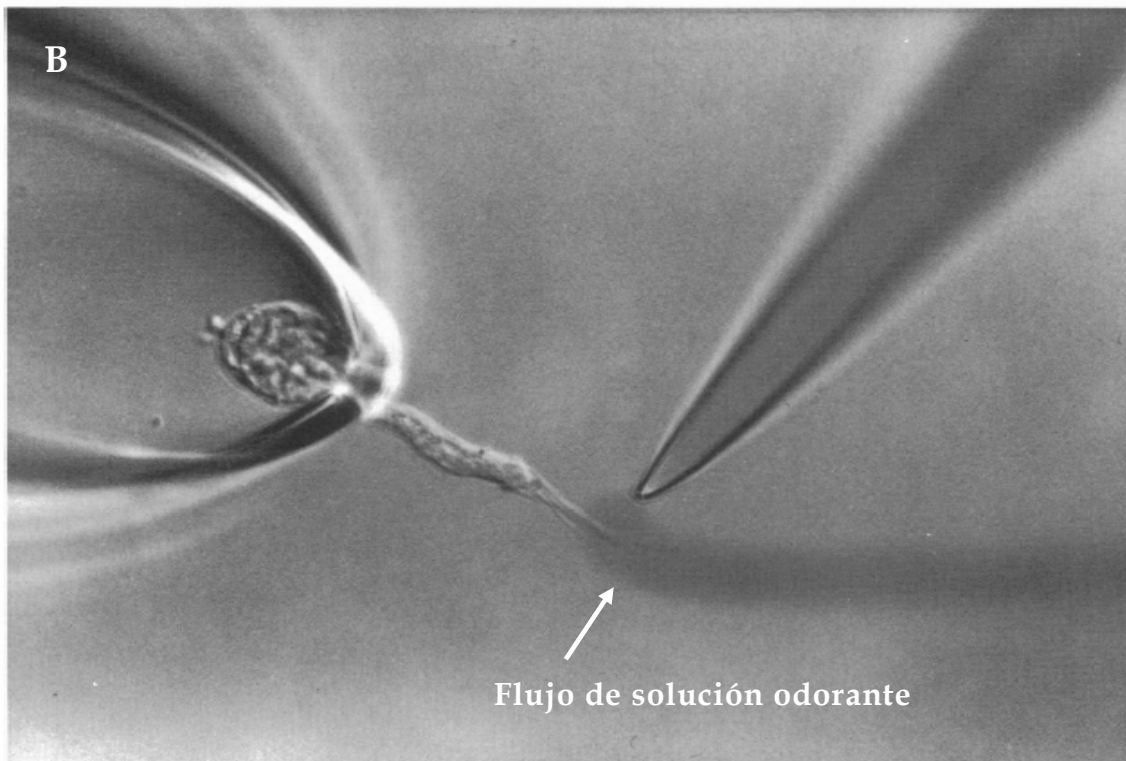
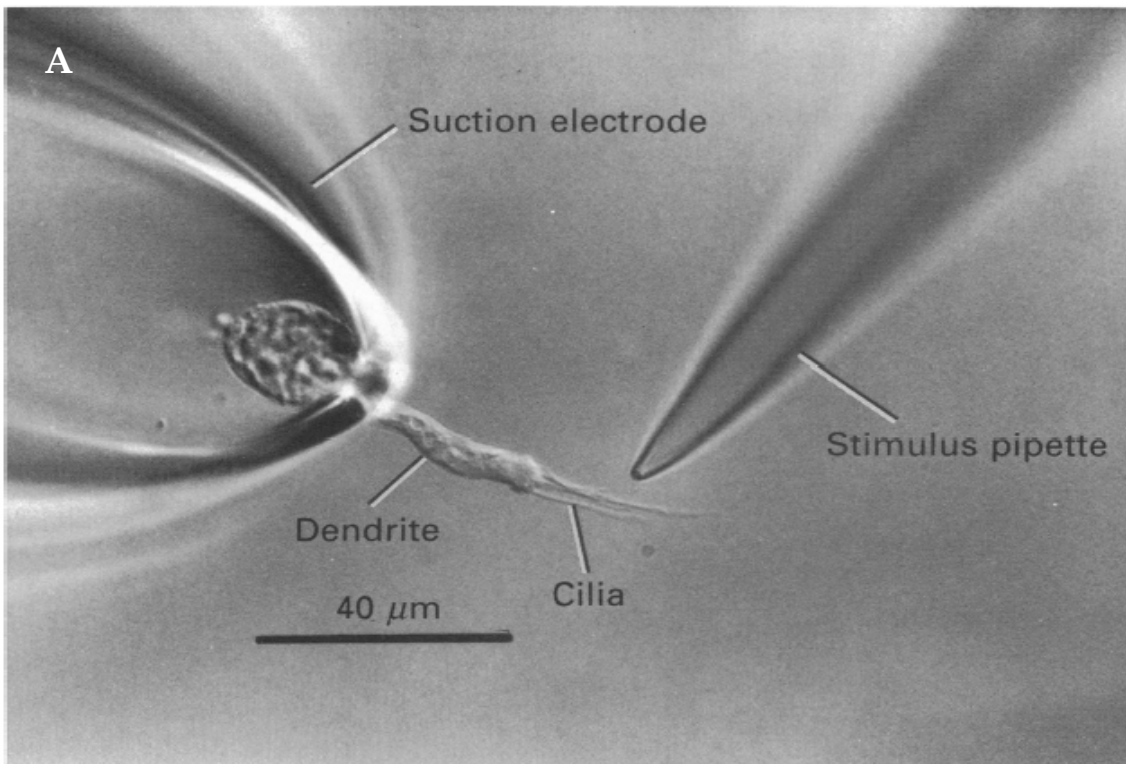


Ilustración 4-1: (Lowe y Gold, 1991) A: configuración del experimento, con la pipeta de succión, la pipeta de estímulo y el flujo constante de la solución Ringer que fuerza a la dendrita y los cilios a extenderse. B: la misma configuración de A, donde además se incluye el odorante, que también se remueve con la corriente de Ringer. La pipeta de estímulo se desplaza a lo largo de la zona expuesta de la neurona para estimular desde la región distal de los cilios exclusivamente, hasta la dendrita completa.

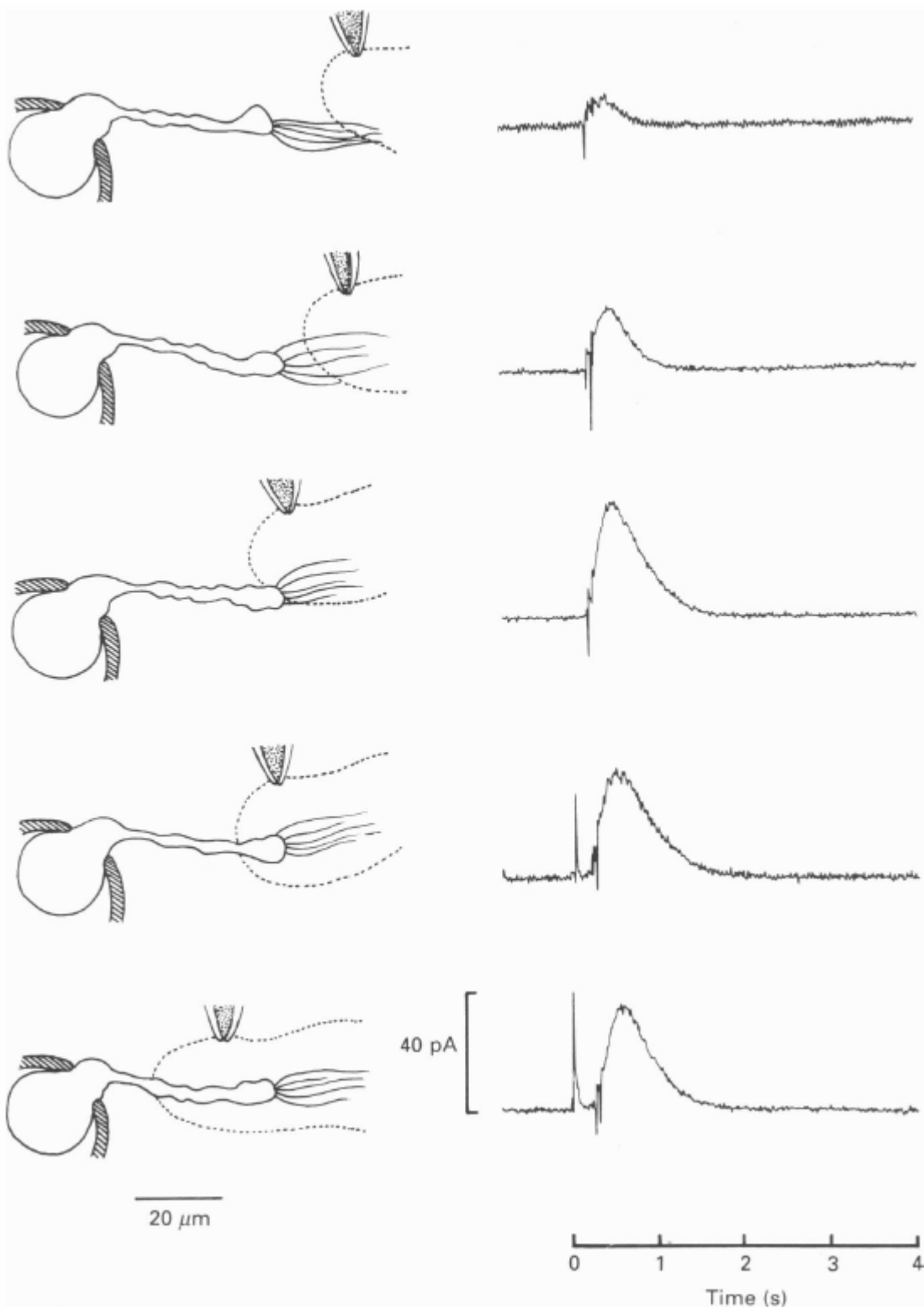


Ilustración 4-2: (Lowe y Gold, 1991) De arriba a abajo va cambiando el lugar de inicio del estímulo, haciéndose cada vez mayor la sección estimulada, hasta ser total. La línea punteada corresponde a los límites de difusión del odorante. En los gráficos de corrientes presentados se aprecia la absoluta gravitación de los cilios al momento de generar las corrientes de respuestas, evidenciando que es allí donde se realiza la transducción olfatoria.

4.2 Análisis de Ruido Básico

La técnica de análisis de ruido ha sido especialmente desarrollada para poder estudiar propiedades y características fisiológicas a las cuales no se tiene acceso directamente por limitaciones del instrumento de medición, de la estructura biológica que se desea estudiar o bien por características del experimento a realizar.

El análisis de ruido ha sido ampliamente utilizado para estudiar la operación y/o parámetros del transporte de iones a través de la membrana. Esto porque históricamente ha sido más fácil acceder a la corriente macroscópica o total que pasa a través de la membrana que a cada uno de los *conductos o mecanismos* que participan en la generación de esa corriente total.

Al aplicar esta metodología se puede deducir ciertos valores de los elementos unitarios a partir de valores estadísticos de la corriente macroscópica. En la versión que se estudiará aquí, la media y la varianza de la corrientes serán las herramientas estadísticas que permitan obtener la conductancia unitaria del canal de cloruro activado por calcio y el número de ellos.

A continuación se explica y desarrolla los fundamentos de esta metodología basándose en (Alvarez et al., 2002), desde el caso más sencillo, considerando las siguientes suposiciones:

1. Los canales tienen sólo 2 estados: conducción / no conducción.
2. Todos los canales son iguales.
3. No hay interacción entre los canales

Este análisis supondrá una configuración de *voltage clamp*, que consiste en someter la estructura a un potencial controlado y medir la corriente que circula a través de la membrana, permitiendo deducir la características conductoras de la membrana.

Se partirá por el caso más simple: una membrana con sólo un canal. Para esta membrana la corriente macroscópica media está determinada por la probabilidad de que su canal esté abierto o cerrado.

- La corriente para el canal cerrado es 0 , la corriente para el canal abierto es i ,
- la probabilidad de encontrar el canal cerrado es q , la probabilidad de encontrar el canal abierto es p .

Según el primer supuesto $p+q=1$, pues si no está abierto está cerrado. Con esto, la corriente media (\bar{I}) será la suma de la corriente en cada estado, multiplicada por la probabilidad de encontrarse en ese estado:

Ecuación 4-1

$$\bar{I} = 0 \cdot q + i \cdot p,$$

Ecuación 4-2

$$\bar{I} = i \cdot p$$

La varianza (σ^2) corresponde a la suma de las diferencias al cuadrado entre cada elemento o dato con respecto a la media, normalizada, es decir, dividida por el número de elementos. Pero en este caso la normalización es intrínseca al ponderar por la probabilidad del evento correspondiente. Por lo tanto, resulta lo siguiente:

Ecuación 4-3

$$\sigma^2 = (0 - i \cdot p)^2 q + (i - i \cdot p)^2 p$$

$$\sigma^2 = i^2 p^2 q + i^2 (1 - p)^2 p,$$

pero $1-p=q$,

$$\sigma^2 = i^2 p^2 q + i^2 q^2 p = i^2 pq(p + q),$$

y como $p+q=1$, finalmente queda:

Ecuación 4-4

$$\sigma^2 = i^2 pq$$

Ahora, que ya se tiene las ecuaciones de la corriente media y la varianza para un canal, es necesario encontrarlas para 2 canales de modo de poder ver la relación más general.

Sean a y b dos canales, ambos tienen p y q como probabilidades de apertura y cierre respectivamente. Los estados posibles de la membrana se muestran en la Tabla 1.

	Probabilidad	Corriente
$a_{abierto}, b_{abierto}$	p^2	$2 \cdot i$
$a_{cerrado}, b_{cerrado}$	q^2	0
$a_{abierto}, b_{cerrado}$	$p \cdot q$	i
$a_{cerrado}, b_{abierto}$	$q \cdot p$	i

Tabla 1: Estado de la membrana y sus respectivas probabilidades y corrientes.

Con los valores indicados en esta tabla, se puede hacer exactamente el mismo desarrollo hecho anteriormente para calcular la corriente media y la varianza.

La corriente media es:

$$\bar{I} = 0q^2 + 2ipq + 2ip^2,$$

Ecuación 4-5

$$\bar{I} = 2ip(q + p) = 2ip$$

La corriente media para dos canales es entonces el doble que para uno.

La varianza por su parte se calcula del mismo modo, la diferencia al cuadrado de cada dato con la media, ponderado por la probabilidad del evento:

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= (0 - 2ip)^2 q^2 + 2(i - 2ip)^2 pq + (2i - 2i \cdot p)^2 p^2, \\ \sigma^2 &= i^2 (4p^2 q^2 + 2(1 - 2p)^2 pq + 4(1 - p)^2 p^2), \end{aligned}$$

Pero como $1 - 2p = q - p$ y $1 - p = q$, entonces resulta:

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= 2i^2 pq (2pq + (q - p)^2 + 2qp), \\ \sigma^2 &= 2i^2 pq (4pq + q^2 - 2pq + p^2), \\ \sigma^2 &= 2i^2 pq (2pq + q^2 + p^2), \\ \sigma^2 &= 2i^2 pq (p + q)^2, \end{aligned}$$

Finalmente, recordando que $p + q = 1$, se obtiene:

Ecuación 4-6

$$\sigma^2 = 2i^2 pq$$

Sabiendo ahora que la varianza aumenta al doble y no al cuadrado, es posible encontrar la fórmula general para N canales, en que la corriente media y la varianza son directamente proporcionales al número de canales.

Corriente media:

Ecuación 4-7

$$\bar{I} = Nip$$

Varianza:

Ecuación 4-8

$$\sigma^2 = Ni^2 pq$$

Teniendo estas dos ecuaciones es posible relacionarlas usando el hecho que $q=1-p$, incorporándolo en la Ecuación 4-8 se obtiene:

Ecuación 4-9

$$\sigma^2 = Ni^2 pq = Ni^2 p(1-p) = Ni^2 p - Ni^2 p^2,$$

y reemplazando ahora la Ecuación 4-7 en la Ecuación 4-9 se obtiene la siguiente relación entre varianza y corriente media:

Ecuación 4-10

$$\sigma^2(\bar{I}) = i\bar{I} - \frac{\bar{I}^2}{N}$$

En esta relación es una parábola cóncava que pasa por el origen, las variables son σ^2 e \bar{I} , y los parámetros i y N . Esta parábola posee dos ceros: uno en el origen, y otro en $N \cdot i$.

La curva descrita por la Ecuación 4-10 puede generarse empíricamente, al graficar los valores de \bar{I} y σ^2 obtenidos en condiciones experimentales que permiten variar el valor de p .

El análisis de esta curva empírica (análisis de ruido) permite obtener el número de canales y la corriente unitaria, que dividida por el potencial al cual se está realizando el experimento es igual a la conductancia unitaria (γ).

Se usan dos métodos equivalentes para obtener los parámetros i y N . En ambos lo primero es obtener i y, teniendo i , se puede calcular N .

La primera forma es usando la derivada de la Ecuación 4-10, que resulta lo siguiente:

Ecuación 4-11

$$\frac{\partial \sigma^2}{\partial \bar{I}} = i - 2 \frac{\bar{I}}{N}$$


De la Ecuación 4-11, al evaluarla en 0 , se obtiene i . Dicho de otra forma, la pendiente de la parábola (Ecuación 4-10) en el origen, corresponde a la corriente unitaria, por simetría, la pendiente en el otro cero es la corriente unitaria negativa. Entonces obtenida i , se puede calcular N , simplemente dividiendo por i el cero que no está en el origen (cero ' $N \cdot i$ ') (Ver Ilustración 4-3A).

La segunda forma consiste en dividir la Ecuación 4-10 por la corriente media \bar{I} , y en la razón resultante ubicar los puntos de corte de cada eje. La ecuación de esta división es la siguiente:

Ecuación 4-12

$$r(\bar{I}) = \frac{\sigma^2}{\bar{I}} = i - \frac{\bar{I}}{N}$$

La Ecuación 4-12 corresponde a una recta cuyos interceptos con las ordenadas y las abscisas son i y $N \cdot i$, respectivamente. Nuevamente se obtiene i , para luego calcular N (Ver Ilustración 4-3B).

Esta metodología de análisis de ruido es aplicable a las membranas en que  corriente aportada por cada canal abierto es siempre la misma.

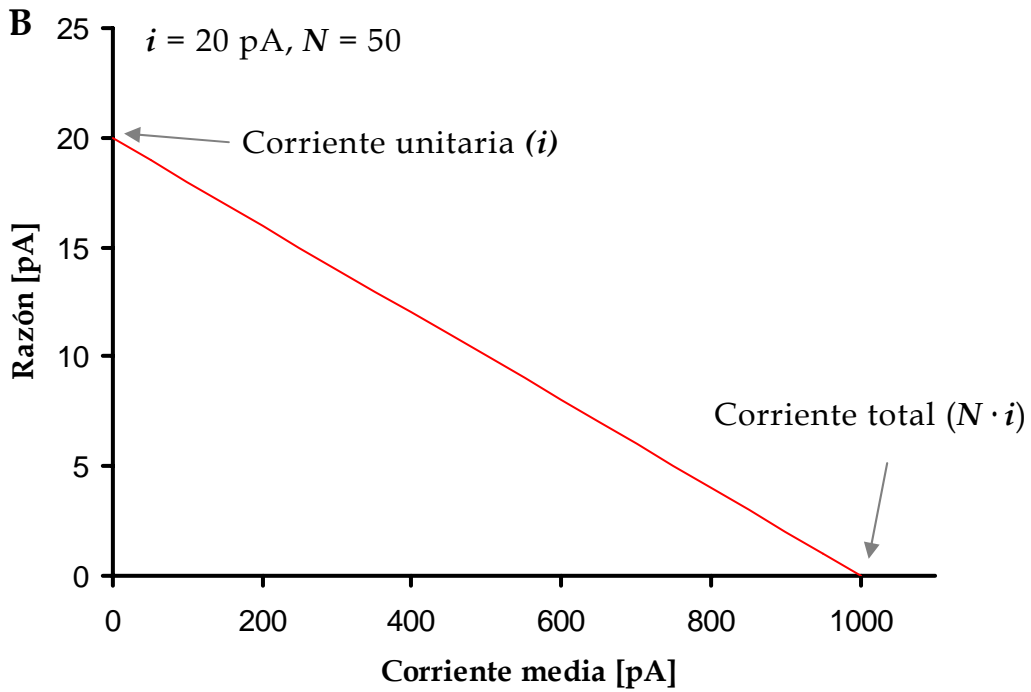
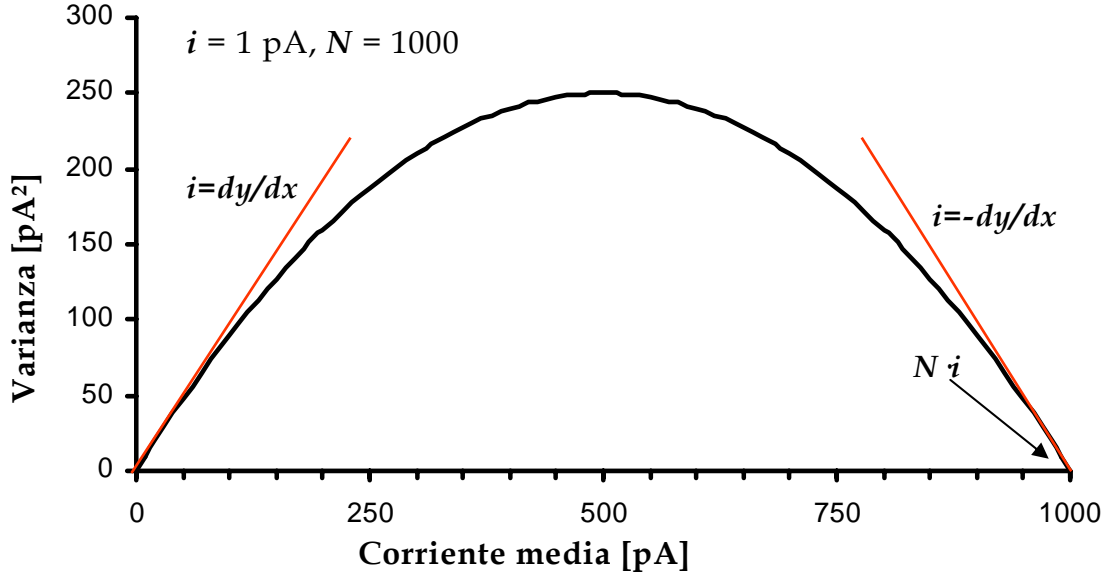


Ilustración 4-3: Gráficas de las ecuaciones de los dos métodos para obtener los parámetros: número de canales y corriente unitaria. A: Usando la curva de la Ecuación 4-10 y la Ecuación 4-11, es decir, la parábola y su derivada. Para $i=1 \text{ pA}$ y $N=100$. B: Usando la curva de la Ecuación 4-12, es decir, la razón entre la varianza y la corriente media, y ubicando los puntos de corte con los ejes. Para $i=20 \text{ pA}$ y $N=50$.

4.3 Revisión del Modelo de Cable Finito

La transmisión de energía en el ámbito de la electricidad es algo muy importante, y por ende muy estudiado. Es bien sabido que el potencial de un cable conductor decae de acuerdo al alejamiento del punto de aplicación de la tensión. A este fenómeno se le conoce como *leak* o chorreo, pues se pierde el potencial como si hubiese una fuga.

Análogamente sucede en estructuras biológicas de características similares a las de un cable. Y las ecuaciones de caída de voltaje son consideradas para estas estructuras.

La ecuación publicada por (Jack et al., 1975) corresponde a la condición de cable finito con leak:

Ecuación 4-13

$$V(x) = V_0 \frac{\cosh((x-l)/\lambda)}{\cosh(l/\lambda)}$$

La variable de esta ecuación es x , que corresponde a la posición o distancia con respecto al punto de alimentación donde es aplicado V_0 . Los parámetros son V_0 , l y λ que respectivamente corresponden al voltaje de alimentación, el largo del cable o estructura y a la constante de espacio, que es una medida de las propiedades conductoras del cable. El dominio de esta función es $x \in [0, l]$.

El parámetro λ -con unidades de longitud- resume las características físicas y geométricas de la estructura y está definida por la siguiente fórmula que es función de las resistencias longitudinales o axiales (cuyas unidades son $\Omega \cdot m^{-1}$), y las resistencias transversales (de unidades $\Omega \cdot m$) de un elemento de longitud del cable:

Ecuación 4-14

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_{transversal}}{R_{longitudinal}}} = \frac{1}{\sqrt{R_{longitudinal} \cdot g_{transversal}}}$$

Se muestran a continuación, en la Ilustración 4-4, algunas curvas de caída de tensión de acuerdo a la Ecuación 4-13 para diferentes parámetros de largo y constante de espacio:

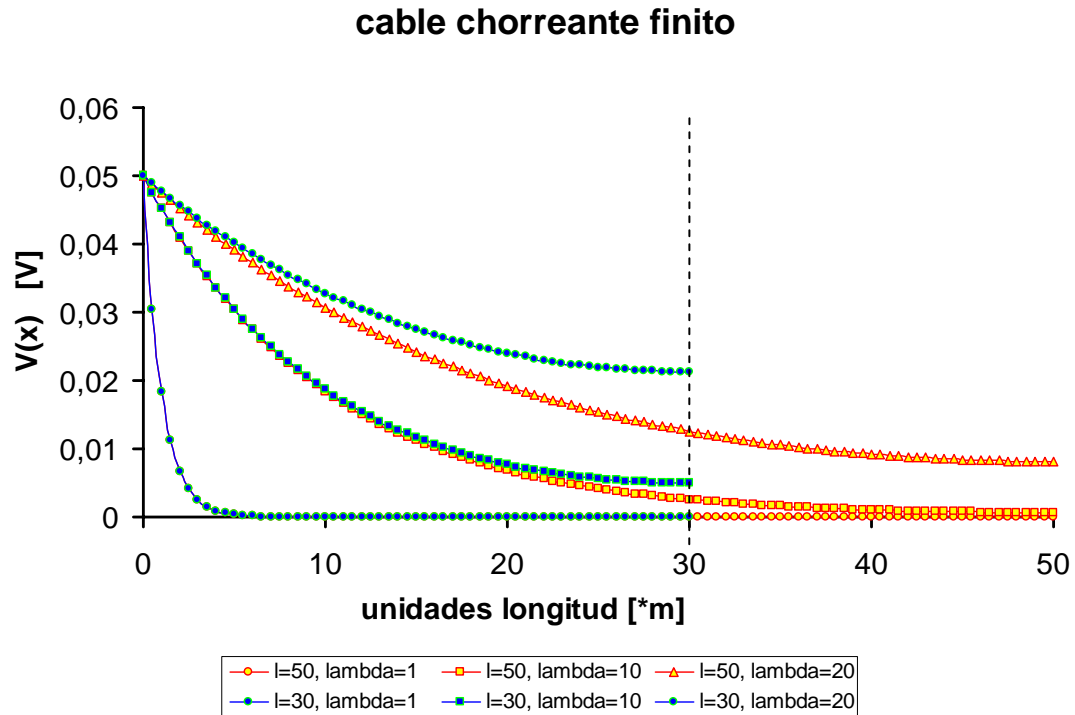


Ilustración 4-4: Curvas de caída de tensión a lo largo de un cable para seis diferentes combinaciones de largos (l) y constantes de espacio (λ). Se ilustra que la forma de distribución del voltaje a lo largo del cable depende fuertemente de la relación entre l y λ . Notar que la función no sale del dominio correspondiente al largo del cable.

Al hacer esta consideración de la caída de tensión a lo largo de la estructura de interés –en este caso el cilio– es evidente que la metodología de análisis de ruido tal y como antes fue explicada no es absolutamente válida. Esto porque si se considera un cilio de largo l y constante de espacio λ tales que lo hagan responder a alguna curva parecida a las presentadas en la Ilustración 4-3, entonces, por más que los canales sean iguales, que no interactúen entre sí y que tengan sólo dos estados (conducción y no conducción), inevitablemente, al estar distribuidos espacialmente a lo largo del cilio, estarán sometidos a distintos voltajes haciendo que cada uno aporte una corriente unitaria distinta.

Esto es muy importante para el análisis de ruido de las corrientes de cilio, pues el cilio presenta una estructura de cable con una longitud entre 25-60 μm y un diámetro estimado de 0.28 μm (Larsson et al., 1997). La afcción por los efectos del leak de cable determinados por la constante de espacio, harán que se distorsione el análisis de ruido en el cilio.

4.4 Revisión de Larsson et al. 1997

Dadas las consideraciones anteriores de la caída de potencial a lo largo del cilio, y sus posibles distorsiones en la validez del análisis de ruido, el grupo de HP Larsson, SJ Kleene y H Lecar, publicó los resultados obtenidos de datos experimentales utilizando una metodología de análisis de ruido modificada para estructuras que, como el cilio, pueden presentar efectos de cable con leak, en cuyo caso el potencial decae a lo largo de éste, redundando en que cada canal no está sometido al mismo potencial y por ende, no aporta la misma corriente unitaria.

Se hará una breve revisión de los puntos esenciales tanto de la metodología de análisis de ruido modificada, como del experimento realizado.

4.4.1 Análisis de Ruido Modificado

El método descrito en Larsson et al. (1997) tiene como base la Ecuación 4-13 de potencial a lo largo del cable. Para poder evaluar esta ecuación es necesario conocer el valor de los parámetros l y λ . El valor del largo se obtiene por inspección, midiendo el cilio. En cambio el valor de λ , como se dijo anteriormente, depende de las resistencias longitudinales y transversales. En este caso, la resistencia axial es una característica del medio interno (lumen) y de la geometría del cilio; por su parte la resistencia transversal se corresponde con la resistencia o recíproco de la conductancia de membrana. La conductancia de la membrana posee dos componentes, una basal y constante, que es una propiedad de la membrana, y otra dinámica, que depende del número de canales abiertos y de la conductancia unitaria (γ) de cada uno de ellos. Naturalmente, el estado de los canales es una variable aleatoria que depende de la probabilidad de apertura de los canales (p). En el caso de canales activados por ligandos, esta probabilidad de apertura es función de la concentración de agonista que haya en el medio interno. En particular para los canales de cloruro, p es función de la concentración de Ca^{2+} (Kleene y Gesteland, 1991a; Lowe y Gold, 1993).

Entonces, la conductancia de membrana responde a la siguiente fórmula:

Ecuación 4-15

$$g_m = g_0 + np\gamma$$

donde g_m es la conductancia de membrana total, g_0 es la conductancia de membrana basal, p es la probabilidad de apertura de los canales y γ es la conductancia unitaria. De estos parámetros, p es el único que no es una característica intrínseca del cilio, por lo tanto se puede utilizar como variable.

Incorporando la Ecuación 4-15 en la Ecuación 4-14 resulta que la constante de espacio es función de la probabilidad:

Ecuación 4-16

$$\lambda(p) = \frac{1}{\sqrt{R_{longitudinal} \cdot g_m(p)}}$$

El método de análisis de ruido modificado opera en forma análoga al básico, busca una relación entre la corriente media, su varianza y cómo obtener de esa curva los parámetros de interés.

Entonces, para un potencial con decaimiento, la corriente media del cilio y la varianza deben calcularse considerando que el aporte de corriente de cada canal depende de x debido a la caída del potencial a lo largo del cilio, por eso las expresiones modificadas para \bar{I} y σ^2 son:

Ecuación 4-17

$$\bar{I} = (npi/V_0) \int_0^l V(x) dx$$

Ecuación 4-18

$$\sigma^2(\bar{I}) = (np(1-p)i^2/V_0^2) \int_0^l [V(x)]^2 dx$$

En ambas expresiones $V(x)$ corresponde a la Ecuación 4-13. Es necesario resolver las integrales de cada una de las ecuaciones para conseguir las fórmulas que describen el comportamiento de \bar{I} y σ^2 en función de p , y así obtener la curva análoga a la parábola de la Ecuación 4-10 o a la recta de la Ecuación 4-12.

Las soluciones de las integrales de interés son las siguientes:

Ecuación 4-19

$$\int_0^l V(x) dx = V_0 \int_0^l \frac{\cosh((x-l)/\lambda(p))}{\cosh(l/\lambda(p))} dx = \lambda(p) V_0 \tanh\left(\frac{l}{\lambda(p)}\right)$$

Ecuación 4-20

$$\int_0^l [V(x)]^2 dx = V_0^2 \operatorname{sech}^2(l/\lambda(p)) \left[l/2 + \left(\frac{\lambda(p)}{4}\right) \sinh\left(\frac{2l}{\lambda(p)}\right) \right]$$

Entonces, reemplazando ahora la Ecuación 4-19 en la Ecuación 4-17, y la Ecuación 4-20 en la Ecuación 4-18, se obtiene las expresiones para la corriente media y la varianza. Con esto se obtiene la curva que relaciona \bar{I} y σ^2 y que permitirá estimar los parámetros de interés. La curva resultante es una función paramétrica, en que

la variable independiente es p , cuyo dominio es $p \in [0,1]$, la abscisa está dada por la Ecuación 4-21 y la ordenada por la Ecuación 4-22.

Ecuación 4-21

$$\bar{I}(p) = npi\lambda(p)\tanh\left(\frac{l}{\lambda(p)}\right)$$

Ecuación 4-22

$$\sigma^2(p) = np(1-p)i^2\lambda(p)\operatorname{sech}^2\left(\frac{l}{\lambda(p)}\right)\left[\frac{l}{2\lambda(p)} + (1/4)\sinh\left(\frac{2l}{\lambda(p)}\right)\right]$$

La razón entre la varianza y la corriente media resulta:

Ecuación 4-23

$$r(p) = \frac{\sigma^2}{\bar{I}} = i(1-p)\left[1/2 + \frac{l/\lambda(p)}{\sinh(2l/\lambda(p))}\right]$$

El parámetro λ depende explícitamente del valor de p de acuerdo a la Ecuación 4-24, que corresponde a la incorporación de la Ecuación 4-15 en la Ecuación 4-16.

Ecuación 4-24

$$\lambda(p) = (R_{longitudinal} \cdot (g_0 + np\gamma))^{-1/2}$$

Con estas ecuaciones paramétricas puede construirse una curva análoga a la descrita en la Ecuación 4-12, en que cada punto es un par ordenado $(\bar{I}(p), r(p))$ calculado para diferentes valores de p . Como se discutirá más adelante, también en esta curva, los puntos de corte con los ejes contienen la información de la corriente unitaria y la cantidad de canales.

En la Ilustración 4-5 se muestran curvas análogas a la de la Ilustración 4-3B, para una colección de parámetros en que varía, en un caso, la densidad lineal de canales en el cilio, y en el otro la conductancia unitaria.

En definitiva, esta metodología de análisis de ruido modificado permite, usando las curvas presentadas, obtener el valor de la densidad de canales, de la corriente unitaria y, finalmente, el de la conductancia unitaria (γ).

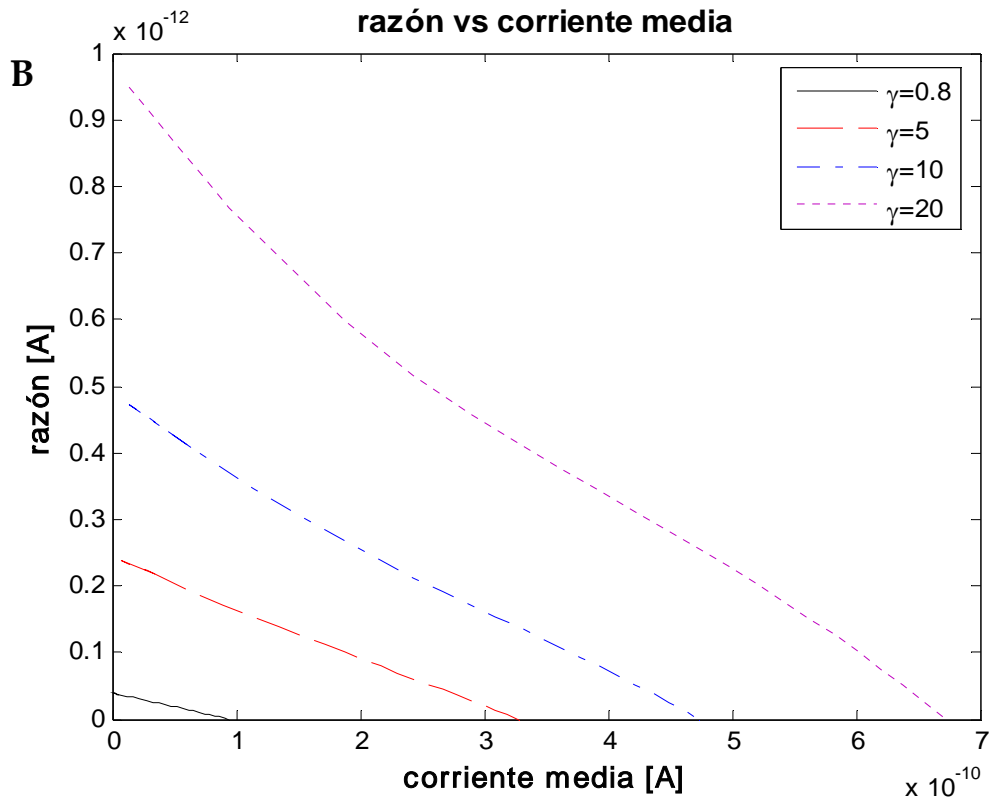
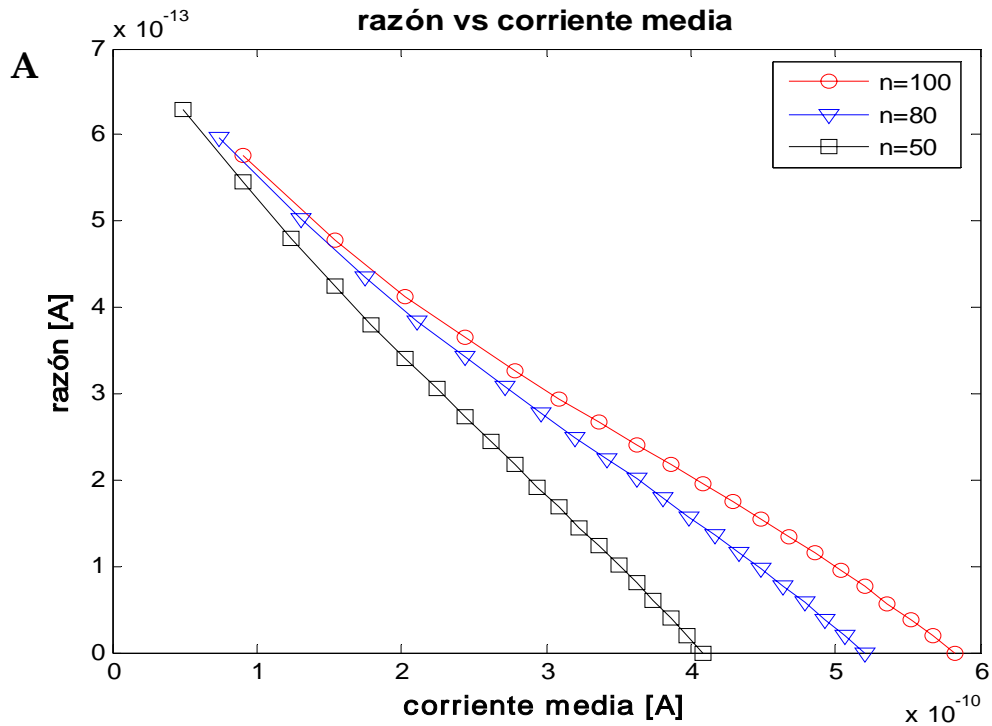


Ilustración 4-5: Curvas paramétricas de la Ecuación 4-21 y Ecuación 4-23 con $R_{longitudinal}=11M\Omega\mu m^{-1}$, $g_0=5pS\mu m^{-1}$, $V_0=50mV$, $l=30\mu m$, común a todas las curvas pero con una colección de diferentes valores para los parámetros n y γ . A: $n=50, 80, 100 \mu m^{-1}$, $\gamma=15pS$. B: $\gamma=0.8, 5, 10, 20pS$, $n=100\mu m^{-1}$. Notar que la tendencia de los puntos de corte en las curvas corresponde a $i \approx \gamma \cdot V_0$ para las ordenadas y en las abscisas varía de acuerdo a n .

4.4.2 Experimento de Cilio Escindido

El experimento descrito en Larsson et al. (1997) consiste en establecer una configuración de cilio escindido con acceso al medio interno, y así poder variar las concentraciones de calcio. De este modo la probabilidad de apertura de los canales también varía. Teniendo esta posibilidad se puede utilizar p como variable independiente, y generar experimentalmente los datos de las curvas correspondientes a las ecuaciones del análisis de ruido modificado. Generar los datos significa realizar las mediciones de corriente macroscópica, para diferentes concentraciones de calcio, para luego calcular la corriente media y la varianza. El procedimiento para esto está descrito detalladamente en (Kleene y Gesteland, 1991a; Kleene y Gesteland, 1991b). Básicamente consiste en escindir un cilio, succionándolo completamente con una pipeta de vidrio, esperar que se realice el sello, y luego forzar el rompimiento. Como se muestra en el esquema de la Ilustración 4-6, el cilio queda embebido en la solución isopotencial de la pipeta. Al extraer el cilio queda expuesto el medio interno de éste, pudiendo, así, someterlo a diferentes concentraciones de agonista.

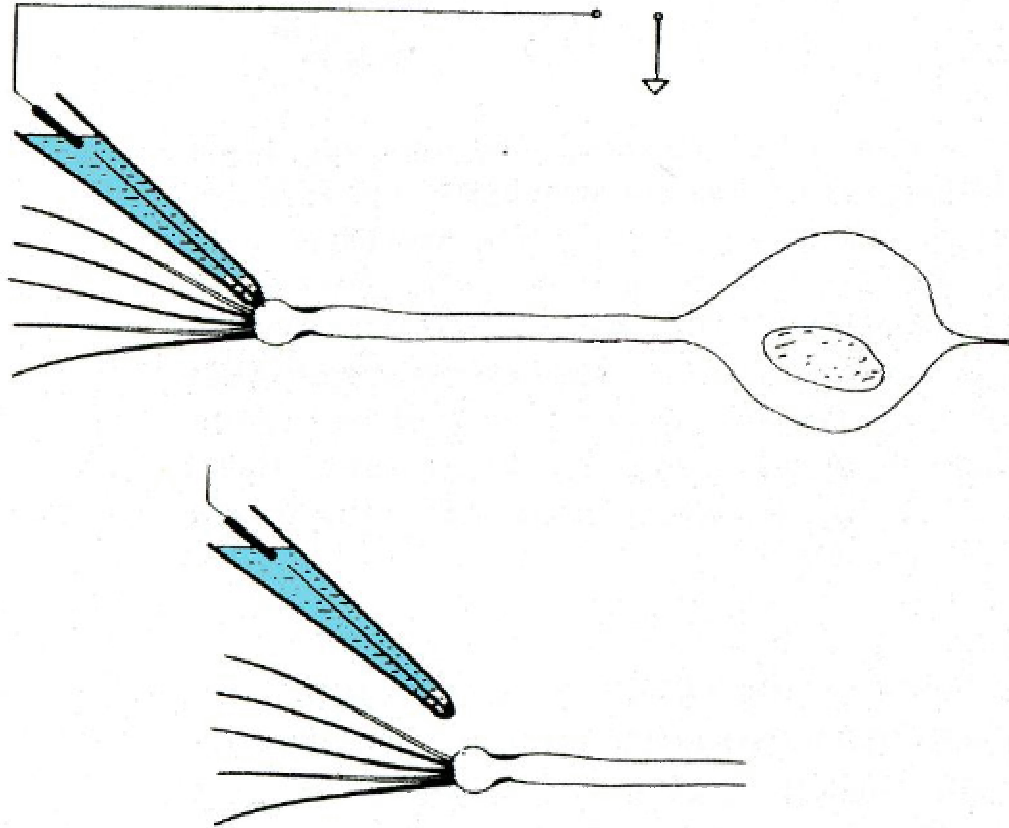


Ilustración 4-6: (Kleene y Gesteland, 1991b) Esquema de la configuración del cilio escindido. Se muestra el cilio en el interior de la pipeta, que contiene una solución conductora, haciéndolo un medio isopotencial. A través de la punta de la pipeta se tiene acceso al medio interno del cilio.

Luego de lograda esta configuración, la pipeta con el cilio es sumergida en diferentes baños de medio interno, cada uno con una concentración característica de Ca^{2+} , recorriendo con esto diferentes valores de la función de probabilidad (Kleene y Gesteland, 1991a). El electrodo que está en el interior de la pipeta conserva un potencial $-V_0$ en la solución conductora. Y en el baño se ubica el electrodo de referencia conectado a tierra. De esta manera, la unidad de registro mide la corriente que circula para cierto potencial V_0 fijo.

Como la solución es isopotencial en la punta de la pipeta (base del cilio) hay $-V_0$, y como el baño está con el electrodo a tierra, entonces en ese punto el potencial de membrana es V_0 pero a medida que se adentra en el cilio la tierra pierde la calidad, tendiendo a $-V_0$, esto equivale a que el potencial de membrana decaiga hacia la parte distal del cilio, sufriendo el efecto de cable finito.

4.5 Adopción de Modelo Circuitual del Cilio

Antes de poder simular cualquier comportamiento de la corriente en el cilio, es necesario definir cuál será el modelo circuitual de éste.

Las propiedades de cable de estructuras biológicas han sido ampliamente estudiadas por la comunidad científica, y la aplicación de modelos de cable a estructuras cuya geometría lo permite, es un ejercicio completamente pertinente. Es por esto, que la utilización de un modelo circuitual de cable para el cilio, es muy apropiado.

Para emular el comportamiento eléctrico del cilio se considera una discretización espacial. Se define entonces un elemento de longitud como la unidad fundamental constituyente del cilio. Dicho elemento de longitud se repite uno a continuación del otro hasta completar el largo del cilio.

Cada elemento de longitud será representado por un elemento de circuito, compuesto por tres componentes (ver Ilustración 4-7):

- Una resistencia axial, representando las características resistivas de una unidad de longitud del cilio, en el sentido longitudinal.
- Una fuente de voltaje, representando el potencial de inversión que debe superarse para que la corriente fluya en un sentido o en otro, generalmente debido a diferencias de concentración de iones.
- Una conductancia (o su recíproco, resistencia) variable de transmembrana, representando la conductancia basal y la conductancia de los canales, como se expresa en la Ecuación 4-15.

Para todos los elementos de longitud el circuito equivalente es igual, excepto para el último, el correspondiente a la parte más distal del cilio. Ahí el circuito se *cierra*, agregando, a continuación de la resistencia axial, otra rama de transmembrana (fuente y conductancia).

En los modelos de cable es usual incorporar una componente capacitiva, correspondiente a la membrana lipídica, representada por un condensador paralelo a la conductancia de transmembrana. En este caso no fue considerado el condensador, pues en Larsson et al. (1997) se muestra que el punto de corte (mitad de potencia) del filtrado producido por la componente capacitiva de la membrana del cilio es aproximadamente 1500 Hz, mientras que el ruido producido por la

apertura y cierre de los canales tiene un ancho de banda cuyo máximo es a 700 Hz. Por lo tanto se desprecian los efectos del condensador, y éste no se agrega al modelo circuital.

Claramente, para las simulaciones es relevante cómo se realice la discretización. En este trabajo se asumió, como base, una unidad de longitud de $1\mu\text{m}$ ya que muchos de los parámetros del cilio usualmente se miden normalizados de acuerdo a esa medida. Sin embargo, el simulador posee, dentro de sus opciones de configuración, la posibilidad de afinar la grilla de discretización en algún factor que se define antes de correr el programa. Los más usados para visualizar los efectos de la grilla fueron 2X, 5X y 10X, es decir, una discretización de hasta 100nm, sin encontrarse mejoras destacables.

Una vez definido el modelo circuital se puede programar el modo de resolver la red. En este caso la variable que interesa calcular es la corriente media o macroscópica, que circula por el cilio, dado un potencial V_0 .

Esta configuración de red es sencilla, de componente lineales, pero extensa, para un cilio de $50\mu\text{m}$, con un factor de grilla de 10X, son más de 500 bucles que hay que resolver. Para este tipo de redes el método de resolución por mallas es ideal, además es programable, y en una plataforma especializada en trabajar matrices, como lo es Matlab, no es muy lento.

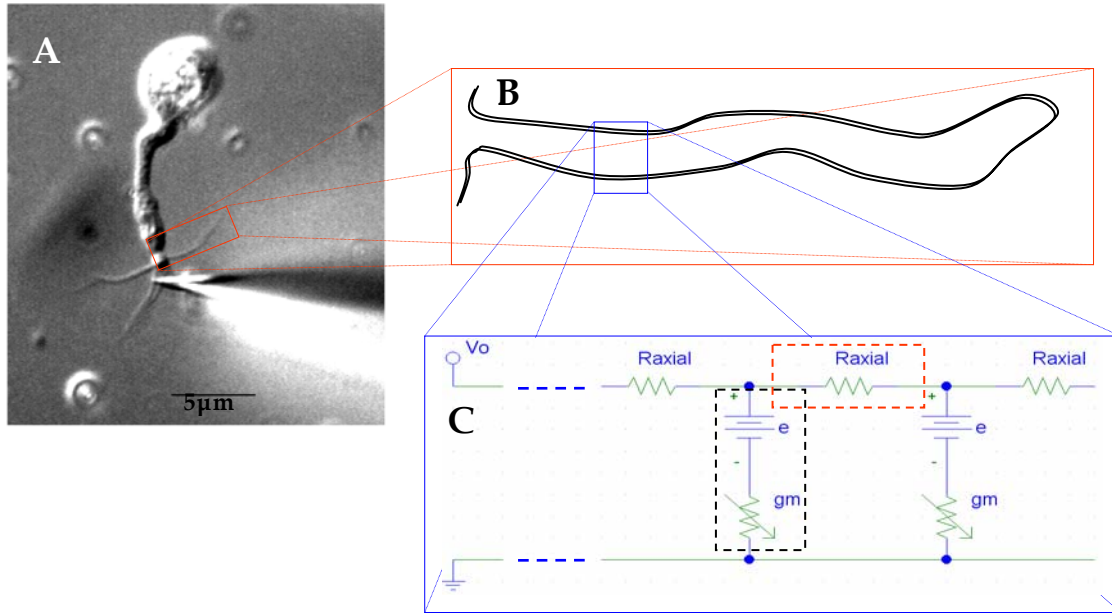


Ilustración 4-7: Modelo circuital de la membrana del cilio y su contexto espacial. A: (Delgado et al., 2003) Neurona sensitiva olfatoria. Encuadrado en rojo uno de los cilios de la neurona (Olympus IX70 con óptica DIC²⁰; objetivo de 40X). B: Esquema de un cilio para poder precisar la ubicación de un *elemento de longitud*. C: Esquema del modelo circuital para un *elemento de longitud*. Encuadrado en negro están los componentes transversales (una fuente de potencial de inversión y una conductancia de membrana variable), y encuadrado en rojo el elemento resistivo longitudinal o axial (resistencia propia de la geometría del cilio y las características conductoras del lumen).

Para emplear el método de las mallas hay que asegurar que sólo haya fuentes de voltaje, que para este caso viene dado por el planteamiento mismo de modelo circuital. Lo siguiente es definir las corrientes de malla. En la Ilustración 4-8 se muestra una malla con unos pocos elementos de longitud, pero cuyo método de resolución es el mismo que para una de más elementos. Las flechas verdes corresponden a cada una de las corrientes de malla. Con las mallas definidas se puede completar la matriz de impedancia, en la cual el elemento $z_{i,i}$ es la sumatoria de todas las impedancias presentes en la malla i . En cambio, el elemento $z_{i,j}$ es el inverso aditivo de la sumatoria de todos los elementos coexistentes en la malla i y en la malla j . Formándose así una matriz simétrica, y que en este caso contiene ceros para cualquier posición fuera de las 3 diagonales. Después se construye el vector de las fuentes, que en este caso posee un solo elemento no nulo que es la diferencia entre el potencial de *clamp* (V_0) y el potencial de inversión (e). Finalmente se escribe la Ecuación 4-25 agregando el vector de *I de mallas* como incógnita.

²⁰ DIC: *Differential Interference Contrast*, también conocida como *óptica Nomarski*, es una técnica de microscopía que logra una imagen con efecto de tridimensionalidad.

Ecuación 4-25

$$\begin{bmatrix} z_{1,1} & -z_{1,2} & 0 & 0 \\ -z_{1,2} & \ddots & \ddots & 0 \\ 0 & \ddots & \ddots & -z_{n,n-1} \\ 0 & 0 & -z_{n,n-1} & z_{n,n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I_1 \\ \vdots \\ \vdots \\ I_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} V_0 - e \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

Para resolver la Ecuación 4-25 basta simplemente premultiplicar por la inversa de la matriz de impedancia, quedando despedido el vector de corrientes.

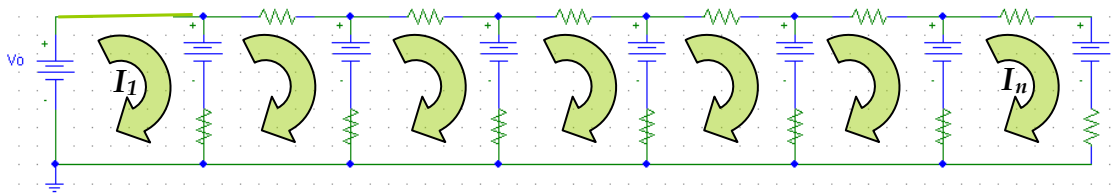


Ilustración 4-8: Esquema de un cilio compuesto por sus elementos de longitud. Cada flecha corresponde a una corriente de malla.

Una vez obtenido el vector de corrientes está listo el cálculo de la corriente macroscópica, pues I_1 es la corriente que circula por la fuente de *clamp*, es decir, es la corriente que la unidad de registro “ve” que circula. En definitiva, el valor del primer elemento del vector de corrientes es la corriente macroscópica que interesa conocer.

4.6 Modo de Operación

El simulador tiene como tarea esencial generar las características de la red, de acuerdo a los parámetros de entrada²¹ que se definan. Para esto el programa tiene como elemento medular una matriz cuyos elementos representan el estado de cada uno de los canales.

En esta matriz de estado cada elemento $a_{i,j}$ corresponde al estado del canal i , del elemento de longitud j . Dicho de otro modo, cada columna de la matriz esta asociada a un elemento de longitud, y contiene el estado de cada uno de los

²¹ Los parámetros de entrada correspondientes a las características del cilio y del experimento a simular, y los parámetros de configuración del simulador se pueden revisar en los anexos, en la sección de códigos.

canales presentes en ese elemento de longitud, representados numéricamente por un **0** para cerrado, y un **1** para abierto (ver Ilustración 4-9). Con esto resulta una matriz cuya dimensión es (*densidad de canales* × *número de elementos de longitud*).

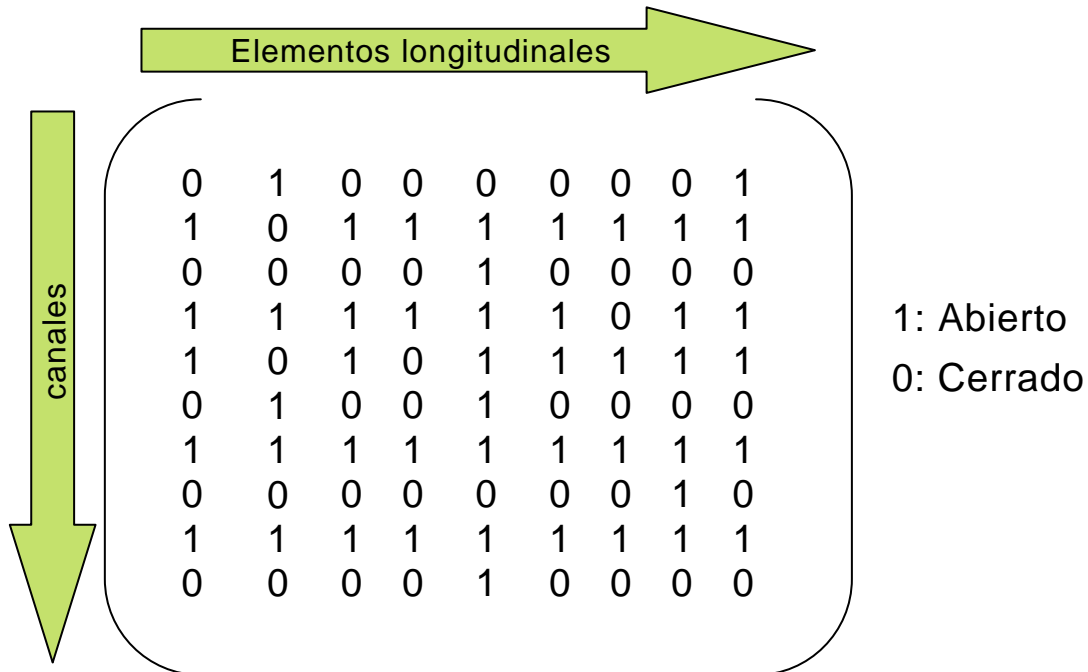


Ilustración 4-9: Ejemplo de matriz de estado de canales para una densidad de canales $n=10$, y un largo de 9 elementos longitudinales. Cada cifra representa a un canal. El estado de dicho canal es abierto si la cifra es 1, o cerrado si es 0.

La suma vertical de elementos en la matriz de estado resulta un vector lista con el número de canales abiertos para cada elemento de longitud. Son estos canales los que están aportando corriente.

Para poder generar los datos, equivalentes a los que se obtendrían en un experimento de laboratorio como el descrito en la Sección 4.4.2, es necesario que la cantidad de *unos* que haya en la matriz este de acuerdo a una variable independiente p , que es la probabilidad de apertura de los canales. Esta será la variable independiente que se variará para poder generar las curvas del análisis de ruido.

Este simulador posee dos modos de operación, uno atemporal, en que cada iteración generadora de corriente (dato) es independiente de las anteriores, y otro temporal, en que cada iteración se hace en base al estado anterior, es decir, se actualiza la matriz de estado con respecto al estado anterior de acuerdo a una cinética operacional de los canales.

La cinética de los canales depende de la probabilidad de que un canal pase de un estado a otro. Para un canal con dos estados, que corresponde al caso estudiado, son dos las constantes que determinan la cinética: α para pasar de cerrado a abierto, y β para pasar de abierto a cerrado. La unidad de estas constantes es s^{-1} , pues al multiplicar por un lapso de tiempo (en el cual se quiere evaluar si hubo cambio) resulta la probabilidad de que el canal haya cambiado de estado.

Ecuación 4-26

$$0 \xrightarrow{\alpha} 1 \xrightarrow{\beta} 0, \text{ con } \alpha \text{ y } \beta \text{ en } s^{-1}$$

En el modo temporal la cinética está representada con el algoritmo que actualiza cada elemento de la matriz de acuerdo a los parámetros α y β , para cada iteración, con un intervalo entre iteración definido por δt .

Primero se verifica el estado del canal; si está abierto (1) se evalúa cuál es la probabilidad de que cambie su estado en un tiempo δt , esta probabilidad es $\beta \delta t$, este valor se compara con un número aleatorio (Nr) del intervalo $[0, 1]$; si Nr es mayor que $\beta \delta t$ el canal cambia de estado, en caso contrario, permanece igual hasta la próxima iteración; si el canal estaba cerrado (0) el procedimiento es el mismo, pero con la constante de cierre (α).

Se cumple que para una cinética dada, la probabilidad de apertura de los canales esta definida por α y β de acuerdo a la siguiente expresión:

Ecuación 4-27

$$p = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

Teniendo la Ecuación 4-27 se puede modificar p , variando alguno de los parámetros de la cinética. Para el modo de simulación atemporal la cinética no es relevante, porque no importa la probabilidad de que un canal *pase* de un estado a otro (esto sí importa para el modo temporal), sólo importa la probabilidad de que un canal *esté* en cierto estado u en otro. Considerando lo anterior, para modificar p el simulador usa diferentes α para un β fijo, de este modo se logra una variación de p , como variable.

Entonces, teniendo p como variable se inicializa la matriz de estado con una distribución aleatoria de unos y ceros, pero que respetan, en número, la probabilidad p .



4.7 Validación y Generación de Datos

La validación de las etapas para el modo temporal y el atemporal son diferentes. Para el modo temporal es necesario verificar la correcta cinética de la apertura y cierre de los canales, para el modo atemporal hay que verificar que se respete la probabilidad p de canales abiertos.

Para el modo temporal se realizó una prueba en que se evalúa que los canales abiertos tiendan a p de acuerdo a la Ecuación 4-27, y que además lo hagan con una cierta "velocidad" τ que está definida de acuerdo a la Ecuación 4-28.

Ecuación 4-28

$$\tau = \frac{1}{\alpha + \beta}$$

Ecuación 4-29

$$f(t) = A \cdot e^{-t/\tau} + C$$

Ecuación 4-30

$$f(t) = A \cdot \left(1 - e^{-t/\tau}\right) + C$$

Para realizar esta prueba se inicializa la matriz con todos los canales abiertos o todos cerrados y se deja que evolucione en el tiempo hasta alcanzar el estado estacionario. Luego a esos datos se les ajusta una función exponencial, que es la solución de la cinética presentada en la Ecuación 4-26. Para el caso de la Ilustración 4-10A, se ajusta una función como la de la Ecuación 4-29, y para la Ilustración 4-10B, una como la Ecuación 4-30, correspondientes a las soluciones de esas condiciones iniciales con todos los canales abiertos y todos cerrados, respectivamente. Finalmente se verifica que los valores de tendencia y "velocidad" correspondan a los esperados de acuerdo a los parámetros de la cinética.

Los resultados de esta prueba demuestran que la matriz de estado de los canales se actualiza correctamente.

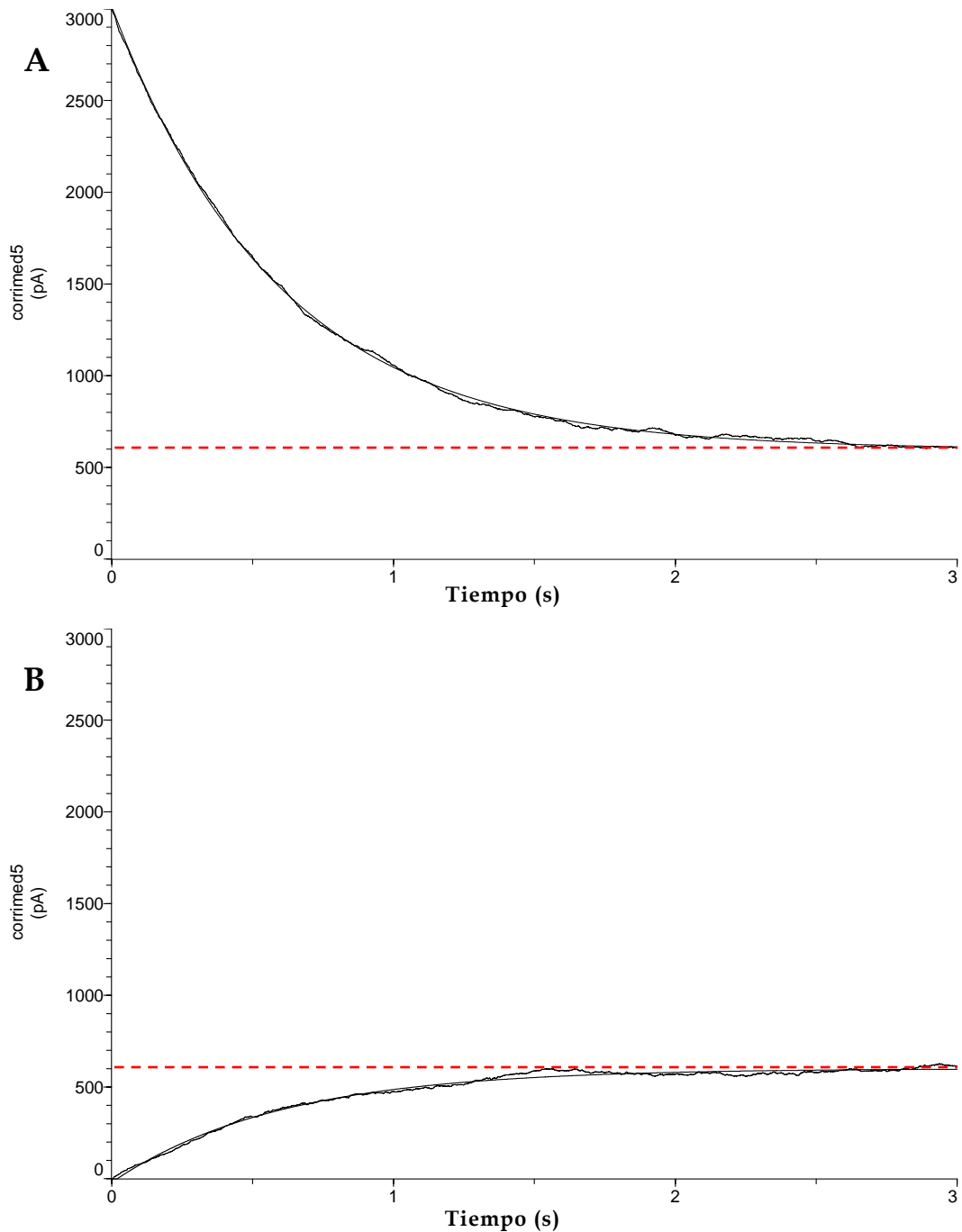


Ilustración 4-10: Curvas de relajación de los canales de un cilio simulado, para *clamp* perfecto, con $a=1/3 \text{ s}^{-1}$, $\beta=4/3 \text{ s}^{-1}$, $n=100\mu\text{m}^{-1}$, *largo*= $30\mu\text{m}$, *discretización*= $1 \mu\text{m}$, es decir, 3000 canales, donde $i=1\text{pA}$. Con estos parámetros las curvas debiesen tender 600pA con un $\tau=600\text{ms}$. En cada gráfico se exhiben dos curvas: la *ruidosa*, es la corriente simulada, y la *suave*, es la curva exponencial de ajuste. A: Relajación partiendo con todos los canales abiertos. B: Relajación partiendo con todos los canales cerrados. Ambas curvas cumplen con lo esperado.

Para el modo atemporal se testeó si calzaban las simulaciones con las predicciones teóricas, para la situación más sencilla, es decir, simulando condiciones de *clamp* perfecto, cuando todos los canales aportan la misma corriente al estar abiertos.

Para simular un *clamp* perfecto basta definir la resistencia axial como inexistente, es decir, el parámetro $R_{axial}=0$ (ver Ilustración 4-8). Así, todas las conductancias de transmembrana quedan sometidas al mismo potencial.

En estas simulaciones, un punto es un par ordenado, cuya abscisa y ordenada son respectivamente la corriente media y la varianza obtenidas de 363 repeticiones (matrices de estado) generadas para cada valor de p . Esta prueba resultó exitosa, debido a la evidente concordancia entre la curva teórica y los datos simulados (ver Ilustración 4-11).

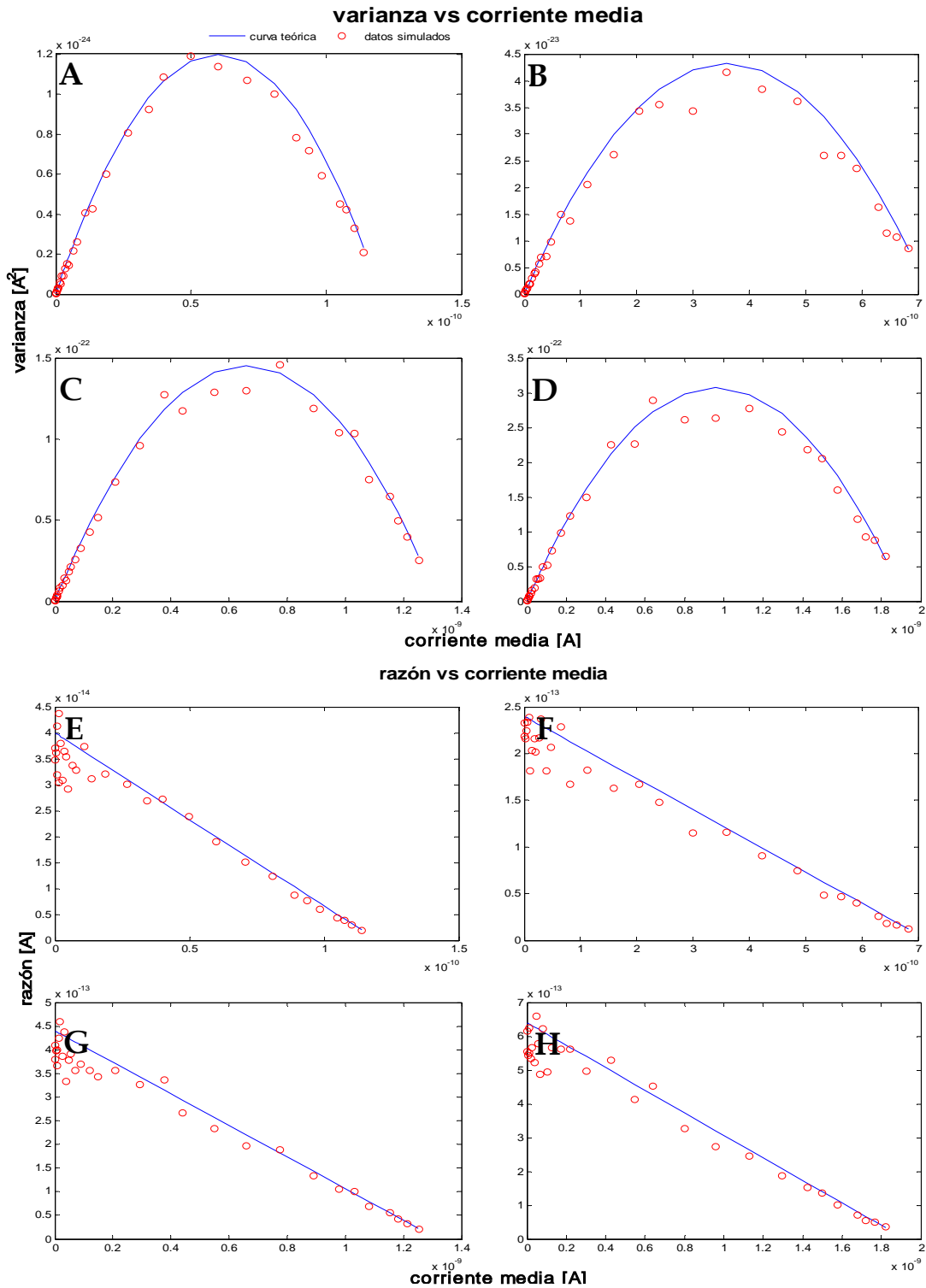


Ilustración 4-11: Cuatro simulaciones de *clamp* perfecto, para validar el funcionamiento del simulador. Se grafica la varianza (A-D) y la razón (E-H) en función de la corriente media. La línea continua azul es la curva teórica para los parámetros dados, y los círculos rojos son los datos simulados para la misma condición. La diferencia entre un recuadro y otro es la conductancia unitaria (γ). (A, E): $\gamma = 0.8 pS$. (B, F): $\gamma = 4.8 pS$. (C, G): $\gamma = 8.8 pS$. (D, H): $\gamma = 12.8 pS$. Nótese la escala de cada gráfico, es un aumento notable a medida que crece γ . Para todos los casos los datos simulados están oscilando en torno de los valores teóricos.

Una vez realizados estos controles, se comenzó a generar datos que permitieran contrastar o apoyar los resultados de Larsson et al. (1997) donde $\gamma=0.8 \text{ ps}$ o el valor de $\gamma=10-20 \text{ ps}$, obtenido por (Delgado y Bacigalupo, Resultados no publicados). O, por último, dar alguna luz en pos de conseguir un valor de la conductancia unitaria del canal de cloruro activado por calcio.

Finalmente, con el simulador validado, es posible hacer las simulaciones cardinales, que eran la motivación de la construcción de un simulador. Estas simulaciones consisten en correr el simulador, para el caso de *clamp* imperfecto, con los parámetros conocidos, generar los datos de corriente que se obtendrían de un experimento de laboratorio y, finalmente, utilizando la metodología de análisis de ruido modificada revisada en la Sección 4.4.1, probar si se recuperan los valores de γ y n , introducidos en la simulación analizada. De ser así, este estudio apoyaría la estimación de la conductancia unitaria publicada por Larsson et al. (1997), en cualquier otro caso sugeriría hacer una revisión de la metodología y/o los experimentos realizados para obtener dicha estimación.

Al realizar dichas simulaciones se obtuvo curvas que no coincidían con las curvas teóricas. Al notar esta inconcordancia se procuró un *acercamiento* gradual al caso de *clamp* imperfecto, es decir, partiendo de simulaciones que coinciden con las curvas teóricas, como es el caso de las de validación ($R_{axial}=0$), expuestas en la Ilustración 4-11, se fue *empeorando* el *clamp*, hasta llegar a valores similares a los presentados en Larsson et al. (1997) ($R_{axial}=11M\Omega \mu m^{-1}$).

Con este procedimiento se aprecia claramente (ver Ilustración 4-12) como comienza una distorsión –que era de esperar– con respecto al caso ideal de análisis de ruido básico, pero también un alejamiento progresivo –que no era de esperar– de los datos simulados con respecto a las curvas teóricas del análisis de ruido modificado.

Lo destacable de la discrepancia es que los datos simulados se ubican por debajo de la curva teórica, es decir, su varianza es menor que la teórica, mientras que la corriente media coincide. Este comportamiento indica que los resultados del simulador coinciden con la corriente media (Ecuación 4-21), pero no con la varianza (Ecuación 4-22), sugiriendo una discrepancia en algún supuesto asumido en la construcción del análisis de ruido modificado, o bien, en la operación del simulador.

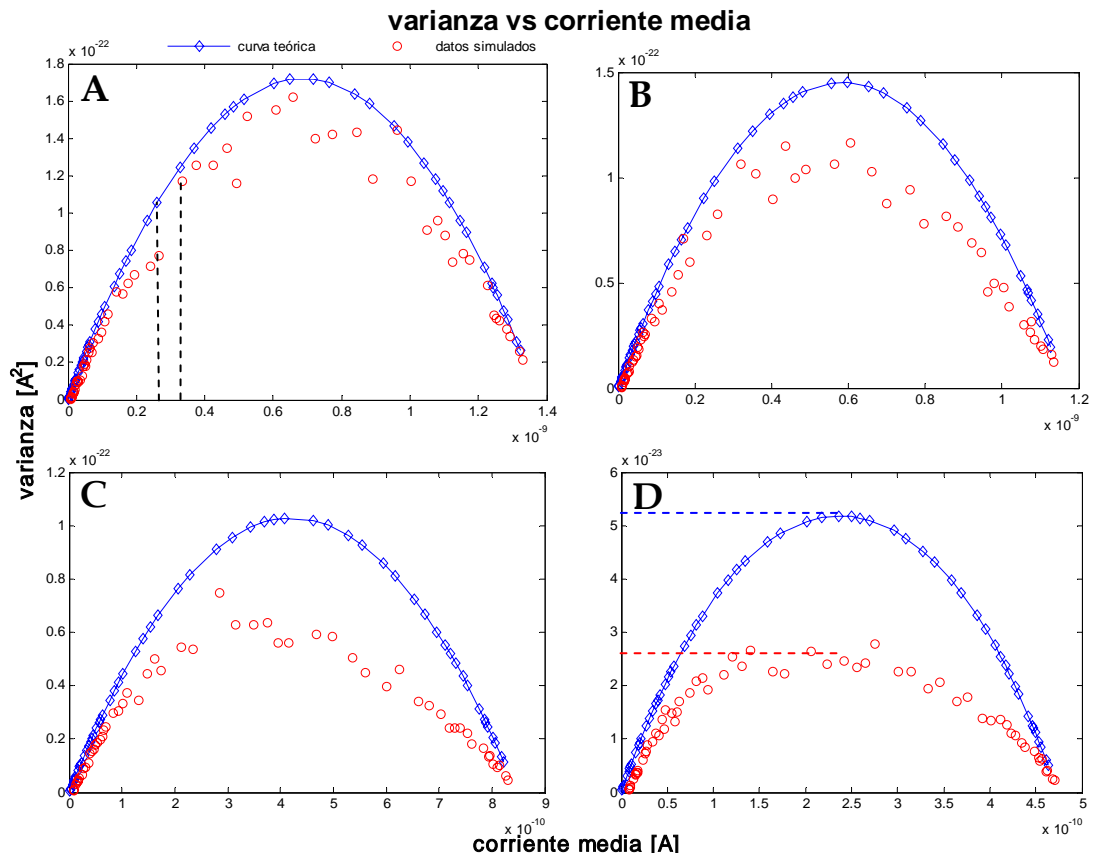


Ilustración 4-12: Gráficos de cuatro simulaciones, para diferentes *calidades de clamp*, con una conductancia unitaria fija ($\gamma=10pS$). Habiendo visto ya la curva para *clamp* perfecto (Ilustración 4-11), se aumentó progresivamente el valor de R_{axial} para visualizar la, también progresiva, disminución de la varianza con respecto a las curvas teóricas. A: $R_{axial}=300k\Omega\mu m^{-1}$. B: $R_{axial}=1M\Omega\mu m^{-1}$. C: $R_{axial}=3M\Omega\mu m^{-1}$. D: $R_{axial}=11M\Omega\mu m^{-1}$. En el caso de (D) la varianza de los datos simulados es aproximadamente el 50% de la de la curva teórica. Mientras que la corriente media no presenta esta discrepancia, cada diamante (\diamond) de la curva teórica se corresponde con un círculo (\circ) de los datos simulados, pues tienen en común el mismo valor de la variable independiente p . Al revisar la posición horizontal de los diamantes y los círculos (ver líneas verticales en A), es prácticamente la misma.

4.8 Diferencia de Supuestos

Al encontrar estas discrepancias numéricas surgidas al simular situaciones de *clamp* imperfecto, se intentó encontrar la razón de éstas.

Considerando que, tanto el análisis de ruido modificado, como el simulador, estaban correcta y consecuentemente desarrollados, había que buscar en la base de cada metodología algo que bifurcarse los resultados generados. Y los resultados del simulador no son más que números que representan corrientes, por eso se inspeccionó la forma en que la corriente era calculada.

Así fue que se realizó una prueba que mezcla el operar del simulador con la base del análisis de ruido. La prueba consiste en generar los parámetros del circuito representante de la membrana del cilio, utilizando la matriz de estado, tal como se hizo en la generación de datos anteriores, pero se reemplazó el método de cálculo de corrientes por mallas. En su lugar se consideró la fórmula de caída de tensión en un cable finito (Ecuación 4-13), cuyos parámetros eran los correspondientes a los usados en la simulación. Luego, esa función resultante se discretizó para poder asignarle un valor a cada elemento de longitud del cilio simulado. Teniendo un valor de potencial para el nodo correspondiente a cada segmento del cilio (obtenido del uso de la Ecuación 4-13), y también el valor de la conductancia de transmembrana de ese segmento (obtenida con la matriz de estado del simulador), simplemente se multiplicó el potencial por la conductancia y se obtuvo la corriente que circula por ese segmento de membrana ($V \cdot g = I$).

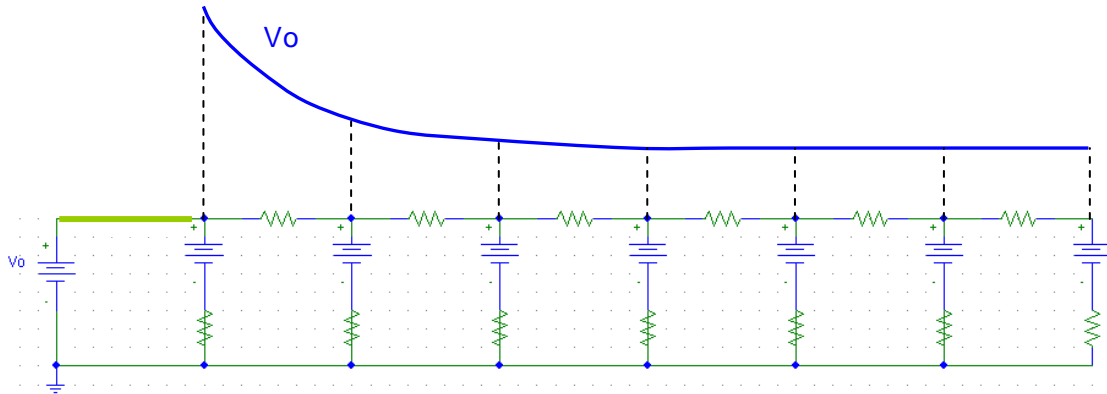


Ilustración 4-13: Curva de caída de potencial a lo largo del cilio según la Ecuación 4-13, sobre el modelo circuital del cilio, cuyos parámetros se generaron con el simulador. Al nodo de cada elemento de longitud del circuito le corresponde un valor de la curva de potencial discretizada. Ese valor multiplicado por el valor de la conductancia de membrana del segmento da la corriente que atraviesa la membrana en ese segmento. La suma de todas las corrientes es la corriente macroscópica que registra el sistema.

La suma de las corrientes de membrana de todos los segmentos del cilio corresponde a la corriente macroscópica que registra el sistema, es decir, el dato requerido. Haciendo simulaciones iguales a las anteriores, pero usando la corriente calculada de este modo, los resultados de las curvas cambian notablemente para los mismos parámetros, como se expone en la Ilustración 4-14.

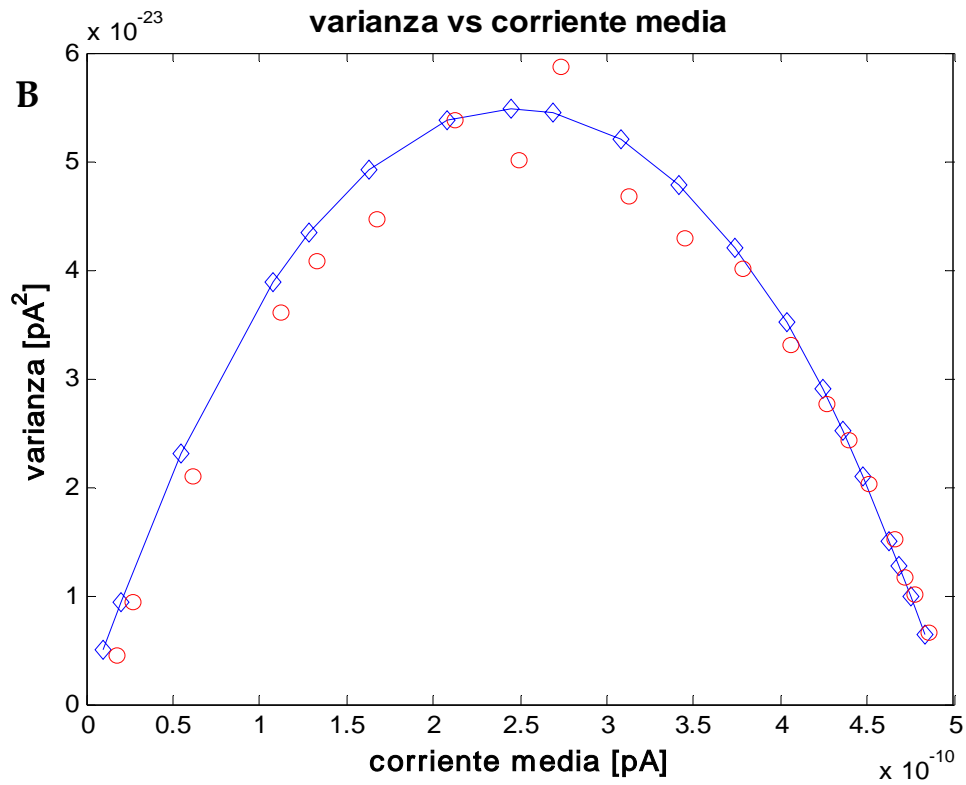
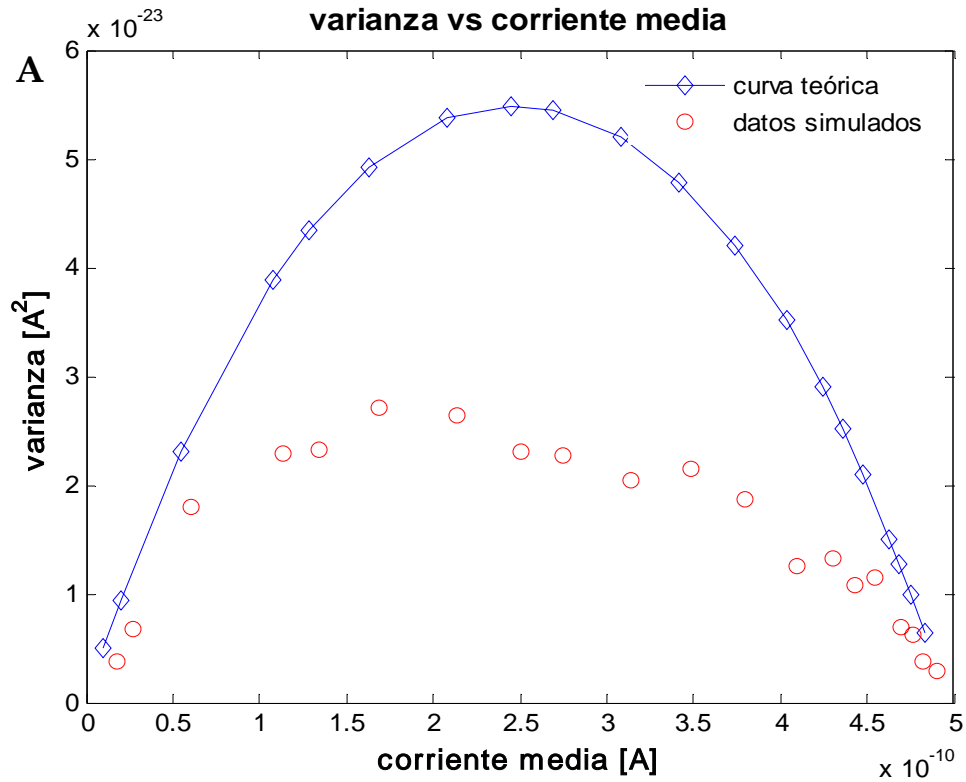


Ilustración 4-14: A: simulación para parámetros $largo=30\mu m$, $\gamma=10pS$, $g_{basal}=5pS\mu m^{-1}$, $n=100\mu m^{-1}$, $R_{axial}=10M\Omega\mu m^{-1}$, $V_0=50mV$, $grilla=5$, con el método de las mallas. B: simulación para los mismos parámetros pero con el potencial de la Ecuación 4-13. Es notable el aumento de la varianza, coincidiendo con la curva teórica.

Como para esta prueba el modo de operación del simulador fue el mismo de las ocasiones anteriores, y lo único que cambió fue la forma de calcular la corriente, el resultado indica que calcular por el método de las mallas no es equivalente a hacerlo utilizando la Ecuación 4-13 para la caída de tensión en un cable.

Para observar la diferencia entre el método de las mallas y la Ecuación 4-13, se plasmó, en un mismo gráfico, el potencial a lo largo de un cilio de ciertos parámetros con la fórmula del potencial en un cable, y el potencial de nodo en cada segmento del cilio (dividiendo la corriente de transmembra por la conductancia correspondiente, $v=i/g$).

En la Ilustración 4-15A se muestra el potencial de acuerdo a estas dos formas, como a simple vista la distribución del potencial parece ser la misma, en la Ilustración 4-15B se muestra el gráfico de la diferencia.

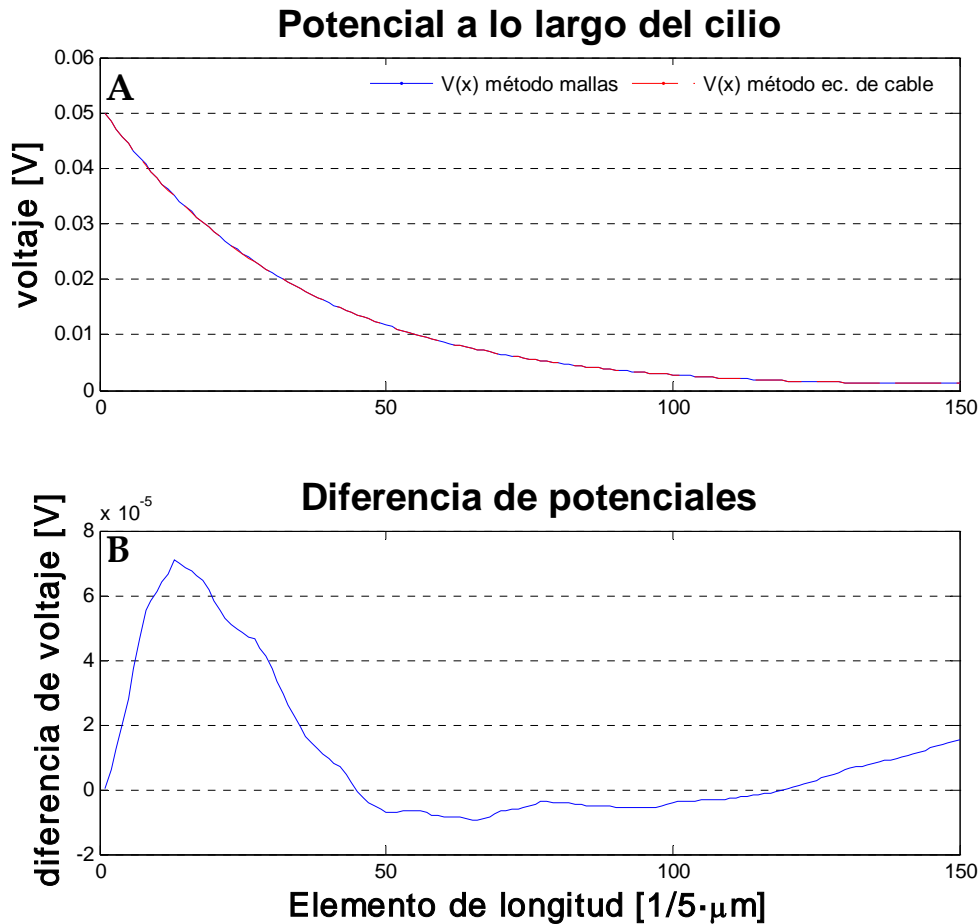


Ilustración 4-15: A: Distribución del potencial a lo largo de un cilio de parámetros $largo=30\mu\text{m}$, $\gamma=20\text{pS}$, $g_{basal}=5\text{pS}\mu\text{m}^{-1}$, $n=100\mu\text{m}^{-1}$, $R_{axial}=11\text{M}\Omega\mu\text{m}^{-1}$, $V_0=50\text{mV}$, $grilla=5$ (por eso las abscisas son de $1/5$ de μm). Calculado por las mallas y por la Ecuación 4-13. Se aprecia, a simple vista, una similitud casi total. B: Diferencia entre ambas curvas (*método de mallas-método de ec. de cable*). En la posición 0 no existe diferencia, pero rápidamente surgen las discrepancias del orden de los $10\mu\text{V}$.

Para ver si esta pequeña diferencia es debida a la discretización de la curva de potencial, se presenta en la Ilustración 4-16 el resultado de una prueba en la cual se discretizó por el flanco derecho, por el flanco izquierdo y por el promedio de ambos. En la prueba se compara las corrientes de transmembrana para cada uno de los segmentos del cilio.

Ninguna de estas discretizaciones coincidió con la del método de las mallas. También se examinó la diferencia entre el método de las mallas y cada una de las discretizaciones. Se observa que en la discretización por la izquierda la diferencia comienza en 0, porque esta discretización es la equivalente a la usada en el método de las mallas, donde se considera el flanco izquierdo del elemento de longitud como su posición representativa (el primer segmento está sometido

exactamente a V_0). Con esto se descarta que la discrepancia sea por una razón de cálculo numérico. Apoyando la idea de una discrepancia por alguna razón relacionada con los fundamentos de las metodologías.

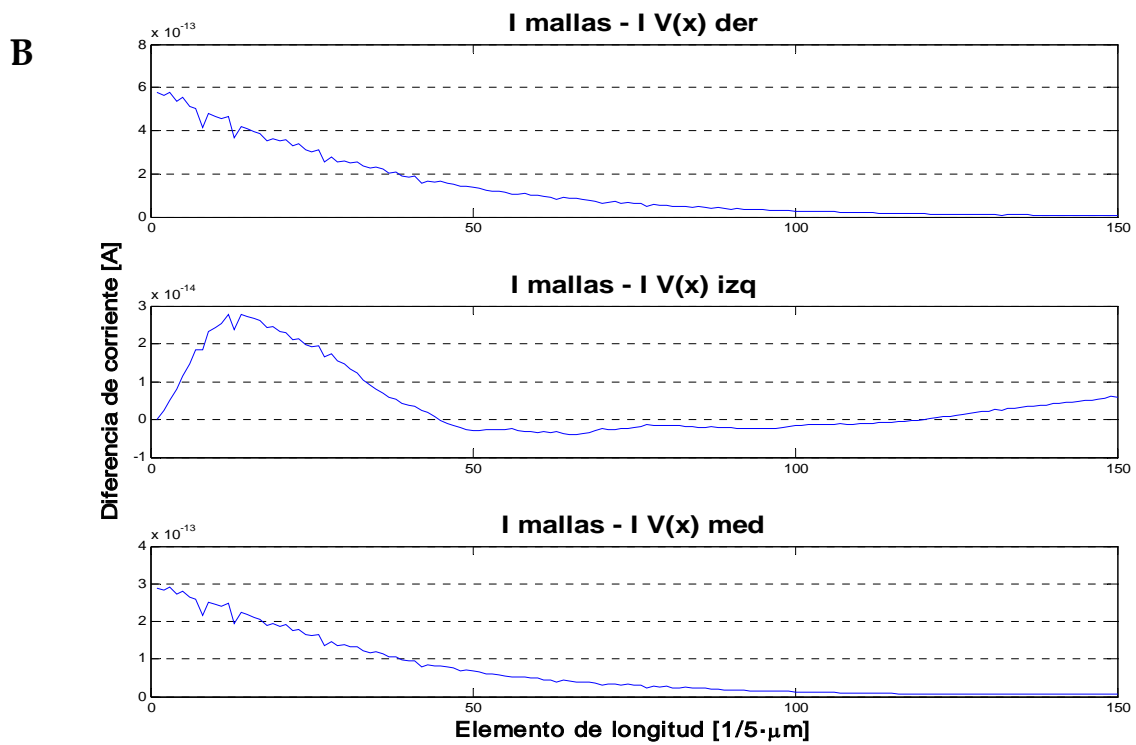
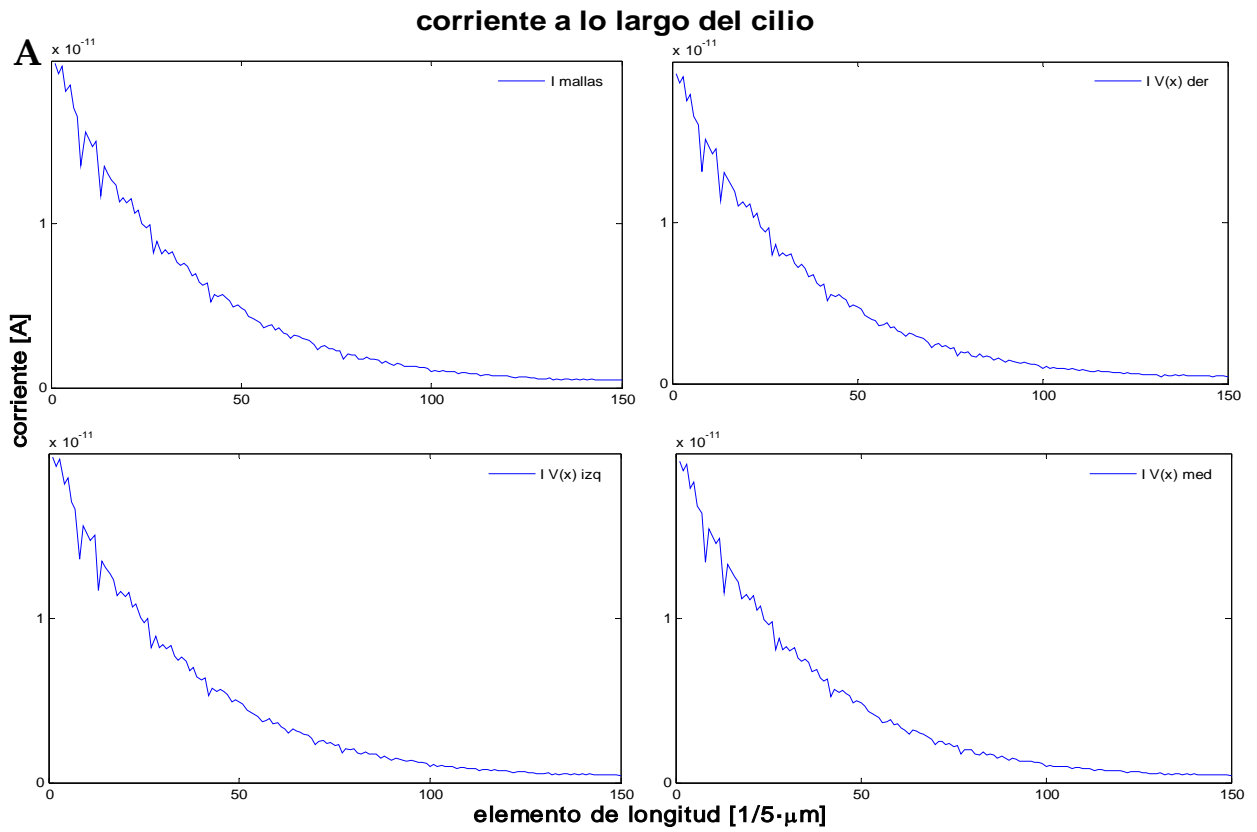


Ilustración 4-16: A: Corrientes a lo largo del cilio según el método de las mallas, y según diferentes discretizaciones de la Ecuación 4-13. B: Gráfico de la diferencia de cada discretización con el método de las mallas. Para los mismos parámetros de la Ilustración 4-15.

Considerando los resultados de las pruebas anteriores, se propone un argumento que explica o da cuenta de la discrepancia numérica entre la curva teórica y el simulador.

En la proposición de Larsson et al. (1997), sobre el análisis de ruido modificado, una hipótesis fundamental es que el voltaje a lo largo del cilio decae de acuerdo a la Ecuación 4-13. Según esto, el potencial en cada punto del cilio está fijo, y determinado por la constante de espacio (λ), que en primera instancia depende de la probabilidad apertura (p). En conclusión, dado un p , el voltaje en cada punto del cilio queda fijo, sin considerar cuántos canales haya realmente abiertos en cada posición del cilio, lo que redundaría en que no se considera que las variaciones de corriente (por la apertura y cierre de canales) modifiquen el potencial a lo largo del cilio. Esta característica de potencial fijo para cada punto no se conserva para un cálculo de corriente con el método de las mallas, pues el voltaje en cada nodo depende de la corriente que la red le pide. Debido a esta suposición de que la tensión está fija para cada punto, la varianza de la corriente resulta mayor, pues, cualquier variación del número de canales abiertos con respecto al promedio $p \cdot n$, se traduce completamente en un aumento o una disminución de la corriente, proporcional a $\Delta N = |n \cdot p - \text{canales abiertos}|$, ya que lo único variable es el número de canales. En cambio, con el método de las mallas, al variar el número de canales abiertos, varía también el potencial del nodo, porque los requerimientos de corriente cambian; dicho cambio del voltaje tiene sentido contrario al cambio de la corriente, por lo tanto las perturbaciones son *amortiguadas* porque el voltaje sube al cerrarse un canal y baja al abrirse. Y las oscilaciones en torno al valor promedio son menores, esto significa una menor varianza (ver Ilustración 4-17).

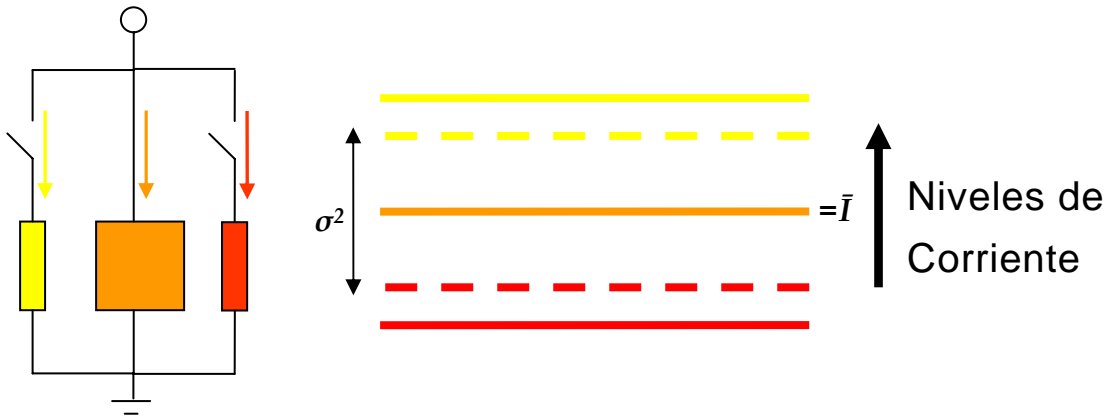


Ilustración 4-17: Para el valor promedio de conductancia de transmembrana (naranja), la corriente está en el nivel promedio (línea naranja continua). Con la apertura de un canal más (amarillo), el nivel de corriente aumenta menos con el método de las mallas (línea amarilla punteada), que con la Ecuación 4-13 (línea amarilla continua). Para el cierre de un canal (rojo) con respecto al promedio, la corriente baja del nivel medio, con el método de las mallas (línea roja punteada) la disminución es menor que con la fórmula (línea roja continua). El nivel de voltaje depende de la apertura y cierre de canales.

La verosimilitud de la proposición radica en que es bien sabido que no existe una fuente de voltaje ideal, a la cual no le afecte cuánta corriente está entregando. Por eso el modelo más simple de fuente de tensión no ideal incluye una resistencia interna (ver Ilustración 4-18), que produce una caída de tensión a mayor corriente entregada, y una subida (limitada por la fuente ideal) a menor corriente.

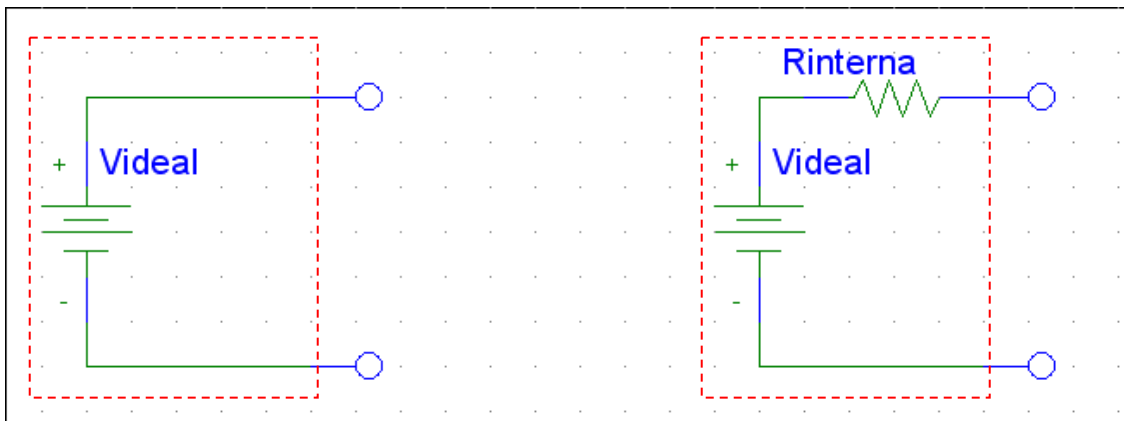


Ilustración 4-18: Comparación de modelo circuital de una fuente ideal con modelo básico de una no ideal. Encuadrado en rojo segmentado está lo que se considera la fuente, fuera del recuadro están los bornes. La imagen de la izquierda no incluye resistencia, la imagen de la derecha incluye una resistencia interna como parte inevitable de una fuente de voltaje.

Este es el argumento propuesto, que explica las discrepancias numéricas entre las simulaciones y las fórmulas del análisis de ruido modificado.

El hecho de que el caso de *clamp* perfecto no delatara esta discrepancia, concuerda perfectamente con la explicación propuesta, porque para esa situación la resistencia axial es nula, quedando todos los nodos (como uno solo), conectados directamente a la fuente de *clamp* (V_0). Es decir no hay resistencia en serie entre la fuente y las cargas, caso similar al de considerar una fuente ideal.

Una prueba que apoyaría la tesis anterior es que para una resistencia axial fija, con conductancias de canal mayores, las discrepancias aumentarían, pues la perturbación que produciría la apertura o cierre de un canal sería relativamente mayor que para un caso de conductancia pequeña, pues el cambio en los requerimientos de corriente son más exigentes, aun cuando la Ecuación 4-21 y Ecuación 4-22 son sensibles al cambio de conductancia, ya que está como elemento constituyente de la constante de espacio (Ecuación 4-14), pero lo que no es considerado, son los cambios de potencial debido a las exigencias de corriente, ante perturbaciones con respecto a la media.

Como se muestra en la Ilustración 4-19, la prueba resultó como se esperaba, considerando la tesis propuesta para explicar la discrepancia.

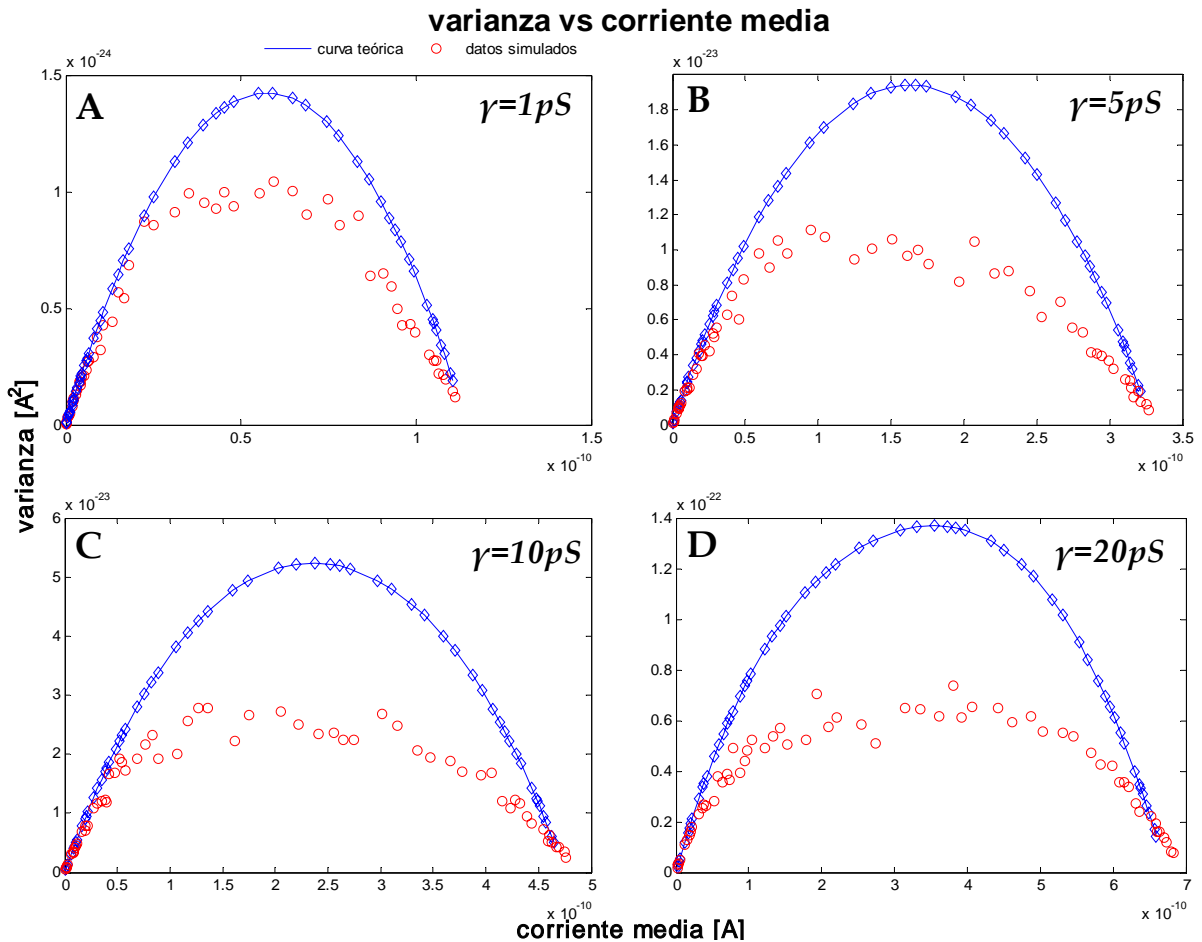


Ilustración 4-19: Simulaciones para cuatro valores de conductancia unitaria (γ), para la misma condición, todas con $R_{axial} = 11 \text{ M}\Omega \mu\text{m}^{-1}$. A: $\gamma = 1 \text{ pS}$, B: $\gamma = 5 \text{ pS}$, C: $\gamma = 10 \text{ pS}$, D: $\gamma = 20 \text{ pS}$. El efecto en el aumento de la discrepancia de la varianza, para canales de mayor conductancia unitaria, es apreciable, como se presenta en estas cuatro simulaciones.

4.9 Corrección de Conductancia Basal

En las técnicas de análisis de ruido básica y modificada, revisadas anteriormente, la curva fundamental, de donde se extrae la información, que es una parábola (Ecuación 4-10) y lo que -provisoriamente- se denominará pseudoparábola (Ecuación 4-21 y Ecuación 4-22), si bien presentan grandes diferencias, hay un elemento común que las une. Este elemento que las une se refleja en el hecho de que ambas curvas pasen por el origen, lo cual indica la suposición implícita de que si no hay ruido de apertura de canales, entonces no hay corriente. Esto se ve al evaluar la Ecuación 4-21 en $p=0$, es decir, con todos los canales cerrados; si en el modelo se considera que los datos tienen conductancia basal entonces existirá un valor de corriente media no nulo para esta evaluación. Pero esto no es así, la evaluación resulta exactamente 0 . Entonces se puede decir que las curvas son aplicables a datos con conductancia basal nula.

Es evidente que no puede ser que la membrana sea un aislante perfecto, es decir, $g_0=0$. No sólo es imposible que la conductancia basal sea nula, sino que por el contrario, puede tener valores que son comparables con la conductancia de los canales que se está estudiando, como es el caso de Larsson et al. (1997), donde se estima la conductancia basal en $5pS\mu m^{-1}$, y su conclusión es que el canal de cloruro activado por calcio tiene $0.8pS$ de conductancia, con una densidad de 70 canales por micrón, lo que resulta en $5.6pS\mu m^{-1}$ cuando están todos abiertos.

En la metodología de Análisis de Ruido Modificado sí está presente la conductancia basal (g_0 en la Ecuación 4-15), influyendo en los valores de la constante de espacio (λ), pero el problema es que las curvas de corriente media y varianza son sólo para las corrientes debidas a los canales y no a la conductancia basal.

Para poder utilizar las curvas del análisis de ruido modificado es necesario corregir lo que la conductancia basal puede producir en los datos experimentales. Omitir esta corrección podría producir distorsiones en las conclusiones que de la metodología se desprenden.

El efecto presumible de esta omisión, es que los datos en realidad estarán desplazados en el eje de la corriente media (abscisas), alejándose del origen, ya que el valor de corriente media será mayor, debido al aporte de los canales (relacionados con la varianza) y de la conductancia basal (no relacionada con la varianza).

Antes de ser explicado, este fenómeno fue observado al realizar las simulaciones, en las que se observaba en algunos casos un notable corrimiento hacia la derecha de los puntos simulados, comparados con los diamantes (\diamond) de la curva teórica. En la Ilustración 4-12A se muestra que la ubicación es prácticamente la misma, y es cierto, pero este corrimiento depende en gran medida de la relevancia porcentual que tenga la conductancia basal con respecto a la conductancia total, y por eso para el caso en que la conductancia basal es mayor y/o la conductancia de canales es menor, el corrimiento será más importante.

En la Ilustración 4-20 se exponen varios casos de este corrimiento al variar el valor relativo de la conductancia basal. En el primer recuadro el efecto es dramático, y decae hasta que en el último es casi imperceptible.

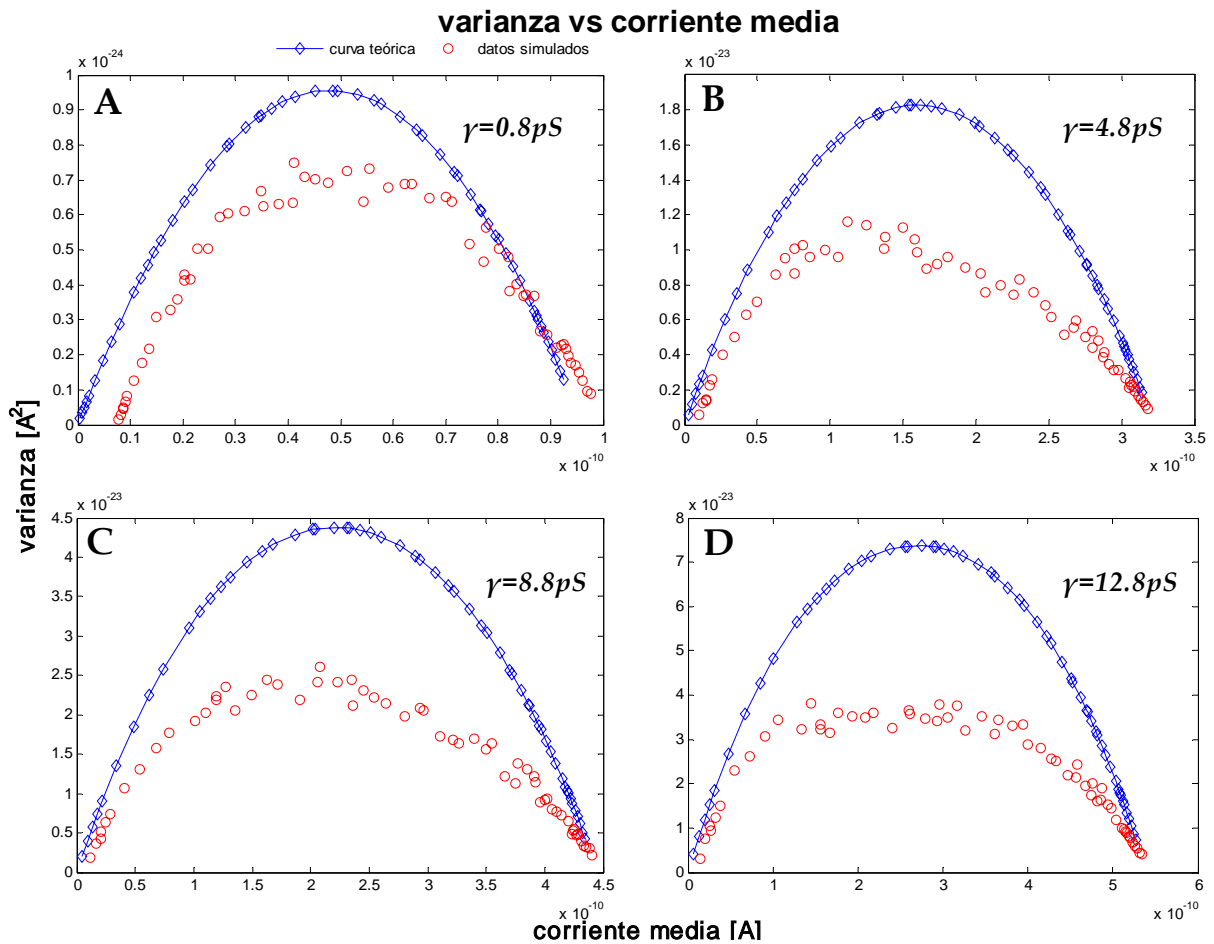


Ilustración 4-20: Simulaciones para diferentes valores de conductancia unitaria (γ), para una misma conductancia basal ($g_0 = 5 pS \mu m^{-1}$), en las que se aprecia que para mayor valor relativo de la conductancia basal, mayor la magnitud del corrimiento. A: $\gamma = 0.8 pS$, B: $\gamma = 4.8 pS$, C: $\gamma = 8.8 pS$, D: $\gamma = 12.8 pS$.

La importancia de este efecto producido por la conductancia basal, es que al intentar ajustar los datos a la curva correspondiente a la Ecuación 4-23, pues como se tratar de una división, la curva puede llegar a deformarse abruptamente en las simulación y/o experimentos, principalmente en la sección más cercana al eje de las ordenadas. En esa sección la división de los dos números (*varianza/corriente media*) es muy exigente en cuanto a precisión, y al existir el efecto de la conductancia basal, existe también un corrimiento, que se traduce en que el denominador de la división sea levemente mayor que lo esperado, provocando que el valor resultante sea, en algunos casos, significativamente menor de lo previsto. Evidentemente la magnitud de esta distorsión también se relaciona con el valor relativo de la conductancia basal con respecto a la total. En la Ilustración 4-21 se muestra ahora, la curva de la Ecuación 4-23, para los mismos casos de la Ilustración 4-20.

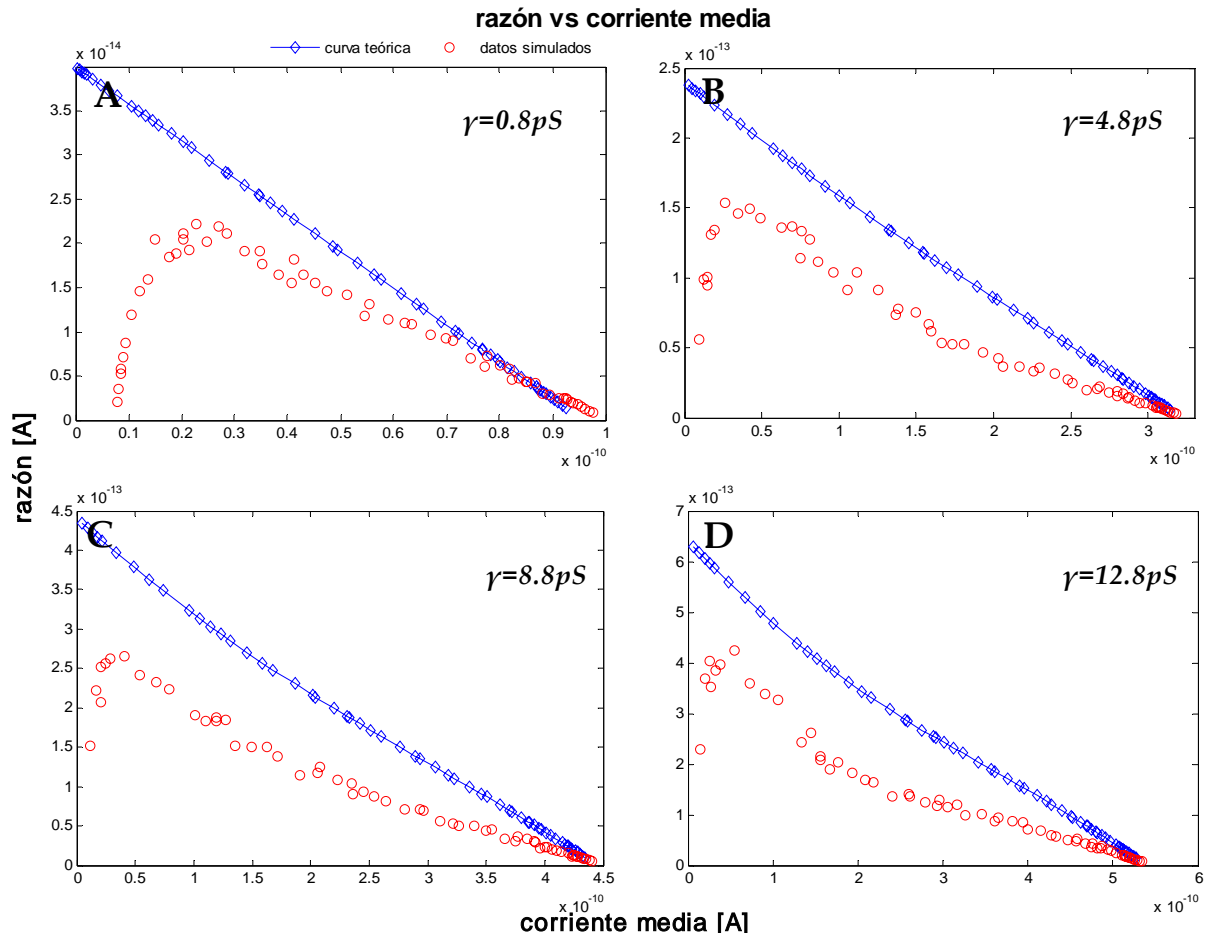


Ilustración 4-21: Curvas correspondientes a la razón entre la varianza y la corriente media (Ecuación 4-23), para las mismas simulaciones de la Ilustración 4-20. A: $\gamma=0.8pS$, B: $\gamma=4.8pS$, C: $\gamma=8.8pS$, D: $\gamma=12.8pS$.

Para asegurar que las distorsiones presentadas en la Ilustración 4-20 y la Ilustración 4-21, eran ocasionadas por efecto de la corriente relacionada con la conductancia basal, en el simulador, se ejecutó una simulación igual a las que generaron los datos de las ilustraciones recién mencionadas, pero además almacenar los valores de corriente macroscópica, se almacenó el valor de la conductancia de canal para cada segmento y su respectiva corriente de malla, en cada una de las iteraciones. De esta forma es posible recuperar, separadamente, la corriente aportada por los canales y la contribuida por la conductancia basal. Teniendo esos valores se sustrajo del dato habitual (I), el valor de la corriente correspondiente a la conductancia basal, por lo tanto debiese quedar solamente la corriente determinada por el comportamiento de los canales. Los resultados obtenidos de esta corrección son sorprendentes (ver Ilustración 4-22). La curva se *reforma*, y claramente tiende a los valores correspondientes.

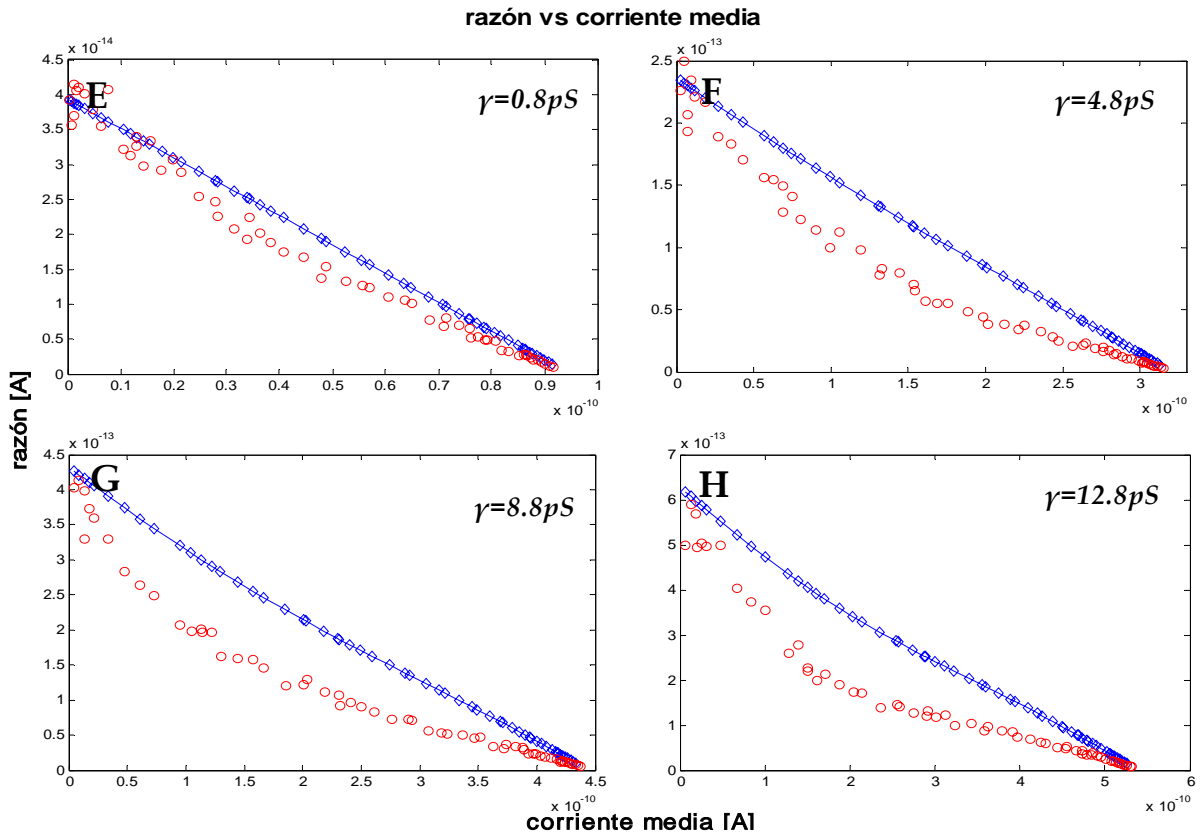
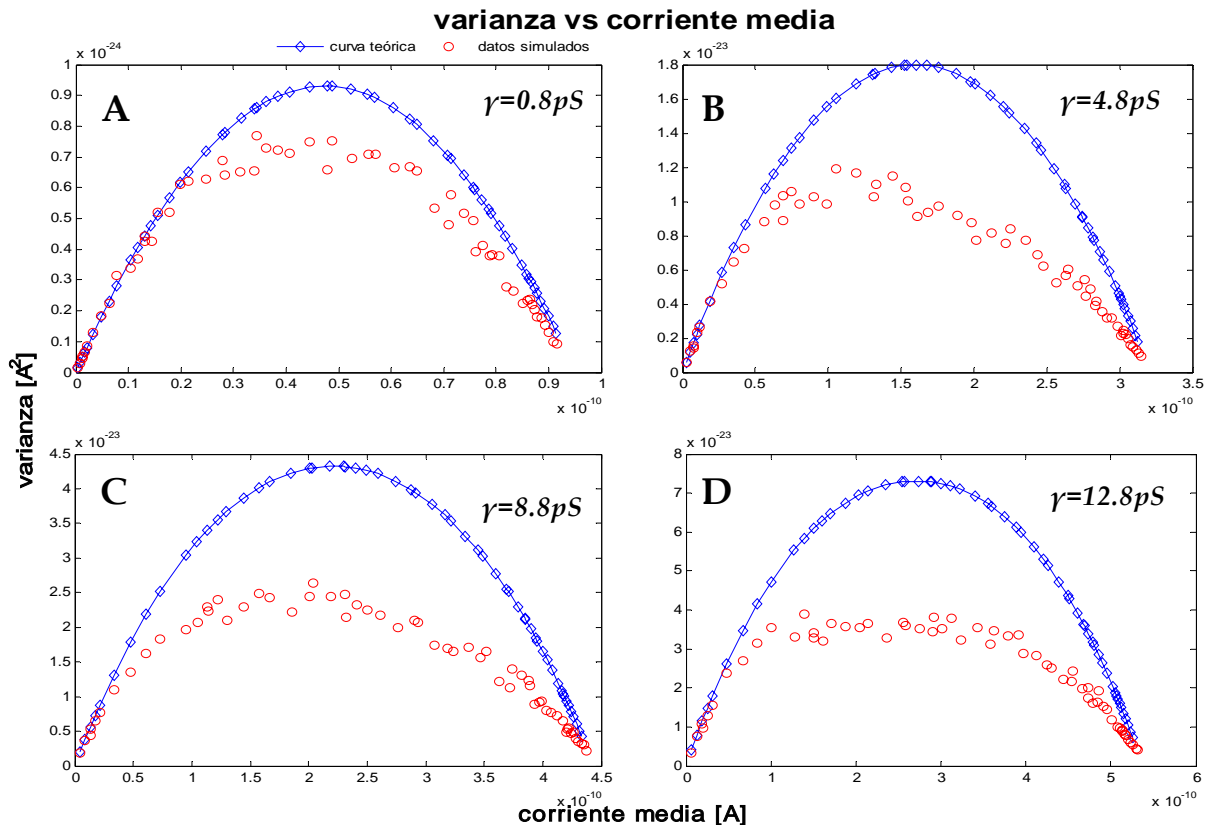


Ilustración 4-22: curvas de las simulaciones presentadas en la Ilustración 4-20 e Ilustración 4-21, corregidas con la sustracción de la corriente correspondiente a la conductancia basal. A, E: $\gamma=0.8pS$; B, F: $\gamma=4.8pS$; C, G: $\gamma=8.8pS$; D, H: $\gamma=12.8pS$.

Este efecto provocado por la conductancia basal es muy relevante, porque afecta directamente la región de donde se concluye el valor de la conductancia unitaria en el método de análisis de ruido modificado, es decir, el punto de corte con el eje de las ordenadas, pudiendo alterar seriamente el valor a obtener.

5 Discusión y Conclusiones

5.1 Sensores Biológicos

Dentro de todo el material revisado en el análisis bibliográfico, no se encontró ningún dispositivo que esté en condiciones de salir al mercado como un producto basado en propiedades biológicas, capaz de detectar olores, sólo hay prototipos experimentales y avances específicos en diferentes carices del desarrollo de un sensor biológico olfatorio. El desarrollo de esta área de investigación todavía dista de poder convertirse en tecnología que beneficie a la humanidad. La mayoría de los reportes presentan resultados de pruebas muy específicas, en condiciones que difícilmente reflejan las exigencias reales de operación de los sensores.

No obstante, también es cierto que en cada experiencia se encuentran resultados positivos y promisorios, que por sí mismos no constituyen competencias suficientes para desempeñarse exitosamente, pero que sí constituyen características necesarias para conseguir elaborar un buen sensor olfatorio biológico.

Los avances se producen de manera paralela en cada uno de los aspectos que pueden componer al sensor (registro de actividad celular, codificación de proteínas receptoras, comprensión del procesamiento de la información, etc.), esto parece ser la tendencia a seguir por al menos unos cuantos años más, hasta que se alcancen estándares óptimos en cada aspecto. Esto es una característica positiva, pues no se produce un estancamiento global cuando un aspecto no progresa.

Posteriormente, luego de estos años de paralelismo, cada línea de investigación intentará agregar una cualidad más a lo que ya habían conseguido, una cualidad que posiblemente ya había sido conseguida por otro grupo de investigadores, y luego otra, produciéndose una convergencia de los aspectos desarrollados. Convergencia que puede ser cooperativa entre los grupos involucrados, donde cada uno apoye con su experiencia y conocimiento adquiridos en su ámbito específico. Acelerando el proceso de creación de un buen sensor biológico olfatorio.

Los trabajos más maduros parecen ser los revisados en la sección 3.1.3 Arreglos Biotecnológicos, es decir, arreglos de antenas y QCM. En los arreglos de antenas ya se desarrolló una técnica de registro y clasificación de las respuestas, pero los resultados aún no satisfacen los requerimientos de mercado, y, además, la

estructura del sistema no facilita la posibilidad de convertirla en un producto *masificable*, debido a las antenas que hay que ir renovando. Por el momento se mantendrán como dispositivos experimentales. Por su parte, los QCM presentan excelentes cualidades de resistencia (duración de 3 meses), pero por el funcionamiento del sistema, está restringido a la detección de algún compuesto odorante, y no a la identificación de olores. Se podría incrementar el espectro de respuestas utilizando el principio de arreglo de varios QCM, cada uno *sintonizado* en un compuesto diferente.

Las investigaciones de sistemas de registro no invasivos (FET; LAPS) son muy promisorias, y con el ritmo de desarrollo que tienen los dispositivos electrónicos, particularmente en investigaciones relacionadas con LAPS se encuentran hasta 30 publicaciones desde el año 2000 a la fecha, revelando importante dedicación. Esto sugiere que es posible concebir métodos de registro no invasivos acabados para el momento en que el conocimiento sobre el sistema olfatorio alcance para generar un sistema de reconocimiento de olores basado en su funcionamiento.

La investigación de Codificación y Procesamiento, es seguramente la que tiene más trabajo por hacer. Elucidar el funcionamiento del sistema olfatorio, íntegramente, es una tarea muy compleja en la que faltan muchas incógnitas por aclarar en diversos ámbitos del sistema (mecanismos de respuesta de las neuronas receptoras olfatorias, conectividad interneuronal, procesos de esparcimiento de la información, etc.). Sin embargo, pueden producirse descubrimientos específicos que permitan desarrollar los sensores biológicos, como lo sucedido con la clonación de proteínas receptoras para revestir los QCM. Dentro de Codificación y Procesamiento los patrones espaciotemporales y sus trayectorias dependientes de estímulo olor-concentración son un descubrimiento muy importante, de resultados alentadores para su futura aplicación, pues para ciertas condiciones de estimulación se pudo identificar olores en diferentes concentraciones, lo cual es el objetivo de los sensores biológicos olfatorios. Las siguientes etapas dentro de esa línea de investigación deben entregar un método o regla que permita reproducir estos resultados para múltiples odorantes, y tanto o más importante que lo anterior es establecer un protocolo de manipulación y sistema de registro robusto, que permita desarrollar un dispositivo que se pueda integrar a algún proceso industrial. como eso posiblemente un buen ejemplo, cuyo futuro es alentador.

Por otra parte, en la búsqueda de aplicaciones el panorama es muy nutrido, con algunas de alto impacto económico para ciertas industrias, lo cual es muy propicio para incentivar aún más el desarrollo de la investigación en pos de un sensor biológico olfatorio.

En resumen, con la acrecentada dedicación existente, la creación de un sensor biológico olfatorio es un hecho casi garantizado. Sin embargo, es una tarea en la que aún debe invertirse bastante tiempo y dinero.

5.2 Simulaciones y Conductancia de Canal

El simulador desarrollado respondió positivamente a las pruebas de validación. El simulador generó datos válidos en los modos temporal y atemporal.

Los ensayos realizados en el simulador permitieron descubrir dos factores que alteran las conclusiones obtenidas del análisis de ruido con modelo de cable para el cilio.

El primer factor encontrado es la suposición, implícita, de que el potencial de membrana es invariable ante cambios pequeños de la corriente de transmembrana. Estas variaciones son producidas por la apertura y cierre aleatorio de los canales iónicos, en torno al valor promedio definido por la probabilidad p . Estos cambios en el número de canales abiertos repercuten en los requerimientos de corriente, por lo tanto, al cambiar la corriente de transmembrana el potencial de membrana también lo hace, eso sí de manera inversa a la corriente. Esta contraposición (una variable aumenta, la otra disminuye, y viceversa) se traduce en una amortiguación de los cambios en torno al valor promedio, en otras palabras, la varianza es menor que si se supone independencia del potencial de membrana ante cambios en la apertura y cierre de canales. Es posible que el potencial tenga un grado de independencia ante los cambios en el estado de los canales. El condensador que usualmente se introduce en los modelos de membrana, se opone a los cambios de potencial de la membrana, la duración de esta oposición depende de la constante de tiempo que caracterice al circuito, pero según Larsson et al. (1997) en este caso los efectos del condensador son despreciables, produciéndose una contradicción con el supuesto de invariabilidad del potencial de membrana ante los requerimientos de corriente producidos por la apertura y cierre de los canales.

Las simulaciones delataron este fenómeno mediante la comparación de la curva que se forma con los datos simulados, con la curva teórica de análisis de ruido modificado para los mismos parámetros. En esta comparación se advierte que los puntos simulados en el mejor de los casos de *clamp* coinciden con la curva teórica, pero a medida que la situación de *clamp* empeora, los datos simulados muestran cada vez una menor varianza (ver Ilustración 4-12).

A nivel práctico, el fenómeno de disminución de varianza genera una distorsión en las conclusiones que se obtienen del análisis de ruido; con datos

experimentales sólo se tiene acceso a los *puntos* de los gráficos presentados, y en base a esos puntos se ajusta –incluso por inspección visual (Larsson et al., 1997)- una curva, para encontrar los puntos de corte con los ejes. El ajuste de una curva donde los puntos (datos) sufrieron el efecto de disminución de varianza, por un mal *clamp*, generará un punto de corte con el eje de las abscisas que estará por debajo del valor real de corriente unitaria (*i*), en consecuencia se altera el valor de la conductancia unitaria y la densidad de canales.

El segundo factor encontrado, produce una alteración en el mismo sentido, es decir, genera una distorsión en la curva que induce la extrapolación de un punto de corte que no representa el valor real. La distorsión se produce por el efecto de la conductancia basal del cilio. El problema se debe a que la conductancia basal permite el paso de una cantidad de corriente que no se relaciona con la apertura y cierre de los canales, por lo tanto no es *ruidosa*. Al no ser ruidosa no tiene varianza asociada, pero la función que relaciona la varianza con la corriente media no contempla la existencia de esta corriente, por lo tanto debe corregirse el efecto de dicha conductancia, de lo contrario se asigna un valor de varianza para dicha corriente basal, lo que distorsiona la curva σ^2 vs. \bar{I} , produciendo un corrimiento en el eje de las abscisas (ver Ilustración 4-20).

El corrimiento producido por la conductancia basal, distorsiona notablemente la curva experimental de la razón entre la varianza y la corriente media vs. la corriente media, pues al ser una curva que se genera con el cociente entre los valores de varianza y corriente, sufre una aguda deformación cuando el denominador (\bar{I}) es levemente mayor (corrimiento) que lo que se esperaba que fuese, reduciendo el valor del cociente. Esta deformación es muy marcada en los puntos cercanos al eje de las ordenadas, que son justamente los datos que más influyen en la extrapolación del punto de corte.

Las conclusiones de Larsson et al. (1997) sobre el valor de la conductancia unitaria del canal de cloruro activado por calcio, pueden haber estado basadas en datos que sufrieron alguna de estas distorsiones. En la Ilustración 5-1 se muestra la curva de la cual concluyeron el valor de $0.8pS$ para dicha conductancia; en ella se detectan indicadores que sugieren el efecto de una distorsión como las encontradas gracias al simulador.

Se encontró que estas distorsiones pueden producir una subestimación de hasta un 50%. En otras palabras, la conductancia unitaria real puede ser hasta el doble de la estimada con el análisis de ruido modificado. Considerando el valor de conductancia unitaria de $1.6pS$, calculado por (Pifferi et al., 2006) usando la misma metodología propuesta por Larsson et al. (1997), podría ser que la conductancia

real alcance los 3.2pS , lo que significa una conductancia cuatro veces mayor que la publicada por Larsson et al. (1997).

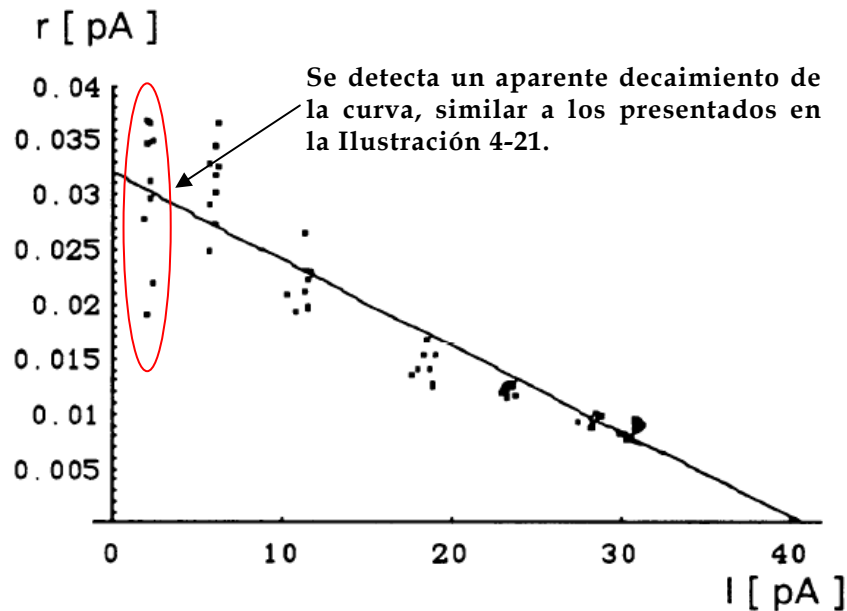


Ilustración 5-1: Gráfico (intervenido) de resultados de análisis de ruido modificado para los canales de cloruro activados por calcio publicados por Larsson et al. (1997). De esta curva se obtiene un valor de conductancia unitaria de 0.8pS . La forma de esta curva -muy similar a las presentadas en la Ilustración 4-21, pero con menor densidad de puntos- indica que podría estar sufriendo las alteraciones explicadas en las Secciones 4.8 y 4.9, sugiriendo que el valor de conductancia obtenido puede estar subestimado.

Con los resultados obtenidos con el simulador se encontró que la metodología propuesta por Larsson et al. (1997) está sobre simplificada (al suponer invariabilidad del potencial ante cambios de corriente). Si no es así, y el voltaje en realidad puede mantener su valor ante cambios en la conductancia de transmembrana, entonces presenta supuestos contradictorios al despreciar el efecto del condensador de la membrana.

Por esto es interesante dilucidar cuál de las dos situaciones es la que en realidad sucede en el cilio. Una proposición de trabajo futuro, para hacer un primer acercamiento que permita aclarar esta incertidumbre, puede ser agregar un condensador al modelo circuital del simulador y realizar simulaciones para ver qué ocurre con el análisis de ruido.

De comprobarse que el potencial de membrana varía ante las aperturas y cierres de los canales, también se sugiere para el trabajo futuro, desarrollar un nuevo

procedimiento matemático analítico que permita hacer el análisis de ruido modificado para potenciales dependientes de los canales, y que además considere los efectos de la conductancia basal.

Si no es posible hacer esta nueva metodología de análisis de ruido, se sugiere simular para múltiples combinaciones de parámetros, generando una carta con las curvas resultantes y tabular los parámetros asociados a dichas curvas. De esta manera, teniendo los datos experimentales, se pueda ver en la carta la curva que mejor coincide con los datos experimentales, y obtener un valor estimado del valor de los parámetros del experimento realizado.

El simulador demostró ser una herramienta provechosa para abordar el estudio de los parámetros del cilio, entregando la posibilidad de estudiar la respuesta del cilio ante variadas condiciones. Si bien el simulador ya incluye varias opciones de simulación (no todas fueron utilizadas para este trabajo, se incluyen los códigos necesarios en la sección de anexos), como el modo temporal/atemporal, la concentración de agonista variable a lo largo del cilio, simulación de los filtros intrínsecos de los sistemas de adquisición de datos, etc; siempre es posible *escalar* los programas, agregando una consideración que haga más útil el simulador, o modificando una función que lo haga más eficiente. Estas tareas también forman parte de la labor futura de este trabajo.

6 Bibliografía

1. Alvarez, O., Gonzalez, C. y Latorre, R. (2002). Counting Channels: A Tutorial Guide On Ion Channel Fluctuation Analysis. *Advan. Physiol. Edu.* 26, 327-341.
2. Aungst, J.L., Heyward, P.M., Puche, A.C., Karnup, S.V., Hayar, A., Szabo, G. y Shipley, M.T. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426, 623-629.
3. Baby, R.E., Cabezas, M. y Walsoe de Reca, E.N. (2000). Electronic nose: a useful tool for monitoring environmental contamination. *Sensors and Actuators B: Chemical* 69, 214-218.
4. Bazhenov, M., Stopfer, M., Rabinovich, M., Abarbanel, H.D.I., Sejnowski, T.J. y Laurent, G. (2001a). Model of Cellular and Network Mechanisms for Odor-Evoked Temporal Patterning in the Locust Antennal Lobe. *Neuron* 30, 569-581.
5. Bazhenov, M., Stopfer, M., Rabinovich, M., Huerta, R., Abarbanel, H.D.I., Sejnowski, T.J. y Laurent, G. (2001b). Model of Transient Oscillatory Synchronization in the Locust Antennal Lobe. *Neuron* 30, 553-567.
6. Benedetti, S., Mannino, S., Sabatini, A.G. y Marcazzan, G.L. (2004). Electronic nose and neural network use for the classification of honey. *Apidologie* 35, 397-402.
7. Bergveld, P. (2003). Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B: Chemical* 88, 1-20.
8. Brezmes, J., Llobet, E., Vilanova, X., Orts, J., Saiz, G. y Correig, X. (2001). Correlation between electronic nose signals and fruit quality indicators on shelf-life measurements with pink lady apples. *Sensors and Actuators B: Chemical* 80, 41-50.
9. Brody, C.D. y Hopfield, J.J. (2003). Simple Networks for Spike-Timing-Based Computation, with Application to Olfactory Processing. *Neuron* 37, 843-852.

10. Brown, S.L., Joseph, J. y Stopfer, M. (2005). Encoding a temporally structured stimulus with a temporally structured neural representation. *Nature Neuroscience* 8, 1568-1576.
11. Buck, L. y Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.
12. Buonviso, N., Amat, C. y Litaudon, P. (2006). Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chemical Senses* 31, 145-154.
13. Cang, J. y Isaacson, J.S. (2003). In vivo whole-cell recording of odor-evoked synaptic transmission in the rat olfactory bulb. *Journal of Neuroscience* 23, 4108-4116.
14. Capone, S., Epifani, M., Quaranta, F., Siciliano, P., Taurino, A. y Vasanelli, L. (2001). Monitoring of rancidity of milk by means of an electronic nose and a dynamic PCA analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* 78, 174-179.
15. Carrasco, A., Saby, C. y Bernadet, P. (1998). Discrimination of Yves Saint Laurent perfumes by an electronic nose. *Flavour and Fragrance Journal* 13, 335-348.
16. De Bruyne, M., Foster, K. y Carlson, J.R. (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* 30, 537-552.
17. Delgado, R. y Bacigalupo, J. (Resultados no publicados).
18. Delgado, R., Saavedra, M.V., Schmachtenberg, O., Sierralta, J. y Bacigalupo, J. (2003). Presence of Ca²⁺-Dependent K⁺ Channels in Chemosensory Cilia Support a Role in Odor Transduction. *J Neurophysiol* 90, 2022-2028.
19. Di Natale, C., Macagnano, A., Martinelli, E., Paolesse, R., D'Arcangelo, G., Roscioni, C., Finazzi-Agro, A. y D'Amico, A. (2003). Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 1209-1218.
20. Di Natale, C., Macagnano, A., Martinelli, E., Paolesse, R., Proietti, E. y D'Amico, A. (2001). The evaluation of quality of post-harvest oranges and apples by means of an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical* 78, 26-31.
21. Dryer, L. y Graziadei, P.P.C. (1994). Mitral cell dendrites: a comparative approach. *Anatomy and Embryology* V189, 91-106.

22. Dutta, R., Kashwan, K.R., Bhuyan, M., Hines, E.L. y Gardner, J.W. (2003). Electronic nose based tea quality standardization. *Neural Networks* 16, 847-853.
23. Eduard, L., Evor, L.H., Julian, W.G. y Stefano, F. (1999). Non-destructive banana ripeness determination using a neural network-based electronic nose. *Measurement Science and Technology* 10, 538.
24. Eeckman, F.H. y Freeman, W.J. (1990). Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. *Brain Research* 528, 238-244.
25. Egana, J.I., Aylwin, M.L. y Maldonado, P.E. (2005). Odor response properties of neighboring mitral/tufted cells in the rat olfactory bulb. *Neuroscience* 134, 1069-1080.
26. Eisthen, H.L. (2002). Why Are Olfactory Systems of Different Animals So Similar? *Brain, Behavior and Evolution* 59, 273-293.
27. Ennis, M., Zhou, F.M., Ciombor, K.J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., Zimmer, L.A., Margolis, F. y Shipley, M.T. (2001). Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *Journal of Neurophysiology* 86, 2986-2997.
28. Freeman, W.J. (1972). Depth recording of averaged evoked potential of olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* 35, 780-796.
29. Friedrich, R.W. (2006). Mechanisms of odor discrimination: Neurophysiological and behavioral approaches. *Trends in Neurosciences* 29, 40-47.
30. Friedrich, R.W. y Korsching, S.I. (1997). Combinatorial and Chemotopic Odorant Coding in the Zebrafish Olfactory Bulb Visualized by Optical Imaging. *Neuron* 18, 737-752.
31. Friedrich, R.W. y Laurent, G. (2001). Dynamic Optimization of Odor Representations by Slow Temporal Patterning of Mitral Cell Activity. *Science* 291, 889-894.
32. Fromherz, P. (2002). Electrical Interfacing of Nerve Cells and Semiconductor Chips. *ChemPhysChem* 3, 276-284.

33. Galan, R.F., Sachse, S., Galizia, C.G. y Herz, A.V.M. (2004). Odor-Driven Attractor Dynamics in the Antennal Lobe Allow for Simple and Rapid Olfactory Pattern Classification. *Neural Comp.* 16, 999-1012.
34. Gardner, J.W., Craven, M., Dow, C. y Hines, E.L. (1998). The prediction of bacteria type and culture growth phase by an electronic nose with a multi-layer perceptron network. *Measurement Science and Technology* 9, 120.
35. Gardner, J.W., Shin, H.W., Hines, E.L. y Dow, C.S. (2000). An electronic nose system for monitoring the quality of potable water. *Sensors and Actuators B: Chemical* 69, 336-341.
36. Getz, W.M. y Lutz, A. (1999). A Neural Network Model of General Olfactory Coding in the Insect Antennal Lobe. *Chem. Senses* 24, 351-372.
37. Giraudet, P., Berthommier, F. y Chaput, M. (2002). Mitral cell temporal response patterns evoked by odor mixtures in the rat olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* 88, 829-838.
38. Haberly, L.B. (2001). Parallel-distributed Processing in Olfactory Cortex: New Insights from Morphological and Physiological Analysis of Neuronal Circuitry. *Chem. Senses* 26, 551-576.
39. Hafeman, D.G., Parce, J.W. y McConnell, H.M. (1988). Light-Addressable Potentiometric Sensor for Biochemical Systems. *Science* 240, 1182-1185.
40. Hai, Z. y Wang, J. (2006). Electronic nose and data analysis for detection of maize oil adulteration in sesame oil. *Sensors and Actuators B: Chemical* 119, 449-455.
41. Hallem, E.A., Dahanukar, A. y Carlson, J.R. (2006). INSECT ODOR AND TASTE RECEPTORS. *Annual Review of Entomology* 51, 113-135.
42. Hallem, E.A., Ho, M.G. y Carlson, J.R. (2004). The Molecular Basis of Odor Coding in the *Drosophila* Antenna. *Cell* 117, 965-979.
43. Hanson, C.W.I.M.D. y Thaler, E.R.M.D. (2005). Electronic Nose Prediction of a Clinical Pneumonia Score: Biosensors and Microbes. *Anesthesiology* 102, 63-68.
44. Harrison, T.A. y Scott, J.W. (1986). Olfactory bulb responses to odor stimulation: analysis of response pattern and intensity relationships. *J Neurophysiol* 56, 1571-1589.

45. Hay, P., Tummon, A., Ogunfile, M., Adebisi, A. y Adefowora, A. (2003). Evaluation of a novel diagnostic test for bacterial vaginosis: 'the electronic nose'. *International Journal of STD & AIDS* 14, 114-118.
46. Hayar, A., Karnup, S., Ennis, M. y Shipley, M.T. (2004). External tufted cells: A major excitatory element that coordinates glomerular activity. *Journal of Neuroscience* 24, 6676-6685.
47. Hopfield, J.J. (1999). Odor space and olfactory processing: Collective algorithms and neural implementation. *PNAS* 96, 12506-12511.
48. Hudewenz, V. (2002). Who nose best? *Global Cosmetic Industry* 170, 34.
49. Illig, K.R. y Haberly, L.B. (2003). Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 457, 361-373.
50. Ismail, A.B.M., Yoshinobu, T., Iwasaki, H., Sugihara, H., Yukimasa, T., Hirata, I. y Iwata, H. (2003). Investigation on light-addressable potentiometric sensor as a possible cell-semiconductor hybrid. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 1509-1514.
51. Jack, J.J.B., Noble, D. y Tsien, R.W. (1975). *Electric current flow in excitable cells* (Oxford Clarendon Press).
52. Johnson, B.A. y Leon, M. (2000). Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. *Journal of Comparative Neurology* 422, 496-509.
53. Jonsson, A., Winqvist, F., Schnurer, J., Sundgren, H. y Lundstrom, I. (1997). Electronic nose for microbial quality classification of grains. *International Journal of Food Microbiology* 35, 187-193.
54. Kashiwadani, H., Sasaki, Y.F., Uchida, N. y Mori, K. (1999). Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* 82, 1786-1792.
55. Kay, L.M. y Stopfer, M. (2006). Information processing in the olfactory systems of insects and vertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17, 433-442.
56. Kleene, S.J. (1997). High-gain, low-noise amplification in olfactory transduction. *Biophysical Journal* 73, 1110-1117.

57. Kleene, S.J. y Gesteland, R.C. (1991a). Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci.* 11, 3624-3629.
58. Kleene, S.J. y Gesteland, R.C. (1991b). Transmembrane currents in frog olfactory cilia. *Journal of Membrane Biology* V120, 75-81.
59. Ko, H.J. y Park, T.H. (2005). Piezoelectric olfactory biosensor: ligand specificity and dose-dependence of an olfactory receptor expressed in a heterologous cell system. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1327-1332.
60. Kodogiannis, V.S., Chountas, P., Pavlou, A., Petrounias, I., Chowdrey, H.S. y Temponi, C. (2002). Electronic nose: clinical diagnosis based on soft computing methodologies. pp. 254-259 vol.251.
61. Kosaka, T. y Kosaka, K. (2004). Neuronal gap junctions between intraglomerular mitral/tufted cell dendrites in the mouse main olfactory bulb. *Neuroscience Research* 49, 373-378.
62. Lam, Y.-W., Cohen, L.B., Wachowiak, M. y Zochowski, M.R. (2000). Odors Elicit Three Different Oscillations in the Turtle Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 20, 749-762.
63. Larsson, H.P., Kleene, S.J. y Lecar, H. (1997). Noise analysis of ion channels in non-space-clamped cables: estimates of channel parameters in olfactory cilia. *Biophysical Journal* 72, 1193-1203.
64. Laurent, G. (1999). A Systems Perspective on Early Olfactory Coding. *Science* 286, 723-728.
65. Laurent, G. y Davidowitz, H. (1994). Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. *Science* 265, 1872-1875.
66. Laurent, G. y Naraghi, M. (1994). Odorant-induced oscillations in the mushroom bodies of the locust. *J. Neurosci.* 14, 2993-3004.
67. Levy, N.S., Bakalyar, H.A. y Reed, R.R. (1991). Signal transduction in olfactory neurons. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 39, 633-637.
68. Lin, Y.-J., Guo, H.-R., Chang, Y.-H., Kao, M.-T., Wang, H.-H. y Hong, R.-I. (2001). Application of the electronic nose for uremia diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical* 76, 177-180.

69. Liu, Q., Cai, H., Xu, Y., Li, Y., Li, R. y Wang, P. (2006). Olfactory cell-based biosensor: A first step towards a neurochip of bioelectronic nose. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 318-322.
70. Lowe, G. y Gold, G.H. (1991). The spatial distributions of odorant sensitivity and odorant-induced currents in salamander olfactory receptor cells. *J Physiol (Lond)* 442, 147-168.
71. Lowe, G. y Gold, G.H. (1993). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* 366, 283-286.
72. Ma, M. y Shepherd, G.M. (2000). Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *PNAS* 97, 12869-12874.
73. MacLeod, K. y Laurent, G. (1996). Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor- encoding neural assemblies. *Science* 274, 976-979.
74. Madrid, R., Delgado, R. y Bacigalupo, J. (2005). Cyclic AMP Cascade Mediates the Inhibitory Odor Response of Isolated Toad Olfactory Receptor Neurons. *J Neurophysiol* 94, 1781-1788.
75. Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. y Buck, L.B. (1999). Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* 96, 713-723.
76. Mazor, O. y Laurent, G. (2005). Transient Dynamics versus Fixed Points in Odor Representations by Locust Antennal Lobe Projection Neurons. *Neuron* 48, 661-673.
77. McGann, J.P., Piñez, N., Gainey, M.A., Muratore, C., Elias, A.S. y Wachowiak, M. (2005). Odorant representations are modulated by intra- but not interglomerular presynaptic inhibition of olfactory sensory neurons. *Neuron* 48, 1039-1053.
78. McKellar, R.C., Rupasinghe, H.P.V., Lu, X. y Knight, K.P. (2005). The electronic nose as a tool for the classification of fruit and grape wines from different Ontario wineries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 2391-2396.
79. Meister, M. y Bonhoeffer, T. (2001). Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *Journal of Neuroscience* 21, 1351-1360.

80. Minamide, T., Mitsubayashi, K. y Saito, H. (2005). Bioelectronic sniffer with monoamine oxidase for methyl mercaptan vapor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 108, 639-645.
81. Mitsubayashi, K., Amagai, H., Watanabe, H. y Nakayama, Y. (2003). Bioelectronic sniffer with a diaphragm flow-cell for acetaldehyde vapor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 95, 303-308.
82. Mitsubayashi, K., Matsunaga, H., Nishio, G., Toda, S. y Nakanishi, Y. (2005). Bioelectronic sniffers for ethanol and acetaldehyde in breath air after drinking. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1573-1579.
83. Mitsubayashi, K., Nakayama, K., Taniguchi, M., Saito, H., Otsuka, K. y Kudo, H. (2006). Bioelectronic sniffer for nicotine using enzyme inhibition. *Analytica Chimica Acta* 573-574, 69-74.
84. Mohamed, E., Bruno, E., Linder, R., Alessandrini, M., Di Girolamo, A., Poppl, S., Puija, A. y De Lorenzo, A. (2003). A novel method for diagnosing chronic rhinosinusitis based on an electronic nose. *An Otorrinolaringol Ibero Am.* 30, 447-457.
85. Mori, K., Mataga, N. y Imamura, K. (1992). Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. *Journal of Neurophysiology* 67, 786-789.
86. Motokizawa, F. (1996). Odor representation and discrimination in mitral/tufted cells of the rat olfactory bulb. *Experimental Brain Research* 112, 24-34.
87. Mustaparta, H. (1990). Chemical information processing in the olfactory system of insects. *Physiol. Rev.* 70, 199-245.
88. Myrick, A.J., Baker, T.C., Park, K.C. y Hetling, J.R. (2005). Bioelectronic Artificial Nose Using Four-Channel Moth Antenna Biopotential Recordings. pp. 313-316.
89. Neher, E. (2001). Molecular biology meets microelectronics. *Nat Biotech* 19, 114-114.
90. Neher, E. y Zingsheim, H.P. (1974). The properties of ionic channels measured by noise analysis in thin lipid membranes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* V351, 61-67.

91. Neville, K.R. y Haberly, L.B. (2003). Beta and Gamma Oscillations in the Olfactory System of the Urethane-Anesthetized Rat. *Journal of Neurophysiology* 90, 3921-3930.
92. Okada, K., Kanzaki, R. y Kawachi, K. (1996). High-speed voltage-sensitive dye imaging of an in vivo insect brain. *Neuroscience Letters* 209, 197-200.
93. Owicki, J.C., Bousse, L.J., Hafeman, D.G., Kirk, G.L., Olson, J.D., Wada, H.G. y Parce, J.W. (1994). The Light-Addressable Potentiometric Sensor: Principles and Biological Applications. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23, 87-114.
94. Park, K.C., Ochieng, S.A., Zhu, J. y Baker, T.C. (2002). Odor Discrimination using Insect Electroantennogram Responses from an Insect Antennal Array. *Chem. Senses* 27, 343-352.
95. Pearce, T.C., Gardner, J.W., Friel, S., Bartlett, P.N. y Blair, N. (1993). Electronic nose for monitoring the flavour of beers. *the analyst* 118, 371-377.
96. Pelz, C., Gerber, B. y Menzel, R. (1997). Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: Roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *Journal of Experimental Biology* 200, 837-847.
97. Perez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G.C., Cassenaer, S., Wilson, R.I. y Laurent, G. (2002). Oscillations and Sparsening of Odor Representations in the Mushroom Body. *Science* 297, 359-365.
98. Pifferi, S., Pascarella, G., Boccaccio, A., Mazzatenta, A., Gustincich, S., Wienini, A. y Zucchelli, S. (2006). Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12929-12934.
99. Reisert, J., Bauer, P.J., Yau, K.-W. y Frings, S. (2003). The Ca-activated Cl Channel and its Control in Rat Olfactory Receptor Neurons. *J. Gen. Physiol.* 122, 349-364.
100. Ringer, S. (1882). Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *Journal of Physiology* 3, 380-393.

101. Rospars, J.-P., Lansky, P., Duchamp, A. y Duchamp-Viret, P. (2003). Relation between stimulus and response in frog olfactory receptor neurons in vivo. *European Journal of Neuroscience* 18, 1135-1154.
102. Rospars, J.-P., Lucas, P. y Coppey, M. (en prensa). Modelling the early steps of transduction in insect olfactory receptor neurons. *Biosystems* in press, Corrected Proof.
103. Ryan, M.A., Homer, M.L., Buehler, M.G., Manatt, K.S., Zee, F. y Graf, J. (1997). Monitoring the air quality in a closed chamber using an Electronic Nose In SAE, International Conference on Environmental Systems, 27th (Lake Tahoe, NV; UNITED STATES).
104. Saevels, S., Lammertyn, J., Berna, A.Z., Veraverbeke, E.A., Di Natale, C. y Nicolai, B.M. (2004). An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life. *Postharvest Biology and Technology* 31, 9-19.
105. Scott, J.W., Wellis, D.P., Riggott, M.J. y Buonviso, N. (1993). Functional organization of the main olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique* 24, 142-156.
106. Schaller, E., Bosset, J.O. y Escher, F. (1999). Practical Experience with 'Electronic Nose' Systems for Monitoring the Quality of Dairy Products. *Chimia* 53, 98-102.
107. Schild, D. y Restrepo, D. (1998). Transduction Mechanisms in Vertebrate Olfactory Receptor Cells. *Physiol. Rev.* 78, 429-466.
108. Schoppa, N.E. y Urban, N.N. (2003). Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends in Neurosciences* 26, 501-506.
109. Schoppa, N.E. y Westbrook, G.L. (2001). Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron* 31, 639-651.
110. Schroth, P., Luth, H., Hummel, H.E., Schutz, S. y Schoning, M.J. (2001). Characterising an insect antenna as a receptor for a biosensor by means of impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* 47, 293-297.
111. Schutz, S., Schoning, M.J., Schroth, P., Malkoc, U., Weibecker, B., Kordos, P., Luth, H. y Hummel, H.E. (2000). An insect-based BioFET as a bioelectronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical* 65, 291-295.

112. Settles, G.S. y Kester, D.A. (2001). Aerodynamic sampling for landmine trace detection. In *Detection and Remediation Technologies for Mines and Minelike Targets VI* (Orlando, FL, USA, SPIE), pp. 890-898.
113. Sinesio, F., Natale, C.D., Quaglia, G.B., Bucarelli, F.M., Moneta, E., Macagnano, A., Paolesse, R. y Amico, A.D. (2000). Use of electronic nose and trained sensory panel in the evaluation of tomato quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 63-71.
114. Sivan, E. y Kopell, N. (2004). From The Cover: Mechanism and circuitry for clustering and fine discrimination of odors in insects. *PNAS* 101, 17861-17866.
115. Spors, H., Wachowiak, M., Cohen, L.B. y Friedrich, R.W. (2006). Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience* 26, 1247-1259.
116. Stein, B., George, M., Gaub, H.E. y Parak, W.J. (2004). Extracellular measurements of averaged ionic currents with the light-addressable potentiometric sensor (LAPS). *Sensors and Actuators B: Chemical* 98, 299-304.
117. Stopfer, M., Jayaraman, V. y Laurent, G. (2003). Intensity versus Identity Coding in an Olfactory System. *Neuron* 39, 991-1004.
118. Sung, J.H., Ko, H.J. y Park, T.H. (2006). Piezoelectric biosensor using olfactory receptor protein expressed in *Escherichia coli*. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 1981-1986.
119. Tanaka, M., Anguri, H., Nonaka, A., Kataoka, K., Nagata, H., Kita, J. y Shizukuishi, S. (2004). Clinical Assessment of Oral Malodor by the Electronic Nose System. *J Dent Res* 83, 317-321.
120. Thaler, E.R., Bruney, F.C., Kennedy, D.W. y Hanson, C.W. (2000). Use of an Electronic Nose to Distinguish Cerebrospinal Fluid From Serum. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126, 71-74.
121. Thaler, E.R.M. (2002). The Diagnostic Utility of an Electronic Nose: Rhinologic Applications. *Laryngoscope* 112, 1533-1542.
122. Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Parent, J.M., Gong, C., Schallert, T. y Miller, G.W. (2006). Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behavioural Brain Research* 172, 97-105.

123. Tuckwell, H.C., Rospars, J.-P., Vermeulen, A. y Lansky, P. (1996). Time-Dependent Solutions for a Cable Model of an Olfactory Receptor Neuron. *Journal of Theoretical Biology* 181, 25-31.
124. Urban, N.N. y Sakmann, B. (2002). Reciprocal intraglomerular excitation and intra- and interglomerular lateral inhibition between mouse olfactory bulb mitral cells. *Journal of Physiology* 542, 355-367.
125. Vassanelli, S. y Fromherz, P. (1998). Transistor records of excitable neurons from rat brain. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* V66, 459-463.
126. Vermeulen, A., Lansky, P., Tuckwell, H. y Rospars, J.-P. (1997). Coding of odour intensity in a sensory neuron. *Biosystems* 40, 203-210.
127. Vermeulen, A. y Rospars, J.-P. (2001). Electrical circuitry of an insect olfactory sensillum. *Neurocomputing* 38-40, 1011-1017.
128. Vermeulen, A., Rospars, J.P., Lansky, P. y Tuckwell, H.C. (1996). Coding of stimulus intensity in an olfactory receptor neuron: Role of neuron spatial extent and passive dendritic backpropagation of action potentials. *Bulletin of Mathematical Biology* 58, 493-512.
129. Vinaixa, M., Vergara, A., Duran, C., Llobet, E., Badia, C., Brezmes, J., Vilanova, X. y Correig, X. (2005). Fast detection of rancidity in potato crisps using e-noses based on mass spectrometry or gas sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 106, 67-75.
130. Wachowiak, M. y Cohen, L.B. (1999). Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. *Journal of Neuroscience* 19, 8808-8817.
131. Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B. y Axel, R. (2003). Two-Photon Calcium Imaging Reveals an Odor-Evoked Map of Activity in the Fly Brain. *Cell* 112, 271-282.
132. Wang, P., Xu, G., Qin, L., Xu, Y., Li, Y. y Li, R. (2005). Cell-based biosensors and its application in biomedicine. *Sensors and Actuators B: Chemical* 108, 576-584.
133. Wehr, M. y Laurent, G. (1996). Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature* 384, 162-166.

134. Wellis, D.P., Scott, J.W. y Harrison, T.A. (1989). Discrimination among odorants by single neurons of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 61, 1161-1177.
135. Wilson, R.I. y Laurent, G. (2005). Role of GABAergic Inhibition in Shaping Odor-Evoked Spatiotemporal Patterns in the *Drosophila* Antennal Lobe. *J. Neurosci.* 25, 9069-9079.
136. Wilson, R.I., Turner, G.C. y Laurent, G. (2004). Transformation of Olfactory Representations in the *Drosophila* Antennal Lobe. *Science* 303, 366-370.
137. Wright, G.A. y Smith, B.H. (2004). Different Thresholds for Detection and Discrimination of Odors in the Honey bee (*Apis mellifera*). *Chem. Senses* 29, 127-135.
138. Xing, C., Mingfu, C., Yi, L., Weijun, H., Ping, W., Kejing, Y. y Hongming, P. (2005). A study of an electronic nose for detection of lung cancer based on a virtual SAW gas sensors array and imaging recognition method. *Measurement Science and Technology* 16, 1535.
139. Xu, G., Ye, X., Qin, L., Xu, Y., Li, Y., Li, R. y Wang, P. (2005). Cell-based biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for single cell monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1757-1763.
140. Yu, H. y Wang, J. (aun no publicado). Discrimination of LongJing green-tea grade by electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical* In Press, Corrected Proof.
141. Yuwono, A.S. y Lammers, P.S. (2004). Odor Pollution in the Environment and the Detection Instrumentation. *Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of Scientific Research and Development* 6.

7 Anexos

En el disco adjunto se incluye una versión digital (formato pdf) de este documento. Además, en la carpeta **programas simulador** se encuentran los archivos con todos los códigos fuente necesarios para ejecutar el simulador desarrollado.