

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

Diseño y construcción de un sistema de estudio in-vivo de poblaciones neuronales utilizando la técnica de fotometría de fibra óptica basado en irradiancia

Tesis que presenta

Alam Iztac Hernández Coss

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Ingeniería Eléctrica

Codirectores de la Tesis:

David Elías Viñas
Ranier Gutiérrez Mendoza

Esta tesis de maestría fue parcialmente financiada por el CONACYT, donativos Fronteras de la Ciencia 63 y Problemas Nacionales 464 y corresponde a un trabajo en conjunto entre el laboratorio 12 de la sección de Bioelectrónica, a cargo del Dr. David Elías Viñas y el laboratorio 36 del departamento de Farmacología, a cargo del Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, ambos en el CINVESTAV Zacatenco.

A los que llegaron antes y a los que vendrán después,
que nuestro trabajo aporte al camino que los conecte.

1.- Resumen del Proyecto

En esta tesis se presenta el proceso de diseño, construcción y pruebas de un sistema para la adquisición de señales lumínicas en tejido vivo mediante el uso de fibra óptica, con el fin de observar señales representativas de la actividad neuronal en animales en libre movimiento que expresen indicadores fluorescentes asociados al flujo de calcio.

2.- Abstract

This thesis presents the design process, implementation and testing of a system for the acquisition of light signals from living tissue using an optic fiber for observing signals representative of the neural activity in freely moving animals expressing fluorescent calcium flux indicators.

Índice

1.-	Resumen del Proyecto	3
2.-	Abstract.....	3
3.-	Introducción.....	5
4.-	Planteamiento del Problema	6
5.-	Objetivos.....	7
6.-	Solución Propuesta	7
7.-	Antecedentes.....	9
7.1.-	Relevancia del Calcio en la Actividad Neuronal	9
7.2.-	Proteínas fluorescentes e indicadores de actividad neuronal	10
7.3.-	Expresión de indicadores de calcio in vivo.....	12
7.4.-	Fotometría de Fibra Óptica como herramienta de investigación	13
7.5.-	Dispositivos comerciales de fotometría	14
8.-	Desarrollo	17
8.1.-	Diagrama a bloques de solución.....	17
8.2.-	Diseño de dispositivos.....	17
8.2.1.-	Muestra fluorescente.....	17
8.2.2.-	Arreglo óptico	21
8.2.3.-	Diseño electrónico	24
8.2.4.-	Software de interfaz	28
8.2.5.-	Diseño de Caja Conductual.....	30
8.3.-	Métodos experimentales.....	31
8.3.1.-	Pruebas de Dilución Viral.....	31
8.3.2.-	Cirugía Estereotáctica de Implantación de Fibra Óptica en Ratones.....	33
8.3.3.-	Inyecciones virales.....	34

9.-	Resultados.....	37
9.1.-	Ensamble terminado del dispositivo de fotometría de fibra.....	37
9.2.-	Caracterización con fluoresceína	38
9.3.-	Medición de cortes histológicos que expresan proteína amarilla fluorescente YFP	42
9.4.-	Construcción de la caja operante.....	43
10.-	Discusión	45
11.-	Conclusiones y Perspectivas.....	46
12.-	Referencias	48
13.-	Apéndices	50

3.- Introducción

El estudio de los mecanismos cerebrales que controlan el comportamiento de los mamíferos requiere del uso de distintas tecnologías que permitan visualizar poblaciones neuronales específicas con alta resolución temporal, durante tareas de libre movimiento, una de estas técnicas, que está siendo de gran relevancia y tiene un avance acelerado en los últimos años es la optogenética. La optogenética consiste en la modificación genética de neuronas con la finalidad de observar su comportamiento natural o de alterarlo mediante estímulos de luz [1]. Para la adquisición de información se utilizan proteínas extraídas de especies bioluminiscentes que son implantadas mediante infecciones virales en las células neuronales a estudiar. Al ser usadas como indicadores de actividad neuronal estas moléculas actúan como marcadores fluorescentes que se expresan en la pared celular, modificando su estructura en presencia de flujos iónicos alrededor de la célula, lo que pone al descubierto una molécula de fluoróforo que emite radiación lumínica en respuesta a estímulos externos de luz [2]. Los potenciales de acción de las neuronas aparecen por flujos de iones a través de

la membrana celular, los indicadores de Ca_{2+} genéticamente modificados reaccionan durante dichos potenciales (también denominados espigas, ya que en cada potencial se incrementa el Ca_{2+} intracelular, ver abajo) y se aumenta la fluorescencia del área infectada, la fluorescencia puede extraerse del cuerpo del animal a través de una fibra óptica implantada y la señal puede adquirirse con un sensor de luz.

A la técnica que engloba la extracción de señales luminosas de animales vivos mediante una fibra óptica, su filtrado y su posterior adquisición se le conoce como fotometría de fibra óptica y su aplicación permite la visualización de la actividad de poblaciones neuronales especificadas genéticamente con una alta resolución temporal y durante periodos de tiempo mayores a los de técnicas como el registro electrofisiológico convencional.

4.- Planteamiento del Problema

El estudio de ensambles neuronales específicos en animales en libre movimiento y realizando tareas implica varios problemas tecnológicos que son solucionados solo parcialmente por las técnicas actualmente utilizadas. El registro electrofisiológico tiene una muy alta resolución espacial y temporal, pero no permite observar poblaciones específicas y no puede realizarse durante varios meses para observar las mismas neuronas por las características de los electrodos, también es altamente sensible a los artefactos eléctricos. La resonancia magnética funcional tiene una menor resolución temporal pero da mayor información de las áreas del cerebro que presentan actividad neuronal durante ciertos procesos, sin embargo, requiere que los animales estén inmovilizados y habitualmente anestesiados, lo que imposibilita el análisis de tareas de libre movimiento y altera inevitablemente la conectividad funcional de sus circuitos neuronales [3]. Con base en estas limitantes se requiere una técnica que permita estudiar poblaciones de neuronas definidas genéticamente, en áreas determinadas del cerebro, mientras los animales están despiertos y que sea inmune a artefactos eléctricos producidos por la activación muscular.

5.- Objetivos

Implementación de una técnica de estudio de poblaciones neuronales mediante la adquisición de la fluorescencia emitida por indicadores de calcio genéticamente codificados.

- Diseño y construcción de la estructura que permita la transmisión hacia fibra óptica de un haz de luz de 450nm y la extracción de señales de fluorescencia de la misma fibra.
- Diseño y construcción de un dispositivo de sensado e instrumentación de las señales de luz emitidas por GCaMP6.
- Implementación de una interfaz de adquisición y visualización de la información obtenida.
- Diseño y construcción de una caja conductual para ratón que permita observar su actividad neuronal durante actividades apetitivas y consumatorias mediante la técnica de fotometría de fibra óptica.

6.- Solución Propuesta

Basado en propuestas de diseño realizadas por el laboratorio de Karl Deisseroth se propone la implantación en el cerebro del ratón por cirugía estereotáxica de una fibra óptica multimodal de 400 μm y apertura numérica de 0.48 fijada al cráneo del animal con una férula de acero inoxidable y acrílico dental, la férula puede acoplarse a otras fibras con “sleeves” de zirconia que las mantienen fijas y alineadas.

La luz obtenida de la fibra acoplada es colimada mediante un objetivo de 40x y el haz dirigido a un cristal dicroico con una longitud de onda de corte de 495 nm. Sobre el dicroico se refleja una luz proveniente de un diodo láser de 450 nm, que excita las moléculas de fluoróforo en el área donde fue implantada la fibra óptica. La fluorescencia de los fluoróforos no es reflejada por el dicroico, pasa por otro filtro óptico pasa-banda para luz verde y se enfoca mediante lentes sobre la superficie de sensado del fotodiodo de avalancha.

La señal del fotodiodo de avalancha se procesa analógicamente y es digitalizada, la información resultante se envía a la interfaz de usuario para ser comparada con el análisis conductual del animal (Fig. 1).

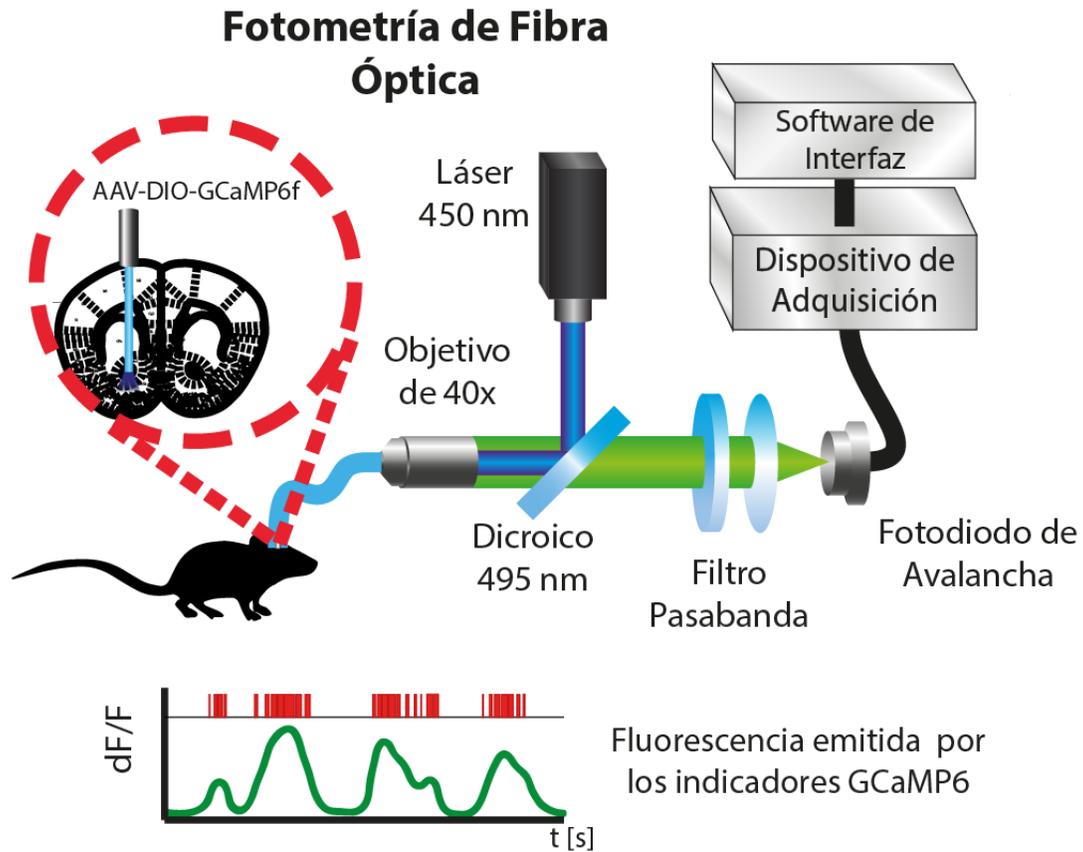


Fig. 1 –Esquema de la fotometría de fibras con el tratamiento óptico de la señal de fluorescencia y los bloques de adquisición e interfaz (Arriba). Comportamiento esperado de la señal de fluorescencia obtenida durante potenciales de acción con líneas rojas (Abajo)

Para realizar los experimentos se requiere un ambiente controlado donde el ratón pueda entrenar y realizar las tareas que serán analizadas, considerando que a lo largo de los experimentos el ratón tendrá una fibra óptica conectada. Existen en el mercado distintas cajas conductuales para estos propósitos, pero sus altos costos, tiempos de importación y limitantes mecánicas (por la fibra) las hacen poco prácticas para este caso, por lo que se opta por fabricar una nueva caja, donde puedan utilizarse los aditamentos de otras cajas (puertos para

bebederos, dispensadores de pellet y palancas retráctiles) y cuya configuración pueda cambiarse con facilidad para montar nuevos experimentos (Fig. 2).

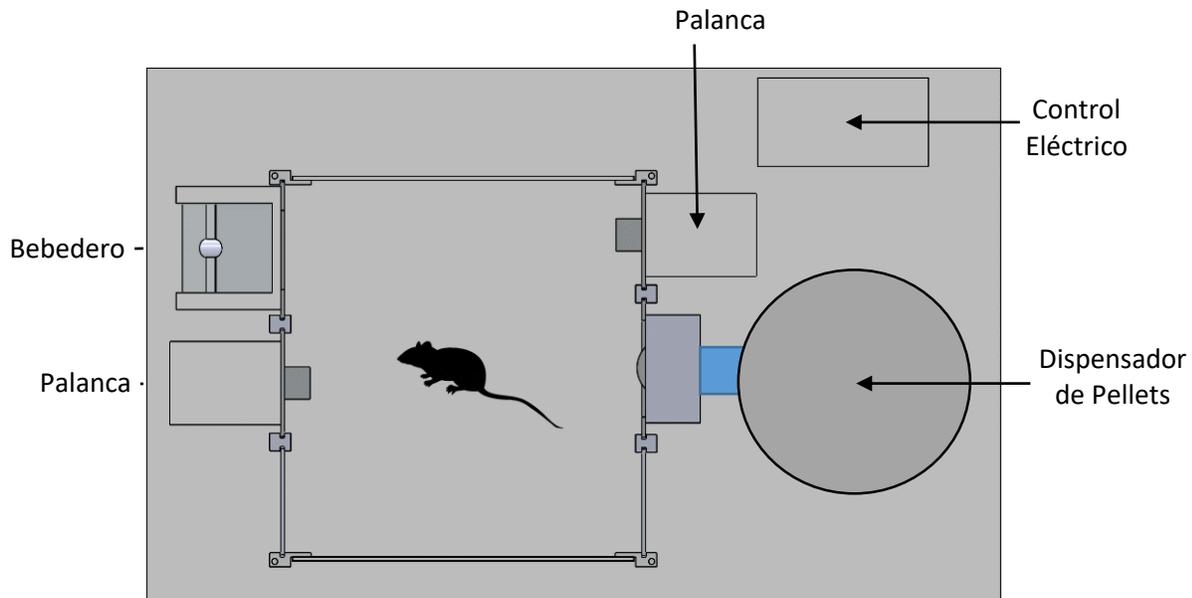


Fig. 2 - Plano superior de caja conductual personalizada

7.- Antecedentes

7.1.- Relevancia del Calcio en la Actividad Neuronal

Las células neuronales de todo tipo utilizan al calcio en funciones clave como la transcripción genética que es un proceso relativamente lento de varias horas de duración, en las terminales presinápticas permite la liberación de las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores, en las terminales postsinápticas es el incremento transiente de calcio en las espinas dendríticas lo que induce la plasticidad neuronal dependiente de actividad. El constante flujo de entrada y salida a través de sus canales y receptores así como el enlace y liberación de calcio a través del cuerpo celular, dendritas, terminales sinápticas y almacenes internos como el retículo endoplásmico determina la concentración total de calcio en la

neurona [4]. Las neuronas de los mamíferos en su estado basal generalmente tienen una concentración de calcio intracelular de alrededor de 100 nano molar, que puede incrementarse hasta 1000 nano molar durante la generación de potenciales de acción [5].

7.2.- Proteínas fluorescentes e indicadores de actividad neuronal

Los cambios en la concentración de calcio en el citosol de la neurona pueden ser detectados cuando proteínas quelantes de calcio u otras moléculas sensibles a calcio conjugadas con un fluoróforo son introducidas en la célula. Cuando estas proteínas o moléculas interactúan con los iones libres de calcio en el interior de la célula modifican su estructura y cambian su luminosidad o fluorescencia. En la actualidad, los indicadores más usados para observar actividad neuronal son los GCaMP, debido a las propiedades cinéticas de esta familia y su capacidad para ser empaquetados en constructos virales o en líneas transgénicas de animales para apuntar a tipos específicos de células in vivo [6].

El desarrollo de los indicadores fluorescentes de calcio GCaMP6 es reportado en la revista Nature el año 2013, por Tsai-Wen Chen, donde afirma que pueden detectar de forma confiable potenciales de acción individuales [2].

El GCaMP6 es un indicador de calcio genéticamente codificado (GECI), como mejora a la proteína originalmente diseñada por Junichi Nakai. Está conformado de una proteína verde fluorescente mejorada (eGFP), calmodulina y M13 que es una secuencia de péptidos de la miosina cadena ligera kinasa, necesaria para la contracción en fibras musculares (Fig. 3). Al unirse con el calcio, la interacción entre la calmodulina y la secuencia M13 causa un cambio conformacional en el complejo lo que lleva a un incremento en la emisión de fluorescencia del eGFP detectable por métodos ópticos.

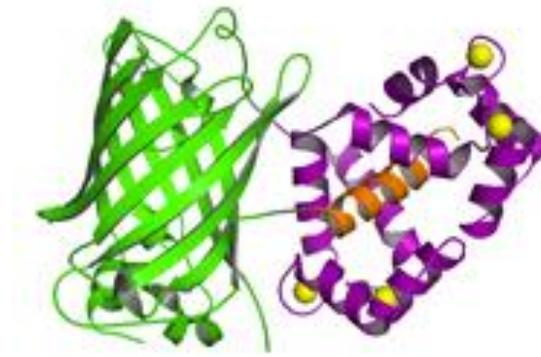


Fig. 3 - Modelo molecular del indicador GCaMP6, adquirido de <https://www.janelia.org/open-science/gcamp>

El modelo de GCaMP6 que es uno de los indicadores más recientes tiene una alta relación señal a ruido y menores tiempos de respuesta y recuperación que las versiones anteriores lo que permite al indicador responder a estímulos de alta frecuencia como son los potenciales de acción individuales [7].

El funcionamiento de los GECI y de otros indicadores de calcio se basa en la detección de cambios de concentraciones citosólicas de iones, para detectarlos necesitan enlazarse con ellos, así que los indicadores están funcionando como buffers exógenos de calcio. Solo por estar presentes están alterando la concentración de calcio y alterando su dinámica intracelular. La medida de la afinidad de estas proteínas hacia el calcio se conoce como constante de disociación K_d . Una constante de disociación baja permite observar cambios más sutiles y de mayor velocidad en las concentraciones de calcio, pero son más susceptibles a ruido, mientras una constante alta tiene una menor resolución temporal pero una mayor relación señal a ruido. El indicador GCaMP6f (fast) es un ejemplo de baja constante de disociación, mientras que el GCaMP6s (slow) tiene un alta constante de disociación, de ahí sus respectivos nombres. Como forma de establecer la eficiencia de los indicadores y las mejoras en su diseño se suelen comparar con las generaciones anteriores registrando su respuesta ante conjuntos de potenciales de acción (AP) (Tabla 1).

Tabla 1 - Características de los Indicadores de Calcio GCaMP6 en comparación con GCaMP3

Indicador	Fluorescencia Basal F ₀ relativa a	Rango Dinámico $\Delta F/F_0$ con 160 AP	SNR, relación señal a ruido con 1 AP
GCaMP3	1	~600	1
GCaMP6s	~0.8	~1700	~11
GCaMP6m	~0.5	~1120	~10
GCaMP6f	~0.7	~1300	~6

7.3.- Expresión de indicadores de calcio in vivo

Con el fin de introducir los indicadores de calcio a los animales en los que se realizarán las mediciones existen dos métodos, mediante un vector viral o mediante líneas transgénicas, ambos métodos tienen sus ventajas y desventajas a considerar con respecto a tiempo de realización, costo y dificultad de implementación.

Los vectores virales son actualmente el método más efectivo para transferir información que modifique las células o tejidos para que expresen distintos genes. Existen distintos tipos de virus que pueden usarse como vectores para este propósito, como los adenovirus (Ad), los retrovirus (γ -retrovirus y lentivirus), los poxvirus, los virus de herpes simplex (HSV) y los virus adenoasociados (AAV) siendo estos últimos los más ampliamente utilizados en las técnicas de imagenología de fluorescencia in vivo.

Los virus AAV provienen de los genus Dependovirus de la familia de los Parvovirus, fueron descubiertos en 1965 como agentes coinfectantes del adenovirus. Los AAV son pequeños y deficientes en su replicación por sí solos, requieren de la asistencia de otro virus como el Ad o el virus de herpes o de algún plásmido para poder replicarse dentro del núcleo de su célula huésped. La cápside, que es el recubrimiento protector de la información del virus es una cápsula icosaédrica de 22 nm de diámetro que cambia de acuerdo al serotipo del virus y le otorgan afinidad con los receptores de distintos tipos de células permitiéndole ser específico

a una variedad de tejidos [8]. Los sufijos numéricos que acompañan a la denominación AAV especifican su serotipo o la combinación de serotipos que posee, los serotipos comerciales suelen ser una combinación del serotipo 2 con cualquiera otro, por lo que se omite añadir el número 2.

El proceso de crear vectores a partir de AAVs inicia con el borrado selectivo de genes que codifican la producción de proteínas Rep y Cap, esto permite la inserción de aproximadamente 5 kb de información de DNA externo. El AAV con la nueva información se acompaña de plásmidos que sustituyen al virus asociado que necesita para replicarse. Para hacer que la célula infectada presente indicadores de calcio, la información que se le inserta al virus contiene todo lo necesario para expresar las proteínas indicadoras y los promotores que lo vuelven específico a cierto tipo de receptores o células [8].

La producción de vectores de AAV requiere de la transfección (introducción de ácidos nucleicos) de células de riñón de embriones humanos (HEK293) con el AAV modificado y uno o dos plásmidos. Estas tareas se realizan a gran escala en instituciones conocidas como “vector cores”, que posteriormente ofrecen y distribuyen los virus para uso en laboratorio.

7.4.- Fotometría de Fibra Óptica como herramienta de investigación

La técnica de fotometría de fibra óptica in vivo fue desarrollada e implementada por primera vez en el laboratorio de Rui Costa para analizar la activación por rutas directas e indirectas del estriado en el 2013 [9]. Un año después se utilizó en la Universidad de Stanford, EEUU, por lo que es una tecnología muy reciente, en desarrollo y con potencial uso en distintas investigaciones en neurociencias, hasta ahora se ha utilizado para el estudio de comportamiento social en ratones [10], para analizar los mecanismos de la saciedad del hipotálamo en ratones [11], para estudiar los circuitos de dopamina en la *Substantia Nigra pars Compacta* [12].

Los sistemas propuestos de fotometría de fibras van desde arreglos de lentes sobre mesas ópticas hasta dispositivos personalizados fabricados por empresas, pero todos comparten los

mismos elementos básicos, la fibra que conecta a la muestra, el espejo dichroico, la estimulación láser y la amplificación de luz.

7.5.- Dispositivos comerciales de fotometría

Tras el auge de dicha tecnología surgieron alternativas comerciales, estos dispositivos presentan un diseño modular con bloques intercambiables de acuerdo a las necesidades experimentales. Los módulos se conectan entre sí mediante fibra óptica, lo que implica una pérdida de la señal adquirida en cada conexión y añade mayor susceptibilidad a artefactos por el movimiento de las fibras (Fig. 4).

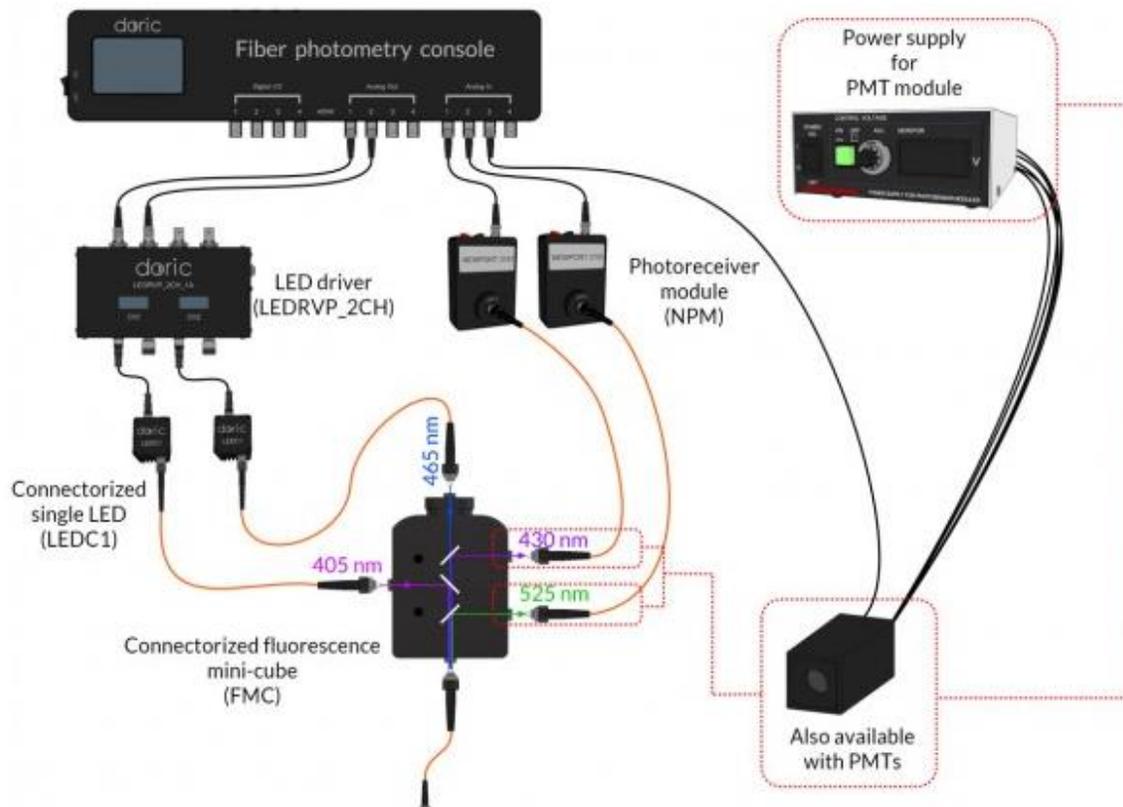


Fig. 4 - Elementos del sistema de fotometría de fibra óptica comercial de Doric Lenses, imagen adquirida de <http://doriclenses.com/life-sciences/315-photometry-systems>

Se adquirió una versión personalizada del sistema mencionado anteriormente optimizado para una estimulación óptica de 473 nm y una lectura de señales proteína verde fluorescente

GFP. Los conectores de fibra óptica son de 400 μm y la señal es amplificada por un módulo de fotodiodo de avalancha alimentado por 12 V. El láser es de 473 nm con una potencia máxima de 70 mW y conexión tipo SMA y la digitalización de la señal se realiza con una tarjeta de adquisición de National Instruments de la familia NiDAQ con conectores BNC.

Para probar la funcionalidad del sistema comercial distribuido por Doric Lenses se realizaron mediciones de fluorescencia in vivo durante la cirugía de implantación de fibra óptica en ratones de la cepa transgénica Thy1-ChR2-eYFP, que expresan canales de Rhodopsina-2 y proteínas amarillas fluorescentes en neuronas genéticamente especificadas. La estimulación láser se mantuvo constante a 500 mA de alimentación (excepto en el Ratón J-1 como se mencionará más adelante) y se midió alrededor de 0.5 mW en la salida de la fibra óptica que se implantaría en el cerebro de los ratones.

Se registró la fluorescencia de 4 sujetos anestesiados con un Xilacina/Ketamina durante una cirugía rutinaria de implantación de fibra óptica de 120 μm de diámetro en el Núcleo Accumbens Shell para consiguientes experimentos de optogenética. La férula se conectó al sistema comercial de fotometría que consistía de un cubo con filtros ópticos, el módulo de fotodiodo de avalancha (APD), el módulo láser/LED de 473 nm, la fuente de corriente controlable del láser, la tarjeta de adquisición y una computadora donde se mostraba una gráfica de la señal de fluorescencia digitalizada (Fig. 5).

Durante las mediciones de fluorescencia del Ratón J-1 se ajustó la fuente de corriente a 900 mA y se encendía solamente por unos segundos para realizar las mediciones cada que la fibra se bajaba 200 μm , haciendo esto el sistema devolvía valores distintos de voltaje para las mismas profundidades y condiciones y la señal decaía rápidamente haciendo muy difícil identificar qué valor tomar, si la luz se mantenía encendida la señal seguía decayendo. Por esto se decidió que en los siguientes tres sujetos se mantendría encendida la estimulación de láser durante toda la sesión a 400 mA para evitar el efecto de blanqueamiento, que sucede en las proteínas fluorescentes cuando son estimuladas con demasiada energía y su función se ve degradada, la medición obtenida de los siguientes tres sujetos fue más estable y congruente y presentaron un súbito aumento de fluorescencia alrededor del milímetro por debajo de

bregma, posiblemente por la densidad de marcadores fluorescentes que tiene esta cepa en la capa 5 de la corteza, donde se encuentran los cuerpos de sus células piramidales.

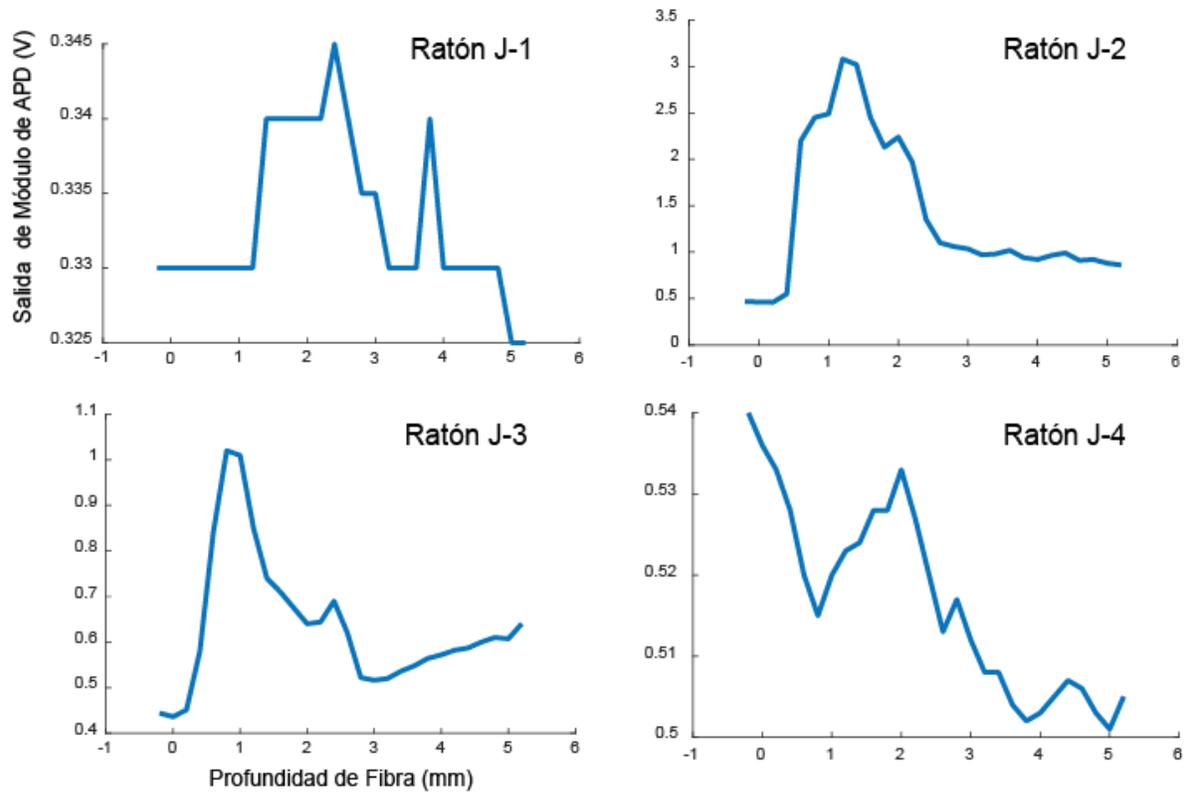


Fig. 5 - Mediciones de fluorescencia obtenidas de ratones Thy1-ChR2-EYFP con sistema comercial de fotometría de Doric Lenses durante cirugía de implantación de fibra óptica a Núcleo Accumbens, las mediciones en el sujeto J-1 se realizaron apagando y encendiendo el láser mientras la fibra se movía

8.- Desarrollo

8.1.- Diagrama a bloques de solución

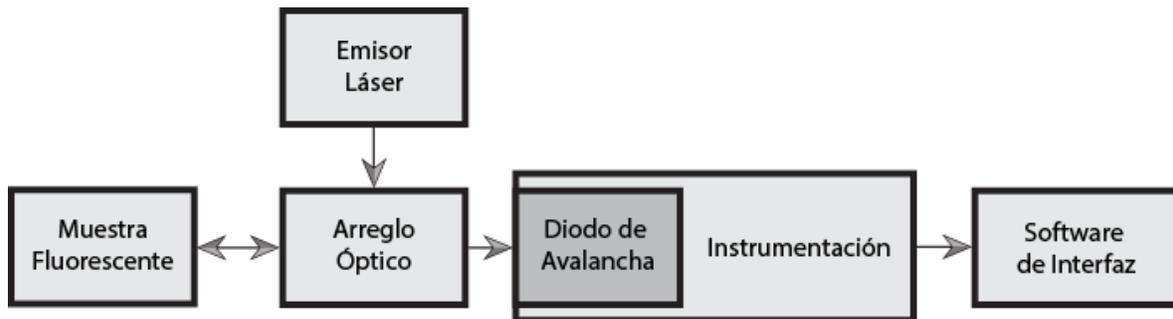


Diagrama 1- Diagrama a bloques de la solución propuesta, para nuestra aplicación la muestra fluorescente es el cerebro del ratón expresando indicadores de calcio.

8.2.- Diseño de dispositivos

El reto del diseño de un sistema funcional de fotometría viene de la variedad de áreas del conocimiento que deben considerarse para su desarrollo, las fibras para implantación deben tener la mayor transmitancia posible pues se está trabajando con una señal óptica muy pequeña y cualquier pérdida de energía resulta costosa, por eso en la cirugía de implantación y en la fabricación de férulas se utilizan técnicas probadas exitosamente en experimentos de optogenética.

8.2.1.- Muestra fluorescente

La configuración del dispositivo le permite la medición de elementos fluorescentes que respondan a una estimulación lumínica de 450 nm y emitan su fluorescencia entre 500 y 555 nm.

La sonda que se implanta consta de una fibra óptica multimodo de 400 μm de diámetro con un índice de apertura numérica de 0.48. Para proteger la fibra, asistir durante la implantación y permitir la conexión posterior hacia el resto del sistema se cubre el borde de la fibra óptica con una férula de zirconia o metal de 2.5 mm, esta férula se adhiere al cráneo del animal y evita que la fibra se desplace o dañe (Fig. 6). La fibra expuesta y la férula se adhieren entre sí con pegamento fotocurable, que los fija lo suficiente para realizar los experimentos, pero permite su separación para reutilizar las férulas en otros implantes. Antes de la implantación se quitan los excedentes de la fibra óptica con una cortadora especializada y se monta la férula en un disco de pulido para pasarlo por lijas gradualmente más finas desde 30 hasta 0.02 μm hasta obtener un acabado espejo. Si en cualquier momento la fibra se dobla demasiado aparecen fracturas en su superficie que se pueden identificar como puntos brillantes al conectar la férula a una fuente de luz, en este caso la fibra se sustituye.

El diámetro mínimo para la fibra óptica utilizable en la implantación depende de la amplificación y la precisión del enfoque del objetivo de microscopio utilizado en el arreglo óptico. Se busca un equilibrio entre el área observable y el daño que el diámetro de la fibra causa inevitablemente en el tejido, por ello se utilizan los 400 μm reportados en otros experimentos de fotometría [9].

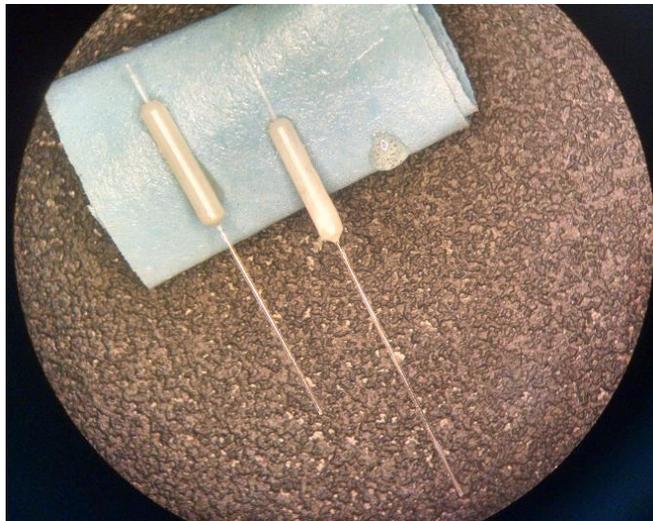


Fig. 6 - Fibra óptica de 400 μm de diámetro unida con adhesivo fotocurable a una férula de zirconia de 2,5 mm en estado previo al corte y pulido

El volumen de tejido neuronal que se estimula y observa depende de las propiedades ópticas de la fibra implantada, la forma del sitio de sensado es un cono con su vértice dentro de la fibra, el ángulo de este cono depende del valor conocido como Apertura Numérica (NA), que equivale al seno del mayor ángulo que puede tener un haz de luz para tener reflectancia interna total en el núcleo de la fibra, un valor mayor de NA significa un cono amplio pues la fibra puede transmitir la luz incidente en su núcleo desde ángulos más grandes (Fig. 7).

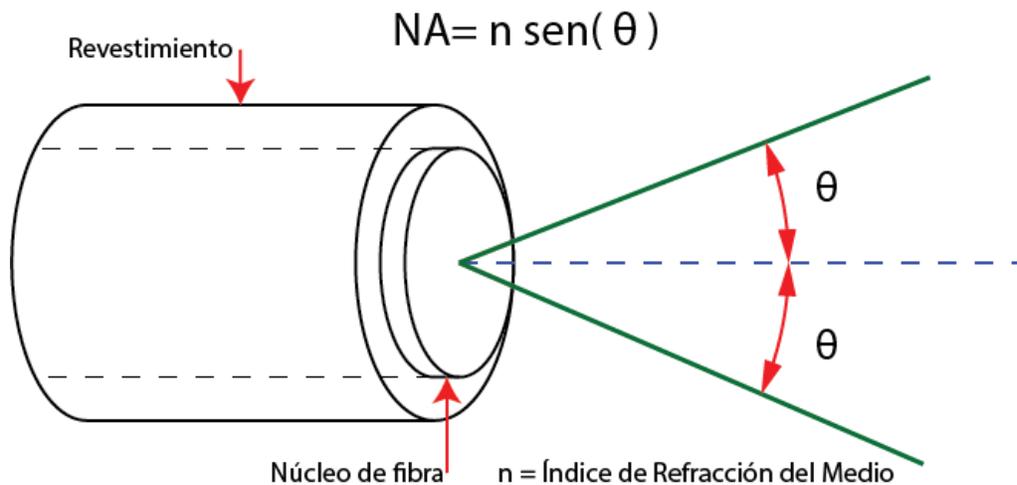


Fig. 7 - La Apertura Numérica está dada por el índice de refracción del medio y el seno del máximo ángulo en que puede incidir luz al núcleo de la fibra y ser transmitido a través de esta.

Si se desea conocer cuál es el alcance que tiene la luz que sale de la punta de la fibra dentro del tejido del cerebro del ratón puede calcularse utilizando la calculadora de irradiancia en el Optogenetics Resource Center de la Universidad de Stanford [13]. Los cálculos de irradiancia obtenidos en esta calculadora se basan en observaciones experimentales en ratones con una estimulación de 473 nm y se necesita conocer el diámetro de la fibra óptica, su valor de NA y la potencia medida en su punta. Se realizaron los cálculos para una fibra de 400 μm , apertura de 0.48 y con una potencia de 0.5 mW a la salida. Cabe mencionar que a mayores longitudes de onda la luz pierde menos irradiancia con la distancia, así que podría esperarse que la luz verde de las proteínas fluorescentes se transmita con menores pérdidas de vuelta hacia la punta de la fibra.

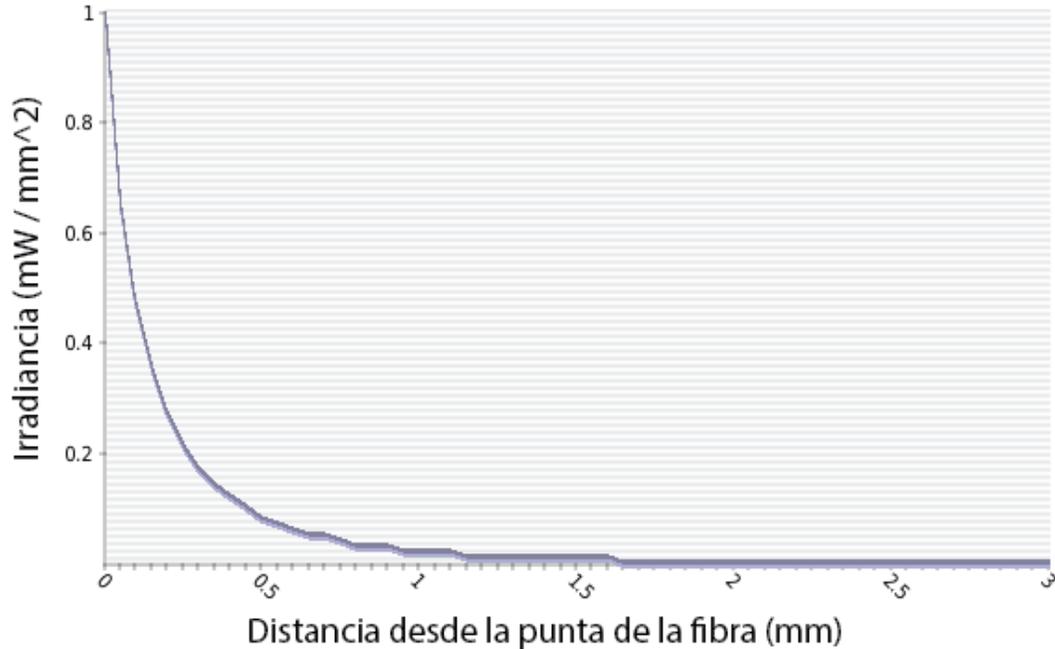


Fig. 8 - Irradiancia con respecto a la distancia de una fibra óptica implantada en tejido cerebral de ratón, para 473 nm, con 0.5 mW medidos en la punta de la fibra y apertura numérica de 0.48

Como se muestra en la Fig. 8, la irradiancia cae rápidamente después de 200 μm y es prácticamente nula después de un milímetro, esta característica, junto con la selectividad genética define la resolución espacial de la técnica de fotometría. El área estimulada y sensada es sensible a la posición de la fibra óptica, aunque no tan sensible como en el registro electrofisiológico donde una neurona detectada un día puede dejar de registrarse al día siguiente por movimientos muy sutiles en el cerebro.

La conexión entre la férula adherida al cráneo y el resto del sistema se logra a través de un segmento de fibra óptica con conectores del estándar FC/PC, que son conectores de fibra óptica con un pulido especial para el contacto físico entre los núcleos de la fibra y resistentes a vibraciones y movimiento del medio de transmisión, esta fibra óptica se utiliza como un canal de dos vías, para la estimulación mediante luz a 450 nm y para el sensado de señales arriba de 500 nm.

8.2.2.- Arreglo óptico

La señal de luz que viene desde la muestra fluorescente necesita aislarse y amplificarse para ser útil, pero al compartir su vía de transmisión con la señal de estimulación se requiere de una etapa óptica de filtrado que las separe.

El bloque de Arreglo Óptico tiene varias funciones, la primera es conectar a la terminal FC/PC que lleva a la muestra, para poder adquirir la máxima cantidad de información de la fibra óptica se utiliza un objetivo para microscopio de 40x, con una WD de 0.65 mm, una pieza cilíndrica con seis tornillos equidistantes permite el ajuste fino del objetivo para enfocar el conector (Fig. 9). La pieza se elaboró en dos mitades iguales para poder realizarse por método de impresión 3D aditiva de plástico ABS, los barrenos circulares pasados permiten el paso de los tornillos y los barrenos cuadrados ciegos tienen tuercas adheridas para servir como cuerdas pues la consistencia de la pieza impresa por este método no permite maquinárselas usando machuelos.

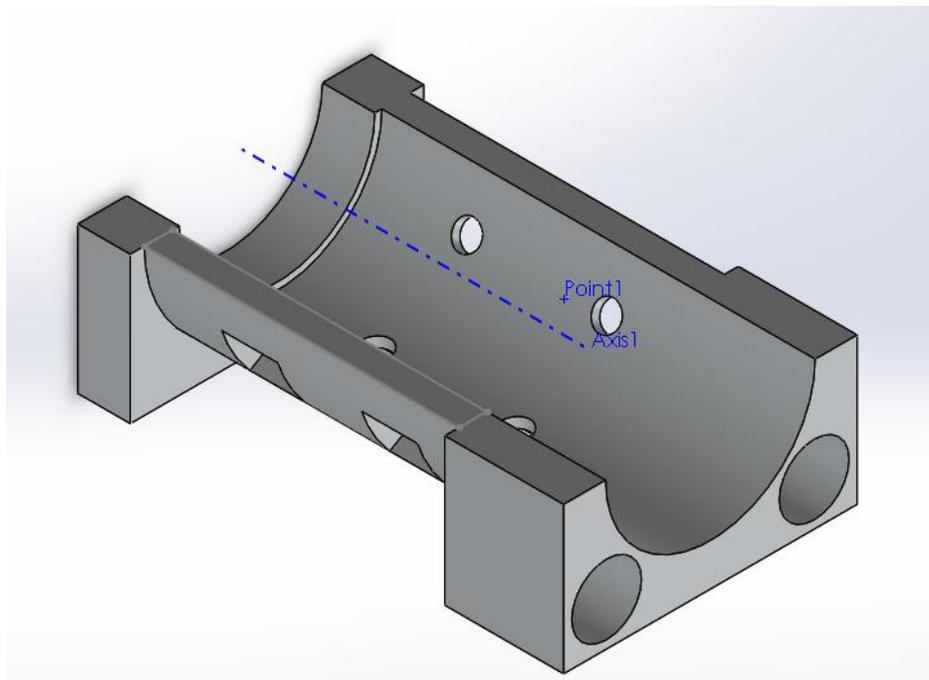


Fig. 9 - Mitad de pieza de ajuste para objetivo de microscopio

La señal de luz a la salida del objetivo de microscopio se transmite hacia un cristal dicroico de 495 nm que funciona de manera análoga a un filtro pasabajas, permitiendo el paso de la luz de mayor longitud de onda que a simple vista es de color verde y amarillo y reflejando la luz de menor longitud de onda, de color azul y morado. El dicroico permite que se utilice una sola línea de fibra óptica para poder estimular con un láser de luz azul y sensar la fluorescencia al mismo tiempo, sin que ambas señales interfieran. El filtro dicroico consta de un sustrato de vidrio con capas delgadas superpuestas de distintos índices de refracción, esta estructura propicia el paso de algunas longitudes de onda y refleja el resto. Los fabricantes de estos filtros proporcionan gráficas con su transmisión a distintas longitudes de onda (Fig. 10).

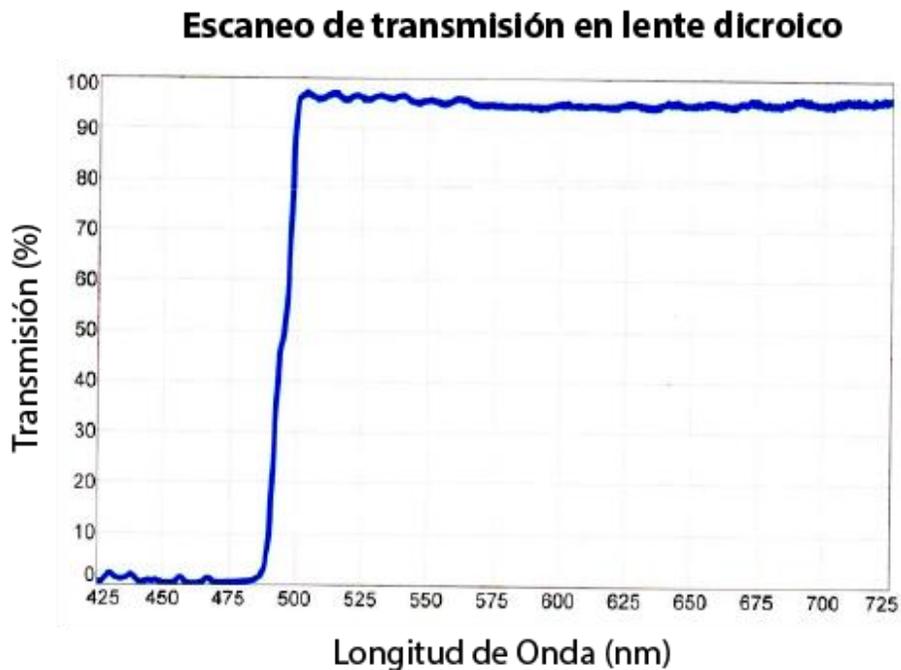


Fig. 10 . Gráfica de la transmisión del filtro dicroico a diferentes longitudes de onda, reportado por Semrock, la empresa que fabrica los filtros

La luz que transmite el dicroico se hace pasar por otro filtro óptico que realiza la función de un filtro pasa-banda, pasando este punto la cantidad de luz azul/morada de la estimulación del LED es prácticamente nula mientras que la luz verde de los indicadores sigue siendo transmitida (Fig. 11).

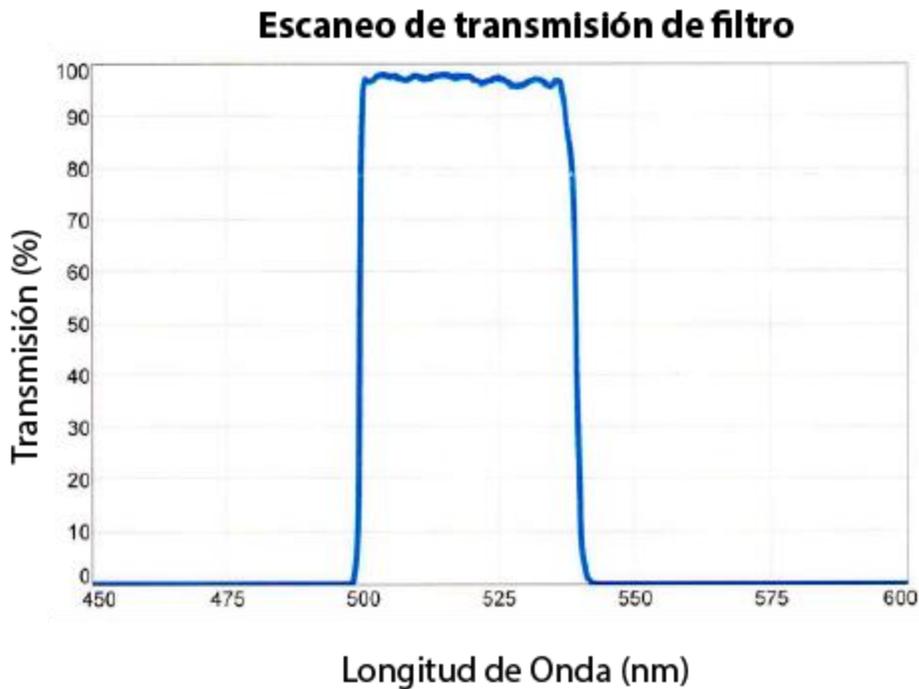


Fig. 11 - Gráfica de la transmisión del filtro de luz de 520/35 nm, reportado por Semrock

Ortogonal a la transmisión de la señal entre la fibra y el sensor se encuentra un diodo emisor de luz (LED) colimada con longitud de onda de 450 nm con una potencia ajustable usado para estimular las proteínas fluorescentes en la muestra. Para modificar la potencia lumínica a la salida se utiliza una fuente de corriente variable.

El láser/LED está conectado a una carcasa que actúa como disipador de calor, protege mecánicamente al diodo, facilita el montaje al resto del dispositivo y permite el desplazamiento del lente de enfoque. Modificando la distancia del lente de enfoque se busca que el haz de luz emitido esté colimado, es decir, que se desplace indefinidamente sin alterar su diámetro y no se disperse (Fig. 12).

La potencia de estimulación del LED se ajusta de acuerdo a la irradiancia que se desea sobre la muestra y se mide en el extremo de la fibra óptica que va implantada en el cerebro del sujeto experimental. La irradiancia es el flujo de energía radiante sobre una unidad de área y sus unidades en el sistema internacional son W/m^2 .

El haz de luz que viaja a través del filtro pasa-banda tiene un diámetro alrededor de 15 mm, mientras que la superficie de sensado del fotodiodo de avalancha (APD) tiene un diámetro de 1 mm, se colocó una última etapa de enfoque mediante un lente biconvexo, con un foco determinado empíricamente a 30 mm de su superficie, donde se fija el APD.

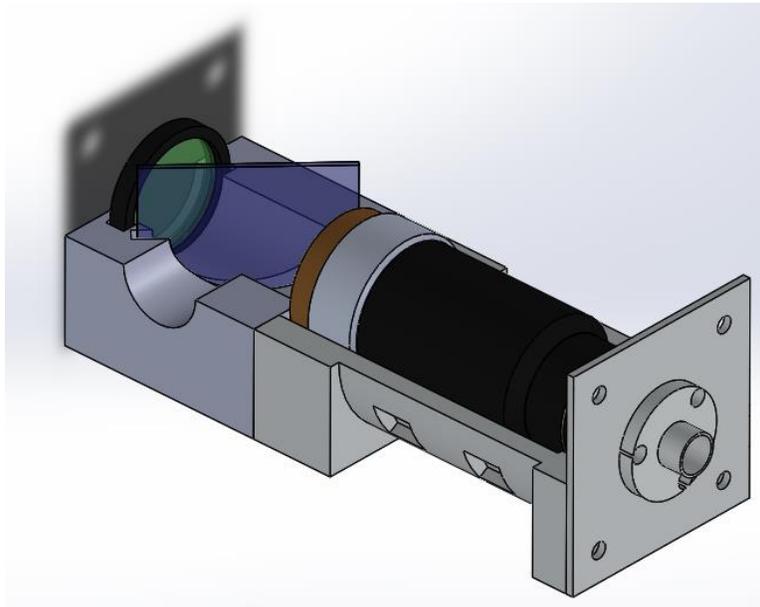


Fig. 12 - Ensamble parcial del Arreglo Óptico, se observa la posición del lente dicróico y el filtro de 520/35 nm

8.2.3.- Diseño electrónico

Tanto el módulo de LED como el controlador e instrumentación del fotodiodo de avalancha son alimentados por una fuente de DC de 12 V a 2 A. El LED es activado con una fuente comercial de corriente constante para compensar el cambio en su resistencia cuando varía su temperatura. El APD es un diodo que opera en polarización inversa, tiene un área con un alto campo electrostático entre su unión *pn* conocida como región de avalancha. Cuando un fotón incide sobre el APD, propicia un desplazamiento de electrones a través de la región de avalancha, donde el campo electrostático los acelera y aumenta su probabilidad de colisionar,

liberando así a otras cargas en un efecto similar a una avalancha y produciendo corrientes elevadas en respuesta a señales lumínicas relativamente pobres, de ahí su nombre. Su funcionamiento es similar a los tubos fotomultiplicadores, pero tiene la ventaja de ser de estado sólido, de menor costo y tamaño.

Los APD funcionan en polarización inversa, al acercarse a su voltaje de ruptura entre 100 y 200 V dependiendo de su estructura. Un mayor voltaje de polarización produce una mayor sensibilidad en el fotodiodo, para alcanzar estos voltajes hay varias soluciones. La más fácil de implementar es convertir directamente la fuente de tensión alterna de 127 Vca a corriente directa con una etapa de rectificación de onda completa, filtrado y regulación, pero esto significaría una conexión extra hacia la línea y una mayor susceptibilidad a las fluctuaciones de voltaje de la misma. Aprovechando que ya hay contemplada en nuestro sistema una fuente de voltaje que alimenta al módulo LED con 12 V puede utilizarse una fuente de DC/DC para aumentar el voltaje de polarización a costa de la corriente utilizable, se eligió utilizar un multiplicador de voltaje por su facilidad de implementación (Fig. 13). El módulo de APD utilizado en este trabajo tiene una respuesta espectral entre 200 y 1000 nm, una fotosensibilidad de 0.42 A/W y un valor típico de corriente oscura de 0.2 hasta 5 nA.

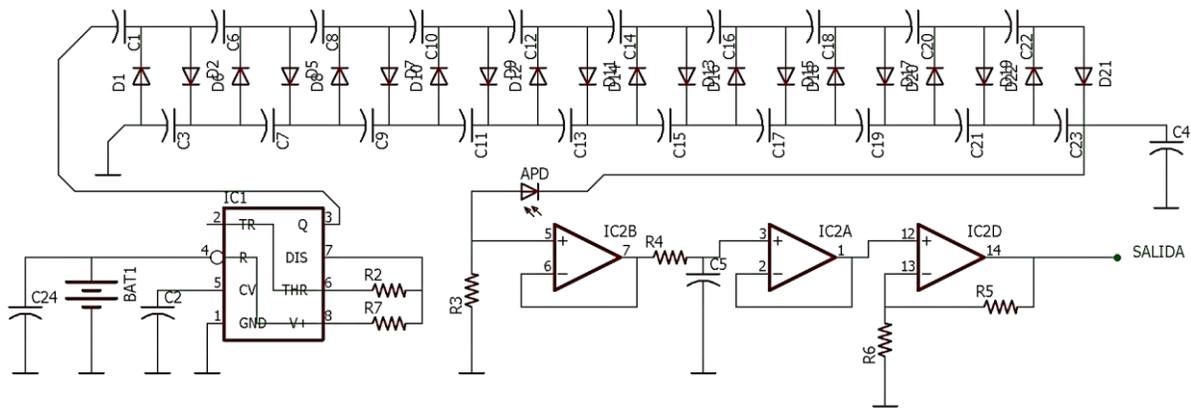


Fig. 13 – Diagrama electrónico del circuito de instrumentación para el fotodiodo de avalancha

Un multiplicador de voltaje convierte una fuente de corriente alterna de bajo voltaje en una fuente de corriente directa de alto voltaje, típicamente con un arreglo de diodos y capacitores, su arreglo más común es el multiplicador de media onda conocido como Cascada de Villard.

En este arreglo a cada mitad del ciclo de AC un diodo propicia la carga de un capacitor mientras otro diodo evita que se descargue, en la otra mitad del ciclo se carga el siguiente capacitor, este conjunto de dos diodos y dos capacitores es una etapa, la diferencia de potencial a la salida del circuito es igual a la tensión RMS de entrada multiplicada por la cantidad de etapas en el multiplicador. La corriente a la salida está limitada por la cantidad de energía que pueden almacenar todos los capacitores en conjunto.

Aunque el multiplicador puede usarse para obtener altos voltajes a la salida los componentes individuales no tienen que estar diseñados para soportar el rango total de voltaje. Cada componente solo soporta las diferencias de voltaje sobre sus propias terminales, que son las mismas de la señal de entrada.

La señal de AC se obtiene con un circuito integrado MC555 en modo de oscilador astable, la salida es una onda cuadrada con una frecuencia y ciclo de trabajo definidos por el valor de los resistores y capacitores usados.

La función que define la frecuencia es:

$$f = \frac{1}{0.693 C(R_1 + 2R_2)}$$

Mientras que los tiempos de encendido y apagado de la onda en segundos están dados por las siguientes ecuaciones:

$$T_1 = 0.693 (R_1 + R_2) C \quad y \quad T_2 = 0.693 (R_2) C$$

Se eligieron los valores de capacitancia y resistencia para tener un ciclo de trabajo de 0.5.

La salida de la cascada de Villard presenta un voltaje de DC de 105 V para la polarización inversa del fotodiodo de avalancha. Cuando el fotodiodo recibe estimulación luminosa permite el paso de corriente del cátodo al ánodo, conectando una resistencia de 1 MΩ en serie puede observarse indirectamente esta corriente a través de la diferencia de potencial en las terminales del resistor. Por efecto de la ley de Ohm, la caída de potencia en el resistor es

equivalente a un millón de veces la corriente que pasa por él, este voltaje se pasa por un seguidor de voltaje para acoplar impedancias y por un filtro activo pasa bajas de primer orden para eliminar el ruido de altas frecuencias que por la cinética de los indicadores de calcio no podría provenir de una señal de fluorescencia.

La salida del filtro pasabajas pasa directamente a un amplificador no inversor que multiplica once veces su voltaje de entrada, esta señal se extrae del dispositivo con un conector hembra BNC para facilitar su conexión a la tarjeta de adquisición. El circuito se dibujó en el software de diseño electrónico Eagle y se fabricó en placa fenólica de una sola cara con componentes de empaquetado *through-hole*, por lo que se muestra la Fig. 14 en modo espejo.

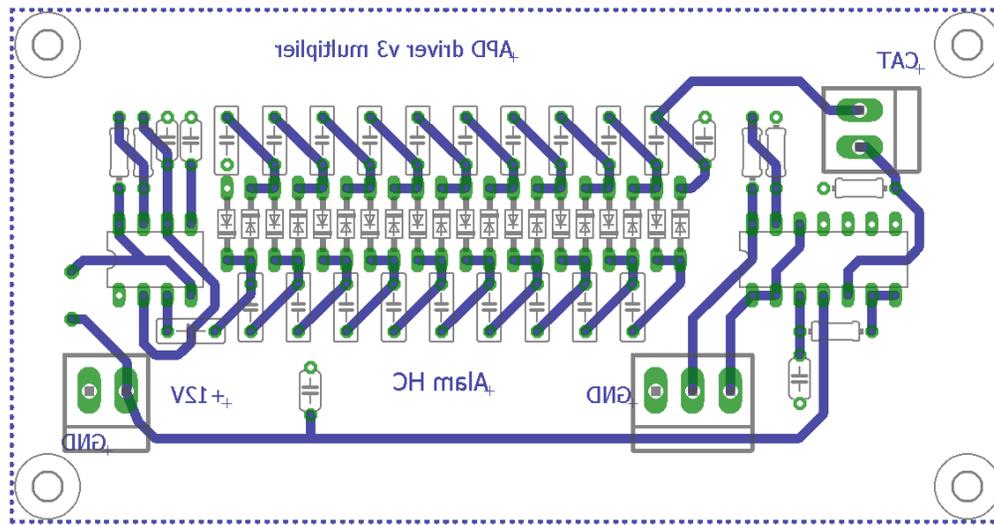


Fig. 14 - La tablilla de circuito impreso (PCB) se imprimió en placa de fenol con cobre por método de tinta fotocurable por UV. Las sección blanca incluye un plano de tierra que conecta a todas las terminales abiertas.

Tanto el circuito de instrumentación del APD como la fuente de corriente del LED de estimulación se alimentan de la misma fuente de voltaje de 12 V, que es una batería sellada de ácido-plomo de 1.2 Ah con una salida a un conector en la caja contenedora para permitir su recarga sin tener que desensamblarlo. Cada circuito tiene un interruptor independiente que

se ilumina para indicar que está encendido y que deben colocarse en la posición de apagado durante los periodos de recarga.

8.2.4.- Software de interfaz

Digitalizar y almacenar la señal de fluorescencia no es suficiente para dilucidar el funcionamiento del circuito que se está analizando. Es necesario sincronizar el reporte de la actividad neuronal con información obtenida del comportamiento de los animales. La información del comportamiento de los animales depende del diseño de la tarea, puede ser su paso por alguna parte de la caja conductual, la entrada de su cabeza a un compartimiento, la activación de una palanca por parte del animal o su lengüeteo en un dispensador de líquidos, todos estos eventos son sensados y convertidos a señales de TTL que son adquiridas junto con la señal de fluorescencia. Para la adquisición de estos eventos se utilizan otros sistemas comerciales que registran sus incidencias en el tiempo, junto al inicio y fin de la tarea. Es la señal de inicio y fin de tarea la que se manda al sistema de fometría para poder sincronizar los otros eventos.

Paralelo al registro de las señales de calcio y los eventos de comportamiento se graban videos de cada sesión experimental, estos videos son analizados para obtener la posición, dirección y velocidad de los animales en cada punto de la tarea, así como su distribución a través del tiempo dentro de la caja conductual.

El programa de interfaz tiene las siguientes funciones

- Visualización en línea de la señal de fometría de fibra.
- Registro una señal digital externa, correspondiente al inicio y término de la tarea para poder sincronizar el resto de los eventos con la fluorescencia.
- Almacenamiento de ambas señales con información de la fecha y hora de adquisición para análisis fuera de línea.

Considerando la disponibilidad de una tarjeta de adquisición de National Instruments, se eligió utilizar la plataforma Labview para el software de interfaz, para simplificar el uso del

sistema de fotometría por parte de los investigadores. La información adquirida se guarda en hojas de datos de formato .xls.

Las señales del sistema se obtienen con una tarjeta de adquisición NI-DAQmx con conexiones BNC con las herramientas de Labview para este propósito. Estas herramientas de programación utilizan un sistema basado en sesiones, cada sesión es un objeto que contiene los parámetros de adquisición como las muestras por segundo, la cantidad de muestras, los límites de voltaje esperados y el tiempo de registro (Fig. 15).

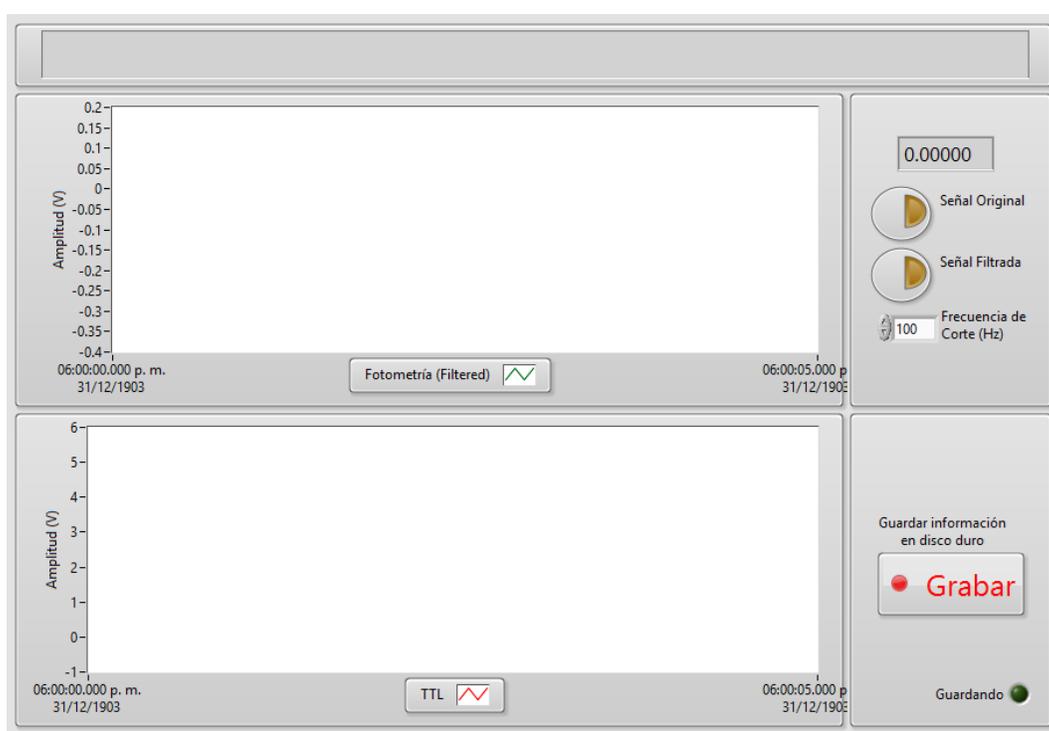


Fig. 15 – Captura de pantalla del software de adquisición, en las dos áreas de gráfica se muestran las señales de fotometría y de TTL respectivamente. Puede activarse o desactivarse el filtro digital y definir su frecuencia de corte. Al presionar Grabar se almacena la información adquirida en un libro de Excel.

Se adquieren dos señales, una del canal analógico y otra de la señal TTL de entrada. La sesión analógica se mantuvo en su configuración por defecto de 1000 muestras por segundo, que es un muestreo suficiente dada la naturaleza de las señales adquiridas. Se ha reportado que los tiempos de respuesta (rise_{20-80}) de los indicadores de calcio GCaMP6 tienen una mediana de

70 ms para la variante *fast* y de 160 ms para la variante *slow*, con tiempos de recuperación (fall_{80-20}) de 400 ms y 900 ms [14]. El rango de medición de la señal analógica se configuró entre 0 y 10 V para aprovechar mejor la señal salida del amplificador operacional alimentado con una sola fuente de 12 V. La resolución del convertidor analógico/digital es de 16 bits.

A la par de la señal de fotometría se adquiere una señal analógica desde una fuente externa de TTL, las muestras de ambas señales están sincronizadas para facilitar su análisis fuera de línea.

8.2.5.- Diseño de Caja Conductual

Los experimentos con ratones en libre movimiento requieren de un espacio confinado en condiciones controladas de luz y ruido. Existen dispositivos comerciales como los fabricados por la empresa Med Associates con módulos intercambiables diseñados para estos fines, se dibujaron las piezas de una caja compatible con las medidas de dichos módulos, posteriormente se maquinaron, ensamblaron y se probó para entrenar animales (Fig. 16).

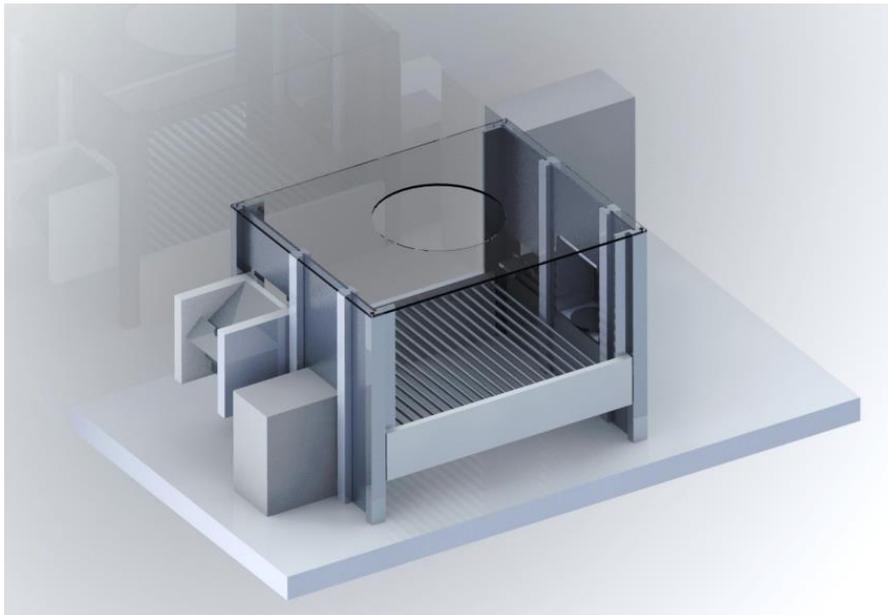


Fig. 16 – Dibujo asistido por computadora de las piezas necesarias para ensamblar la caja conductual personalizada

8.3.- Métodos experimentales

8.3.1.- Pruebas de Dilución Viral

Cuando se distribuye un vector viral, se acompaña de una hoja de especificaciones donde se especifica el “*Titer*” o título viral que corresponde con la cantidad de unidades virales por volumen o la cantidad de unidades formadoras de placa por volumen, pero este índice no es una medida confiable de la eficiencia del virus una vez introducido en el tejido a observar, es por eso que cada nuevo lote de virus debe someterse a una prueba de dilución viral que consta de los siguientes pasos:

1. Obtener alícuotas del material viral original del mínimo volumen necesario para cada sesión experimental, por ejemplo 5 μ l y mantenerlas en tubos de PCR a -60 °C, evitando que pasen por varios ciclos de congelación y descongelación, pues esto puede afectar negativamente la infectividad del virus.
2. Extraer una alícuota, descongelar sobre hielo y preparar distintas soluciones en salina en distintas proporciones: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, las cuáles serán inyectadas todas en distintos animales de la misma cepa en un área previamente determinada por sus coordenadas con respecto a bregma.
3. Realizar una craneotomía mediante cirugía estereotáxica en las mismas coordenadas laterales y anteroposteriores sobre el sitio en el cerebro que desea infectarse y retirar la dura para evitar obstrucciones en la aguja.
4. Cargar la aguja con el volumen de dilución a inyectar, usualmente entre 100 y 500 nl dependiendo del volumen de la zona que se desea infectar.
5. Introducir la aguja a través de la apertura de la craneotomía y bajarla en el eje dorso-ventral hasta posicionarla sobre el sitio de infección.
6. Inyectar lentamente, a una velocidad alrededor de 40 nl por minuto y después dejar la aguja inmóvil entre 5 o 7 minutos para que la dilución sea absorbida por el tejido circundante y evitar que siga la ruta de la aguja al retraerse.

7. Limpiar la craneotomía y sellar con gelfoam o adhesivo compatible y luego suturar la piel.
8. Inyectar al sujeto con las dosis de anti-inflamatorios y analgésicos apropiados a su peso.
9. Repetir la operación para cada una de las proporciones de dilución en los mismos sitios en distintos animales.
10. Después de 2 a 3 semanas sacrificar a todos los sujetos, perfundirlos y observar por microscopía confocal los niveles de fluorescencia en cada uno. Elegir la mayor dilución que infecte todo el sitio de interés sin presentar sobre-expresión. En el caso de los indicadores GCaMP6, las neuronas sobre-expresadas tienen altos niveles fluorescencia y se observan como puntos brillantes, mientras que un buen nivel de expresión se observa como un halo fluorescente solo en las paredes celulares [15].

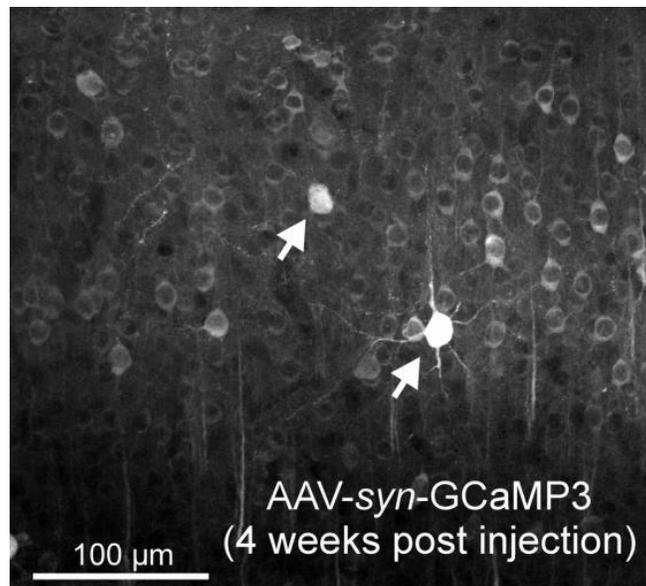


Fig. 17 - Niveles estables de expresión en un ratón Ai38 infectado con AAV-syn-GCaMP3 cuatro semanas después de ser inyectado, las flechas apuntan a dos células que presentan sobre-expresión (Zariwala, 2012)

Una vez establecida la mejor proporción para la dilución dado el tiempo en que el animal fue sacrificado se puede utilizar para inyectar al resto de los animales y puede planearse la cirugía

de implantación de fibra óptica de forma que al recuperarse presenten una expresión óptima de los indicadores de calcio (Fig. 17).

8.3.2.- Cirugía Estereotáxica de Implantación de Fibra Óptica en Ratones

El procedimiento de fotometría de fibra óptica requiere la implantación de las fibras al sitio de interés en el cerebro del sujeto, esto se realiza por medio de cirugía estereotáxica, la cual consiste a grandes rasgos de los siguientes pasos:

1. Se anestesia al ratón con una inyección intraperitoneal de un coctel de ketamina/xylacina en proporción a su peso. En general, es apropiada una dosis de 20 $\mu\text{l/g}$ con base en su peso corporal, sin embargo, algunos ratones pueden presentar mayor sensibilidad al anestésico según su cepa, edad o cantidad de adipocitos. El volumen total de la inyección debe limitarse a 750 μl para evitar incomodidad en los animales. Se considera que el animal está correctamente anestesiado cuando no presenta reflejos a punzadas en las patas y en la cola, esto puede tomar arriba de tres minutos en suceder y una vez anestesiado el efecto puede durar arriba de 45 minutos, si el animal no estuvo sometido a mucho estrés antes y durante la inyección. Posterior a esto se remueve el pelo del área a trabajar con una rasuradora y se limpia la piel con iodo. Los ojos se mantienen abiertos durante el procedimiento así que deben recubrirse con un ungüento o gel humectante.
2. El sujeto se monta en el dispositivo estereotáxico, que es un posicionador cartesiano de tres ejes, anteroposterior, lateral y dorso-ventral. Se colocan los incisivos superiores del ratón sobre una barra adaptada para recibirlos y se fija su nariz con una pinza. Un par de piezas de plástico conocidas como lápices se presionan contra la parte más rostral de los huesos temporales del ratón, cerca de los meatos auditivos externos y se fijan para termina asegurar que el cráneo no se mueva durante el resto del procedimiento, los puntos lambda y bregma del cráneo deben estar a la misma altura.

3. Se inyecta lidocaína entre el cráneo y la piel y se deja que se absorba unos segundos. La piel sobre el cráneo se abre con una incisión de bisturí en el eje longitudinal o levantando la piel con fórceps y cortando con tijeras y se raspa el tejido del cráneo.
4. Con un cortador se realiza la craneotomía sobre el sitio donde se implantará la fibra, desbastando el hueso del cráneo mientras se limpia con solución salina para evitar el sobrecalentamiento de la corteza. Puede o no removerse la dura madre, según la naturaleza del implante.
5. En el brazo manipulador del estereotáxico se sujeta la fibra óptica acoplada a una férula metálica o de zirconia, se alinea paralela al eje dorso-ventral y se referencia al punto bregma del cráneo que es la intersección entre la sutura coronal y la sutura sagital. A partir de bregma se toman las coordenadas laterales y anteroposteriores y se coloca la fibra sobre la craneotomía realizada previamente. La fibra se hace bajar en dirección ventral hasta estar sobre el sitio de interés en el cerebro, lentamente para evitar lesionar demasiado y permitir que el cerebro se reacomode alrededor de la fibra.
6. Se sella la craneotomía con pegamento de curado rápido y se fija la férula al cráneo con algún otro adhesivo como el acrílico de uso dental evitando así que la fibra se mueva o caiga por los movimientos naturales del ratón pero teniendo cuidado de no cubrir del todo la férula, pues es el único medio de conexión con la fibra implantada.
7. El ratón se desmonta del estereotáxico, se le administra una dosis de anti-inflamatorio y analgésico y se coloca en su caja hogar bajo condiciones controladas de temperatura para su recuperación, que suele ocurrir en una semana.

Una vez que el ratón está recuperado de la cirugía se puede conectar mediante una manga de zirconia (*sleeve*) a otra férula con fibra óptica y hacia el sistema de fotometría de fibra.

8.3.3.- Inyecciones virales

El éxito en la medición de actividad neuronal mediante la técnica de fotometría de fibra óptica depende en gran medida de la correcta expresión de los indicadores de calcio en el cerebro

de los animales, los laboratorios que producen y distribuyen los vectores virales especifican el título de cada lote, esto es, la cantidad de unidades virales por mililitro, pero no es suficiente información para decidir en qué concentración, volumen y sitio del cerebro debe inyectarse el vector o si va a tener el mismo comportamiento entre distintas especies, tampoco se sabe por cuánto tiempo pudo descongelarse durante su importación al país, esta es la importancia de la prueba de dilución.

Se realizó una prueba de dilución para un vector viral AAV5.CamKII.GCaMP6f.WPRE.SV4 con un título físico reportado de 1.232×10^{13} GC/ml (copias genómicas por mililitro) distribuido en un vial de 0.1 ml.

La prueba fue realizada en 8 ratones silvestres de la cepa C57 y 8 ratas de la cepa Sprague Dawley, cada animal se sometió a cirugía estereotáxica para inyectarle 500 nl de dilución viral en cada uno de los tres sitios de interés, las medidas siguientes son en milímetros para ratones, con el punto anatómico bregma del cráneo como coordenada cero:

- Nucleus Accumbens Shell, con coordenadas 1.2 AP (anteroposterior), 1.0 ML (medial lateral) y -5.1 DV (dorsoventral)
- Corteza Orbitofrontal (2.6 AP, 1.3 ML, -2.5 DV)
- Corteza Insular (1.4 AP, 3.3 ML, -3 DV)

Las inyecciones son todas en el hemisferio derecho y se repartieron cuatro diluciones entre ambas especies, resultando en 2 ratones y 2 ratas por cada dilución (Fig. 18).

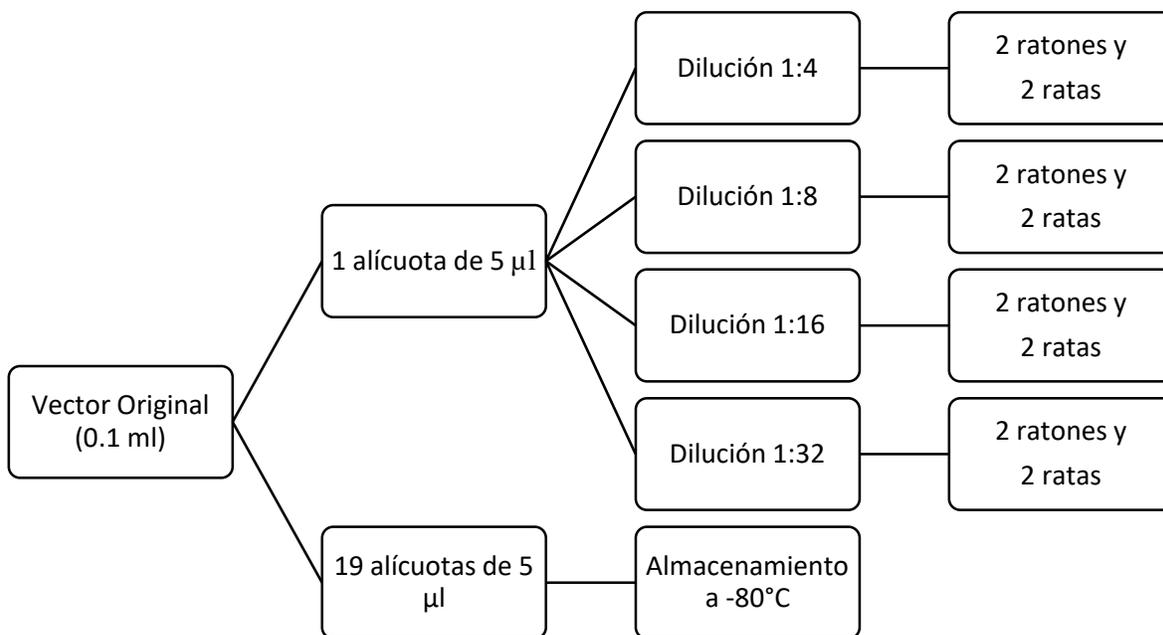


Fig. 18 - Distribución del vector original al realizar las alícuotas, formar diluciones en las cuatro proporciones distintas e inyectar a los animales durante las pruebas de dilución.

Todas las inyecciones se realizaron en un lapso de diez horas, con excepción de uno de los ratones de dilución 1:4 que no sobrevivió a la cirugía y fue sustituido por uno inyectado al siguiente día. Los animales se sacrificaron un mes después de ser inyectados y sus cerebros preparados y extraídos para el análisis histológico. Para cada especie se eligió la dilución con una mejor expresión de proteínas fluorescentes para ser utilizada con las siguientes alícuotas. Los dos criterios principales en la elección de la dilución son la expresión focalizada de GCaMP6, es decir que no infecte más allá del sitio a analizar debajo del punto de inyección y la correcta expresión de la proteína fluorescente sobre la pared celular, esta debe verse como un halo y no como una mancha pues lo segundo indica que se ha sobreexpresado y dificultaría la extracción de información por fotometría.

9.- Resultados

9.1.- Ensamble terminado del dispositivo de fotometría de fibra

El ensamble óptico, el control electrónico y la batería sellada de ácido-plomo se fijaron sobre una placa de acrílico y ahí se realizaron los últimos ajustes de enfoque que maximizaran la transmisión del láser en la punta de la fibra óptica y la cantidad de luz enfocada en el área efectiva de 1mm^2 del fotodiodo de avalancha, este arreglo se montó en la parte inferior de la carcasa (Fig. 19).

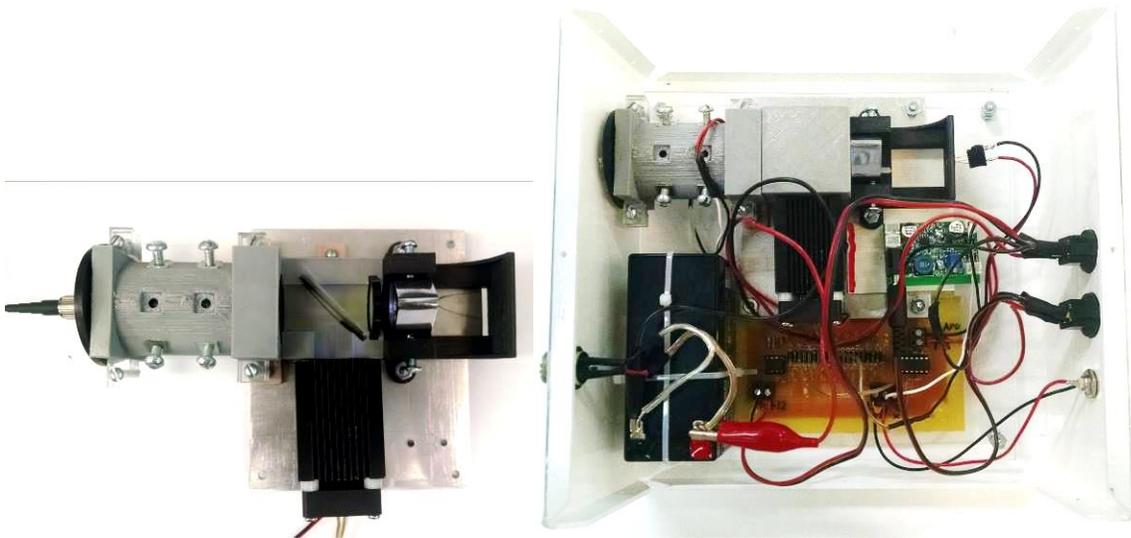


Fig. 19 –Ensamble óptico sin cubiertas para mostrar la posición de los filtros dicroico y pasa-banda, seguidos a la derecha del lente de enfoque y el soporte para el fotodiodo de avalancha (Izquierda) y ensamble óptico con el fotodiodo de avalancha, la fuente de corriente, el circuito de instrumentación del APD, la batería de alimentación y los interruptores montados en la base de la carcasa (Derecha).

La carcasa se construyó de láminas flexibles de PMMA de 2.8 mm de espesor pintadas con pintura acrílica blanca por dentro para hacerlas opacas, en la base se colocaron los interruptores y todas las conexiones, para facilitar su mantenimiento o reemplazo (Fig. 20).



Fig. 20- Fotografía del dispositivo terminado, se observa la salida por conector BNC y los interruptores de encendido para la estimulación láser y el circuito de amplificación del fotodiodo de avalancha (Izquierda) y parte trasera de la carcasa, con el conector tipo FC para fibra óptica y el conector para la carga de la batería.

9.2.- Caracterización con fluoresceína

Para probar el sistema de fotometría se necesitaba medir una fuente variable de fluorescencia con un comportamiento similar al esperado de las proteínas de GCaMP6. La sal de fluoresceína de sodio es un fluoróforo soluble en agua con un pico de excitación con luz de 460 nm y un pico de emisión a 515 nm.

La fluoresceína se diluyó en valores entre 1 mM y 6.2 μ M, 0 la fluorescencia de nueve soluciones de 1 ml se midió dentro de tubos de PCR negros de 1.5 ml para evitar interferencia de fuentes externas de luz. La señal se adquirió con la tarjeta NI-DAQmx en 2000 muestras por cada concentración durante 4 segundos y se calculó su valor promedio. Las primeras

cuatro muestras son diluciones en base 10 (6.2, 62.5, 625 y 6250 μM), para observar cómo se comporta el dispositivo a bajas concentraciones, las siguientes cinco diluciones son base 2 (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mM) para observar el comportamiento para altos niveles de fluorescencia (Fig. 21).

El valor de fluorescencia basal se obtuvo midiendo la punta de la fibra en un contenedor oscuro de paredes negras opacas. Su valor es distinto a cero porque la fibra óptica tiene propiedades internas de autofluorescencia inherentes a su estructura y porque el fotodiodo de avalancha deja pasar una corriente de oscuridad al ser polarizado inversamente, aún en ausencia total de luz.

Las mediciones se realizaron en un cuarto oscuro, sin fuentes artificiales ni naturales de luz visible, sumergiendo ligeramente la punta de la fibra óptica en el centro del tubo de PCR con cada solución durante cuatro segundos. Se midió desde la menor concentración hasta la mayor limpiando la punta de la fibra con agua destilada entre cada inmersión y secándola antes de pasar a la siguiente. El dispositivo en esta etapa aún no tenía una carcasa opaca, por lo que se debían hacer las pruebas en cuartos oscuros.

La sonda de fibra óptica utilizada para las mediciones es de 400 μm de diámetro con 0.48 de apertura numérica, en una terminación tiene una férula de 2.5 mm que es la que se sumerge en la solución y en otro tiene un conector FCM que se conecta al aparato.

La estimulación láser se mantuvo encendida durante todas las mediciones y fue calibrada a 1 mW en la punta de la fibra óptica.

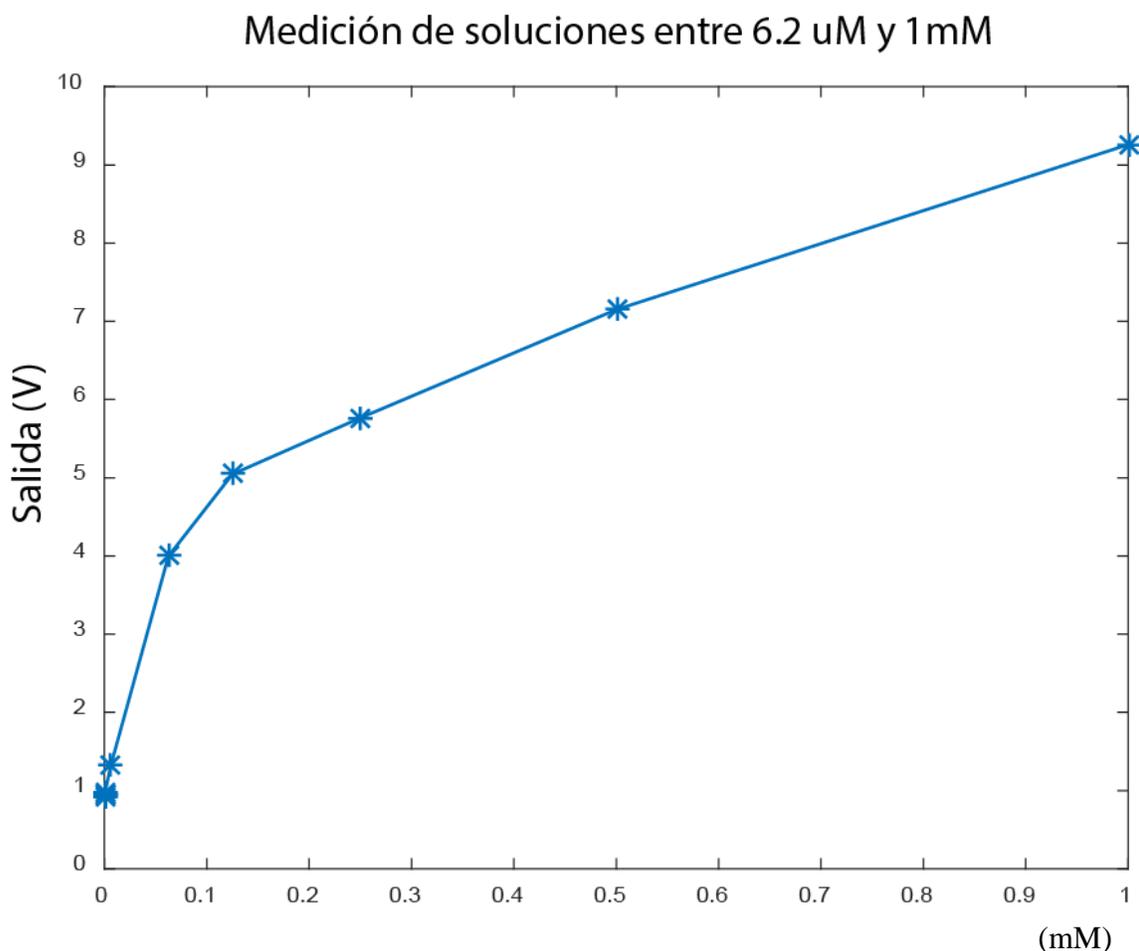


Fig. 21 – Fluorescencia medida con el sistema de fotometría de fibra sin carcasa opaca en oscuridad total y en soluciones de fluoresceína con nueve concentraciones entre 6 μ M y 1 mM, a la izquierda se ven las 10 medidas, a la derecha se muestran solo las primeras cinco

La señal de fluorescencia para altas concentraciones dejó de comportarse linealmente, lo que dificulta evaluar si esto es por saturación en las soluciones, por un artefacto del dispositivo o por inconsistencia durante las mediciones. Para descartar que se tratara de un efecto de saturación en la solución se realizaron nuevas concentraciones, considerablemente más bajas, lo que también ayudó a determinar cuál la mínima concentración detectable. El procedimiento de medición se realizó sobre una gradilla para tubos de PCR, sujetando la fibra perpendicular a los tubos abiertos e introduciéndola con la ayuda de un marco estereotáxico. En estas pruebas se utilizó la interfaz programada en Labview y se mantuvo corriendo durante todo el experimento, se ajustó un filtro digital pasabajos tipo butterworth de segundo

orden con frecuencia de corte de 10 Hz para observar solo los cambios de baja frecuencia y poder registrarlos más fácilmente. Las concentraciones y los valores filtrados se muestran en la Tabla 2, mientras que la gráfica de concentración contra voltaje se observa en la Fig. 22.

Solución	Concentración (μM)	Salida (mV)
1	10	878
2	8	872
3	6	867.4
4	4	859.5
5	2	852
6	1	848.8
7	0.5	848.2
8	0.1	847
9	0.05	846.2
10	0 (Agua Destilada)	845

Tabla 2 – Salida en mV del dispositivo terminado para distintas concentraciones de fluoresceína de sodio medidas usando el marco estereotáxico

Se observaron cambios evidentes en la señal de fotometría en el software de interfaz al introducir la fibra en la superficie de cada una de las muestras, para tomar las medidas se tomó el valor máximo de voltaje que se presentó posterior a la inmersión.

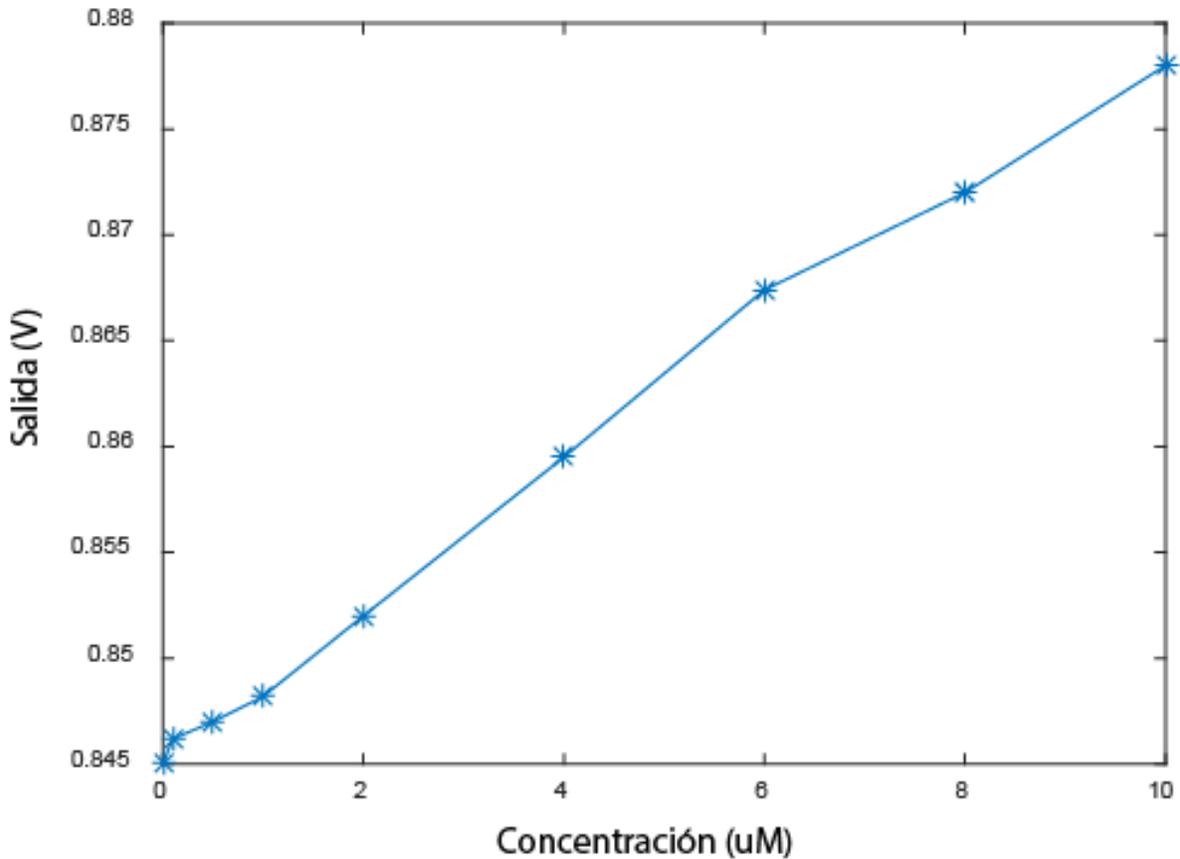


Fig. 22 – Las mediciones de la tabla 2 graficadas en voltaje (V) contra concentración (μM), un valor de concentración 0 se refiere a agua destilada sin fluoresceína.

9.3.- Medición de cortes histológicos que expresan proteína amarilla fluorescente YFP

Medir distintas concentraciones de fluoresceína es útil para comprender el funcionamiento del sistema a distintas intensidades de luz, pero no necesariamente significa que será útil para observar la fluorescencia en tejido vivo, para este fin se utilizaron cortes histológicos de cerebros de ratones que expresaban proteínas amarillas fluorescentes y proteínas de channelrhodopsin-2 en células nerviosas genéticamente definidas mediante el promotor Thy1 [16]. Las proteínas de YFP tienen una máxima excitación entre 495 y 510 nm y una máxima

emisión entre 520 y 550 nm, pero aun así pueden ser excitadas a 450 nm y ser observadas por el sistema diseñado (Fig. 23).

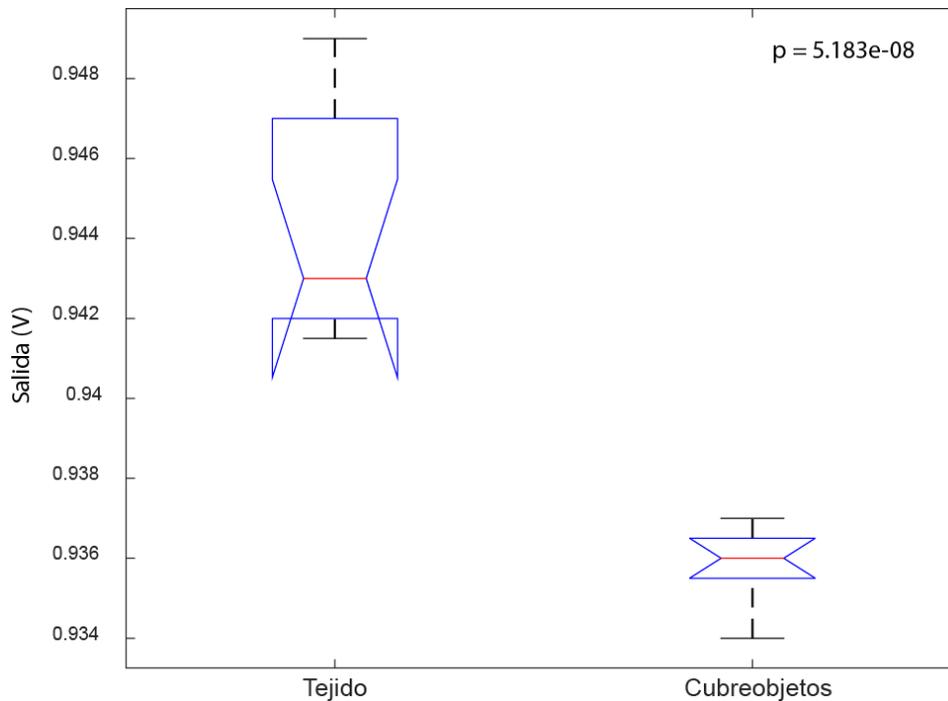


Fig. 23 - Diagrama de caja de las mediciones de fluorescencia obtenidas de cortes histológicos, comparando la medición en tejido con la medición sobre el cubreobjetos adyacente al tejido, se realizaron 20 mediciones y se aplicó un análisis de varianza que determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=5.183 \times 10^{-08}$)

9.4.- Construcción de la caja operante

Se construyó una caja operante que pudiera utilizar los módulos comerciales que se usan actualmente en el laboratorio de Neurobiología del Apetito del CINVESTAV. Algunos de estos módulos fueron ampliados para facilitar su uso por parte de los ratones conectados con fibra óptica.

Las paredes internas y columnas de la caja son de aluminio para evitar que los ratones las dañen por mordisqueo. Las cubiertas laterales y la tapa son láminas de acrílico transparentes que permiten grabar a los sujetos durante su tarea, la apertura circular en la tapa es para que

pase la fibra óptica, los bordes de esta apertura fueron redondeados para evitar que la fricción con ellos dañe la fibra.

El ensamble es compatible con los accesorios de MED Associates (Fig. 24) y es utilizado actualmente para entrenar a los animales que se someterán a la inyección viral de GCaMP6.



Fig. 24 – Caja conductual terminada, el ensamble se hizo sobre una placa de acrílico que fija la caja, los dispositivos de control, los puertos y el dispensador de pellets.

10.- Discusión

Es importante que las mediciones se hagan controlando la profundidad de inmersión en la muestra para poder identificar los puntos de máxima fluorescencia, el marco esterotáxico permite esto siempre y cuando las muestras estén fijadas a la misma altura y contengan el mismo volumen de solución.

La última prueba con soluciones de fluoresceína muestra cambios identificables a simple vista en la señal mostrada en el software de interfaz al introducir la fibra aún en la más baja concentración de 50 nM, podemos afirmar con los datos obtenidos que el sistema detecta cambios en la fluorescencia de al menos esta magnitud.

La señal medida tiene un *offset* de hasta 845 mV cuando la batería está completamente cargada. Dos factores podrían estar provocando este *offset*, la corriente de oscuridad del fotodiodo de avalancha y la autofluorescencia de la fibra óptica utilizada para medir, ambas son propiedades intrínsecas de estos componentes y no pueden ser eliminadas, sin embargo, pueden ser útiles para conocer el nivel de carga de la batería y para determinar la calidad de la fibra conectada.

La salida de voltaje presenta un comportamiento directamente proporcional a la concentración de fluoresceína medida, no parecen necesarios ajustes para linealizar la señal.

Las señales de fotometría se reportarán como $\Delta F/F$ en valores escalares y sin unidades de medida, esto es para compensar la creciente expresión de los indicadores de calcio durante la realización de los experimentos. El procesamiento de $\Delta F/F$ normaliza la señal y detecta cambios más sutiles en la misma.

11.- Conclusiones y Perspectivas

Se cumplieron exitosamente tanto el objetivo general del proyecto como los objetivos particulares. Se diseñó y construyó un sistema novedoso de adquisición de señales en vivo de la actividad de neuronas especificadas genéticamente, robusto ante artefactos eléctricos musculares, personalizable para las características de cualquier indicador fluorescente, así como una caja conductual en la cual llevar a cabo los experimentos a medir.

El software de adquisición e interfaz fue diseñado para ser compatible tanto para las señales de este sistema como para los sistemas comerciales. Puede detectar y almacenar tantas señales analógicas de entrada como permita la tarjeta de adquisición.

El sistema terminado puede conectarse a cualquier diámetro de fibra mientras esté acoplada a un conector FC, sin embargo, fue diseñado para trabajar con fibras con diámetro de 400 μm y apertura numérica de 0.48, esto lo define el objetivo de microscopio y el lente de enfoque hacia el APD, cambiando estos elementos podría ajustarse para otro tipo de fibras.

El diseño cuenta con varias piezas que permiten el ajuste individual del objetivo, de la estimulación láser, de los filtros, el enfoque y el sensado, pero varias de estas piezas podrían maquinarse en conjunto para reducir tiempo de construcción y reducir el error humano durante el ensamble, sin sacrificar la capacidad para modificar el tipo de filtros o ajustarlo a otros diámetros de fibra.

Una ventaja de este sistema sobre su contraparte comercial es su portabilidad y facilidad de implementación. En las versiones comerciales es necesario conectar cada módulo con fibras ópticas, la transmisión de energía a través de la fibra óptica nunca es ideal así que en entre la muestra y la etapa de sensado hay una pérdida de energía que puede empeorar gravemente si cualquiera de las fibras se dañara durante su uso. En el sistema presentado en este trabajo la señal adquirida de la fibra óptica es colimada, filtrada y reenfocada al sensor mientras la muestra se estimula con el LED, todo en el mismo componente sin las pérdidas que implicaría usar fibra óptica para conectar cada sección. Esta característica también es ventajosa si se

deseara analizar la señal de varias fibras al mismo tiempo, para esta modificación se necesitaría cambiar el conector de FC por un puerto para conectar un arreglo de férulas paralelas y cambiar el APD por una cámara de video de alta ganancia como una sCMOS, similar a lo realizado por el laboratorio de Karl Deisseroth en 2016 [17].

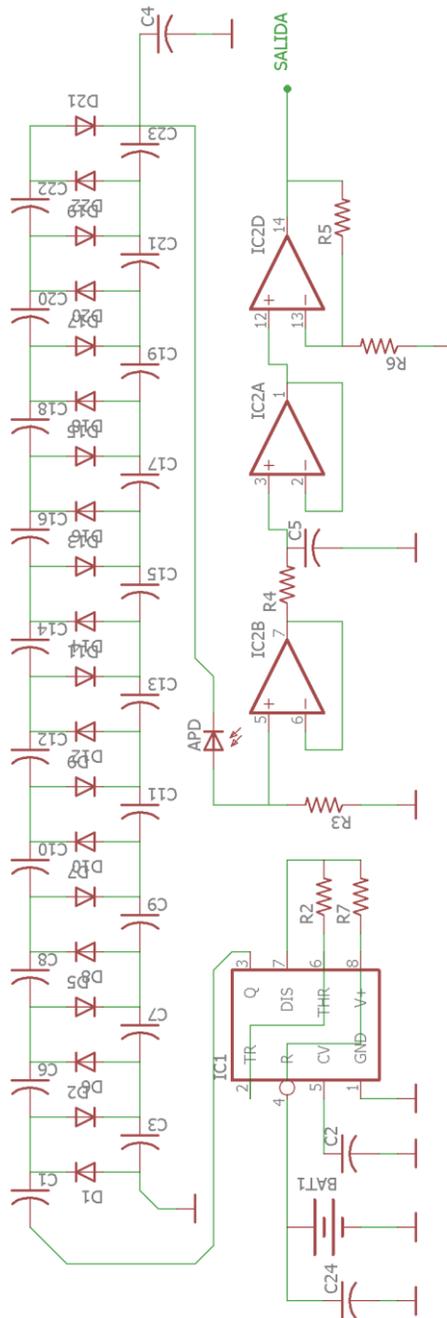
Tan pronto se pueda definir la concentración adecuada y el volumen inyectable del vector con base en los resultados de las pruebas de dilución viral se infectarán los animales entrenados, después de dos semanas se realizará la implantación de fibra de 400 μm y tras una semana de recuperación se iniciarán las mediciones in vivo de actividad neuronal.

12.- Referencias

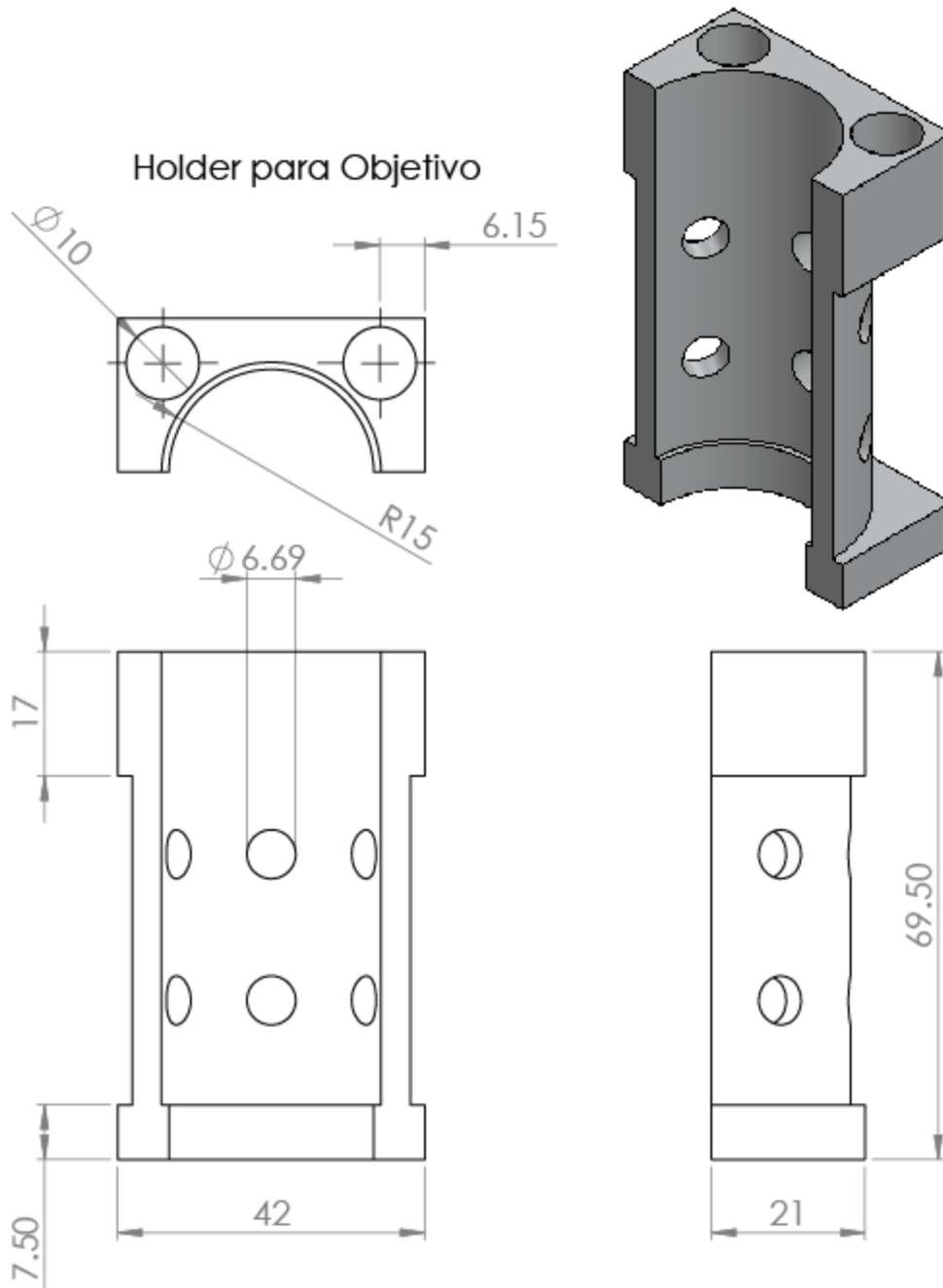
- [1] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel y K. Deisseroth, «Millisecond-timescale, genetically activated optical control of neural activity,» *Nature Neuroscience*, pp. 1263-1268, 2005.
- [2] T.-W. Chen, «Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity,» *Nature*, pp. 499: 295-300, 2013.
- [3] J. Grandjean, «Optimization of anesthesia protocol for resting-state fMRI in mice based on differential effects of anesthetics on functional connectivity patterns,» *Neuroimage*, p. 838–847, 2014.
- [4] C. Grienberg y A. Konnerth, «Imaging Calcium in Neurons,» *Neuron*, 2012.
- [5] M. J. Berridge, P. Lipp y M. D. Bootman, «The Versatility and Universality of Calcium Signalling,» *Molecular Cell Biology - Nature Reviews*, 2000.
- [6] J. Ding, A. F. Luo, L. Hu, D. Wang y F. Shao, «Structural Basis of the Ultrasensitive Calcium Indicator GCaMP6,» *Science China*, 2014.
- [7] G. J. Broussard, R. Liang y L. Tian, «Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators,» *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014.
- [8] M. Al-Rubeai, *Viral vectors for gene therapy*, Humana Press, 2011.
- [9] G. Cui, «Concurrent Activation of Striatal Direct and Indirect Pathways,» *Nature*, pp. 494: 238-242, 2013.
- [10] L. Gunaydin, «Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behaviour,» *Cell*, pp. 157:1535-1551, 2014.
- [11] Y. Chen, «Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuis,» *Cell*, pp. 160: 829-841, 2015.
- [12] T. Lerner, «Intact-brain analyses reveal distinct information carried by SNc dopamine subcircuits,» *Cell*, pp. 162:635-647, 2015.
- [13] Stanford University, «Brain Tissue Transmission Calculator,» 1 Septiembre 2016. [En línea]. Available: <http://web.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>.

- [14] J. Lock, I. Parker y I. Smith, «A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells,» *Cell Calcium*, 2015.
- [15] H. A. Zariwala, «A Cre-Dependent GCaMP3 Reporter Mouse for Neuronal Imaging in Vivo,» *The Journal of Neuroscience*, 2012.
- [16] B. R. Arenkiel, «In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing Channelrhodopsin-2,» *Neuron*, 2007.
- [17] C. Kim, S. Yang, N. Pichamoorthy, N. P. Young, I. Kauvar, J. Jennings, t. Lerner, A. Berndt, S. Yeun Lee, C. Ramakrishnan, T. Davidson, M. Inoue, H. Bito y K. Deisseroth, «Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain,» *Nature Methods*, 2016.
- [18] S. L. Resendez y G. D. Stuber, «In vivo Calcium Imaging to Illuminate Neurocircuit Activity Dynamics Underlying Naturalistic Behaviour,» *Neuropsychopharmacology Reviews*, pp. 40: 238-239, 2015.
- [19] R. L. Lowery y A. K. Majewska, «Intracranial injection of adeno-associated viral vectors,» *JoVE*, 2010.

13.- Apéndices

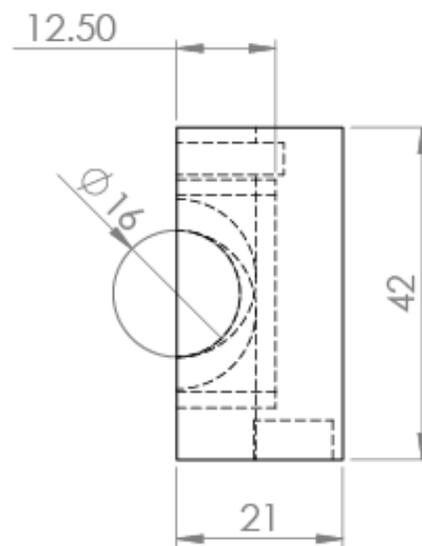
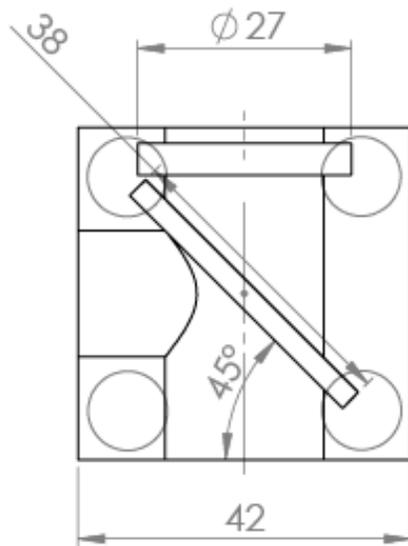
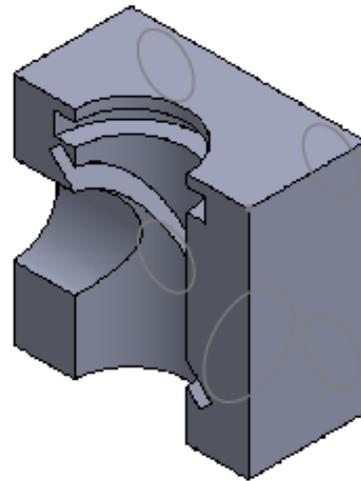
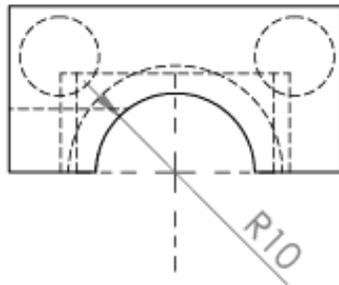


Apéndice 1 – Circuito de instrumentación para el fotodiodo de avalancha. El integrado es un MC555 en modo de oscilador astable con un ciclo de trabajo de 0.5. La cascada de Villard son diodos 1N4004 y capacitores cerámicos de 0.1 μ F. El amplificador operacional es un LM324 para funcionar con una sola fuente. Es un seguidor de voltaje, un filtro pasabajas de primer orden con frecuencia de corte a 200 Hz y un amplificador no inversor de diez veces la señal de entrada.



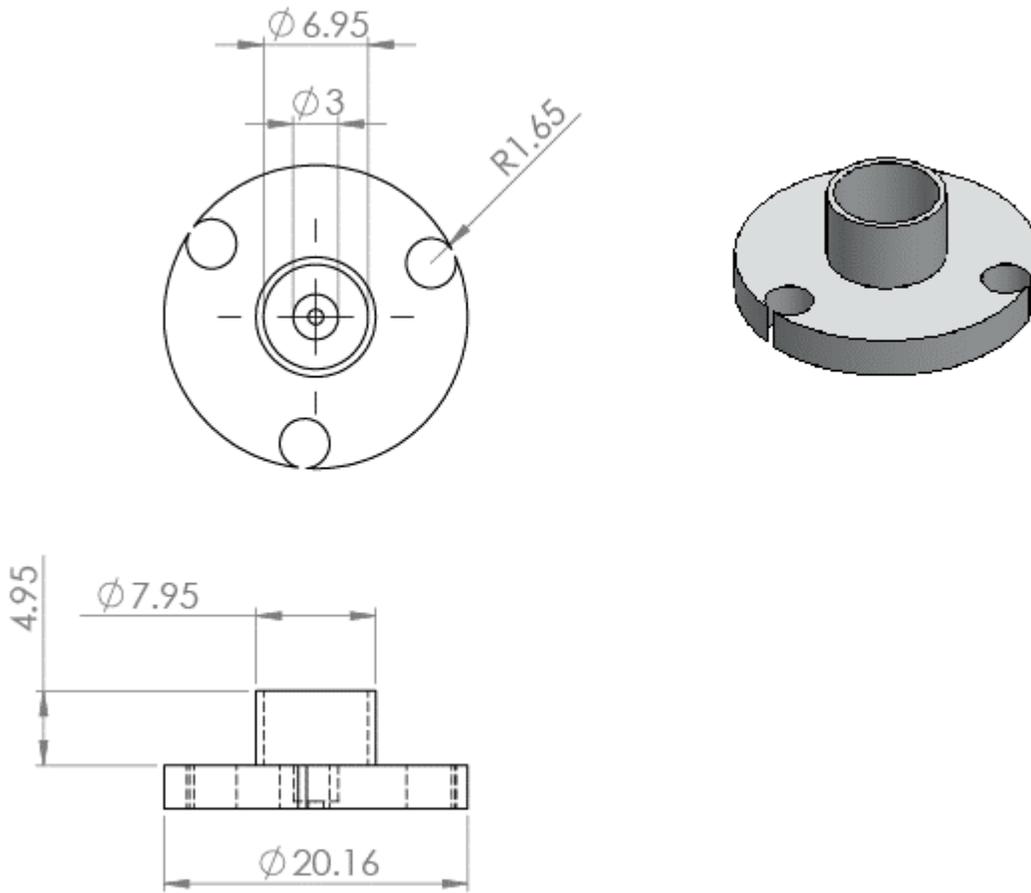
Apéndice 2 – Mitad del holder para alinear el objetivo de microscopio de 40x con respecto a la cara de la fibra óptica. Se realizó por medio de impresión 3D en ABS, se dejó un espacio en el borde de los barrenos para poder introducir una tuerca que sirviera de cuerda. Todas las cotas están en milímetros.

Cubo de Filtrado



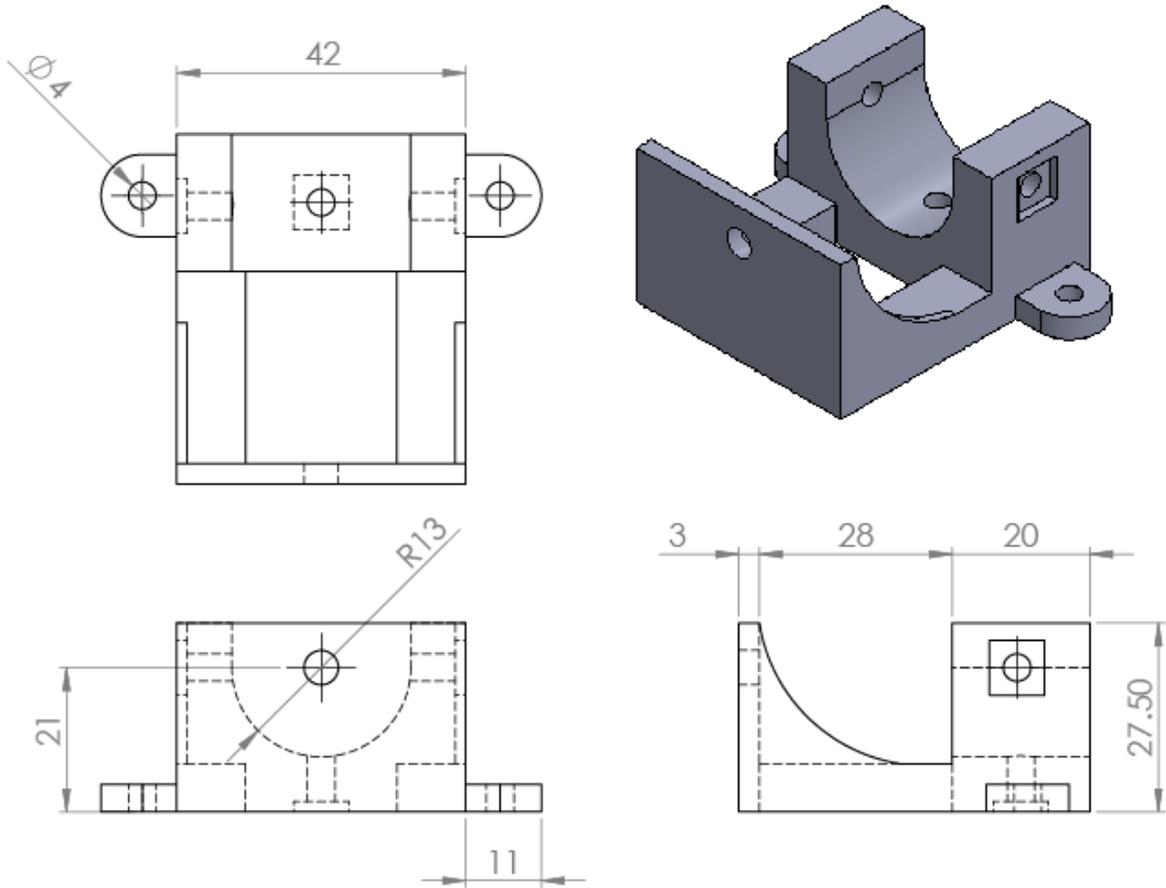
Apéndice 3 – Cubo de Filtrado que sostiene en su ranura rectangular central al filtro dicroico y en la ranura cilíndrica al filtro óptico pasa-banda. Para esta pieza no es necesario el ajuste de los lentes, solo mantenerlos fijos, también se imprimió en ABS por proceso de deposición de material fundido.

Conector FC



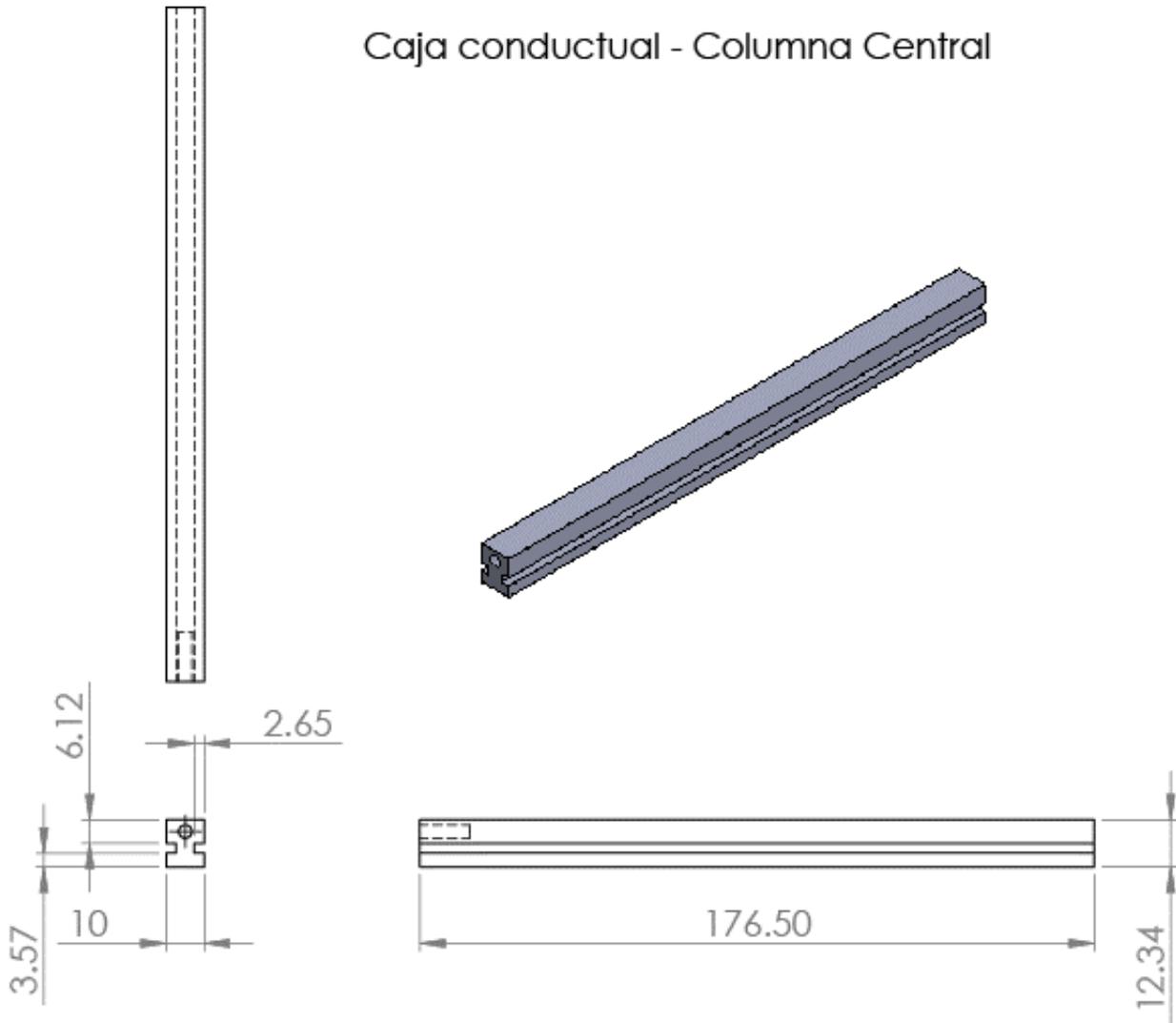
Apéndice 4 – Contector de férula para la fibra óptica que viene desde la muestra a medir, es una pieza de aluminio para evitar deformación por conectar y desconectar la fibra.

Holder para lente de enfoque y APD

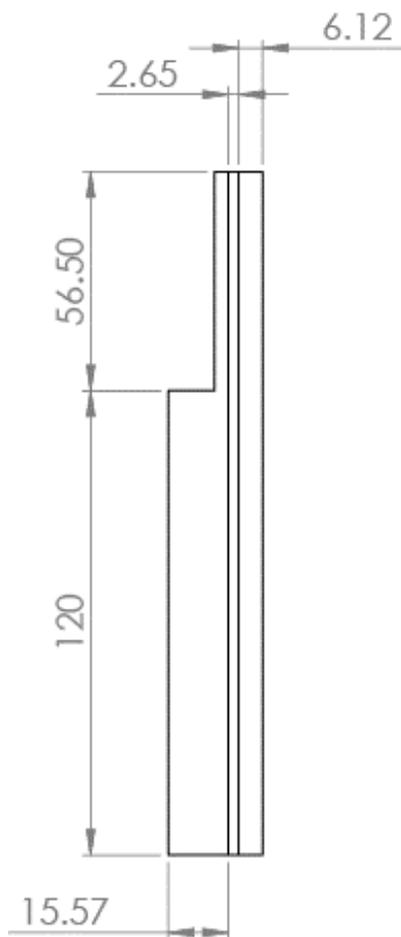


Apéndice 5 – La última etapa óptica es el enfoque del haz de luz filtrado hacia el área efectiva del APD. Tres pares tornillo-tuerca permiten el ajuste del lente. Se busca que el APD esté a 30 mm de distancia de la cara más cercana del lente biconvexo. La pieza se imprimió también en ABS.

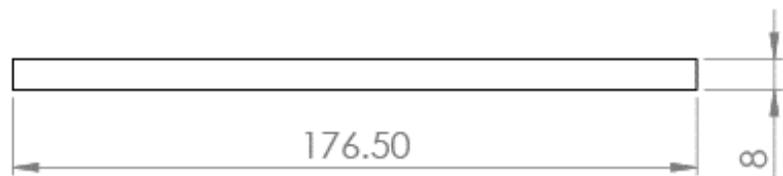
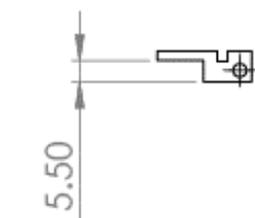
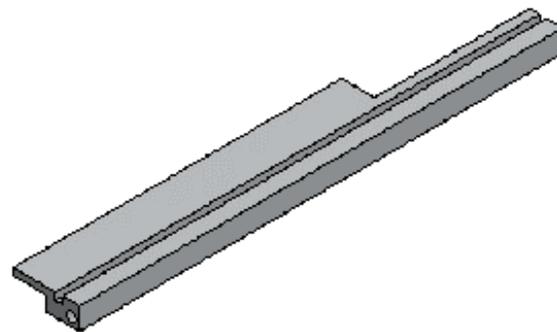
Caja conductual - Columna Central



Apéndice 6 - Se fabricaron cuatro de estas columnas en aluminio, en sus ranuras se deslizan los módulos intercambiables de MED Associates. En uno de sus bordes hay un barreno ciego con cuerda de 1/8 de pulgada.

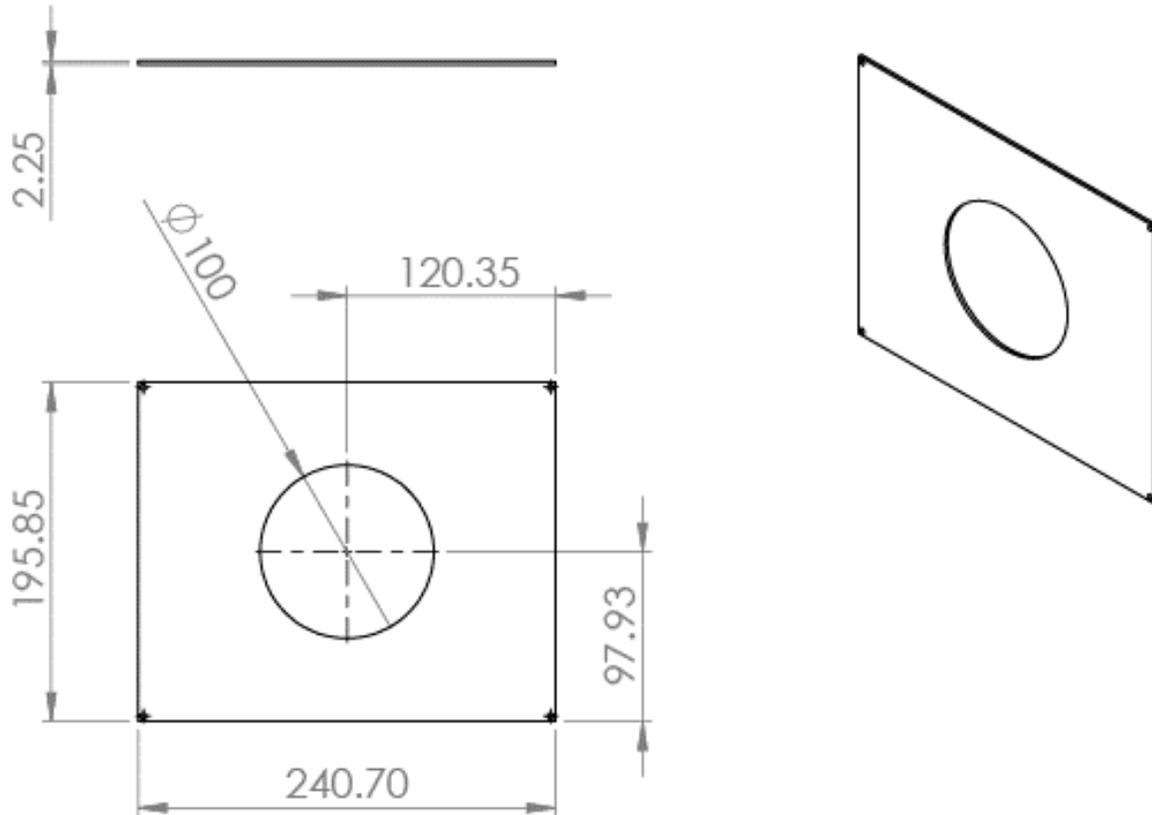


Caja Conductual - Columna Esquina



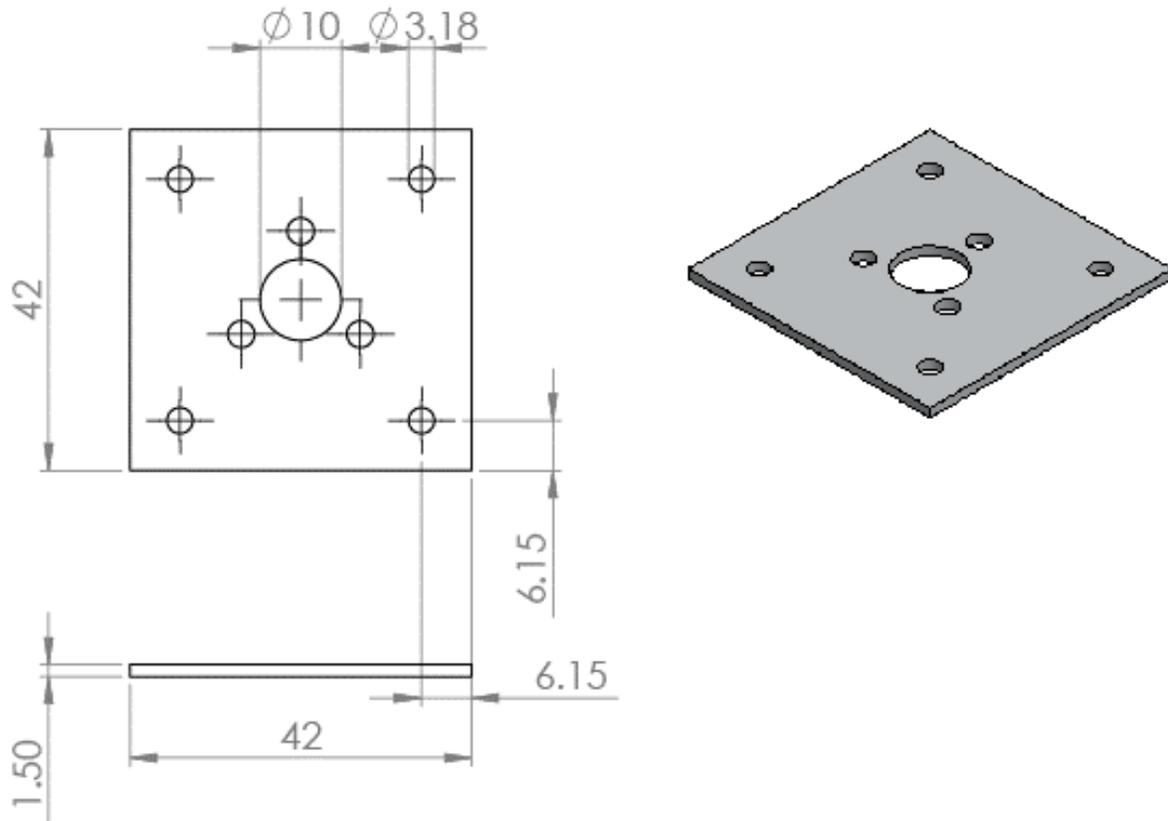
Apéndice 7- Columna lateral para caja conductual, se maquinaron cuatro de estas columnas para sostener las paredes de acrílico.

Caja Conductual - Tapa Interna



Apéndice 8 – La tapa de acrílico transparente de la caja conductual tiene un agujero circular de 100 mm de diámetro para permitir el movimiento del ratón conectado a la fibra óptica.

Placa para Conector FC



Apéndice 9 – Una placa impresa en ABS sostiene al conector FC y lo mantiene fijo con respecto al holder del objetivo de 40x.