

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

***EQUIPO PARA MEDICIÓN ESPACIAL
Y TEMPORAL DE LOS CAMBIOS EN LA
CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR***

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

LUIS JULIÁN VARELA LARA

**ASESOR: DR. JOSÉ JOAQUÍN AZPIROZ LEEHAN
CO-ASESOR: M. EN C. RAFAEL GODÍNEZ FERNÁNDEZ**

México, D. F., noviembre 1999

INDICE.

RESUMEN	1
CAPITULO 1: INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	
1.1 Fisiología celular.....	2
1.2 ¿Por qué es necesario medir el Ca^{2+} libre intracelular?.....	6
1.3 Técnicas para medición de concentraciones iónicas.....	14
1.3.1 Microelectrodos.....	14
1.3.2 Fotoproteínas	16
1.3.3 Indicadores Metal-cromados	17
1.3.4 Indicadores fluorescentes	18
CAPITULO 2: OBJETIVOS GENERALES	22
CAPITULO 3: MATERIAL Y METODOS	
3.1 Propuesta	23
3.2 Partes del equipo	24
3.2.1 Indicador fluorescente	24
3.2.2 Fuente de iluminación	42
3.2.3 Filtros ópticos y controlador de cambio de filtros (shutter).....	43
3.2.4 Microscopio	50
3.2.5 Cámara CCD	52
3.2.6 Software de adquisición y procesamiento de imágenes	62
CAPITULO 4: RESULTADOS	
4.1 Software de simulación	67
4.2 Pruebas al sistema para el cambio de filtros	75
4.3 Adquisición y procesamiento de imágenes	80
4.4 Filtros ópticos	86
CAPITULO 5: DISCUSION Y COMENTARIOS	
5.1 Software	87
5.2 Equipo	87
5.3 Almacenamiento masivo temporal de información	88
5.4 Velocidad de cambio de los filtros	88
5.5 Nuevas técnicas	89
5.6 Otras formas de plantear el equipo	89
5.7 Comentario final	90
BIBLIOGRAFIA	92

RESUMEN.

En los últimos años las técnicas experimentales que involucran a las imágenes como una herramienta para la obtención de información han comenzado a tener aplicaciones en áreas de la investigación donde antes, debido a limitaciones tecnológicas, no era posible. Una de estas áreas precisamente es la biofísica, donde los instrumentos utilizados tendían a dar solo información temporal, sin embargo la información espacial también era de gran importancia aunque difícil de obtener.

Con el desarrollo tecnológico que han tenido los dispositivos electrónicos para la digitalización de señales e imágenes como los CCD's , el gran poder alcanzado por las computadoras personales y el desarrollo de algoritmos computacionales para el procesamiento digital de señales e imágenes, ahora es posible obtener y guardar grandes cantidades de información y con ello las técnicas actuales involucran la obtención simultánea de ambos tipos de información : espacial y temporal.

Esta tesis comprende el diseño de un instrumento para medir los cambios de concentración de calcio iónico en el citoplasma celular ($[Ca^{2+}]_i$). La técnica es relativamente nueva e involucra la adquisición y el procesamiento de las imágenes vistas a través de un microscopio captadas por una cámara CCD de la intensidad de fluorescencia emitida por un indicador a calcio iónico, cargado previamente en el interior de la célula.

Con esta tesis no solo se obtiene la implementación de un equipo útil para correlacionar actividad celular con Ca^{2+} , que es una aplicación específica en el área de la biología biofísica, también con ello se logra introducir en el laboratorio la infraestructura para desarrollar nuevos proyectos con la misma línea de aplicación de imágenes y así poder llegar a tener las técnicas más actuales para este tipo de investigaciones.

1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

1.1 FISIOLOGIA CELULAR

Para entender cómo una célula puede llegar a realizar sus actividades y funciones nosotros debemos primero conocer las partes de las que está formada y de las "herramientas" con que ella cuenta para llevar a cabo estas tareas. Sin embargo una célula no puede ser descrita de manera general, pues las partes que la integran dependen del tipo de que se trate, aunque sí hay rasgos comunes en todas ellas de los cuales hablaremos a continuación.

La membrana celular o también llamada membrana plasmática, se encarga de separar el medio que hay entre el interior de la célula y su exterior y el espacio ocupado por la célula y darle su geometría. Es una parte que toda célula tiene, pero por otra parte las membranas celulares pueden tener características eléctricas, químicas o estructurales diferentes, que posiblemente las haga más excitables a algún estímulo que a otros.

El medio a un lado y otro de la membrana (dentro y fuera de la célula) es bastante diferente en cuanto a tipo y/o cantidad de las sustancias que lo componen, y esto se debe a que la membrana celular es semipermeable, permitiendo que algunas sustancias pasen a través de ella y excluyendo otras. Sin embargo esta exclusión puede ser temporal ya que además la membrana puede variar su permeabilidad, ya sea por ejemplo con la llegada de un potencial de acción (una variación de voltaje en la superficie de la membrana muy común en el transporte de información de las células del sistema nervioso), o la presencia de un agente químico (como un neurotransmisor o una hormona).

La tabla 1.1 nos da una idea de que tan permeable es una membrana en reposo a ciertas sustancias observando que tanto deja pasar esta desde el exterior hasta el interior de la célula. Por ejemplo el líquido extracelular contiene grandes cantidades de sodio, una menor cantidad de potasio y grandes cantidades de cloruro; en cambio en el líquido intracelular los fosfatos y proteínas están en proporciones considerablemente mayores. Estas notables diferencias son muy importantes para los fenómenos vitales de las células.

Sustancia	Líquido Extracelular	Líquido Intracelular
Na ⁺	142mEq/L	10mEq/L
K ⁺	4mEq/L	140mEq/L
Ca ⁺⁺	2.4mEq/L	0.0001mEq/L
Mg ⁺⁺	1.2mEq/L	58mEq/L
Cl ⁻	103mEq/L	4mEq/L
HCO ₃ ⁻	28mEq/L	10mEq/L
Fosfatos	4mEq/L	75mEq/L
SO ₄ ⁻	1mEq/L	2mEq/L
Glucosa	90 mg/dl	0 a 200 mg/dl
Aminoácidos	30 mg/dl	200 mg/dl
Colesterol Fosfolípidos		
Grasas Neutras	0.5 mg/dl	2 a 95 mg/dl
PO ₂	35mmHg	20mmHg
PCO ₂	46mmHg	50mmHg
PH	7.4	7.0
Proteínas	2 mg/dl	16 mg/dl

Tabla 1.1 Composición química típica de los líquidos extracelular e intracelular.

La membrana plasmática está formada por una bicapa lipídica que tiene la propiedad de no permitir el paso a sustancias que no son liposolubles como los iones, o moléculas de gran tamaño, pero sí a otras que sí son liposolubles como el oxígeno. Esto es algo ventajoso puesto que así se lleva a cabo con relativa facilidad el intercambio gaseoso oxígeno (transportado por la sangre) bióxido de carbono (producto de la actividad celular) el cual es un proceso vital. Si la membrana celular estuviera compuesta solo por esta bicapa lipídica sería imposible que pudieran entrar a la célula los iones, y los iones son agentes que permiten disparar diversidad de funciones de la célula, y con los que además la célula logra estar en un medio con un equilibrio electro-químico [11L]. Para ello la célula cuenta sobre su membrana con proteínas que la atraviesan y que son medios de transporte para los iones.

La forma en que un ion pasa ayudado por una proteína puede ocurrir de dos formas. Si la proteína es uno de los denominados canales iónicos, el ion para el cual el canal es selectivo pasará por ella como si la proteína formara un túnel. Por ello el movimiento iónico irá a favor de un gradiente de concentración, es decir del lado de mayor concentración al de menor concentración (de afuera hacia adentro de la célula o de adentro hacia fuera, dependiendo). O bien el transporte puede realizarse haciendo que la proteína tenga un sitio específico en donde el ion pueda llegar y unirse a la proteína. Una vez unido, la proteína rota, arrastra al ion hacia el lado contrario y lo libera. A estas proteínas se les conoce como transportadoras, y requieren de un gasto energético fuerte para realizar su función (gasto de ATP) y además por este gasto energético el transporte puede ir en contra de un gradiente de concentración. Sin embargo no todo el tiempo estos mecanismos están funcionando, puesto que si no entonces nos sería posible variar la permeabilidad de la membrana a una especie iónica. Por ejemplo hay canales iónicos que necesitan de un pulso de un cambio en el voltaje de membrana para poder abrirse, otros por otra parte necesitan de la presencia de otro ion. Algunas proteínas transportadoras no comienzan a trabajar hasta que la concentración de un ion ha alcanzado un nivel específico. O hasta que un agente químico llega al sitio de unión de la proteína, o como en las uniones sinápticas de las neuronas, cuando el neurotransmisor llega al otro lado de la hendidura el aumento de concentración de un ion activa a algunas enzimas y estas actúan sobre los canales iónicos aumentando su capacidad para dejar pasar todavía más cantidad de iones.

La figura 1.1 muestra un ejemplo de cómo un ion Ca^{2+} puede tener dos diferentes formas de pasar la membrana plasmática, ya sea facilitado por un gradiente de concentración a través de un canal iónico o al unirse con una proteína transportadora.

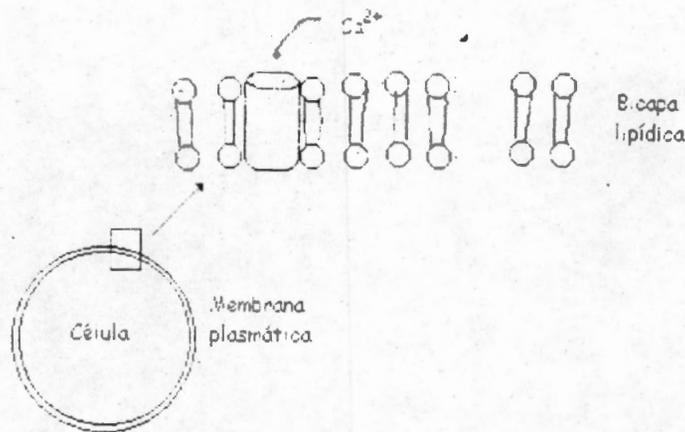


Figura 1.1 Representación de la membrana celular, canal iónico y proteína transportadora.

Debido a que estos mecanismos que regulan la entrada y salida de iones desde el exterior al interior de la célula o desde su interior a su exterior se encuentran instalados sobre la membrana, cuando por algún estímulo sucede un aumento de la permeabilidad de la membrana a algún ion es de esperarse que estos cambios se vean mucho más rápidos y de mayor intensidad en las cercanías de la membrana. Imaginemos esto como un cuarto amplio con varias entradas y mucha gente queriendo entrar a ese cuarto. Si viéramos hacia el interior del cuarto la gente que ya logró entrar se encuentra dispersa en todo el cuarto; en cambio en las cercanías de las puertas la gente se amontona. La forma en que un ion se distribuye en la célula es importante ya que podría observarse en qué sitios afecta más un incremento o disminución de la concentración de este ion si por ejemplo depende de que organelo celular está en un lugar. Pero para poder observar esta distribución necesariamente debemos contar con un equipo que nos dé la información espacial y temporal de lo que sucede dentro de una célula. Actualmente se está volviendo más común ver artículos de divulgación científica y reportes experimentales donde utilizan técnicas que permiten obtener esta información.

Debemos definir que una célula se encuentra en equilibrio electrogénico cuando se encuentra en un equilibrio eléctrico y químico. Este se logra cuando se tienen controlados los niveles de concentración de los diferentes iones y sustancias que estén presentes en la solución donde está inmersa la célula tanto a un lado de la membrana celular como en el otro.

El estudio de los mecanismos de regulación electrogénica celular va mas allá de comprobar la existencia de ellos o la forma de operar. Una vez conociendo eso se puede pasar a por ejemplo observar y medir las variaciones en la cantidad de algún tipo de canal por unidad de área de superficie de la membrana celular y esto puede darnos indicios de patologías o algún tipo de afectación que estén sufriendo en ese momento las células, ya que es posible establecer una cantidad normal de este parámetro durante un previo estudio estadístico sobre células identificadas como sanas y células identificadas como enfermas. También el observar el papel que juega un ion al llevarse a cabo una tarea conjunta y posteriormente observar lo que ocurre al tratar de llevar a cabo esa tarea pero ahora eliminando la presencia del ion puede decirnos lo que podría estar ocurriendo cuando por causas desconocidas alguna parte de nuestro organismo deja de funcionar correctamente.

1.2 ¿PORQUÉ ES NECESARIO MEDIR EL Ca^{2+} LIBRE INTRACELULAR?

Hace mas de 100 años Ringer (1883) mostró que el calcio iónico extracelular era requerido para la contracción normal del corazón de las ranas. Durante los siguientes 20 o 30 años, muchos investigadores mostraron que los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre en el fluido alrededor de las células tenían un profundo efecto en su morfología y respuesta a estímulos [2L]. Estos estudios documentaron por primera vez la evidencia de que el Ca^{2+} extracelular juega un rol vital en la regulación celular.

Posteriormente Fatt y Katz [3L] que en 1953 realizaban estudios sobre canales para iones sodio, donde utilizaban bloqueadores que impedían el paso de este ion por los canales y donde se podía medir su efecto en la actividad celular. Lo que ellos esperaban ver es que al estimular la célula con un pulso de voltaje no hubiera cambios en el potencial de membrana, ya que en ese entonces estos cambios se le atribuían solo al ion sodio. Sin embargo no sucedió así, en sus registros aparecía un potencial de acción muy rápido, en forma de espiga, quedando por varios años la incógnita de su origen.

No fue sino hasta 1958, 5 años después, que el mismo Fatt pero en colaboración con su colega Gisborng, logró aislar al "elemento" que provocaba este potencial en forma de espiga, y descubrieron que el ion calcio al entrar a las células estimuladas por el potencial de acción era el responsable. A partir de este descubrimiento, los estudios de muchos tipos celulares fueron enfocados a descubrir la función de este ion tanto en el interior como en el exterior de las células, y además a descubrir los mecanismos de los que se vale la célula para llevar a cabo esta regulación.

Cuatro son los roles principales del Ca^{2-} que han sido caracterizados en el organismo [13L,14L,15L,16L]:

1.- *Rol estructural*: incluye al calcio precipitado extracelular, principalmente fosfato o carbonato de calcio, en estructuras esqueléticas como hueso, caparazones en moluscos y artrópodos y algunos organismos unicelulares. Esto también incluye al Ca^{2-} unido a fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son requeridos para el funcionamiento normal de muchas estructuras intracelulares y membranas biológicas, o la función reguladora del volumen celular que se lleva a cabo por medio tanto del calcio iónico almacenado internamente en la célula o por calcio iónico extracelular [18 A].

2.- *Cofactor enzimático*: muchas enzimas degradantes como la proteasa, nucleasa y fosfolipasa, requieren Ca^{2-} para su actividad biológica. O por ejemplo en las neuronas el Ca^{2-} ayuda a propagar los potenciales de acción al activar enzimas que actúan sobre los canales iónicos y aumentan su capacidad para dejar pasar iones.

3.- *Rol eléctrico*: Ca^{2-} no solo participa sobre la membrana celular al mantener su estabilidad estructural, si no que en membranas eléctricamente excitables este también puede actuar como un transportador de corriente a través de estas membranas.

4.- *Rol de regulador intracelular* : en este caso los cambios en la concentración del Ca^{2-} libre dentro de la célula son causados por un estímulo fisiológico primario, el cual puede ser eléctrico como un potencial de acción llegando a una terminal nerviosa, o químico, como por ejemplo la acción de un neurotransmisor u hormona. Un ejemplo de este tipo es la reproducción celular (Gu Xionan & Spitzer, 1995) donde los cambios de concentración de Ca^{2-} determinan su rapidez y continuación.

La contracción muscular es un claro ejemplo de un rol eléctrico y de regulador del Ca^{2-} en el interior de la célula. Los canales iónicos que se activan o inactivan con Ca^{2-} o la liberación de Ca^{2-} de almacenes intracelulares inducido por Ca^{2-} , son otros ejemplos.

Hoy el consenso es que el Ca^{2-} libre en el interior de la célula juega una parte vital como intermediario o "mensajero" para la regulación de la actividad celular como resultado de un estímulo primario, definiendo a estímulo primario a un estímulo llegado desde el exterior de la célula, como puede ser una hormona, un neurotransmisor o un potencial de acción.

Para poner un ejemplo sencillo, la visión y la locomoción son dos actividades que casi en todo momento utilizamos y que sin la participación del Ca^{2-} no sería posible realizarlas [14 A]. En 1964 Hagiawara y Naka [3L] utilizando como preparación biológica músculo de crustáceo observaron la dependencia extraordinaria entre la contracción muscular y la presencia del ion calcio. Además algo que fue de suma importancia es que midieron la concentración de Ca^{2-} antes del evento (10^{-7} M) y su máximo durante el evento (10^{-3} M) y observaron esta enorme diferencia de casi 4 ordenes de magnitud.

Además de la contracción muscular que fue una de las primeras funciones celulares en la que ha sido plenamente identificada su relación con Ca^{2-} se pueden mencionar otras como:

- *Liberación de neurotransmisores*. [15 A] Su mecanismo es un poco complejo pero a grandes rasgos lo podemos describir así: una neurona en sus terminales presinápticas mantiene al neurotransmisor almacenado en pequeñas vesículas, al llegar un pulso de despolarización provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana celular a Ca^{2-} , aumentando la concentración interna de este ion. Este aumento provoca que estas vesículas o sacos se fusionen con la membrana celular liberando su contenido hacia la hendidura sináptica, llegando a la célula postsináptica y logrando la comunicación entre neurona y neurona.
- *Secreción de las glándulas endócrinas*. Por ejemplo la producción de insulina por el páncreas [19 A, 13 A] esta regida por la presencia en cantidades adecuadas de Ca^{2-} y K^{2-} . En el hígado la secreción de bilis además de otras de las múltiples funciones relacionadas con este órgano son estimuladas por la presencia de Ca^{2-} .
- *Activación del sistema inmunológico*. [8 A,9 A] Cuando un macrófago le presenta a un linfocito T parte de algún antígeno ingerido (bacteria o virus), el linfocito T activa solo si hay un aumento de Ca^{2-} intracelular, después a su vez los linfocitos T activan a los linfocitos B y estimulan su reproducción y así se forman los mecanismos de ataque específicos para el virus o bacteria inicialmente ingerido por el macrófago.
- *La reproducción celular* no ligada al sistema inmunológico como en el caso de las neuronas en el feto, es iniciada y continuada solo si existe un incremento sostenido en la concentración de Ca^{2-} .

La tabla 1.2 nos da unos cuantos ejemplos de procesos fisiológicos y la forma del estímulo que se presenta para que inicie el transporte del mensaje a través de cambios de concentración de Ca^{2-} .

Estímulo primario	Proceso fisiológico regulado
Neurotransmisor	Contracción muscular
Quimiotaxis	Movimiento celular
Impulso eléctrico en terminal nerviosa, hormona o neurotransmisor	Secreción
Glucagón	Acción hormonal
Luz	Visión
Hormonas	División celular y maduración
Neurotransmisor y hormonas	Comunicación celular
Membrana despolarizada	Permeabilidad de la membrana a iones

Tabla 1.2 Algunas funciones reguladas por Ca^{2+}

La evidencia de Ca^{2+} como un regulador intracelular ha sido basada principalmente en 4 técnicas experimentales [13L]:

1.-El efecto de remover el Ca^{2+} extracelular y vaciar los almacenes intracelulares de Ca^{2+} usando agentes de unión a Ca^{2+} para capturarlo y disminuir su concentración en estado libre [20 A, 15 A]. Uno de estos agentes y de los mas utilizados es el "ethylenglycol-bis-(β -amino-ethyl ether) tetraacetic acid" mejor conocido como EGTA.

2.-El efecto de manipular el Ca^{2+} : ya sea variando la concentración extracelular, microinyección, la aplicación extracelular de cationes divalentes ionóforos como A23187 y X537A, o estimulación de almacenes internos de Ca^{2+} para que sea liberado en el interior de la célula junto con el uso de inhibidores de la permeabilidad de la membrana celular a Ca^{2+} para evitar su rápida salida [16 A, 2 A, 3 A].

3.-Los mecanismos de cambios de Ca^{2+} libre intracelular son estudiados al medir el flujo de corrientes de Ca^{2+} a través de la membrana celular [1 A].

4.-La base molecular de la acción del Ca^{2+} en el interior celular está caracterizada por aislamiento de enzimas y proteínas, e investigando su regulación por Ca^{2+} *in vitro*. Es esencial que estas investigaciones sean relacionadas al rango de cambio de Ca^{2+} que ocurre *in vivo*. Una investigación puede concluir que enzimas intracelulares son reguladas por cambios de Ca^{2+} libre, pero es también de gran importancia determinar en que rango de concentraciones de Ca^{2+} libre suceden estos efectos [21 A].

Ciertamente el entendimiento del rol del Ca^{2+} intracelular como un regulador es limitado a algunas células en el presente debido a la dificultad de estudiar los cambios de este catión directamente. Si un estímulo primario es para regular una actividad celular vía un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , entonces este debe involucrar algún cambio en la cantidad de Ca^{2+} unido a las moléculas responsables de controlar esta actividad.

Hay solo dos caminos por los cuales puede suceder un cambio en la cantidad de Ca^{2+} unido a las moléculas responsables de controlar una actividad, ya sea por un aumento de Ca^{2+} libre en el medio donde las moléculas están inmersas, o por un cambio en el número de afinidad de las moléculas para unirse a Ca^{2+} [13L]. La gran mayoría de los estudios actuales indican que el cambio de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es el principal mecanismo por el cual ocurre un incremento en la cantidad de proteínas u otras moléculas unidas a Ca^{2+} . A su vez un cambio en la cantidad de Ca^{2+} libre intracelular puede ocurrir como consecuencia de la alteración en sistemas de almacenamiento intracelulares o cambios en la permeabilidad a Ca^{2+} de la membrana celular, junto con un cambio en el número de afinidad del sitio de unión final. Un método para medición de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular es entonces necesario para:

1.-Proveer evidencia directa para relacionar la señal extracelular primaria y el evento fisiológico intracelular, puesto que el curso temporal del cambio de Ca^{2+} libre intracelular puede ser correlacionado con la actividad celular. Por ejemplo cambios de Ca^{2+} libre se han observado que ocurren en el músculo como una consecuencia de la despolarización de la membrana y este cambio inicia la contracción.

2.- Obtener mediciones absolutas de Ca^{2-} libre intracelular que proveen el rango de concentraciones de Ca^{2-} , junto con el tiempo de respuesta, necesarios en orden para relacionar estudios de la cinética de Ca^{2-} unido a proteínas para la respuesta fisiológica.

El primer reporte de una observación directa de un cambio de la concentración de Ca^{2-} en el interior de una célula fue hecho por Pollack en 1928. El utilizo una técnica donde inyectaba una solución saturada de sal de sodio con tinte rojo alizarin-sulfanato dentro de una ameba y observó una gran actividad del Ca^{2-} cerca de los sitios de formación de pseudópodos que venia a confirmar la relación de Ca^{2-} con el movimiento celular. Sin embargo esta técnica era poco confiable y poco válida, además de ser indispensable obtener valores absolutos de los niveles de concentración y no solo una descripción visual de lo que ocurre.

Pero aún no tenemos una idea clara como hace el Ca^{2-} para alterar o activar las funciones celulares. Para ello se puede hacer una distinción entre tres tipos de procesos controlados, operacionalmente diferentes [14L]. En el primer lugar pondremos a los casos en donde para que la célula se active, todo lo que se necesita es un breve mensaje o disparo para iniciar una secuencia ya programada de procesos bioquímicos y eléctricos que aún cuando el estímulo desaparezca esta continua hasta terminarse. En otros casos, puede ser que exista un proceso cíclico por si mismo que se esta realizando aún en la ausencia de un mensajero extracelular (como Ca^{2-}) , pero que al aparecer este mensajero la amplitud de este proceso o su frecuencia pueden ser variadas. Y por ultimo en el tercer caso están las situaciones en los cuales la respuesta es aumentada con la presencia de un mensajero extracelular y se sostiene tanto tiempo como el mensajero esté presente. Una vez removido el mensajero la respuesta termina.

Para cualquiera de los tres tipos de procesos en los que estemos estudiando la forma en que el Ca^{2-} controla alguna función, cuando se trata de elegir un sistema o una técnica para la medición de Ca^{2-} libre intracelular se deben tomar en cuenta varios criterios [13L]:

- a) Selectividad a Ca^{2+} : el método debe ser sensible a Ca^{2+} a concentraciones poco menores a $0.1 \mu\text{M}$, o incluso 10 nM . Debido a que la concentración de otros iones como el Mg^{2+} libre en el citoplasma que es bastante mayor a la del Ca^{2+} ($1\text{-}5 \text{ mM}$), el método debe ser altamente selectivo a Ca^{2+} sobre Mg^{2+} o sobre otros iones que estén actuando en el proceso al mismo tiempo que Ca^{2+} y los cuales puedan llegar a unirse al elemento sensor .
- b) Estimación cuantitativa de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: se debe decidir si el método deberá dar la información en cantidades relativas o absolutas, o si es el caso en que el método pueda darla en cualquiera de las dos formas con solo un cambio relativamente sencillo o una calibración adicional.
- c) Tiempo de respuesta: el método deberá ser lo suficientemente rápido para poder detectar los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre, que va de acuerdo al tipo de experimento en que se esté, en algunos casos este puede ser del orden de milisegundos, y en otros de segundos, minutos e incluso horas.
- d) Accesibilidad a las células: el método deberá ser lo suficientemente simple para poder llegar con el elemento sensor a la célula sin tener que variar mucho la técnica dependiendo del tipo celular y sin causarle daño alguno.
- e) Tolerancia biológica: el método no debe causar ninguna alteración en las propiedades eléctricas, fisiológicas o bioquímicas de la célula, y no deberá causar disturbios significativos del balance de Ca^{2+} dentro de la célula, puesto que si el sensor actúa de tal forma que para medir captura una gran cantidad de Ca^{2+} libre del lugar donde se encuentra, la respuesta celular se verá afectada por la disminución de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el propio sensor.

- f) Distribución: el método deberá ser adaptable, independiente de la morfología celular para poder medir la distribución de Ca^{2+} en el citoplasma.
- g) Disponibilidad: el método deberá ser realmente disponible y relativamente poco costoso.

1.3 TÉCNICAS PARA MEDICIÓN DE CONCENTRACIONES IÓNICAS.

Existen varias técnicas para la medición de la concentración de Ca^{2+} libre en el interior de las células [12L]. Entre los más utilizados se encuentran los microelectrodos, fotoproteínas, indicadores metal-cromados, NMR y los indicadores fluorescentes. La popularidad de cada uno de ellos va de acuerdo al tiempo en que aparecieron y a las dificultades y ventajas que representa el utilizarlos.

1.3.1 Microelectrodos.

Los microelectrodos son tubos delgados huecos con punta muy fina ($<1\mu\text{m}$), tan fina que es más delgada que el diámetro de una célula. Para hacer la medición de la concentración de algún ion en su punta se coloca una resina sensible al ion que produce una diferencia de potencial proporcional a su concentración debido a la reacción química entre el ion y la resina [4L, 7 A]. El tubo hueco del microelectrodo se llena con un líquido que sirve como conductor eléctrico, entonces en el otro extremo opuesto a la punta del microelectrodo se coloca un alambre dentro del líquido con el cual se recoge la señal transducida por el sensor y llevado a un amplificador para acondicionar la señal como muestra la figura 1.2.

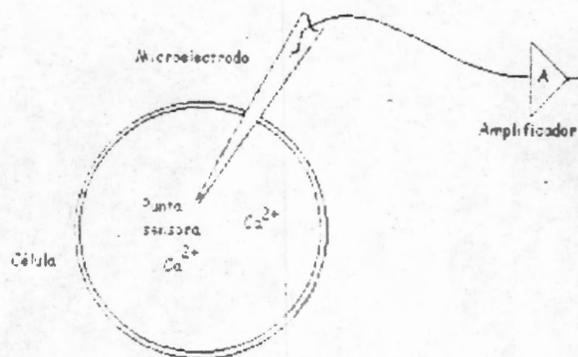


Figura 1.2 Técnica para medir concentraciones iónicas con microelectrodos.

Tal vez esta sea la técnica más sencilla, sin embargo hay muchas desventajas al hacer la medición utilizando microelectrodos. Entre ellas está en que la preparación del microelectrodo requiere más bien una técnica artesanal que de una complicación tecnológica. Por otra parte células de tamaño muy pequeño pueden sufrir graves daños al insertar el microelectrodo, y en el caso de que se hicieran los microelectrodos con puntas más finas, esto provoca que la impedancia del microelectrodo aumente y por lo tanto el amplificador deba tener características electrónicas mucho mejores, sin olvidar las capacitancias parásitas que limitan el tiempo de respuesta del sensor.

Por otra parte si nos interesara conocer la distribución espacial del ión que estamos midiendo, con esta técnica no es posible obtener esta información ya que el microelectrodo solo da la medición de la concentración existente justo en el lugar donde está colocada la punta, y esta posición usualmente no se conoce.

Además muchos experimentos ya involucran la utilización de una micropipeta (que es igual al microelectrodo solo que sin la resina sensible) para estimular a la célula o inyectar soluciones con concentraciones específicas de elementos, lo cual hace mucho más difícil el ahora tener dos puntas penetrando la célula sin dañarla.

1.3.2 Fotoproteínas.

La figura 1.3 muestra esta técnica óptica, las fotoproteínas tienen la propiedad de que al unirse a Ca^{2+} producen luz azul-verde, esta técnica ha sido la más utilizada en los pasados veinte años para medir la concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula. Las fotoproteínas necesitan ser introducidas a la célula por microinyección y la medición se hace por medio de un fotomultiplicador que capta la luz emitida.

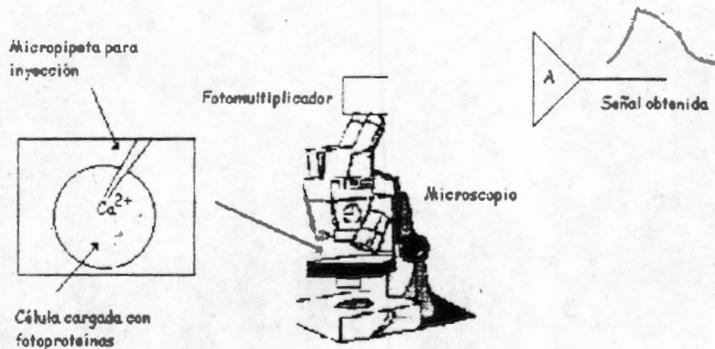


Figura 1.3 Técnica utilizando fotoproteínas para medir concentraciones iónicas

Esta es una técnica con muchas ventajas, tiene una buena resolución temporal, la medición es relativamente fácil, y la información obtenida desde el fotomultiplicador de alguna manera puede ser tomada como espacial, puesto que es un promedio de la luz emitida en toda la célula, que da un promedio de la actividad del Ca^{2+} en toda la célula, sin embargo debido a la utilización de una micropipeta para inyectar las fotoproteínas se tiene la posibilidad de dañar las células de tamaño pequeño, sin embargo las fotoproteínas pueden ser inyectadas por la misma micropipeta por donde se aplica el estímulo a la célula.

Se podría pensar en la posibilidad de utilizar una cámara para captar las imágenes de la luz emitida por las fotoproteínas y así ya no obtener un promedio de la luz emitida sino un valor en cada punto espacialmente definido, sin embargo la luz emitida es muy débil, por lo cual esa posibilidad queda descartada y es por ello el uso del fotomultiplicador.

1.3.3 Indicadores Metal-cromados.

Estos indicadores aparecieron antes de los indicadores fluorescentes que mencionaremos mas adelante pero su funcionamiento es semejante. Los indicadores metal-cromados son sustancias que al unirse con alguna especie iónica cambian su absorbancia a longitudes de onda relativamente grandes (600-700nm) . La absorbancia está definida como: $\log(I_0/I)$ donde I_0 es la intensidad de la luz que incide sobre la muestra e I es la intensidad de la luz de la luz que deja pasar la muestra.

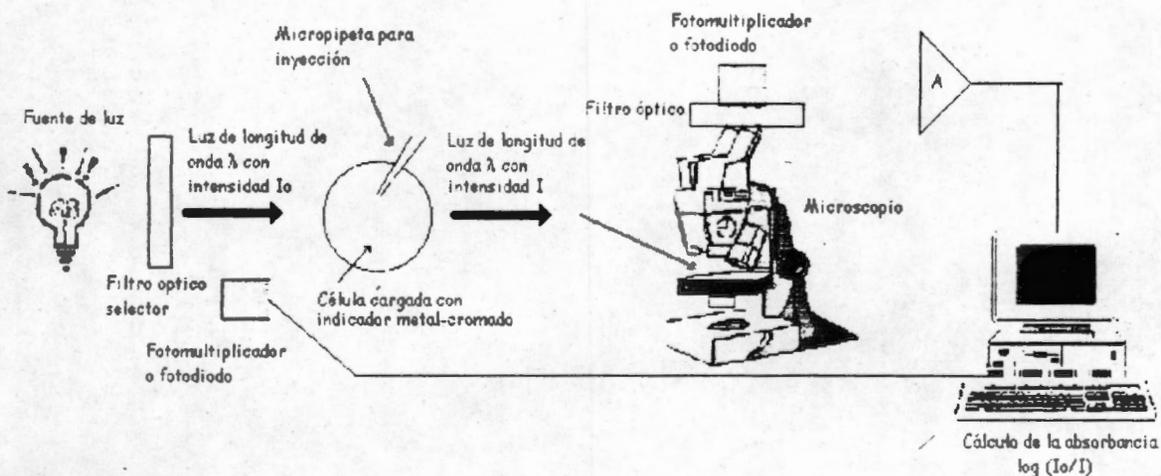


Figura 1.4 Técnica utilizando indicadores metal-cromados para medir concentraciones iónicas

Para hacer la medición de las concentraciones del ion al cual se unen los indicadores metal-cromados, se requiere de iluminar a la célula la cual ha sido cargada con el indicador, con una luz de longitud de onda dentro de la gama de cambio de absorbancia con un equipo como el mostrado en la figura 1.4. Gracias a que las longitudes de onda de luz con las que se necesita iluminar este tipo de sustancias, están dentro de la gama visible, la óptica del equipo es simple y además no hay peligro de dañar a las células como cuando se utiliza luz ultravioleta (luz de longitud de onda pequeña con gran energía).

El principal problema con la utilización de estos indicadores es que no son muy selectivos a la especie iónica y por otra parte la absorbancia de fondo suele ser muy grande y podría enmascarar la medición.

Al igual que en el caso de las fotoproteínas, se puede utilizar un fotomultiplicador o un fotodiodo para captar y medir la absorbancia, además, para hacer el cálculo de la absorbancia se debe tener ya sea un circuito extra o bien una computadora. Estos indicadores también necesitan ser cargados en el interior de la célula por microinyección.

1.3.4 Indicadores Fluorescentes.

Los indicadores fluorescentes son sustancias que como ya dijimos trabajan en forma muy similar a los indicadores metal-cromados, solo que en los indicadores fluorescentes como su nombre lo dice lo que se mide no es el cambio de absorbancia a cierta longitud de onda, sino un cambio en la intensidad de fluorescencia. Cada indicador fluorescente tiene asociada una o mas longitudes de onda de la luz a la cual se logra un cambio máximo en la fluorescencia. Este cambio puede ser directamente proporcional al cambio de la concentración o inversamente proporcional.

Hay dos formas de utilizar estos indicadores fluorescentes, una es utilizando una sola longitud de onda de excitación y una sola longitud de onda en donde se mide la emisión de fluorescencia; esto tiene una gran ventaja, ya que hace al método rápido y fácil de calibrar, sin embargo está mas sujeto a errores ya que por ejemplo en un momento dado un cambio en la intensidad de fluorescencia puede no deberse a un cambio en la concentración del ion que se esta midiendo, si no a por ejemplo una redistribución del indicador o a una variación en la intensidad de la fuente luminosa que está excitando la fluorescencia, por ello este método necesita que tanto la intensidad de la fuente luminosa y la distribución del indicador permanezcan constantes durante toda la medición. Para medir los cambios en la fluorescencia se puede utilizar algún dispositivo óptico como un fotomultiplicador o un fotodiodo en el caso de que solo se desee obtener un promedio de la

fluorescencia de toda la zona observada, o bien debido a que la fluorescencia emitida por algunos de estos indicadores es bastante grande se puede incluso utilizar una cámara CCD y así observar por medio de imágenes capturadas dinámicamente lo que sucede en forma espacio temporal, solo que al utilizar este método de una sola longitud de onda de excitación y emisión, es probable que lleve a errores debido a los factores que se mencionaron arriba, y además el modo de una sola longitud de onda mostrado en la figura 1.5 nos da información en cantidades relativas.

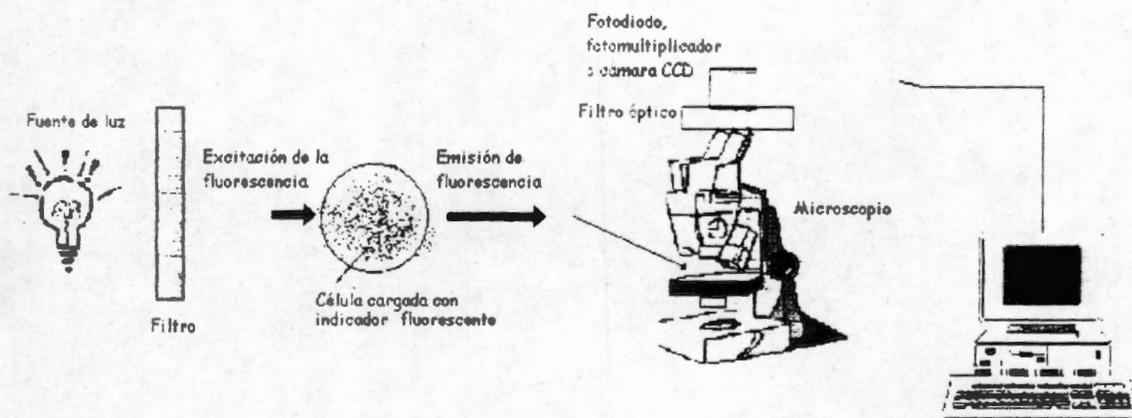


Figura 1.5 Equipo para medir concentraciones iónicas con indicadores fluorescentes excitando en una sola longitud de onda y midiendo también en una sola longitud de onda.

Sin embargo hay indicadores fluorescentes que se pueden utilizar ya sea con dos longitudes de onda de excitación y una de emisión o una longitud de onda de excitación y dos longitudes de onda de emisión, ya sea en la excitación o emisión donde se utilicen dos longitudes de onda una de ellas corresponde a excitar (o donde emite) el indicador libre del ion al que es selectivo (λ_1) y la otra es la correspondiente para excitar (o donde emite) el indicador unido al ion (λ_2), y entonces lo que se hace es calcular la razón $R = F_{\lambda_2} / F_{\lambda_1}$ donde F_{λ_2} es la fluorescencia excitando (o midiendo) en λ_2 y F_{λ_1} es la fluorescencia excitando (o midiendo) en λ_1 . Este método elimina el error producido por los factores de cambios en la intensidad de la fuente de iluminación para la excitación y redistribución del indicador, puesto que si por ejemplo la fuente luminosa cambia su intensidad la

fluorescencia cambiara en un factor K para ambas longitudes de onda pero R seguirá siendo la misma ya que $R = K \cdot F_{\lambda_2} / K \cdot F_{\lambda_1} = F_{\lambda_2} / F_{\lambda_1}$ lo mismo en el caso de una redistribución del indicador si antes se encontraba más acumulado en ciertas zonas y como la fluorescencia es también proporcional a la cantidad de indicador libre e indicador unido (cuando una es máxima la otra es mínima y viceversa), pero si ahora el indicador se esparce en todo el espacio la fluorescencia cambiará en la zona donde antes había mas indicador y también en donde antes no había mucho, puesto que ahora aumenta la cantidad de indicador en estas zonas, pero R seguirá siendo la misma. Sin embargo la necesidad de medir o excitar en dos longitudes de onda diferentes para hacer el cálculo de la concentración en un instante dado disminuye la resolución temporal del equipo y además hace al equipo más complicado por la necesidad de sincronizar las mediciones en cada una de las longitudes de onda con un sistema que se encargue de dejar pasar alternadamente λ_1 y λ_2 . Al igual que con el método anterior la fluorescencia puede ser captada con un fotodiodo, un fotomultiplicador o una cámara CCD como muestra la figura 1.6 y además en todos ellos la medición está en cantidades absolutas.

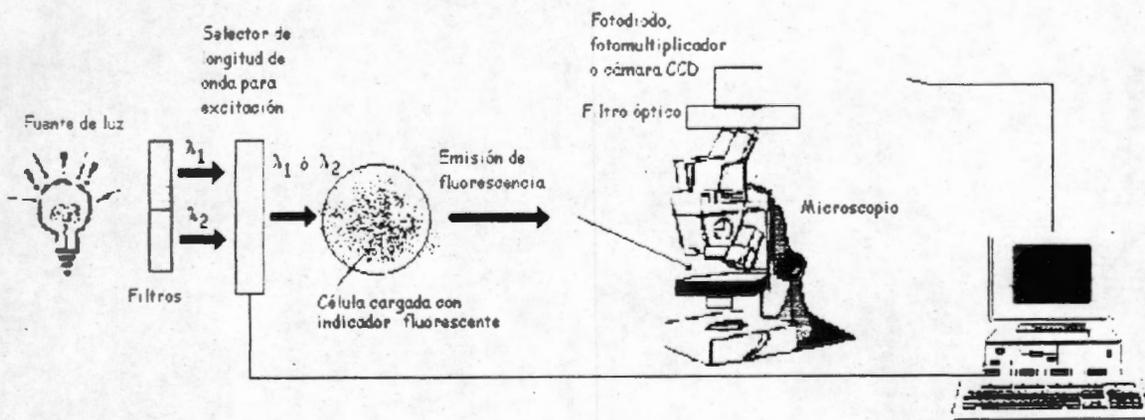


Figura 1.6 Equipo para medir la concentración del ion utilizando un indicador fluorescente que en el modo de dos longitudes de onda de excitación y una solo de emisión.

Una de las grandes ventajas al utilizar los indicadores fluorescentes es que estos pueden ser cargados a la célula además de con la técnica de microinyección con una micropipeta, por una técnica de incubación utilizando una forma esterificada del indicador y entonces la disrupción sobre la membrana celular ya no es necesaria..

2. OBJETIVOS GENERALES.

En el capítulo 1 hemos visto la importancia que juega el ion calcio dentro de las células excitables, se mencionaron diferentes técnicas para hacer mediciones de la concentración y distribución del ion dentro de la célula. Se presenta esta tesis que es parte de un proyecto que tiene como objetivo desarrollar un equipo que nos permita medir las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ durante cambios transitorios, que por cierto pueden suceder grandes cambios en tiempos muy cortos. Para lograr nuestro objetivo, el equipo a desarrollarse en general debe cumplir con ciertas características:

- 1) Debe ser una técnica altamente selectiva a Ca^{2+} sobre otros iones.
- 2) Dar información de los cambios de $[Ca^{2+}]_i$; tanto en el tiempo como en el espacio dentro de la célula.
- 3) La resolución temporal debe ser lo suficientemente alta como para poder captar los cambios transitorios rápidos de $[Ca^{2+}]_i$.
- 4) La información deberá estar de manera preferente en unidades absolutas o en ciertos casos puede darse en cantidades relativas con el fin de incrementar la resolución temporal.

Esta tesis abarca la parte del desarrollo del software para procesamiento digital de datos y la definición de las partes del equipo necesarias con las cuales se cubrirá gran parte de las características que deseamos en el equipo.

3-MATERIAL Y METODOS

3.1 PROPUESTA.

Puesto que esta tesis implica definir un método capaz de presentar la información espacial y temporal de las mediciones de la concentración de Ca^{2+} en el interior de una célula, y en base a los antecedentes presentados anteriormente, se propone implementar un equipo que utilice indicadores fluorescentes como elemento sensible al Ca^{2+} y una cámara CCD para captar imágenes. Este equipo cumple con las siguientes características:

- Es un método altamente selectivo a Ca^{2+} sobre otros iones.
- Es capaz de dar la información tanto en unidades relativas como absolutas, volviéndose un método con mayor resolución temporal en el primer caso.
- Puede llevarse a cabo la medición en células de tamaño pequeño si se utiliza al indicador en su forma esterificada.
- No produce disturbios importantes, ya que con baja concentración de los indicadores se produce buena intensidad de fluorescencia y por tanto no actúa como un buffer ni produce efectos tóxicos en la célula.
- Las imágenes capturadas dinámicamente dan información espacial y temporal de las variaciones en la concentración del ion calcio.

Sin embargo este equipo puede llegar a presentar limitaciones en resolución temporal, puesto que al trabajar con imágenes se trabaja con una gran cantidad de datos por ejemplo una imagen de 256x256 pixeles tiene en total 65536 datos, y si cada pixel esta representado con 8bits (1 byte) en total son 64Kbytes por imagen, y por tanto el tiempo de adquisición y almacenamiento de cada imagen es prolongado [6 A].

3.2 PARTES DEL EQUIPO.

El equipo que se propone tiene los siguientes elementos:

- Indicador fluorescente
- Fuente de iluminación que contenga la o las longitudes de onda de excitación del indicador seleccionado.
- Filtros selectores para dichas longitudes de onda y control de selección de filtros (shutter).
- Microscopio
- Cámara CCD
- Software y hardware de adquisición y procesamiento de imágenes.

Cada una de las partes que integran al equipo debe seleccionarse o desarrollarse cuidadosamente pues de ello dependen las capacidades del equipo.

3.2.1 Indicador Fluorescente.

Los indicadores fluorescentes para Ca^{2+} como ya se dijo son sustancias que cambian la intensidad de fluorescencia con respecto a la cantidad de Ca^{2+} unido a el, y como sabemos, para que haya mas indicador unido debe haber un aumento de la concentración de Ca^{2+} y una baja concentración de Ca^{2+} propicia que el indicador se encuentre libre. Estos indicadores cambian su fluorescencia linealmente con los cambios de concentración de calcio y además este cambio puede ser inversa o directamente proporcional a esa unión dependiendo de la longitud de onda de excitación [12L,5L, 10L].

La figura 3.1 muestra un cambio típico en la intensidad de fluorescencia debido a un cambio en la concentración del ion calcio, para un indicador fluorescente llamado fluo-3, el cual requiere excitación a 490nm y presenta máximos de la emisión a 525nm.

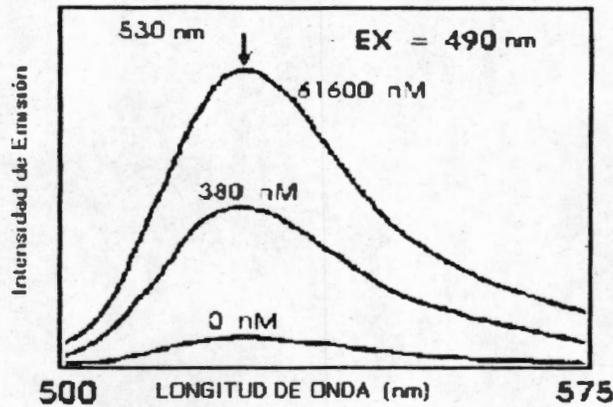


Figura 3.1 Espectro de emisión para concentraciones de 0, 380 y 61600 nM del indicador fluo-3.

Los indicadores fluorescentes de la concentración de Ca^{2+} libre en el interior de la célula han llegado a desarrollarse tanto que ahora es posible introducir al indicador en la célula sin necesidad de agredir de ninguna forma la membrana celular como en el caso de la microinyección, que puede dañar la célula antes de hacer el experimento. Esto inició una revolución en los estudios relacionados con la homeostasis celular y Ca^{2+} . Esta revolución comenzó por primera vez con R. Y. Tsien y colaboradores [12L], quienes hicieron muy popular a **quin-2** en estudios de Ca^{2+} libre en el citoplasma celular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y que desde entonces contribuyó para que los laboratorios que producen los indicadores se interesen en crear nuevos indicadores más selectivos y sensibles, con mejor producción de fluorescencia y además de para monitorear otros iones como Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e H^+ (indicadores de pH). Las áreas donde se han empleado mayormente estos indicadores fluorescentes es en estudios de la liberación de hormonas regulada por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} tienen aplicaciones importantes como estudios de Ca^{2+} regulando la permeabilidad de la membrana celular y fracciones subcelulares debido a su capacidad para ser observados mediante imágenes. Estos marcadores han encontrado menos aceptación en estudios de eventos eléctricamente disparados en neuronas y algunos sistemas musculares, debido a que estos son eventos demasiado rápidos y como ya dijimos es un método con limitaciones de resolución temporal. Sin embargo sí ha habido algunos avances en esta dirección al usar por ejemplo microscopía confocal laser en conjunto con Fluo-3 otro indicador muy utilizado es esos casos.

Por sobre todo, en términos de la facilidad para usarlos y la calibración, los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} ofrecen la técnica mas sencilla y accesible de las técnicas disponibles para medir $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en forma espacio temporal

Principios de operación de los indicadores fluorescentes.

La fluorescencia es un proceso molecular en el cual hay una emisión de radiación electromagnética debido a la absorción de radiación desde una fuente extra molecular [12L]. El tiempo de vida en el cual la molécula permanece excitada después de la fuente de radiación externa cesa es del orden de 10^{-8} segundos. La radiación de la fluorescencia tiene una longitud de onda mas larga (menor energía) que la longitud de onda de la radiación de excitación. Para muchas aplicaciones biológicas, el rango útil de longitudes de onda en el espectro electromagnético cae en el rango del ultravioleta cercano hasta el visible. Cada especie molecular tiene una o mas longitudes de onda óptimas para que la fluorescencia sea excitada, las cuales normalmente coinciden con la máxima absorción, y una longitud de onda optima de emisión. Bajo condiciones de iluminación constante y en un ambiente químico y fisico fijos, la intensidad de fluorescencia generado por una especie molecular es proporcional a su concentración. Por esto. La intensidad de fluorescencia puede ser utilizada como una herramienta de cuantificación. Debido a que la relación entre intensidad de fluorescencia y concentración es mucho mas dependiente de la instrumentación usada, y de las condiciones durante el experimento, se necesita de una calibración cada vez que se realiza alguno para mediciones de valores absolutos.

Los experimentos con fluorescencia tienden a ser utilizados en dos diferentes caminos en biología celular. Pueden ser utilizados como indicadores de la localización y cuantificación de estructuras celulares especificas.. Como las moléculas fluorescentes pueden ser sensibles a aspectos específicos de su ambiente se utilizan para monitorear algún parámetro de interés dentro de compartimentos celulares y para lograr un monitoreo continuo de cómo este parámetro cambia con manipulaciones en el experimento. Algunos de los experimentos con fluorescencia de este tipo fueron diseñados para medir pH, y los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} también quedan dentro de este grupo de experimentos.

Un tercer grupo, menos explorado, está representado por experimentos en los cuales se han unido en sitios específicos de proteínas para permitir monitoreo directo de cambios conformacionales.

Para que un experimento con fluorescencia nos de información útil sobre su ambiente, es necesario que las propiedades de la fluorescencia sean alteradas de alguna forma por el parámetro a ser medido. Para muchas aplicaciones biológicas, alguna o una combinación de los siguientes tres cambios en las propiedades de la fluorescencia son apropiadas:

- Un cambio en la producción de fluorescencia .
- Un corrimiento en el espectro de excitación.
- Un corrimiento en el espectro de emisión.

Otras propiedades como el tiempo de vida de la fluorescencia durante el experimento, también puede ser útil , pero esta generalmente requiere de instrumentación mucho más sofisticada. La medición de los cambios de intensidad de fluorescencia por causas en cambios de producción de ella en una sola longitud de onda es la forma más frecuentemente utilizada, aunque, la calibración de estas señales requiere de algunas mediciones de cantidades conocidas durante el experimento si lo que se quiere es obtener la información en cantidades absolutas, y en señales con resolución espacial, por lo general no es posible distinguir entre diferencias de fluorescencia debidas a las variaciones reales del parámetro de interés y diferencias resultantes de una distribución no homogénea del indicador y cambios por variaciones de la fuente luminosa. Para indicadores donde hay un corrimiento en su espectro de excitación o de emisión en respuesta al parámetro a ser medido , es posible superar este problema haciendo mediciones en dos longitudes de onda. Las longitudes de onda son seleccionadas de manera en que en cualquiera de las dos la señal cambie inversamente en respuesta a la variable a ser medida, o una de las dos longitudes es seleccionada por ser un punto de iso-fluorescencia, donde la intensidad de la fluorescencia no cambia en respuesta al parámetro a ser medido . Usando la técnica de

longitud de onda dual (ya sea en la emisión o en la excitación), es posible calcular la proporción del indicador en una de sus dos formas (por ejemplo unido a Ca^{2+} y libre de Ca^{2+}) con la razón de fluorescencias medidas en las dos longitudes de onda. Esta vez es independiente de la distribución del indicador o su concentración.

La figura 3.2 muestra los cambios de la intensidad de fluorescencia como producto de cambios de la concentración de Ca^{2+} . Vemos como cuando la concentración aumenta la fluorescencia del indicador excitado a la longitud de onda para medir indicador libre disminuye y la del indicador unido aumenta.

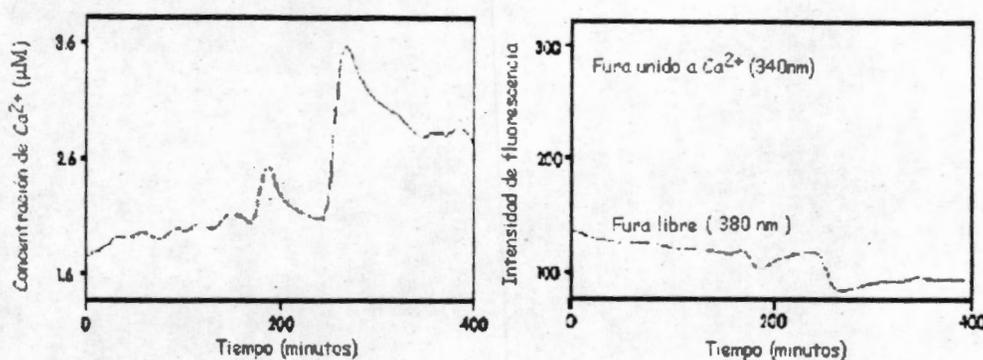
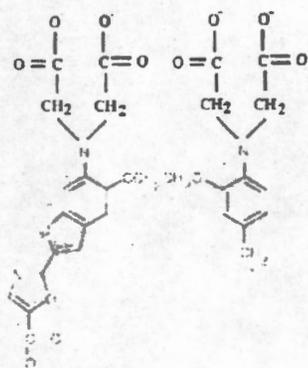


Figura 3.2 Datos obtenidos con un experimento típico con Fura-2

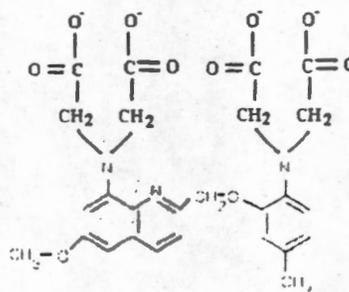
Características generales de los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} .

Los indicadores disponibles para la medición de Ca^{2+} han sido modelados en base a una molécula de unión altamente selectiva a Ca^{2+} , el EGTA, que es una sustancia que se utiliza mucho durante un experimento para considerar el medio libre de Ca^{2+} . Tiene una selectividad para Ca^{2+} sobre Mg^{2+} de 5 a 6 ordenes de magnitud, y esta bien ubicado para retener Ca^{2+} en el rango de concentraciones fisiológicas de 10^{-8} a 10^{-3} M. La figura 3.3 muestra la estructura de EGTA, de quin-2 y de Fura-2 para comparación. En ella se puede observar que el ácido tetracarboxílico que es el sitio de unión a Ca^{2+} permanece casi intercambiable en estos indicadores fluorescentes a Ca^{2+} , y que se han adicionado otros grupos los cuales actúan como reporteros de Ca^{2+} . Al unirse a Ca^{2+} se le quita al nitrógeno un par de electrones de los anillos aromáticos resultando una alteración de las propiedades de fluorescencia. Entonces estos cambios son utilizados para calcular la proporción del

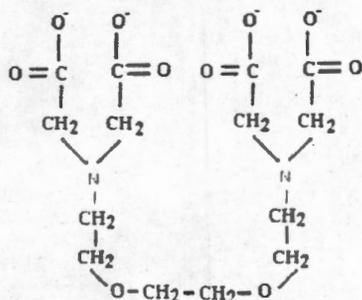
indicador en la forma unido a Ca^{2-} o libre de Ca^{2-} . Al modificar el núcleo aromático para hacer que se retiren mas o menos electrones, la afinidad del sitio de unión puede decrementar o incrementar respectivamente.



Estructura molecular de Fura-2



Estructura Molecular de Quin-2



Estructura molecular del EGTA

Figura 3.3 Estructura molecular de agentes de unión e indicadores de Ca^{2-}

Como se menciona antes, una propiedad importante de estos indicadores de Ca^{2-} es su selectividad por Ca^{2+} sobre Mg^{2+} . Aunque un buen número de estos iones pueden llegar a unirse a EGTA, incluyendo Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , y otros iones metálicos divalentes los cuales se pueden encontrar en bajas concentraciones dentro de una célula. Estos iones metálicos debido a que se unen al indicador fluorescente interfieren con la calibración del equipo. Otros iones los cuales pueden afectar los sitios de unión para Ca^{2+} son H^+ , mientras que EGTA es muy sensible al pH en el rango fisiológico (pH de 6.5 a 8.0). Por contraste los quin-2 y fura-2 son relativamente insensibles al pH en este rango.

Existen varios indicadores fluorescentes para medir la concentración de Ca^{2+} . La popularidad de ellos fue cambiando de acuerdo a la época en que aparecieron y al desarrollo tecnológico de los instrumentos ópticos y electrónicos. A continuación mencionaremos algunos de ellos y sus características:

Quin-2

Fue el primer indicador fluorescente para Ca^{2+} por lo que fue usado ampliamente, antes de la aparición de otros. Tiene la desventaja de que se necesita inyectar a las células con alta concentración de este indicador para lograr una buena intensidad de fluorescencia. Esto por supuesto en cualquier experimento de fisiología celular es indeseable, ya que la interacción con componentes químicos extraños lleva a medir artefactos al realizar las pruebas. Además en general los indicadores fluorescentes actúan como un buffer al ion al que se unen, es decir retiran iones del medio del interior celular que puede afectar la respuesta de la célula. Otra desventaja es que la máxima concentración que puede ser medida de Ca^{2+} está limitada acerca de 1mM que es menor a los valores máximos de concentración que llega a haber. Tiene una pobre discriminación de Ca^{2+} sobre Mg^{2+} lo que ocasiona que fácilmente iones magnesio se unan a él y emita fluorescencia correspondiente a la concentración de este ion y no a Ca^{2+} . Sin embargo muestra ventajas como el ser bastante soluble en agua y por ello puede ser introducido a la célula por medio de la forma acetoxymethyl ester (método AM que se verá mas adelante) sin ninguna complicación. Este indicador emite su máxima fluorescencia alrededor de los 360nm y se necesita una longitud de onda pequeña de excitación(339nm). El hecho de necesitar una sola longitud de onda de excitación y emitir a una misma longitud de onda evita el uso de filtros alternados en la medición como para el caso de otros marcadores, sin embargo lo somete a los errores que ya hemos hablado.

Fura-2.

Actualmente es el indicador de Ca^{2+} mas ampliamente utilizado en estudios con imágenes. Es cerca de 30 veces mas fluorescente que **Quin-2** y es capaz de medir concentraciones mucho mayores y discrimina más el Ca^{2+} sobre Mg^{2+} . Esto hace que las concentración del indicador en el interior celular puedan ser mucho menores (en el orden de decenas de nM, en lugar del rango de μM de quin-2). Las desventajas de este indicador es que si no se usa con el debido cuidado al ser cargado al interior de la célula por el método AM, sufre una hidrólisis incompleta y entonces se compartamentaliza en órganos subcelulares, aumentando el efecto buffer del que ya se ha hablado. Fura-2 requiere de dos longitudes de ondas de excitación 340nm y 380nm la primera para fura-2 que tiene unido Ca^{2+} y la segunda para el que se encuentra libre, y la emisión ocurre a 510nm para ambos casos, esta doble excitación es útil para evitar los errores en el cálculo de la concentración y permite utilizarlo en aplicaciones con imágenes. Aquí es importante hacer notar que la fuente luminosa con la que este dotado el microscopio debe contener estas longitudes de onda. Las mediciones de intensidad de fluorescencia en ambas longitudes de onda son necesarias ya que como veremos mas adelante el calculo de la concentración de Ca^{2+} hace uso de ellas . La excitación a dos longitudes de onda implica la utilización de un aparato llamado "shutter" que se encarga de hacer los cambios alternados entre filtros para variar la longitud de onda de excitación, además de mandar una señal de sincronía.

Indo-1.

Indo-1 es tan utilizado como **Fura-2**, solo que difiere en que este es un indicador de Ca^{2+} que tiene dos longitudes de onda de emisión de fluorescencia 485nm y 405nm para indicador libre e indicador unido a Ca^{2+} respectivamente, lo cual hace que debe haber un cambio de filtros a nivel de objetivo, lo cual podría dificultar su aplicación para aplicaciones en imágenes ya que un filtro colocado frente a la cámara podría ocasionar distorsión en la imagen, pero si esto no es problema es valido el utilizar un "shutter" u obturador como en el caso de **Fura-2**. La longitud de excitación es una sola y es de 335nm.

Fluo-3.

Este es un marcador con muy buenas características como el ser excitado con luz visible, lo cual hace que la óptica no deba ser especializada, tiene mucha de las características de **Fura-2**, sin embargo no es apropiado en el estudio con imágenes desde un microscopio de óptica convencional puesto que la fluorescencia de fondo suele ser muy grande y es difícil eliminarla en este tipo de óptica. No en cambio con un microscopio confocal.

Rhod-2.

Tiene casi las mismas características que el **Fluo-3** puede medir altas concentraciones de Ca^{2+} (10mM) sin embargo es necesario una mayor concentración del marcador para lograr una buena fluorescencia en comparación de **Fluo-3** y además **Rhod-2** sufre más compartimentalización intracelular.

Los tres primeros indicadores que se mencionaron son excitados con luz ultravioleta, y hay experimentos donde esto es problemático ya que puede dañar a la célula. Para esos estudios se utilizan entonces indicadores excitados con luz visible como los dos últimos, solo que ello dificulta la medición por medio de un microscopio óptico convencional debido a la luz de fondo. Además de estos indicadores de más reciente creación están **fura-red**, **calcium green-1**, **calcium green-2**, que están más bien diseñados para la nueva tecnología de microscopía confocal de escaneo laser al igual que **fura-3** y **rhod-2**.

A continuación se presenta una tabla resumiendo las características de excitación y emisión de cada uno de los indicadores descritos arriba, así como otro parámetro llamado constante de disociación K_d , necesaria en los cálculos de calibración con estos indicadores.

Indicador	Longitudes de onda óptimas para		Kd
	Excitación (nm)	Emisión(nm)	
Quin-2 libre	339	492	126
Quin-2 unido a Ca ²⁺	339	492	
Fura-2 libre	380	510	224
Fura-2 unido a Ca ²⁺	340	510	
Indo-1 libre	355	485	250
Indo-1 unido a Ca ²⁺	355	405	
Fluo-3 libre	490	525	400
Fluo-3 unido a Ca ²⁺	490	525	
Rhod-2 libre	550	575	400
Rhod-2 unido a Ca ²⁺	550	575	

Tabla 3.1 Indicadores fluorescentes excitados por luz ultravioleta y visible



Figura 3.4 Espectro electromagnético

Cada uno de los indicadores de los que hemos hablado tiene dos versiones que permiten dos formas de introducirlo al interior de la célula, una por medio de microinyección en la versión de ácido libre del indicador, que es el que hace uso de una micropipeta para pasar la solución con el indicador hacia el interior celular. Tiene la desventaja de que entonces hay que contar con el equipo y técnicas para el uso de pipetas, además la pipeta puede dañar a la célula al penetrarla. Esta fue la forma que se utilizaba antes de la aparición del indicador en forma esterificada (AM) que es una técnica mas sencilla y actual, que consiste simplemente en incubar las células en la solución con el indicador disuelto y este gracias a su forma esterificada es permeable a la membrana celular y difunde hacia su interior después de un tiempo, una vez dentro enzimas que están

presentes en el interior de la célula le quitan la parte esterificada (hidrólisis) y lo dejan como ácido libre que ya no es permeable a la membrana celular y entonces el indicador ya no puede salir. Un protocolo más detallado para cargar el indicador AM se describe a continuación:

- 1) Prepare las células ya sea en suspensión o alguna otra técnica.
- 2) Prepare a 1 mM DMSO en solución de stock del indicador AM ester (no almacene el indicador AM ester en soluciones acuosas por periodos de tiempo prolongados ya que puede causar hidrólisis espontánea).
- 3) Diluya esta solución con el indicador 100 a 500 veces en un buffer apropiado. Use la mínima concentración del indicador AM ester necesaria para obtener una señal de fluorescencia adecuada a la instrumentación utilizada. La concentración del indicador casi siempre es tan baja como 1 μM y raramente excede de 5 μM . Esta baja concentración del indicador es recomendada para reducir artefactos que resultante la hidrólisis enzimática incompleta del AM esters. Tsien recomienda el uso de una solución al 25% wt/wt de un detergente no-iónico, de baja toxicidad (Pluornic F-127) para promover la dispersión del indicador.
- 4) Adicione la solución acuosa diluida a la solución en donde están las células en un volumen aproximadamente igual a estas.
- 5) Incubar de 15 a 60 minutos a 25 o 37 grados centígrados (este tiempo puede variar mucho en función del tipo celular).
- 6) Lavar las células dos veces con buffer.

Selección del indicador a utilizar.

Debido a que el equipo con que se cuenta es un microscopio óptico convencional y de acuerdo a las características que se han mencionado de los indicadores el más apropiado para nuestro caso es **Fura-2/AM** puesto que está libre de errores utilizándolo en el modo de excitación dual, y su fluorescencia es lo suficientemente grande como para aplicaciones con imágenes, puede servir para estudios en una sola célula o en poblaciones celulares.

Por otra parte también puede ser utilizado en el modo de excitación a una sola longitud de onda bajo la condición de estabilidad en la distribución del indicador en el interior de la célula y no variaciones en la iluminación y con ello conseguir una mejor resolución temporal.

Calibración de los indicadores fluorescentes.

La calibración de los indicadores fluorescentes depende de si es un indicador utilizándose en el modo de una sola longitud de onda en excitación y emisión, o si es un indicador en el modo ya sea de excitación dual o emisión dual [12L]. Para cualquiera de los dos casos el principio parte de la ecuación de acción de masas que en el equilibrio muestra la relación de la concentración de calcio libre Ca^{2+} (Ca^{2+}), el grado de unión del Ca^{2+} con el indicador ($[CaX]$), y la concentración libre ($[X]$) del indicador, que es:

$$Kd = \frac{[X] \times [Ca^{2+}]}{[Ca X]} \quad \text{que da a lugar a:} \quad Ca^{2+} = Kd \times \frac{[Ca X]}{[X]}$$

pero la cantidad $[CaX]$ es proporcional a la diferencia entre la fluorescencia (F) en cualquier instante y la fluorescencia propia del indicador sin Ca^{2+} (F_{min}), es decir que cuando la concentración es cero, al no haber indicador unido la fluorescencia es igual a la fluorescencia mínima por lo que llegamos a: $[CaX] = F - F_{min}$.

Por otra parte la cantidad de indicador libre [X] es proporcional a la diferencia entre la fluorescencia cuando todo el indicador está unido (F_{\max}) y la fluorescencia en cualquier instante (F), es decir que si en un momento dado la fluorescencia F es tan grande como F_{\max} no hay indicador libre por lo que esto queda expresado por: $[X] = F_{\max} - F$. Si reemplazamos estos resultados en la expresión de arriba obtenemos:

$$[Ca^{2+}] = Kd \times \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

Esta es precisamente la relación utilizada para indicadores en donde se utiliza una sola longitud de onda de excitación y emisión. Como vemos para el cálculo de la concentración en un momento dado solo hace falta hacer una sola medición de la intensidad de fluorescencia en una longitud de onda por lo que la resolución temporal es el doble de si necesitáramos hacer dos mediciones de fluorescencia como en el caso de emisión o excitación dual. El protocolo de calibración que nos lleva a obtener F_{\max} y F_{\min} en estudios con una sola célula utiliza un ionóforo que es una sustancia que aumenta la permeabilidad de la membrana selectivamente a iones metálicos divalentes, para aumentar la permeabilidad a Ca^{2+} el ionóforo más utilizado es Br-A23187 o ionomicina. Adicionando esta sustancia se puede elevar la concentración intracelular de Ca^{2+} lo que nos lleva a saturar el indicador y a medir F_{\max} . Para medir F_{\min} necesitamos reducir la concentración intracelular de Ca^{2+} a cero, sin embargo esto es muy difícil de lograr después de haber vertido el ionóforo, pues estas sustancias no permiten equilibrar la concentración de Ca^{2+} a muy bajos niveles, por ello se toma ventaja de una desventaja de los indicadores, la capacidad de tener afinidad a otros iones además de Ca^{2+} . Y precisamente fura-2 e indo-1 tienen una afinidad más grande a Mn^{2+} que a Ca^{2+} pero una vez unidos a Mn^{2+} estos indicadores no producen más que el nivel de autofluorescencia, entonces si se adiciona una gran cantidad de Mn^{2+} en forma de $MnCl_2$ y aprovechando la permeabilidad aumentada de la membrana por el ionóforo para que el Mn^{2+} pueda entrar a la célula y unirse al indicador se puede disminuir la fluorescencia y obtener F_{\min} . Los pasos del protocolo de calibración se dan a continuación en el listado y en la figura 2.5.

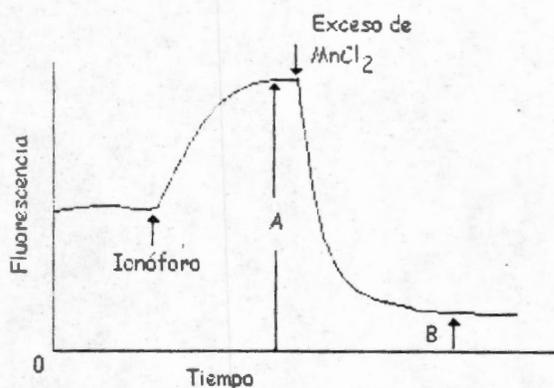


Figura 3.5 Protocolo de calibración con excitación y emisión en una sola longitud de onda

- 1) Adicionar suficiente ionóforo para incrementar la señal al máximo. Con ionomicin , una concentración final de 2 a 40 μM en la solución de stock DMSO normalmente es suficiente. (Nota: serum albúminas se unen al ionomicin , entonces si es posible hay que eliminarlas de la solución para maximizar la eficiencia del ionoforo). Medir $F_{\text{min}} = A$.
- 2) Adicionar 2mM de MnCl_2 para tener exceso de Mn^{2+} . El Mn^{2+} utiliza al ionoforo para penetrar a la célula y unirse al indicador en el interior de la célula, Medir $F_{\text{min}} = B$
- 3) Repetir varias veces los pasos 1 y 2 para obtener un promedio de F_{max} y F_{min} .

Para indicadores utilizados en el modo de excitación dual la relación es un poco diferente, ya que en este tipo de experimentos se hace uso de la razón entre la F medida a la longitud donde se mide indicador unido y la F medida a la longitud de indicador libre. Esta relación es:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \beta \times \frac{(R - R_{\text{min}})}{(R_{\text{max}} - R)}$$

donde:

K_d es la constante de disociación para Ca^{2+} del indicador

R es la razón de fluorescencia de $F_{\text{longitud de onda de indicador unido}} / F_{\text{longitud de onda para indicador libre}}$

R_{max} es la razón de fluorescencia con indicador totalmente unido a Ca^{2+}

R_{min} es la razón de fluorescencia con el indicador totalmente libre

β es la razón entre las fluorescencias $F_{\text{con indicador totalmente libre}} / F_{\text{con indicador totalmente unido}}$ pero medidas ambas en la longitud de onda para medir indicador libre.

El protocolo para este caso no puede usar al Mn^{2+} para calcular R_{min} , puesto que no sería posible calcular R_{min} ya que requiere que el indicador pueda producir fluorescencia debido a la excitación y en una baja concentración de Ca^{2+} y no solo de la autofluorescencia del indicador. Entonces para ello lo que se hace es agregar primero EGTA-Tris y luego ionoforo para que al penetrar el EGTA-Tris actúe para unirse al Ca^{2+} intracelular y dejar al indicador libre y producir fluorescencia, de esta manera se calcula R_{min} . Después se puede elevar la cantidad de Ca^{2+} vía $CaCl_2$ que penetra a la célula ayudado por el ionóforo y saturar al indicador lo que nos lleva a calcular R_{max} y finalmente se agrega ahora si $MnCl_2$ para calcular la autofluorescencia que es un valor que se debe restar a cada una de las mediciones. El protocolo queda descrito en el siguiente listado y en la figura 2.6.

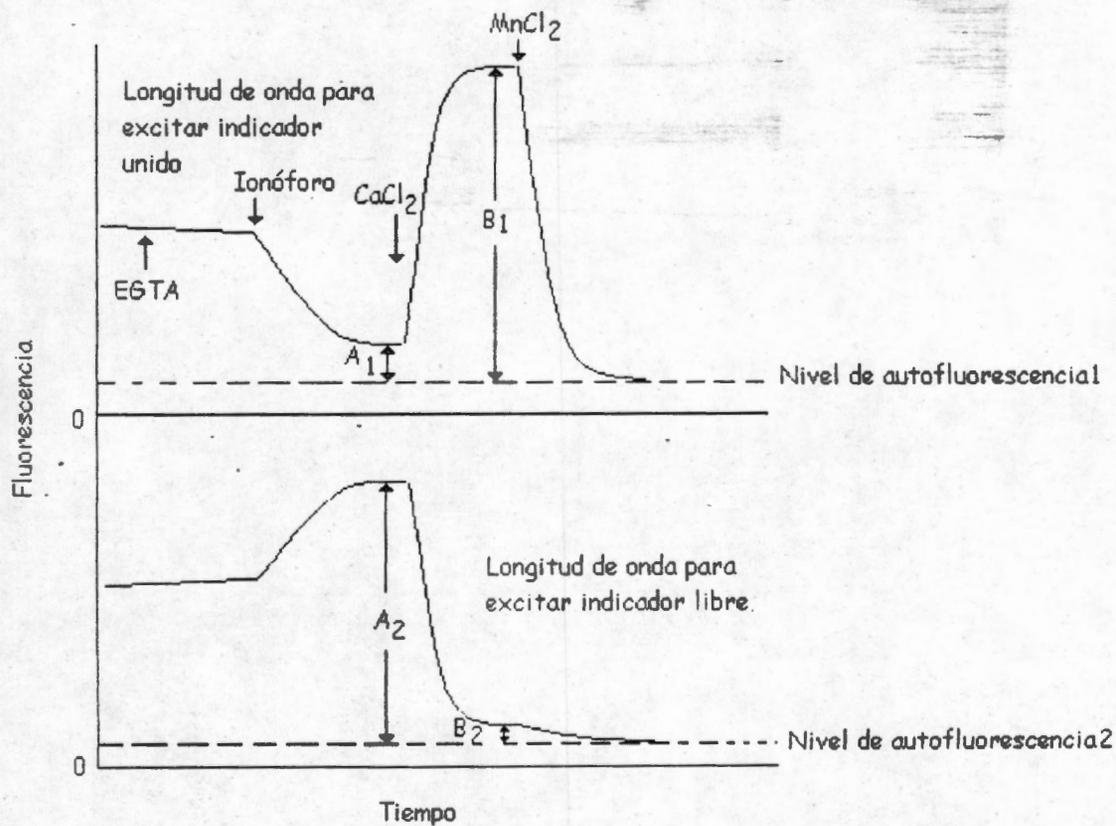


Figura 3.6 Protocolo de calibración en modo de dual excitación o emisión.

- 1) Adicionar EGTA-Tris equivalente a 3 o 4 veces la concentración de Ca^{2+} que hay en el medio.
- 2) Adicionar 2- 40 μM de ionomicin hasta llevar la señal a un cambio máximo y una vez que es estable medir $A_1 + \text{autofluorescencia}_1$ y $A_2 + \text{autofluorescencia}_2$.
- 3) Una vez que se ha reducido al mínimo la concentración de Ca^{2+} libre, se agrega 10mM de CaCl_2 a fin de saturar al indicador intracelular, y entonces se calcula $B_1 + \text{autofluorescencia}_1$ y $B_2 + \text{autofluorescencia}_2$.
- 4) Se adiciona 5mM de MnCl_2 para evaluar el valor de autofluorescencia 1 y autofluorescencia 2.
- 5) Se resta el término de autofluorescencia en su respectiva longitud de onda y se calcula entonces $R_{\min} = A_1 / A_2$, $R_{\max} = B_1 / B_2$ y $\beta = A_2 / B_2$.

Solo falta decir que la técnica de indicadores fluorescentes con imágenes por lo general presenta sus resultados en figuras con colores falsos que casi siempre van en una escala del azul al rojo, siendo el azul representativo de una baja concentración y el rojo de una alta concentración. A continuación las figuras 3.7 a la 3.10 muestran los resultados de varios experimentos que utilizan indicadores fluorescentes.

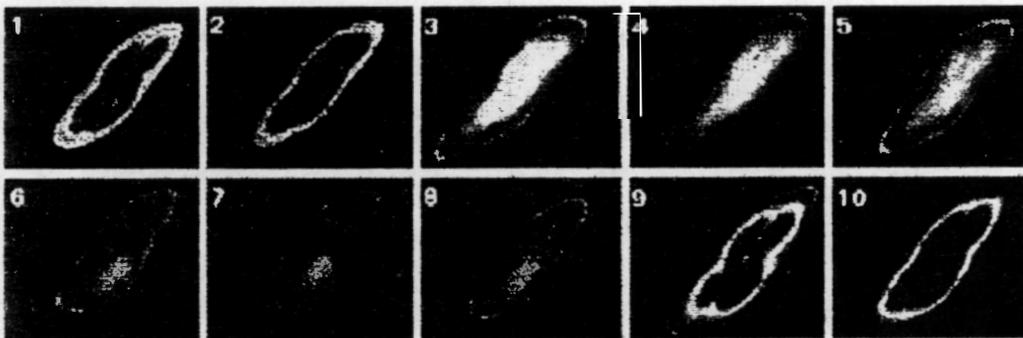


Figura 3.7 Imágenes en pseudocolor utilizando el indicador Fluo-4 AM de los cambios de calcio libre intracelular en células AtT-20/D16v-F2. monitoreadas a intervalos de 9-segundos. Para inducir el flujo de calcio libre al interior de la célula, estas fueron despolarizadas con 50 mM de KCl en (figura 2) y expuestas a 5 mM (figura 8) de ionomicin (ionoforo de calcio). Las imágenes en pseudocolor van de acuerdo a la intensidad de fluorescencia, con el rojo representando altas concentraciones de calcio y el azul representando bajas concentraciones. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de altas longitudes de onda apropiado para Fluo-4 a través de una cámara CCD controlada por el software de Universal Imaging Corporation's MetaMorph. Foto de Diane Gray and Janell Bishop-Stewart, Molecular Probes, Inc.

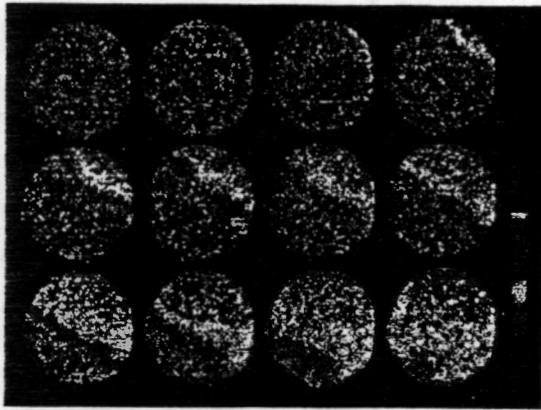


Figura 3.8 Imagen de los concentración de Ca²⁺ inducidos en un oocito de un pez estrella *Pisaster ochraceus* a intervalos de 5 minutos después de haber sido fertilizado. El oocito fue cargado por microinyección con calcium-green. Foto de Stephen A. Stricker, Departamento de Biología, Universidad de Nuevo México.

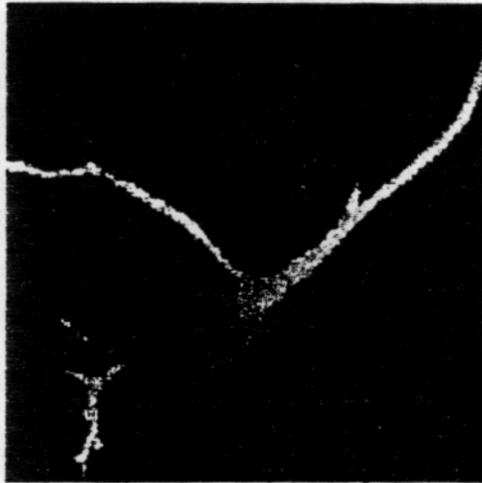


Figura 3.9 Imagen en color falso de la concentración de Ca²⁺ libre en neuronas de Purkinje del cerebelo de un ratón embrión. Las neuronas fueron cultivadas por 12 días, y cargadas con fura-2 usando un microelectrodo. La imagen representa el cálculo de la concentración utilizando el método de la razón de fluorescencias excitando a 340 nm y a 380 nm, y revela la movilización de almacenes internos de Ca²⁺ sin contribución de flujo externo de Ca²⁺. Foto de. Linden, Departamento de Neurociencias, Universidad Johns Hopkins, y M. Smeyne y J.A. Connor, Instituto Roche de Biología Molecular.

3.2.2 Fuente de Iluminación.

La fuente de iluminación se encarga en conjunto con un filtro óptico o dos filtros y un shutter (para excitación dual) de proporcionar la longitud o longitudes de onda apropiada de la luz para excitar la fluorescencia. Por ello la luz emitida por la fuente luminosa debe contener esta longitud de onda. No todas las lámparas emiten luz en las longitudes de onda de la excitación de fluorescencia, por ejemplo una lámpara común de tungsteno emite en el rango visible e infrarrojo pero difícilmente en el ultravioleta.

En la figura 3.11 podemos observar el espectro de radiación para dos tipos de lámparas comerciales muy utilizadas en experimentos biológicos por su alta potencia de iluminación. Una de ellas es una lámpara de mercurio, tiene gran potencia, solo que presenta picos discretos a diferentes longitudes de onda y podría no llegar a tener la potencia suficiente si la longitud de onda para máxima excitación no corresponde a uno de estos picos.

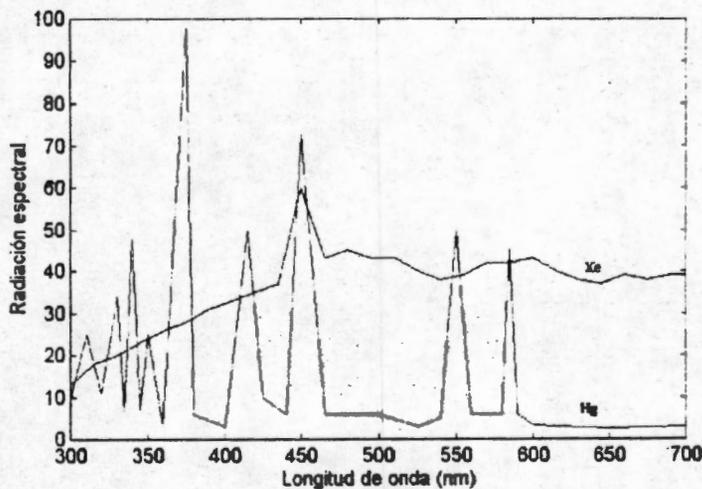


Figura 3.11 Espectro de radiación de lámparas de mercurio y xenón

El otro espectro presentado corresponde al de una lámpara de xenón, esta tiene menor potencia en algunos puntos que la lámpara de mercurio, pero contiene casi todo el rango de longitudes de onda, es por ello que esta lámpara sea más recomendada y por ello se selecciona como elemento de fuente de iluminación en el equipo, más específicamente una lámpara de xenón de 75W como reporta la literatura [12L].

3.2.3 Filtros ópticos y controlador de cambio de filtros (shutter).

Los filtros ópticos ya se venden comercialmente y solo se seleccionan por parámetros como : la longitud de onda central que deja pasar, el ancho de banda alrededor de esa longitud de onda central, tamaño, peso y costo. Por ejemplo la compañía ORIEL Corporation ofrece de entre muchos filtros los que tienen número de catalogo 51660 y 51680 que tienen las características necesarias para la excitación de Fura-2 en 340 y 380nm respectivamente. Sin embargo como mas adelante veremos se tiene la necesidad de construir nuestro propio sistema de cambio de filtros, la forma de estos debe ser adaptable al diseño, pero los de la compañía ORIEL al ser de cristal su forma no puede ser cambiada. Por esto se pretende utilizar los llamados filtros de gelatina muy utilizados para fotografía y tienen una gran calidad óptica y que además son micas que pueden ser recortadas para obtener la forma que se desee .

El "shutter" como se conoce en inglés al instrumento que se encarga de seleccionar una longitud de onda desde un conjunto de filtros ópticos y pasarla, fue una parte del equipo que preocupó de alguna forma, por razones de costo como veremos mas abajo de acuerdo a lo encontrado con algunos de estos instrumentos comerciales.

El cambio de filtros es necesario para lograr hacer mediciones con indicadores fluorescentes que se excitan (o emiten) en dos longitudes de onda y se tiene que tomar en cuenta varias características para seleccionar uno. Entre estas características una de las mas importantes que deben cumplirse es la de velocidad de cambio entre un filtro y otro, que debe ser lo mas alta posible para que este instrumento no sea la causa de una resolución temporal pobre en todo el equipo en conjunto, y además que recordemos que para hacer un solo cálculo de concentración es necesario hacer una toma de la emisión de fluorescencia habiendo excitado al indicador libre (380nm para fura-2) y otra toma de la emisión habiendo excitado al indicador unido (340nm para fura-2). Supongamos que en el instante en que se tomo la primera la concentración de Ca^{2+} es de $[Ca^{2+}]_{\text{indicador_libre}}$ y en el instante en que se tomo la segunda la concentración es $[Ca^{2+}]_{\text{indicador_unido}}$, para que el cálculo de la concentración con ambas tomas sea correcto es necesario que el cambio de concentración $\Delta[Ca^{2+}] = [Ca^{2+}]_{\text{indicador_libre}} - [Ca^{2+}]_{\text{indicador_unido}}$ sea aproximadamente 0, pero si el tiempo que transcurre entre una y otra medición es demasiado largo el cambio de concentración puede llegar a ser grande y conduce a cálculos incorrectos.

Compañías como **Axon Instruments** (<http://www.axonet.com/>) ofrecen equipos para captura y procesamiento de imágenes celulares acoplado a un microscopio como el de la figura 3.12, además de accesorios que permiten aplicaciones como la medición de concentraciones iónicas con indicadores fluorescentes. Este equipo llamado "**Integrated System for Cellular Imaging**" tiene entre sus accesorios un shutter para el cambio de filtros. El shutter del que hace referencia es denominado controlador de longitud de onda , y especifica dos modelos cuyas características se dan a continuación:



Figura 3.12 Integrated System for cellular Imaging de Axon Instruments

Lambda 10-2

-Es un shutter que se muestra en la figura 3.13 es operado a base de un microcontrolador , con alta velocidad de cambio entre filtros , el instrumento consiste en una rueda que contiene una serie de filtros circulares de 25 mm de diámetro , y un obturador electrónico, el tipo de filtro depende de la aplicación y es colocado manualmente en un compartimento. El cambio entre filtros adyacentes puede variar entre los 55 y 100 ms y depende del peso y numero de filtros montados sobre la rueda. La rueda gira gracias a un motor de pasos controlado por algoritmos inteligentes que vencen la inercia de la carga evitando oscilaciones, además de detectar error en la posición . La velocidad del cambio puede ser elevada hasta 33ms con el uso de filtros especiales.

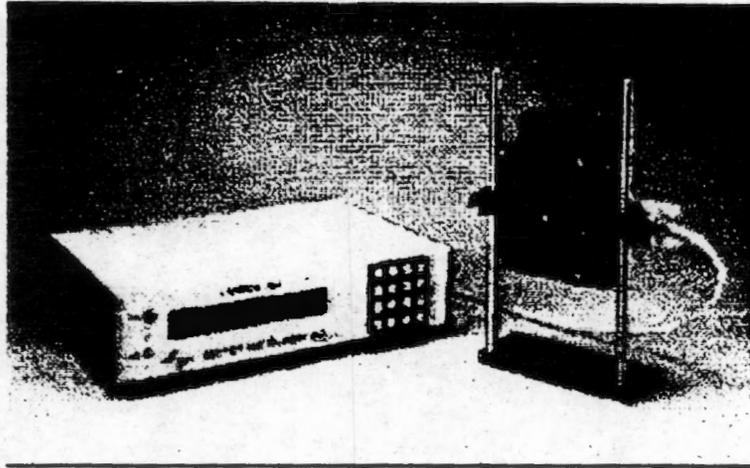


Figura 3.13 Lambda 10-2 de Axon Instruments

Lambda DG-4.

Este equipo de la figura 3.14 es de ultra alta velocidad puede hacer cambios entre filtros en un tiempo menor a 1.2 ms. La tecnología de este equipo es diferente a la de Lambda 10-2 , ya que la selección de longitudes de onda no se hace por un cambio directo entre filtros sino por medio de espejos que desvían un haz de luz monocromático proveniente de la previa separado de la luz de una lámpara de xenón por medio de filtros de interferencia , con ello entonces seleccionan que rayo de luz se dirige hacia la muestra .



Figura 3.14 Lambda DG-4 de Axon Instruments.

Debido a las características mencionadas Lambda 10-2 es bastante pobre en resolución temporal lo que se quisiera es un equipo tal vez no tan rápido como lambda DG4 pero si aproximadamente con un tiempo de respuesta igual.

Los resultados de la búsqueda de este shutter no fueron muy alentadores en cuanto a adquirir alguno comercial debido a sus precios elevados, y además a que estos shutters comerciales tienen aditamentos y/o capacidades que no son necesarios en nuestro experimento, como por ejemplo el que sean capaces de manejar mas de 2 filtros que seguramente incrementa su complejidad y por tanto su costo. Por lo anterior se opto por intentar diseñar uno el cual cumpla con nuestras necesidades y que el costo se reduzca al mínimo.

Diseño del controlador de cambio de filtros.

Si analizamos el funcionamiento de Lambda 10-2, vemos que la lentitud de cambio entre un filtro y otro se debe a la inercia que debe vencer para cambiar su posición, sin embargo si pensamos en la posibilidad de en lugar de fijar el disco hacerlo girar todo el tiempo a mas o menos 250 revoluciones por segundo, y que el disco contenga en una mitad a un filtro que deje pasar una longitud de onda de 340 nm (excitación de fura-2 unido) y en la otra mitad otro filtro que deje pasar una longitud de onda de 380nm (excitación de fura-2 libre), para el modo dual de Fura2, obtendríamos un cambio de filtro en un tiempo de 2ms (4ms por vuelta pasando una vez cada filtro), entonces no tendríamos que preocuparnos por vencer ninguna inercia, sin embargo el problema ahora reside en saber cual de los filtros esta pasando por enfrente de la fuente luminosa, lograr esta cantidad de revoluciones en un motor, y observar si hay efectos de distorsión al tener en movimiento los filtros.

Se construyó un prototipo hecho a base de un disco compacto al cual se le colocaron un par de micas, una de color rojo y otra azul, que simulan ser los filtros para la excitación dual del Fura-2, mas o menos un esquema de ellos es el de la figura 3.15.

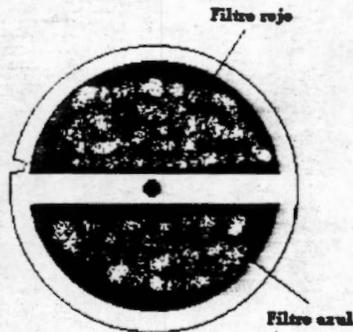


Figura 3.15 Disco prototipo

Además al disco se le hizo una muesca que ayudara a detectar el momento en que pasa cada filtro. Si hacemos pasar el disco entre un led y un fotodiodo, el disco en cualquier parte excepto en la muesca no dejará pasar la luz del led al fotodiodo y este no se polariza, manteniendo una alta impedancia entra sus terminales. Si el fotodiodo se encuentra colocado en un divisor de voltaje con una resistencia en serie el valor del voltaje en el fotodiodo estará dado por:

$$V_{\text{fotodiodo}} = V_{\text{fuente}} R_{\text{fotodiodo}} / (R_{\text{fotodiodo}} + R)$$

Si la resistencia fija se elige tal que su valor sea mucho menor a la resistencia del fotodiodo en el estado de no conducción, entonces la caída de voltaje en el fotodiodo será casi igual a la del voltaje de fuente. Sin embargo en el momento en que la muesca pase entre el fotodiodo y la luz del led incide sobre el fotodiodo hace que este conduzca y entonces se reduce su impedancia a un mínimo tal que ahora la resistencia fija es mucho mayor a la resistencia del fotodiodo y entonces la caída de voltaje en el fotodiodo tiende a cero. Sin embargo para obtener en realidad valores de cero y de fuente la señal del fotodiodo se introduce a un comparador de voltaje que entregue estos valores.

La siguiente figura 3.16 muestra lo que se describe, con el disco montado sobre un motor de DC que lo hace girar entre dos pares de dispositivos fotodiodo-led y la señal que se vería en el comparador. Cada par de fotodiodo-led tiene asociado la identificación del paso de uno de los filtros. Cada par da una señal de pulsos que van indicando cuando su filtro asociado esta pasando.

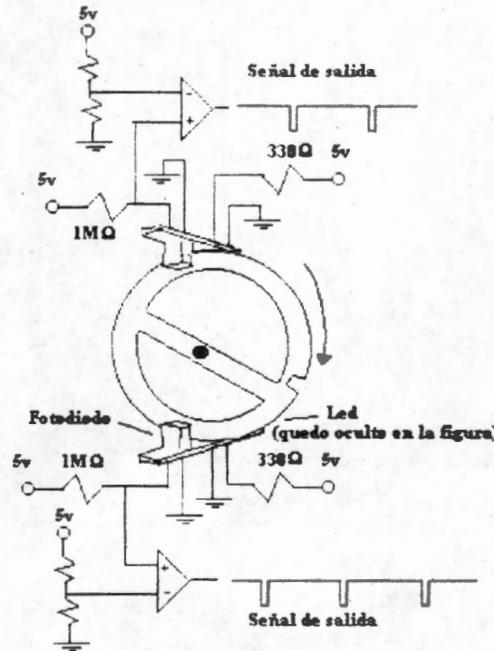


Figura 3.16 Detección del paso de filtros

Ahora hay que implementar un circuito que se encargue de dejar pasar selectivamente uno de los pulsos a una sola salida dependiendo de que filtro sea necesario en un momento dado y asegurar que después de haber dejado pasar algún pulso el próximo provenga del fotodiodo-led contrario pues el cálculo de la concentración depende de un par de imágenes, una de cada filtro. Una forma de hacerlo es disminuir la velocidad del motor hasta asegurar que si se selecciona un pulso, el tiempo que lleva hacer la toma y guardar una imagen sea menor o igual al tiempo que le lleva al disco girar 180° para que la próxima vez se haga una toma sea con el filtro contrario, sin embargo para estar totalmente seguro de no equivocarnos este tiempo se hace lo suficientemente grande por lo que se pondría a girar al motor muy lentamente y por tanto se disminuye la resolución en tiempo de cambio de filtros, algo no deseable. Otra solución que es la que tomaremos es mantener

el motor girando lo mas rápido posible, pero que exista un circuito extra que se encargue de elegir de donde vendrá el siguiente pulso utilizando por ejemplo un bit de un puerto de la computadora, donde si su valor es de cero volts, conocido como cero lógico en electrónica digital, elige que el pulso vendrá del fotodiodo1, y si tiene 5 volts, uno lógico digital, se elige que el pulso venga del fotodiodo2 y además por otro bit se puede activar o desactivar la posibilidad de que haya un pulso solo cuando el sistema no esté ocupado atendiendo una petición de toma anterior o guardando la imagen capturada que es el procedimiento más lento, entonces ya no importa que el filtro con el que se debía hacer la siguiente adquisición haya pasado, se esperará siempre a que pase de nuevo.

El circuito capaz de hacer esto se muestra en la figura 3.17, en realidad es un circuito muy sencillo, y su funcionamiento no es muy complicado. Veamos que pasa en las compuertas que tienen conectados los fotodiodos: la salida de las compuertas NAND darán un pulso si y solo si todas sus entradas están en 1 lógico, pero si por ejemplo la entrada que está conectada a bloqueo se encuentra en cero lógico ningún pulso pasará mas allá del fotodiodo, entonces con un bit conectado a bloqueo podemos decidir cuando estamos en condiciones de recibir una petición de toma. Por otra parte si bloqueo está en 1 (listo para recibir petición de toma) el pulso solo podrá venir del fotodiodo1 si la salida Q del flip flop JK se encuentra en 1, o del fotodiodo2 si Q' esta en 1, Q y Q' tienen siempre valores contrarios asi que a la vez solo puede pasar el pulso de uno de los fotodiodos.

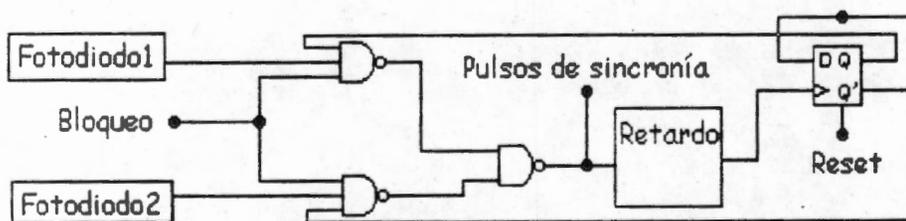


Figura 3.17 Circuito de control

La compuerta NAND intermedia que tiene como entradas las salidas de las primeras compuertas hace el trabajo de una compuerta OR con el propósito de tener una sola salida donde se refleje un pulso ya sea del fotodiodo1 o del fotodiodo2 y su salida sirve como señal de sincronía para hacer petición de toma. Si aparece un pulso en la señal de sincronía, este pasa a la señal de reloj del flip-flop con cierto retraso, esto para dar tiempo a que el sistema que se encarga de hacer las tomas (una computadora) tenga tiempo para "darse cuenta" de que se está pidiendo una toma. Una vez que el pulso llega al reloj del flip-flop este ocasiona que sus salidas Q y Q' conmuten al estado contrario al que tenían, por lo que aseguran que el siguiente pulso venga del fotodiodo contrario del que lo dio en ese momento. Si en el instante en que se hace caso a la petición de toma se pone en cero el bloqueo hasta haber terminado la adquisición entonces se asegura que el siguiente pulso venga del fotodiodo contrario al que dio el primero. Ahora solo falta estar seguros de saber cual fotodiodo dará por primera vez un pulso al iniciar una adquisición, para ello se utiliza la señal del flip-flop llamada reset, que obliga a llevar a la salida Q a 0 lógico y por tanto a Q' a 1 lógico, por lo que el primer fotodiodo que estará habilitado al inicio de cualquier serie de adquisiciones provendrá del fotodiodo2 [9L].

3.2.4 Microscopio.

El microscopio utilizado en experimentos de fluorescencia que requieren de excitar con luz ultravioleta son llamados **microscopios de epifluorescencia** [8L], figura 3.18. estos microscopios a diferencia de los microscopios ópticos convencionales cuentan con dos fuentes de luz, una de ellas le permite funcionar igual que un microscopio óptico convencional, y la otra es la fuente de luz que sirve para excitación de la fluorescencia .

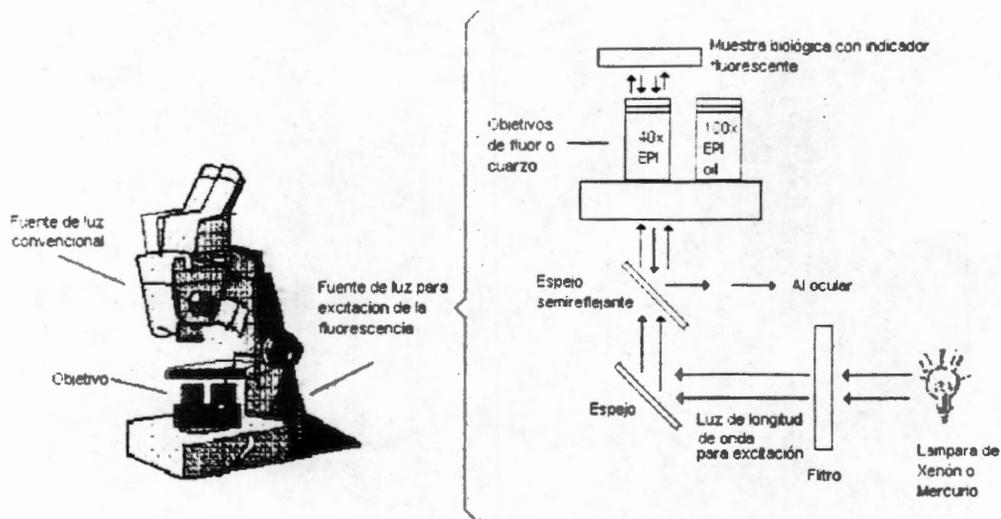


Figura 3.18 Microscopio invertido de epifluorescencia .

La luz que sirve para excitar la fluorescencia no pasa por el mismo camino que la luz convencional, pues debido a la aplicación y como se puede ver en los espectros de las lámparas de mercurio y xenón, estas lámparas emiten en el ultravioleta que puede llegar a ser dañina para la persona que está manejando el microscopio, por ello esta luz esta totalmente interna al microscopio, y para llegar a la muestra que debe excitar se refleja por un espejo, pasa por un espejo semirreflejante, que no refleja del lado por donde pasa la luz ultravioleta, se hace pasar por el objetivo y llega a la muestra excitando así la fluorescencia, la cual es recogida nuevamente por el objetivo y pasa por el espejo semirreflejando que si refleja de ese lado y por otro juego de espejos se lleva la imagen hasta el ocular, esta luz de emisión de la fluorescencia esta dentro del rango visible y no hay peligro para el que opera el microscopio.

No todos los objetivos de un microscopio presentan características ópticas tales como que el material del que estén hechos no sea opaco a las longitudes de onda para la excitación de fluorescencia, el material de los objetivos para estas aplicaciones es de cuarzo, aunque los mejores son de fluor, solo que existe una diferencia grande en los precios.

Para aplicaciones donde se requiere gran aumento de las muestras el microscopio además es del tipo invertido, pues estos permiten utilizar objetivos de gran amplificación pero que necesitan estar inmersos en aceite.

3.2.5 Cámara CCD.

Un CCD es un arreglo en forma de matriz (figura 3.19) de elementos que transducen la luz en un nivel de voltaje, estos elementos se llaman pixeles, y todos en conjunto forman una codificación de la imagen que se encuentra colocada frente a él.

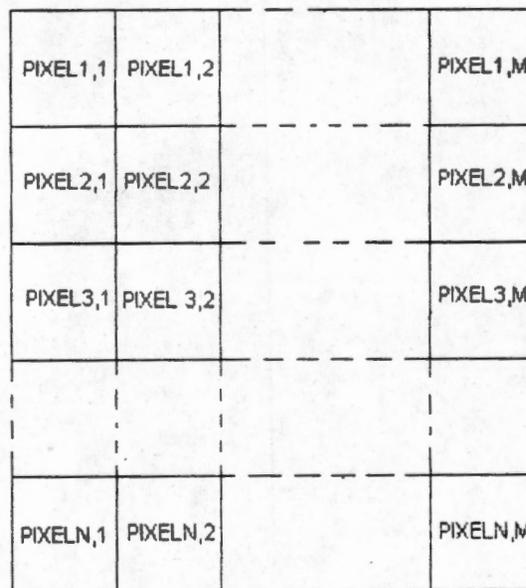


Figura 3.19 Arreglo de $N \times M$ pixeles de un CCD

Existen CCD's que captan las imágenes en blanco y negro y otros en color, cada pixel de un CCD blanco y negro es sencillo y se encarga de convertir la intensidad de la luz en un nivel de voltaje. Para el CCD a color cada pixel del arreglo tiene tres sensores uno especializado para captar luz de color rojo, otro para luz verde y otro para luz azul, dando por resultado un código RGB (Red,Green,Blue) que sirve para representar los colores de la imagen en cada punto de acuerdo a la intensidad de cada color RGB.

Un circuito que es parte de toda cámara CCD, se encarga de recorrer todos los pixeles y leerlos mandando su valor por un cable formando una señal analógica como la que se muestra en la figura siguiente [7L]:

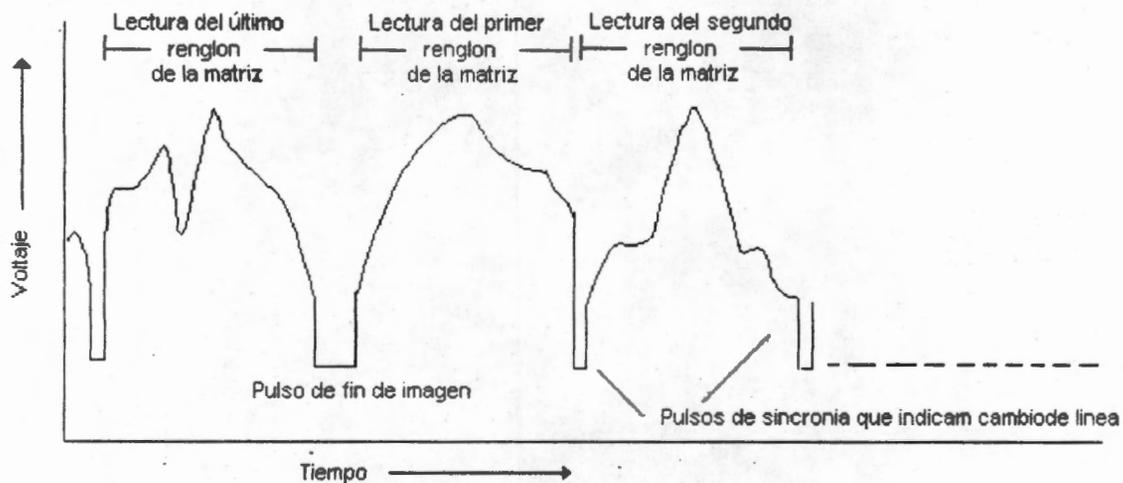


Figura 3.20 Señal de video.

La señal de la figura 3.20 está formada por una serie de variaciones de voltaje que pertenecen a los diferentes niveles de voltaje en cada uno de los píxeles de la cámara, cada vez que se termina de leer una línea de la matriz del CCD se da un pulso de voltaje, este pulso además de otro pulso de mayor duración que se da al terminar de leer la matriz completa lo utilizan los monitores de video para sincronía. Esta señal entonces puede conectarse directamente a la entrada de video de un monitor y se visualiza la imagen captada por el CCD. Hay que aclarar que esta señal está disponible en solo algunas cámaras CCD. Hay otras cámaras CCD que su salida es digital y están diseñadas para utilizarse con una computadora. Estas cámaras lo que envían es una serie de números

binarios que se obtienen desde un convertidor analógico a digital interno a la cámara, en donde la señal analógica que se convierte es muy semejante a la que se muestra arriba, y todos estos números binarios los recoge una computadora con ayuda de hardware ya sea específico como lo puede ser alguna tarjeta proporcionada por el fabricante de la cámara o por hardware común en las computadoras como el puerto paralelo de impresión o un puerto serial y software proporcionado siempre por el fabricante de la cámara, y con los datos una vez recogidos se reconstruye la imagen captada por el CCD que puede ser presentada en el mismo monitor de la computadora.

Si lo que se tiene es una cámara con salida analógica pero se quiere adquirir la imagen en una computadora, entonces se debe contar con una tarjeta especial que tiene un convertidor analógico a digital y memoria, y en algunos casos pueden traer incluido un procesador de imágenes que se encarga de hacer procesamiento digital de imágenes con la ventaja de que las operaciones se realizan mucho más rápido que por software, estas tarjetas son conocidas como "Frame-grabbers".

En cuanto a la compra de una cámara CCD se pueden encontrar numerosos modelos con variadas características que van desde color, blanco y negro, velocidad, tiempo de exposición, resolución en pixeles (tamaño de la matriz), resolución en bits por pixel al digitalizar (en cámaras digitales), mínima intensidad luminosa que pueden captar, ajuste automático del blanco, controles de temperatura, capacidad de seleccionar una parte de la matriz del CCD (zoom) con el propósito de leer menos cantidad de datos y hacer más rápida la transmisión de la imagen, una muy importante que es la relación señal a ruido y otras. A continuación hablaremos sobre cada una de estas características y si son o no necesarias en el proyecto:

Color: el color en las imágenes no representa mucho cuando lo que se desea es procesarla, así que asumimos que el color no es necesario en el proyecto, además de que los CCD a color tienen velocidad inferior, y la resolución temporal es una característica del equipo que estamos buscando optimizar. Sin embargo, por ejemplo al usar Indo-1 que tiene dos

longitudes de onda de emisión, en lugar de hacer un cambio de filtros para seleccionar cada una de ellas se podría hacer un análisis del espectro de color de la imagen captada, se esperaría observar dos picos predominantes en las dos longitudes de onda de emisión y con ello cuantificar las intensidades de la fluorescencia y hacer el cálculo de la concentración de Ca^{2+} . No hay trabajos reportando esta técnica y sería interesante probarla, pero por el momento nos concentraremos en la técnica convencional.

Escalas en grises: esta es una característica que se adapta al tipo de proyecto que queremos realizar, donde lo que nos interesa es la intensidad de fluorescencia, que queda bien representada por la intensidad luminosa captada por los pixeles de un CCD blanco y negro, que básicamente daría una escala de grises que va del negro (intensidad de luz 0) al blanco (intensidad máxima que puede captar el CCD) pasando por todos los niveles de gris intermedios, figura 3.21. Por otra parte un CCD en blanco y negro es más rápido que un CCD a color. Esta diferencia de velocidad se debe a que un para recuperar el valor de un pixel en un CCD blanco y negro se necesita solo de un número, en cambio para rescatar el valor de un pixel en color se necesitan tres (RGB), lo cual hace que se triplique el número que necesitan enviar a la computadora para formar una imagen con una matriz del mismo tamaño que con un CCD blanco y negro.



Figura 3.21 Escala de grises

Velocidad: esta fue una característica muy buscada en las cámaras ya que el sistema en estudio es dinámico muy rápido, y es importante hacer la mayor cantidad de tomas por segundo, dentro de la literatura se reportan tiempos que a nuestra consideración son muy grandes, del orden de 250ms o más por imagen (utilizando cámaras CCD) y es nuestro objetivo disminuir este tiempo. Sin embargo el tiempo que se lleva el adquirir una imagen y almacenarla no depende solo de la cámara, depende de si se está almacenando vía hardware o software, por supuesto el primero es mucho más rápido, pero requiere de prestar más atención al diseño electrónico de una tarjeta especializada que lo haga, y el

software requiere menos tiempo para diseñarlo pero requiere del conocimiento de técnicas del manejo de la memoria de la computadora, y además el mismo software se ejecutará a diferentes velocidades en computadoras de capacidades distintas.

Tiempo de exposición: el tiempo de exposición es el tiempo en el que la cámara es capaz de captar una imagen y estar lista para ser transmitida. Estamos de acuerdo en que este tiempo debe ser lo más pequeño posible no solamente para que obtengamos la mejor resolución temporal sino también para que la información de la imagen sea más representativa de lo que pasa en un instante que de lo que pasa en promedio durante todo el tiempo de exposición.

Resolución en pixeles: la resolución de pixeles esta representada por el tamaño de la matriz del CCD en pixeles y puede decirse que esta es la resolución espacial máxima que tendrá nuestro equipo. Siempre es deseable tener imágenes con mejor resolución pues su apariencia es mejor como se puede ver en las figuras 3.22(a) y 3.22(b), que son la misma imagen pero captada con diferentes resoluciones. Sin embargo una resolución espacial demasiado grande disminuye la velocidad del CCD, ya que se deben transmitir una mayor cantidad de pixeles.



Figura 3.22 (a) Imagen de eritrocitos en resolución de 800x600 y (b) misma imagen pero de 80x60 pixeles. ambas en escala de 256 tonos de gris captada por una cámara CCD (Laboratorio de biofísica Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa)

Resolución en bits por pixel: La resolución en bits ayuda a discriminar entre las diferentes intensidades de fluorescencia, a mayor cantidad de bits mayor número de niveles de tonos de colores o grises podemos obtener, sin embargo hay que pensar también en que la capacidad del ojo humano para distinguir entre dos tonos diferentes de un color o de gris no es tan grande como para pensar en resoluciones muy grandes que no llevarían a mejor percepción de una imagen si no mas bien a generar una gran cantidad de datos redundantes, en la figura 3.23 se muestran dos imágenes una con una resolución de 4 bits (16 niveles de gris) y otra de 8 bits (256 niveles de gris). En ellas se observa como al bajar la resolución de bits por pixel es difícil establecer diferencias entre tonos de las células y el fondo.



Figura 3.23 (a) Imagen original en 256 tonos de gris y (b) misma imagen a 16 tonos de gris

Sin embargo si hay que pensar que la resolución que nos dé el convertidor será la misma que tendremos para discriminar entre los diferentes cálculos de concentración. Y además debemos pensar que si se van a guardar una gran cantidad de imágenes entonces hay que aumentar la capacidad de memoria necesaria para almacenarlas, y con 8 bits, cada pixel ocuparía un byte, ocupando por supuesto menos memoria que si se utilizaran 12 bits o 16 bits por de resolución por pixel, o pero aún en un CCD a color que por lo general utilizan 24 bits (8 bits para el rojo, 8 para el verde y 8 para el azul en un sistema RGB). Es cierto que a mayor número de bits se obtiene mejor relación señal a ruido (ver mas adelante) pero las cámaras actuales tienen buenas características aún siendo de 8 bits. Lo que se piensa es utilizar un CCD en blanco y negro, y decidimos que una escala de 256 tonos (8 bits) de gris es suficiente.

Mínima iluminación: las imágenes de fluorescencia no son por lo general de gran intensidad, por lo que es importante que la cámara pueda captar imágenes aunque estas sean un tanto oscuras. Esta característica la da un parámetro que viene expresado en luxes. Mientras menor sea este parámetro es mejor, aunque también no es suficiente que la cámara sea demasiado sensible puesto que si la intensidad de fluorescencia llegara a ser más elevada de lo que se pensara los píxeles de la cámara se saturarían y siempre marcaran una imagen blanca. Por ello esta sensibilidad se debe buscar que sea variable, que es común en las cámaras que tengan un control de ganancia ya sea controlado por una perilla o por software.

Ajuste de blanco: esta es una característica que nos permite decidir a que intensidad de luz obtenemos escala completa. Esto es importante para que las variaciones de intensidad luminosa queden representadas del mínimo al máximo nivel de gris. Este parámetro se varia por un valor llamado "BIAS" que indica que valor del convertidor será considerado como el tono intermedio de la escala de grises, en el caso de un convertidor de 8 bits es común que su valor sea de 127.

Control de temperatura: algunos CCD tienen controles de temperatura para evitar algunos efectos que se forman en las celdas del CCD cuando esta aumenta, donde por lo general se observan "manchas" en la imagen ocasionados por fotones liberados por electrones que aumentan su energía como producto del aumento de la energía térmica. Estos controles son necesarios cuando el CCD va a trabajar en lugares con ambientes extremos como por ejemplo cuando se montan en un telescopio que esta apuntando directamente al sol, el cual no es el caso en este proyecto donde se trabajara a temperatura ambiente.

Zoom: es una característica que nos permite observar una región de la imagen con una correspondiente perdida de resolución espacial (píxeles), pero con un considerable aumento en la velocidad ya que las imágenes transmitidas son de menor tamaño. Esta característica la consideramos deseable ya que en la mayoría de los experimentos se tiene

solo una zona de interés, que es el lugar donde se encuentra la célula o células. Existe un compromiso entre resolución temporal y espacial que hay que equilibrar para obtener las mejores características del equipo.

Relación de señal a ruido: esta es una característica bastante importante, que se cuida casi en cualquier dispositivo o instrumento electrónico, mientras mas grande sea esta, mejor calidad tendrán las señales captadas, y en caso del CCD, las imágenes. Esta depende de la calidad de las celdas CCD que contengan menos electrones de fuga, y en menor medida depende también de la estabilidad del convertidor analógico a digital.

Se realizo una búsqueda entre cámaras de varias marcas como **Kodak, Sony, Hamamatsu, Dalsa** y con varios modelos y podemos mencionar algunas de ellas que cumplieran con las características.

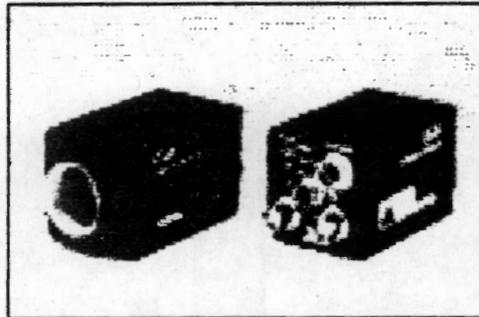


Figura 3.24 Cámara Sony XC-8500

La sony XC-8500 mostrada en la figura 3.24 tiene capacidad en aplicaciones para procesamiento de imágenes en tiempo real, buena resolución en pixeles (752x582), monocromática, adquisición en forma asincrónica, y pixeles cuadrados para evitar deformación de la imagen. Sin embargo ofrece un software y hardware de adquisición de uso general, y la arquitectura es cerrada, por lo que es difícil crear un software de uso específico.

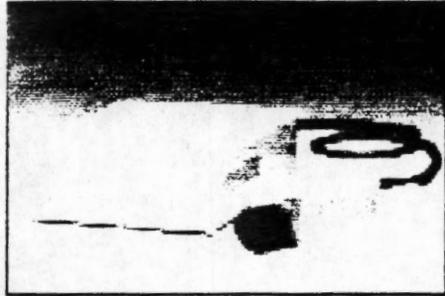


Figura 3.25 Cámara Hamamatsu C 5985-10

La Hamamatsu C 5985-10 de la figura 3.25 con alta resolución en pixeles, alta sensibilidad para imágenes de baja iluminación (250 microlux), tiempo de exposición ajustable desde 1/10000 de seg. hasta 300 seg., memoria de imagen integrada para la sustracción de fondo entre una imagen y otra, o promediación para aumentar la relación señal a ruido, controlada por el puerto RS232 o manualmente. Nuevamente no incluye herramientas par desarrollar aplicaciones de uso específico.

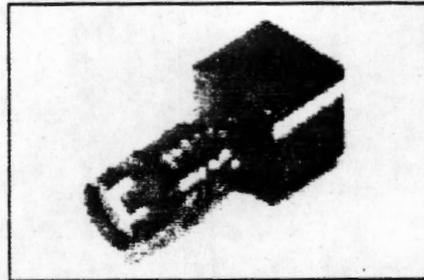


Figura 3.26 Cámara Dalsa CA-D1

La Dalsa CA-D1 de gran velocidad, transmite 220 imágenes por segundo de 256x256 pixeles, 830 de 128x128 o 2900 de 64x64 se muestra en la figura 3.26. Cuenta con software que corre en procesadores de 16 bits para Windows 3.x y compatible con software como LabView 3.11 y 4.0. Esta es la cámara más tentadora de las anteriores, LabView es un software que permite realizar software de propósito específico pero es bastante costoso.

No se decidió por ninguna de las anteriores cámaras aun cuando tenían buenas características, sobre todo la última, la Dalsa CA-D1 con gran velocidad sobre todo la de 830 imágenes por segundo a resolución de 128x128, sin embargo se optó por la cámara que ofrece la misma compañía a la cual se le compró el microscopio, principalmente por que la misma compañía vende los accesorios para montar la cámara además de que esta cámara cumple con los requisitos establecidos. Esta cámara es la que se muestra en la figura 3.27.

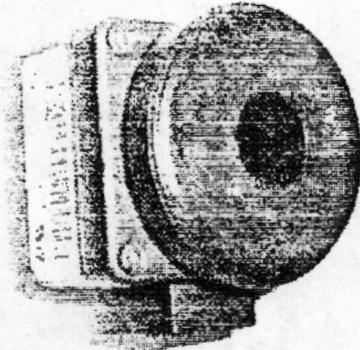


Figura 3.27 Cámara DIC-U (ultra alta resolución) de WPI (World Precision Instruments).
(http://www.wpiinc.com/WPI_Web/Microscopy_Cameras/DICs)

A continuación presentamos las características con que cuenta esta cámara:

- Monocromática (blanco y negro).
- 8 bits por pixel (256 niveles de gris).
- Máxima razón de pixeles 1-2 Mpixeles por segundo lo que da una cantidad de 15 a 30 imágenes de 256x256 pixeles por segundo dependiendo de la potencia del computador donde se está adquiriendo las imágenes.
- Tiempo de exposición 1ms mínimo hasta 30 segundos, controlado por software.
- Capacidad de seleccionar una parte de la CCD (zoom).
- Resolución total de la matriz del CCD de 1134x486 pixeles.
- Software para DOS y Windows con librerías para C, Fortran, Basic, y ensamblador, para desarrollar aplicaciones de uso específico.
- Control de ganancia y bias por software.
- Tarjeta de adquisición de imágenes incluida.

3.2.6 Software de adquisición y procesamiento de imágenes.

Esta etapa contempla dos ramas, una de ellas fue pasar un software de simulación originalmente en una dimensión (Laura Haro y Rafael Godinez) en uno que presentara los resultados en dos dimensiones, y otra rama dedicada a la adquisición real de la cámara, el procesamiento y todo lo necesario para controlar al equipo.

Software de Simulación

Se contaba con un software elaborado en el laboratorio de Biofísica de la UAM-I, el cual simula las variaciones en la concentración de Ca^{2+} dentro de una célula esférica que se divide en capas concéntricas como se muestra en la figura 3.28, y que es excitada con un pulso de fijación de voltaje.

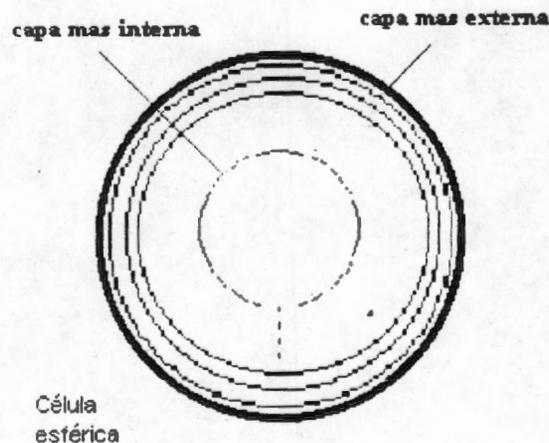


Figura 3.28 Célula esférica dividida en capas concéntricas

En cada simulación se elige una serie de parámetros como el número de iteraciones del algoritmo el cual hace que cambie el periodo de tiempo donde se observan las variaciones de concentración de Ca^{2+} , se especifican también las características del pulso de voltaje

como su duración y amplitud, la capa concéntrica en donde se quiere medir la concentración, variar la actividad de la bomba de Ca^{2+} , las dimensiones de la célula, la separación de las capas y otros.

Después de terminado el tiempo de simulación, en pantalla se presentan gráficas de los resultados del algoritmo que entre otras se muestra la de las variaciones en la concentración de Ca^{2+} en la capa especificada. Los resultados de estas gráficas pueden ser guardados en archivos y es aquí donde fue posible hacer una colección de archivos de la simulación capa por capa. Estos archivos contienen la información de las variaciones en un periodo de tiempo que dependió del numero de iteraciones especificado. Entonces se elaboró un programa en lenguaje C que se encarga de recuperar la información de los archivos y entonces guarda la información en un arreglo de dos dimensiones como el que se muestra en la figura 3.29.

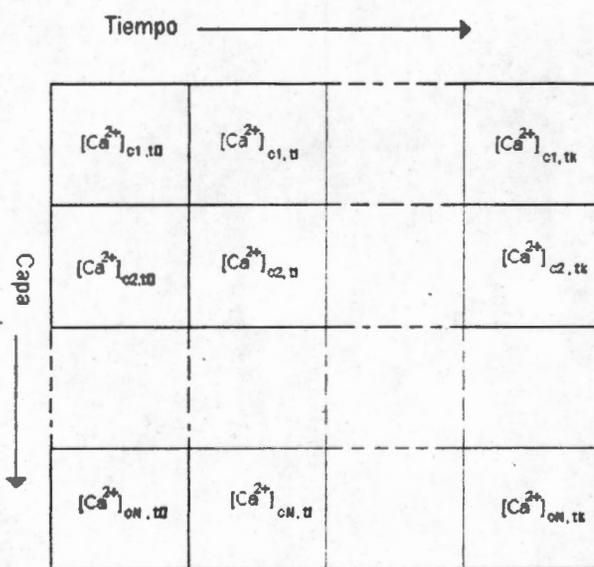


Figura 3. 29 Arreglo de dos dimensiones para guardar la información de una simulación de N capas y K iteraciones.

En cada casilla de este arreglo se tiene guardado el valor de la concentración de Ca^{2+} en la capa C y al tiempo t. Como cada una de las capas esta igualmente separadas es posible hacer una serie de anillos como los de la figura de la célula en capas concéntricas formando al final un círculo relleno. A cada anillo se le asigna un color dependiente del valor de concentración que haya en esa capa. Lo que se observa al simular este programa es como varia la concentración de Ca^{2+} tanto espacial como temporalmente, antes, durante y después de que el pulso despolarizante aparece (depende del numero k de iteraciones y de las características del pulso)

El programa tiene ciertos requerimientos en hardware mínimo como lo son:

- Monitor a color VGA
- Tarjeta de video con 1Mb de memoria
- Procesador 486 DX o en su defecto 386 con coprocesador matemático
- Mouse

Los requerimientos anteriores se deben a que el programa fue hecho para modo gráfico en alta resolución (1024x780) y a 256 colores, que son los 256 colores falsos en que se representan las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por otra parte, se hicieron funciones para que con ayuda del mouse al parar en un instante de tiempo al programa, sea posible que al señalar con el cursor en la figura de la célula en una capa especifica se mida su concentración en ese instante, además de presentar una gráfica del gradiente de concentración a lo largo de todas las capas en que fue dividida la célula.

Software de adquisición control y procesamiento.

La simulación se realizo en el periodo de espera de la compra de la cámara. Una vez que se tuvo la cámara se paso a la segunda rama en materia de software que fue la elaboración del software para control de la cámara, control del circuito para el cambio de filtros, sincronía de las tomas, adquisición y almacenamiento de imágenes, calibración del equipo, y cálculo de la concentración de Ca^{2+} a partir de las imágenes capturadas.

Este software fue hecho en lenguaje C en ambiente de DOS. No fue un software sencillo de elaborar, debido a varias causas:

- 1) Las librerías incluidas para el manejo de la cámara en lenguaje C fueron diseñadas para un compilador Microsoft C versión 7.0, esta versión nunca pudo ser encontrada, entonces se tuvo que adaptar estas librerías a manera que funcionaran con un compilador BorlandC++ 3.0.
- 2) El modo gráfico en que corrían las librerías no era compatible con las funciones gráficas propias de C, entonces primero se intento hacer funciones de manejo gráfico en lenguaje ensamblador, sin embargo estas eran dependientes del hardware (tarjeta de video específicamente) en donde se estuviera corriendo el programa. Por ello se tuvo que buscar un manejador gráfico compatible con ambos, las librerías y las funciones gráficas, por lo que tenia que ser un manejador BGI, el cual fue encontrado en la red.
- 3) La capacidad de memoria que puede generar por si solo un programa al compilarlo en ambiente de DOS es de 640 Kbytes. En el programa se requiere de un buffer constante de cerca de 400 KBytes para desplegar la imagen completa captada por la cámara CCD, lo que deja solo 240 Kbytes de memoria para almacenar imágenes. Una imagen de 256x256 pixeles ocupa un espacio de 64Kbytes de memoria, por lo que la memoria restante solo es capaz de almacenar 4 imágenes de este tamaño, eso sin tomar en cuenta la memoria ocupada por el resto de las variables del programa, con estas 4 imágenes apenas son suficientes para hacer dos cálculos de la concentración sin necesidad de liberar memoria y perderlas, que además no es posible puesto que para el cálculo de la concentración se requiere de 6 imágenes de calibración (ver la figura de calibración de indicadores fluorescentes en modo dual que son los valores de A1,A2,B1,B1, autofluorescencia1 y autofluorescencia2), y es un proceso lento y se requiere que sea fuera de línea lo que indica que todas las imágenes capturadas deben estar disponibles después del periodo de adquisición. Se pensó entonces primero en ir adquiriendo imágenes y guardarlas en disco duro, sin embargo el tiempo de acceso a disco duro es

sumamente grande cerca de 0.8 segundos para cada imagen de 256x256 mas el tiempo de adquisición, esto hace sumamente lento al sistema. Posteriormente se tuvo contacto con el profesor Oscar Yañez del Laboratorio de Procesamiento de señal e imágenes UAM Iztapalapa, quien ofreció unos programas que hacen acceso a memoria extendida para lenguaje C. Estos programas tuvieron que ser modificados. Finalmente con esto se consiguió apartar un buffer de 4Mbytes de memoria dividido en páginas de 64Kbytes, lo que permite guardar aproximadamente 60 imágenes de 256x256. Suficiente para almacenar las 6 imágenes de calibración y aproximadamente 50 imágenes para las mediciones, logrando obtener entonces hasta 25 cálculos antes de tener que desechar imágenes.

- 4) Los pulsos de sincronía para la adquisición provenientes del circuito diseñado para el cambio de filtros no siempre eran detectados pues primero lo que se hacía era estar leyendo el estado del bit y en el momento que cambiara se hacia la toma. Se observo que no se lograba captar el pulso de sincronía cuando el cambio de filtros era demasiado rápido, pero esto no debía ser ningún impedimento. Entonces la solución se encontró haciendo que el sistema respondiera bajo una señal de interrupción por hardware a través del puerto paralelo de impresión, además el resto de los bits de control del circuito de control de los filtros también fueron tomados desde este puerto.

El resto del programa varía el tiempo de exposición, el intervalo de tiempo entre un cálculo y otro de la concentración a fin de observar sistemas dinámicos mas lentos donde los cambios de concentración suceden en segundos, minutos e incluso horas, claro que para sistemas mas rápidos este retraso es de 0, y por tanto el sistema adquiere el máximo número de tomas por segundo (aproximadamente 20). También se selecciona la zona de interés que no debe ser una imagen superior a los 64Kbytes ya que se usa una página de memoria por cada imagen almacenada. Finalmente el programa va guiando en el protocolo de calibración a fin de obtener las 6 imágenes arriba mencionadas. También se incluye la opción para guardar las imágenes de interés en formato BMP. El cálculo de la concentración de Ca^{2+} se presenta en color falso en la escala de azul al rojo ya mencionada.

4-RESULTADOS

4.1 SOFTWARE DE SIMULACIÓN.

En la figura 4.1 se muestran las gráficas del programa realizado por Laura Haro y Rafael Godinez [4 A, 5 A] donde se observan las variaciones de $[Ca^{2-}]$ en un punto dentro de la célula. Adelante en las figuras 4.2 a la 4.8 se muestran las gráficas e imágenes de un segundo programa que forma parte de esta tesis, que corresponden a la variación de $[Ca^{2-}]$ que sucede en todo el espacio intracelular de una modificación hecha al programa original.

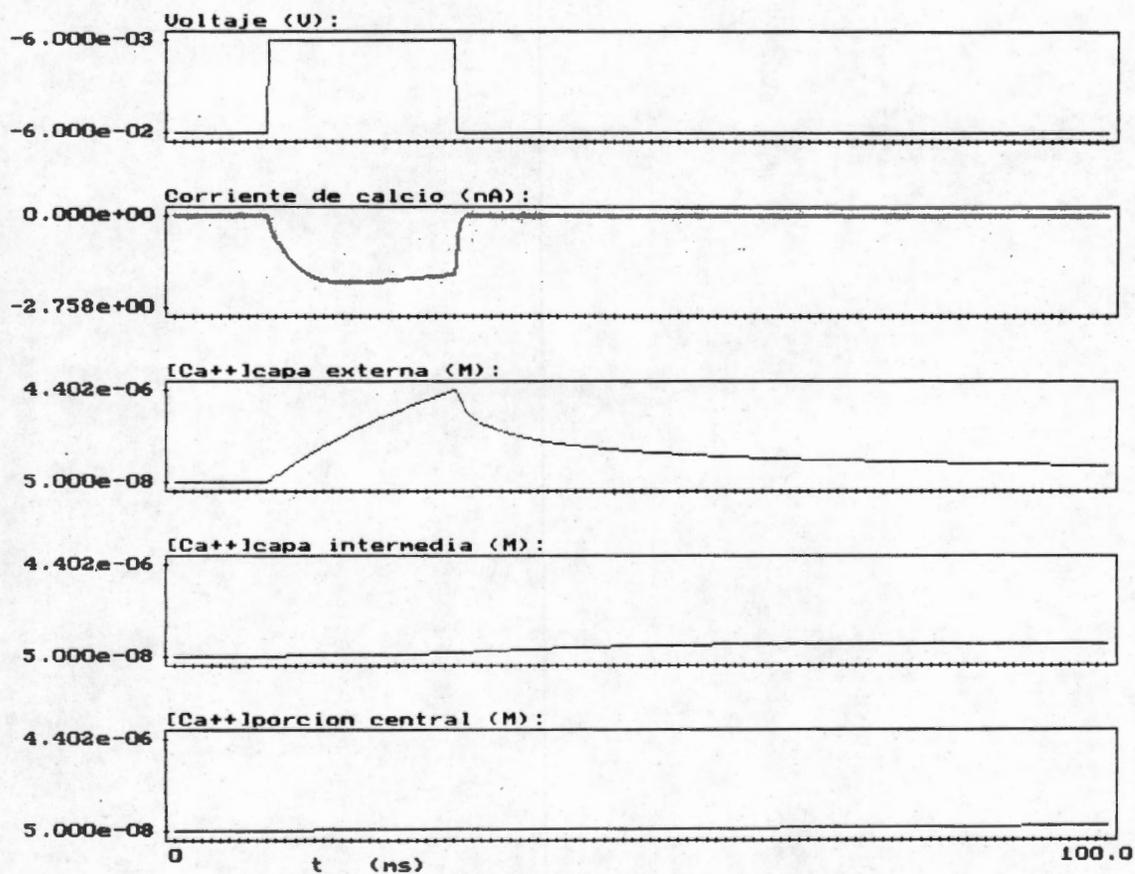


Figura 4.1 Gráficas del programa original.

En la figura 4.1 se muestra un conjunto de gráficas iguales a las que presenta el programa original. En la parte superior de la figura 4.1, la primera gráfica presenta el pulso simulado de fijación de voltaje que despolariza a la célula e induce el flujo de iones calcio al interior de la célula, al cual se selecciona su amplitud, tiempo de inicio y tiempo en que acaba. La segunda gráfica muestra la corriente de Ca^{2+} inducida por el pulso de fijación de voltaje, en un caso real esta señal se tendría que observar con ayuda de una micropipeta colocada sobre la membrana de la célula.

La tercera gráfica de la figura 4.1 corresponde a los cambios de concentración de Ca^{2+} en la última capa en que fue dividida la célula (capa más cercana a la membrana celular), recordemos que en el programa se divide a la célula en una serie de capas concéntricas de acuerdo a un número que seleccionamos, este número nos permite variar por decirlo así la resolución espacial que deseamos tener, por otra parte también en el programa se selecciona una capa de interés para observar los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La cuarta gráfica muestra precisamente los cambios en la concentración de calcio en la capa de interés seleccionada, y la quinta presenta los cambios de concentración en la primera capa (la más central). Estos resultados de las gráficas 3, 4 y 5 son señales como las que se observarían al utilizar una técnica con un microelectrodo sensor de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y el efecto de ir variando la capa de interés es como ir variando la colocación de su punta a diferentes profundidades dentro de la célula.

Si se hacen simulaciones con todos los parámetros iguales excepto que se va variando la capa de interés, se pueden tener una colección de datos que contiene toda la información de lo que ocurre en todas las diferentes capas en que fue dividida la célula, solo que hasta ahora a un mismo instante de tiempo la información de lo que sucede en todo en espacio intracelular se encuentra por separado en cada gráfica. En las figuras 4.2 y 4.3 se muestran dos colecciones de este tipo con dos pulsos de fijación de voltaje diferentes.

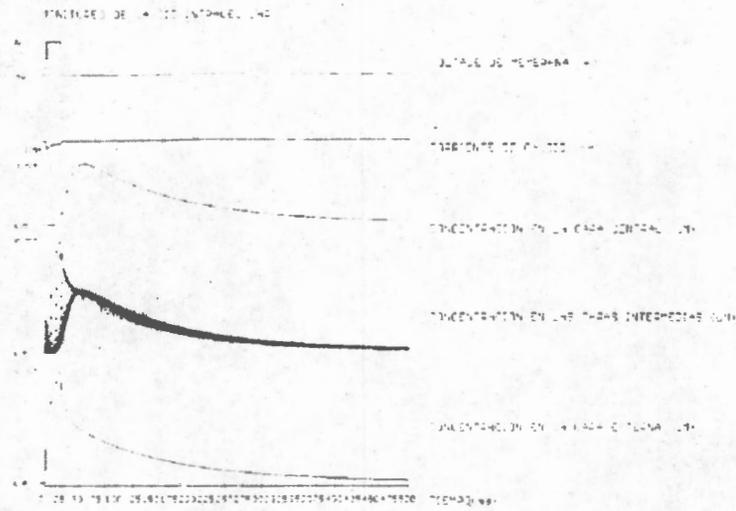


Figura 4.2 Gráficas de las simulaciones en cada una de las capas con un pulso de fijación de voltaje de corta duración.

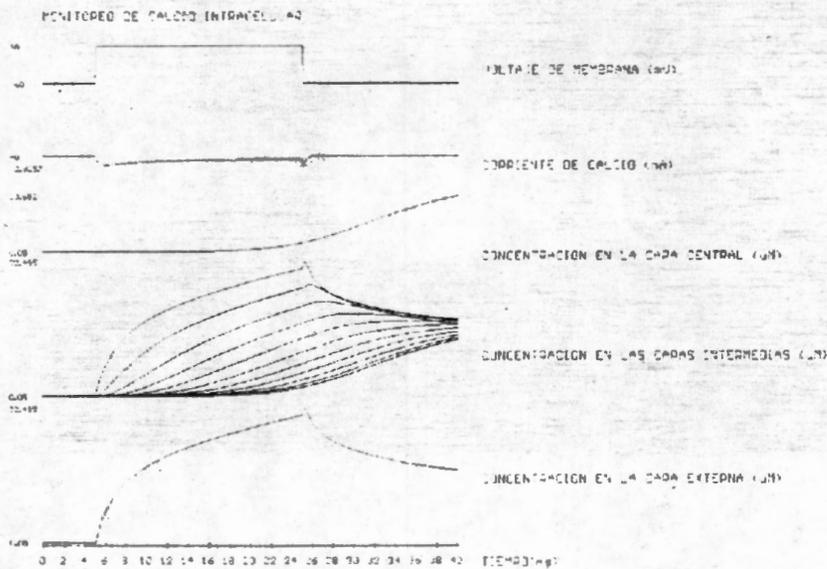


Figura 4.3 Gráficas de las simulaciones en cada una de las capas con un pulso de fijación de voltaje de mayor duración que las gráficas anteriores.

Estas figuras muestran exactamente las mismas gráficas que el programa original, solo que en donde se presentaba la gráfica de la variación temporal de la concentración de Ca^{2-} en una capa específica se ve ahora todo un grupo de gráficas, que son las gráficas de las variaciones de concentración en todas las capas en que fue dividida la célula, un total de 100 en cada simulación. Para el resto de las señales de las gráficas como su valor no cambia en cada simulación por ser independiente de la capa que se observa, entonces aparecen como una sola.

A continuación se muestran las figuras del curso espacio-temporal de los cambios de la concentración de Ca^{2-} , como un paso de la información recabada con el programa original en una dimensión (temporal en un punto fijo), a una representación en dos dimensiones (imágenes). Estas imágenes tienen un aspecto artificial debido a algunas consideraciones un tanto ideales con que fueron generados los datos en el programa original. Decimos que son consideraciones un tanto ideales por que en él se supone el hecho de que la concentración de Ca^{2-} cambia de igual forma a puntos igualmente distantes del centro de la célula (en base a una morfología esférica y a una población de canales de Ca^{2-} uniforme sobre la membrana) lo que ocasiona que en las imágenes se observe un patrón de anillos concéntricos cada uno con un mismo pseudocolor que representa el valor de la concentración en la escala de colores mostrada a la izquierda.

La primera imagen de este tipo se muestra en la figura 4.4, es una imagen que muestra los niveles de concentración de Ca^{2-} muy bajos en estado de reposo de la célula, aquí el pulso de despolarización aún no ha iniciado. La información es mucho más fácil de interpretar solo observando el color de la célula y comparando con la escala de concentración que se encuentra a su derecha.

MONITOREO ESPACIAL Y TEMPORAL DE $[Ca^{++}]_i$

CONCENTRACION EN LA CAPA () = μM
 OPRIMA LA LETRA M PARA MEDIR
 OPRIMA LA LETRA C PARA CONTINUAR
 OPRIMA LA LETRA T PARA TERMINAR

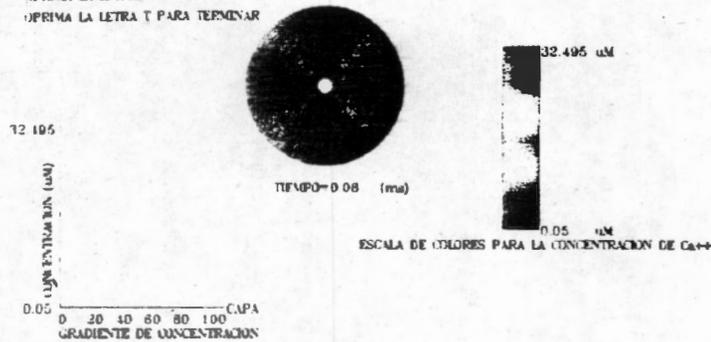


Figura 4.4 Simulación en t=0

En la figura 4.5 se presenta otra imagen en la que se ve como poco tiempo después de que ha sido aplicado el pulso de despolarización la concentración de Ca^{2+} comienza a incrementarse, y se ve como el efecto es mayor en las capas más cercanas a la membrana celular. A la izquierda vemos una gráfica del gradiente de concentración que existe en ese momento.

MONITOREO ESPACIAL Y TEMPORAL DE $[Ca^{++}]_i$

CONCENTRACION EN LA CAPA () = μM
 OPRIMA LA LETRA M PARA MEDIR
 OPRIMA LA LETRA C PARA CONTINUAR
 OPRIMA LA LETRA T PARA TERMINAR

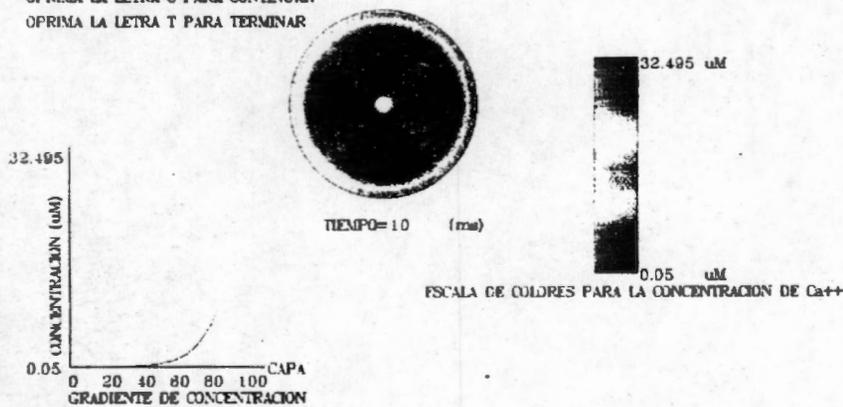


Figura 4.5 Simulación en t=10 ms

El pulso de despolarización acaba a los 25 ms por lo que se observa en ese instante que la concentración se ha elevado casi a su valor máximo (figura 4.6). En realidad el valor máximo lo alcanza poco después ya que la corriente de cola que se produce al final del pulso da un último pico de incremento a la concentración.



Figura 4.6 Simulación en $t=25.12$ ms

La simulación en tiempos posteriores al fin del pulso de voltaje nos da información de cómo la concentración regresa a sus niveles en reposo. Se observa que aunque el tiempo que le llevó a la célula elevar la concentración hasta el valor máximo fueron los 25 ms que duro el pulso de voltaje, aún 75ms después de terminado (simulación en 100ms) la célula no ha alcanzado el nivel de concentración que existía en reposo, y aún 475ms después (simulación en $t=500$ ms) esto aún no sucede, tal como se muestra en las figuras 4.7 y 4.8.

MONITOREO ESPACIAL Y TEMPORAL DE $[Ca^{++}]_i$

CONCENTRACION EN LA CAPA () = μM

OPRIMA LA LETRA M PARA MEDIR

OPRIMA LA LETRA C PARA CONTINUAR

OPRIMA LA LETRA T PARA TERMINAR

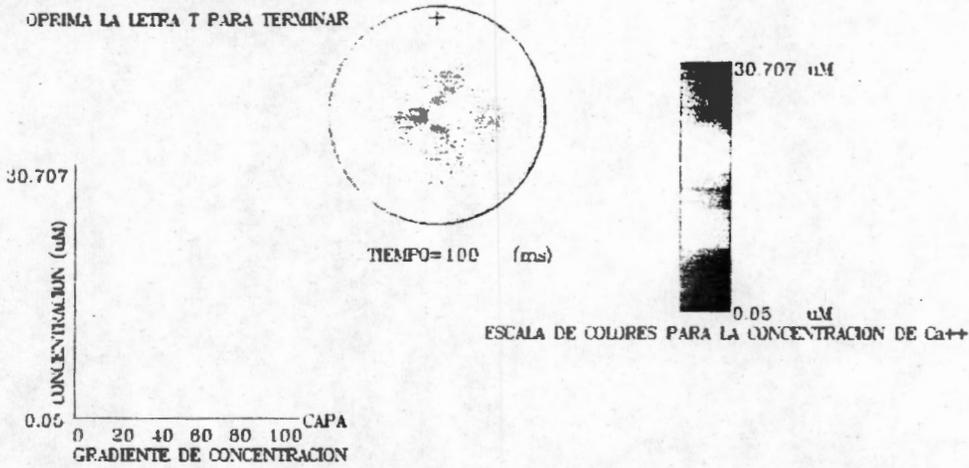


Figura 4.7 Simulación en $t=100ms$

MONITOREO ESPACIAL Y TEMPORAL DE $[Ca^{++}]_i$

CONCENTRACION EN LA CAPA () = μM

OPRIMA LA LETRA M PARA MEDIR

OPRIMA LA LETRA C PARA CONTINUAR

OPRIMA LA LETRA T PARA TERMINAR

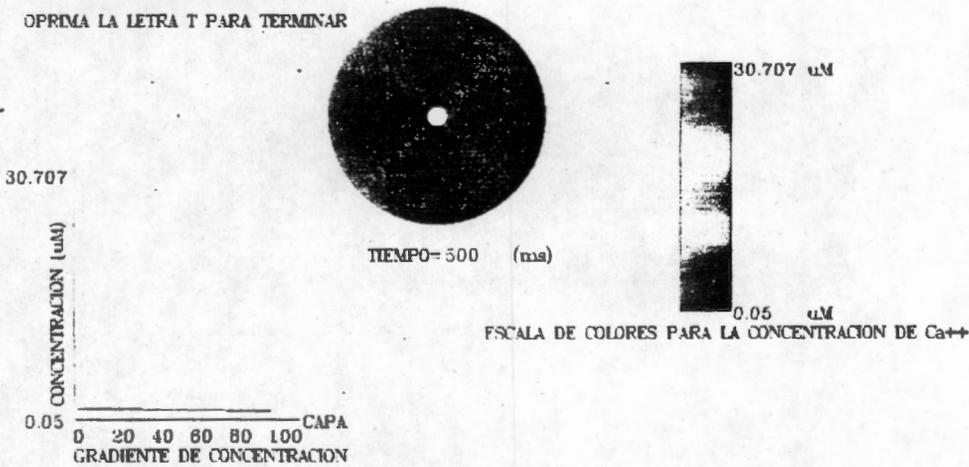


Figura 4.8 Simulación en $t=500ms$

Tanto en la simulación como mostraron las figuras anteriores como en la figura 4.9 publicada por Erwin Neher (premio Nobel en Medicina 1991) en 1992, en un caso real no simulado, se ve que los cambios de concentración suceden de forma más rápida y amplia en la cercanía de la membrana celular. También se observa la lenta recuperación de los niveles de concentración como los que se observaron en la simulación. Esto indica que la simulación es una buena aproximación a lo que sucede realmente, claro que en la realidad la distribución espacial no es uniforme como en la simulación debido a la suposición hecha en la simulación de que a igual distancia del centro de la célula la concentración es igual no es tan cierta.

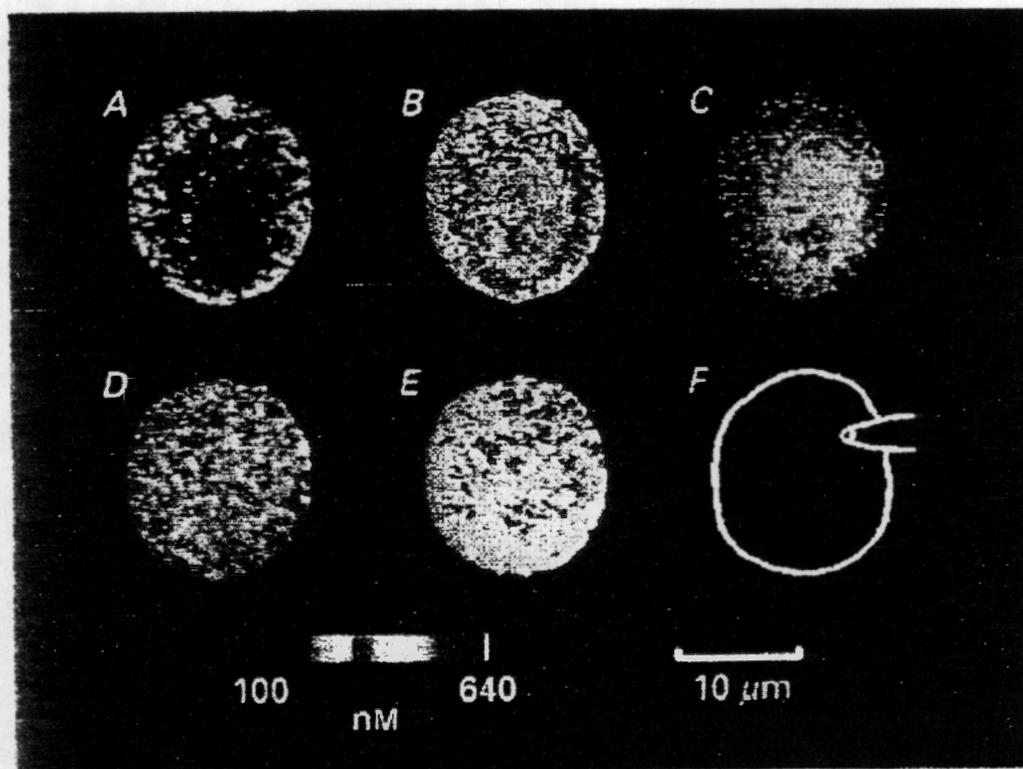


Fig. 4. Imaging of $[Ca^{2+}]_i$ changes in a single chromaffin cell responding to a 500-ms-long depolarization to $+5$ mV. Changes in relative fluorescence intensity (380 nm excitation) have been encoded into the pseudocolor scale shown at the lower left. A–C, images obtained during the depolarization, at 100 ms, 300 ms and 500 ms after the beginning of the depolarization respectively. D and E, fluorescence maps at 1 and 10 s following the end of the depolarization. F, schematic illustration showing the position of the patch pipette relative to the outline of the cell. During the experiment the microscope was focused on a plane through the centre of the cell and the fluorescence of the patch pipette was not visible.

Figura 4.9 Erwin Neher, Journal of Physiology 1992

4.2 PRUEBAS AL SISTEMA PARA EL CAMBIO DE FILTROS

A continuación se mostrarán gráficas de adquisiciones hechas para probar la velocidad de cambio de los filtros y de las pruebas hechas para verificar la distorsión de la luz que atraviesa cada "filtro" al estar parado y en movimiento. Finalmente se presenta una foto del sistema.

La figura 4.10 es una señal adquirida en uno de los comparadores donde se está detectando el cruce de uno de los filtros con ayuda de un fotodetector (led-fotodiodo). Esta señal corresponde al motor girando a la velocidad máxima en la cual esta se mantiene estable, es decir sin grandes variaciones. Aproximadamente cada 20ms hay un pulso, lo cual indica que el motor está girando a una frecuencia de 50Hz suficiente para hacer un cambio de filtros en un tiempo mínimo de 10ms.

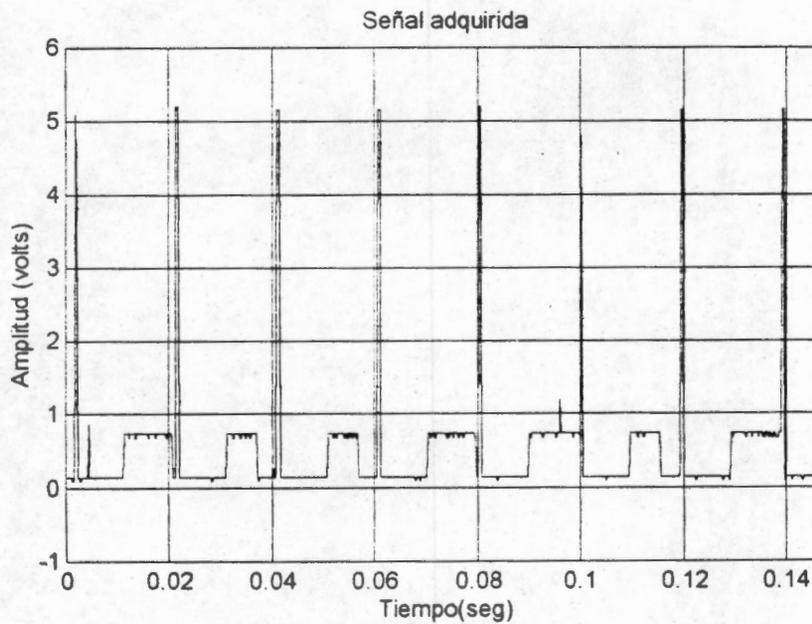


Figura 4.10 Señal a velocidad estable máxima

Las figuras 4.11 y 4.12 muestran otras gráficas que son señales también de la medición de velocidad del motor para comprobar su estabilidad pero a diferentes velocidades.

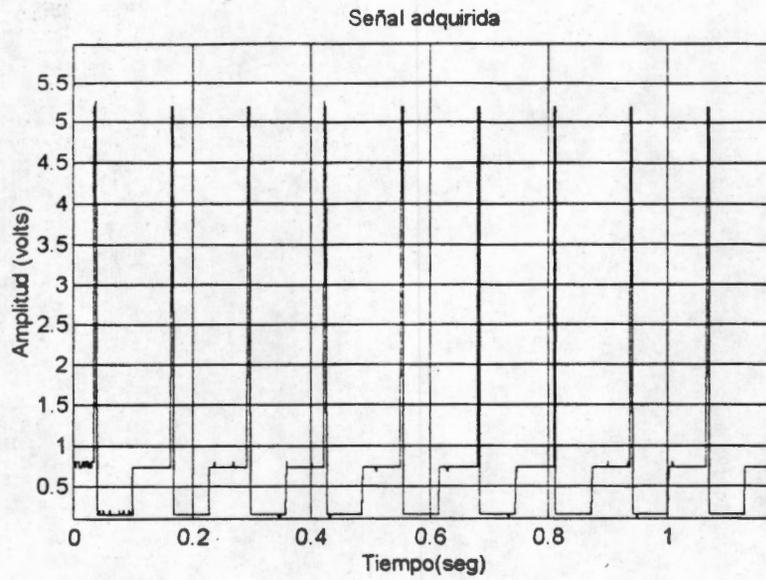


Figura 4.11 Señal a una velocidad media

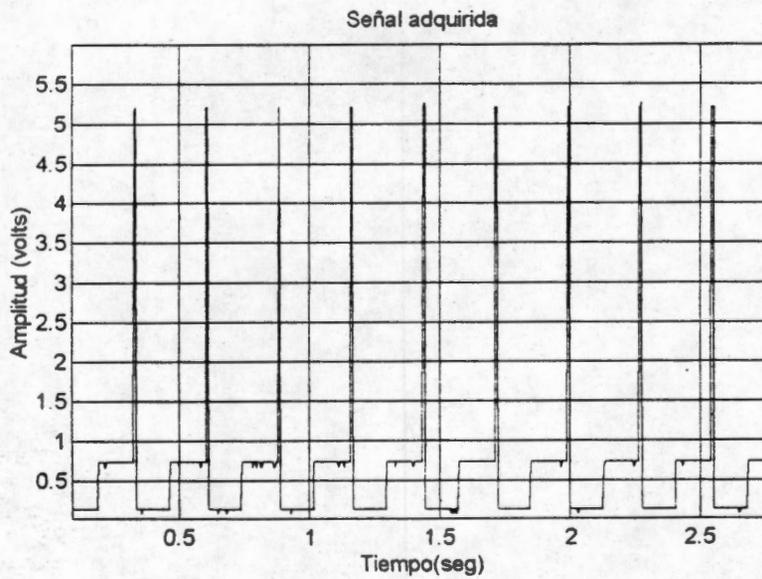


Figura 4.12 Señal a una velocidad lenta

Para comprobar el hecho de que no hay cambios considerables en el nivel de iluminación cuando los filtros estuvieran girando lo que se hizo fue un esquema como el mostrado en la figura 4.13.

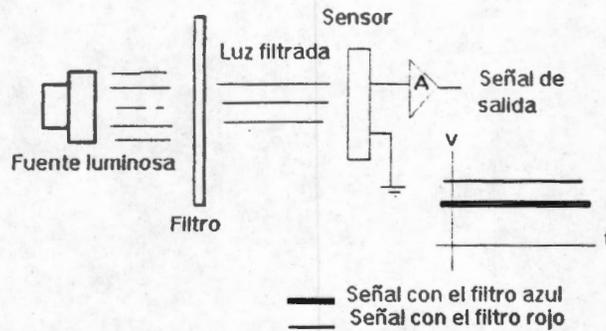


Figura 4.13 Esquema del experimento para verificar distorsión por movimiento de los filtros.

Primero se obtuvieron los niveles de intensidad de la luz que deja pasar cada filtro sin movimiento alguno. La figura 4.14 muestran las dos diferentes respuestas a cada filtro, se notan pequeñas variaciones de nivel muy probablemente a fluctuaciones de la fuente luminosa o ruido en el convertidor analógico a digital o a interferencia externa. Mas o menos los niveles de voltaje son de 0.85 volts para uno de los filtros (filtro azul) y 1.05 volts para el otro (filtro rojo). Gracias a la diferencia de respuesta del sensor utilizado para captar la cantidad de luz que deja pasar cada filtro de acuerdo a su color, podemos observar si cuando los filtros estén en movimiento, se vuelven a obtener estos mismos niveles de voltaje.

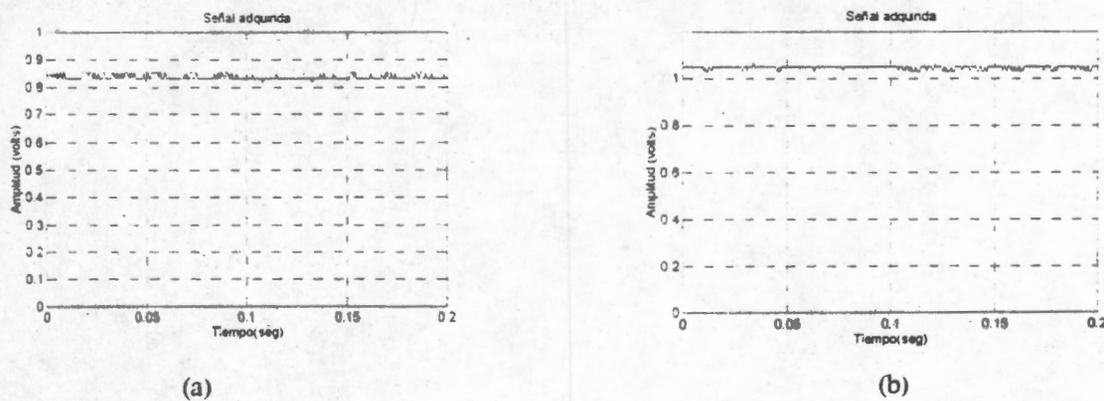


Figura 3.14 Detección de la intensidad de luz que deja pasar cada "filtro" en reposo. (a) para el filtro azul. (b) para el filtro rojo.

Al poner en movimiento el disco se obtuvo la siguiente mostrada en la figura 4.15.

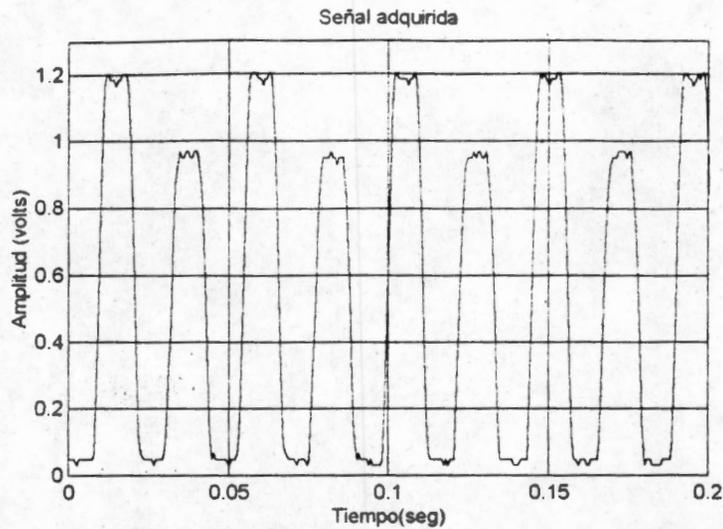


Figura 4.15 Señal de la intensidad de luz al poner en movimiento los filtros.

Efectivamente se observan patrones repetidos de niveles de voltaje correspondientes al paso de un filtro y del otro y un voltaje cercano a cero volts cuando pasan las zonas no transparentes del disco. Siguen observándose pequeños rizados pero esto se observó aún estando en reposo así que no se le puede atribuir al movimiento. Con esto podemos comenzar a pensar que no hay un efecto importante de cambios de iluminación al mantener girando el disco, no tan solo por las señales obtenidas si no también a que los “filtros” utilizados en realidad no son tales, tan solo son micas sin ninguna calidad óptica, que tiene ralladuras y aún con ello se obtiene poca variación en la iluminación, algo que seguramente mejorará mucho la utilizar filtros reales de buena calidad, mas adelante se hará una prueba diferente con la que intentaremos seguir demostrando que no hay efecto considerable.

La figura 4.16 muestra una foto del prototipo de este sistema para cambio de filtros diseñado, En la foto se puede identificar el disco hecho con un CD, el circuito de control que se conecta al puerto paralelo y un pequeño eliminador de baterías como fuente de alimentación.

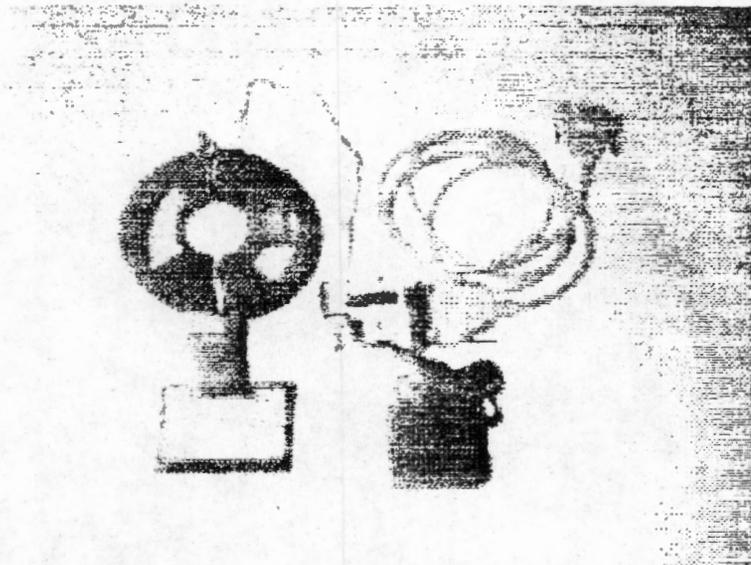


Figura 4.16 Sistema para el cambio de filtros, velocidad de cambio máxima aproximada de 10ms. envía una señal TTL para el disparo de adquisición por la interrupción del puerto paralelo (IRQ7).

4.3 ADQUISICION Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

Las primeras pruebas hechas para verificar el equipo completo fueron hacer tomas alternadas con un filtro y otro para verificar el correcto comportamiento del circuito diseñado para el cambio de filtros. En pantalla se observó un patrón repetido de una imagen de un tono y la siguiente de otro tono. Esto se debe a la diferente cantidad de luz que deja pasar cada uno de los "filtros" utilizados. El tono se ve poco afectado por el movimiento de los filtros por lo que se concluye una vez mas que no hay inconveniencia en que los filtros se encuentren en movimiento. La figura 4.17 es la imagen vista en el monitor de la PC al haber seleccionado un área cuadrada pequeña del total de la imagen captada por la cámara CCD la cual esta recibiendo luz de un led.

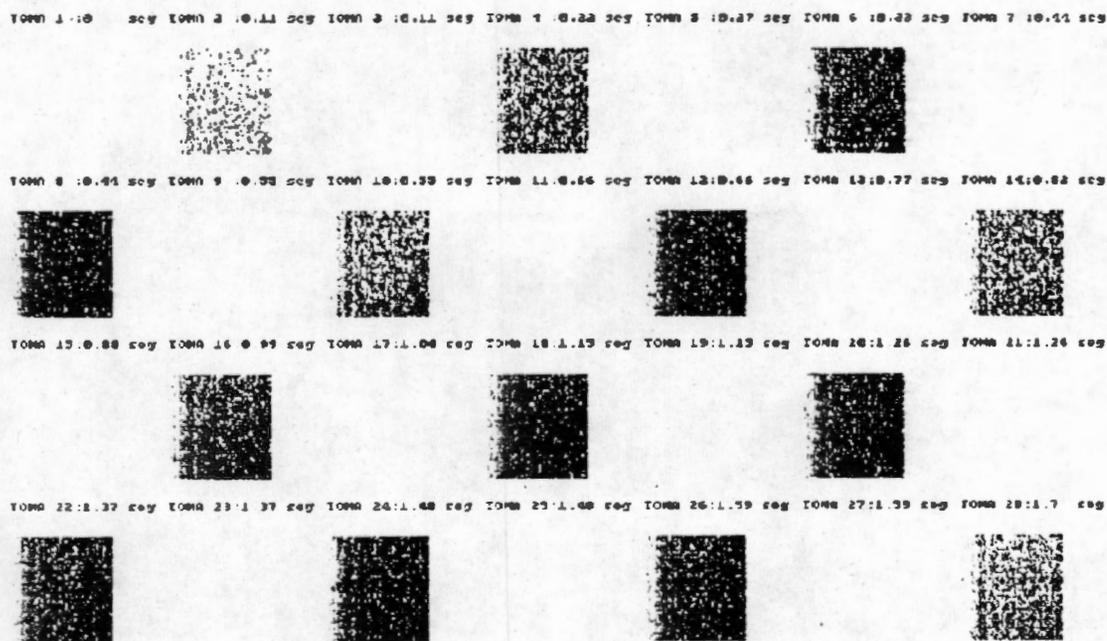


Figura 3.17 Toma alternada de imágenes con uno y otro filtro en movimiento

Esta figura muestra las imágenes sin ningun procesamiento de una adquisición continua disparada por uno y otro filtro. El patrón repetido indica la correcta sincronía entre el circuito diseñado y el software para llevar a cabo la adquisición de imágenes.

A cada una de las tomas de la figura 4.17 se le saco su histograma, en la figura 4.18 se muestran los histogramas de unas cuantas de ellas. En ellos se puede apreciar que la cantidad de luz que deja pasar cada filtro esta representada en cierto tono de gris, que puede ser diferenciado entre un filtro y otro, lo que quiere decir que si los filtros en movimiento ocasiona histogramas repetitivos hay poco efecto en los cambios de iluminacion. Por otra parte hemos de recordar que este sistema de cambio de filtros esta pensado para un equipo para indicadores fluorescentes con doble longitud de onda en la excitación, y los filtros nunca se interpondran entre la imagen y la cámara, lo cual disminuye aún mas cualquier efecto que pudiese tener, que en el caso de un equipo que necesitara cambiar sus filtros en la emisión, ya que el sistema de cambio de filtro se tendría que colocar entre la muestra biológica y la cámara.

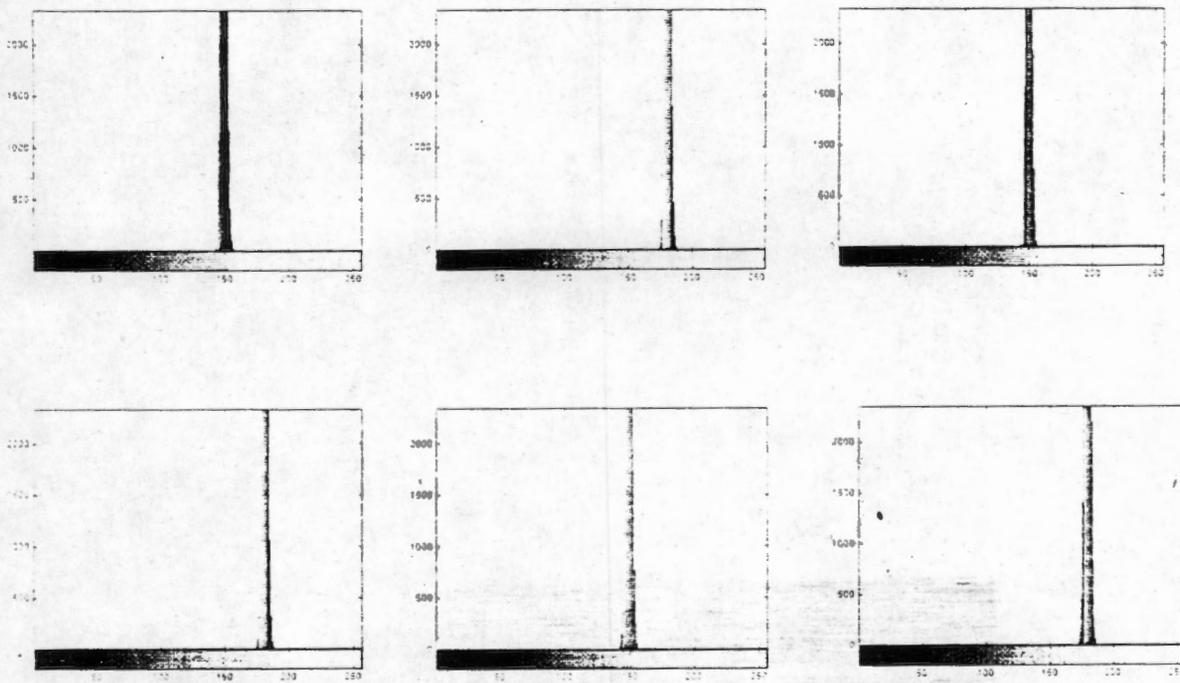


Figura 4.18 Histogramas de las tomas alternadas de la figura 4.17

La siguiente prueba que se realizó fue una simulación utilizando un frotis de sangre humana (que es un método que se utiliza para observar células sanguíneas al ser fijadas a un portaobjetos) para que un eritrocito sea utilizado como imagen durante de la semisimulación.

El experimento consiste en poner el frotis al microscopio, captar la imagen y seleccionar cualquier eritrocito que tenga buenas características (al criterio del que seleccione) como tener bien definida su forma, imagen nitida, poco ruido, etc. Posteriormente se comienza el protocolo de calibración simulada del equipo: se sube al máximo la iluminación de la luz del microscopio, y se dice que esta imagen corresponde a la fluorescencia máxima que emitiría el fura2 al saturarlo de Ca^{2+} medido en la longitud de onda de fura unido (340nm). Luego se baja la intensidad de la luz al mínimo y se dice que esta imagen correspondería a la condición de fura saturado de Ca^{2+} como en el caso anterior pero medida en la longitud de onda donde se mide fura libre, esto nos da por resultado punto a punto en la imagen el cálculo de R_{max} . Para calcular R_{min} se toma como la inversa de R_{max} ; esto querría decir que la fluorescencia medida al excitar al indicador unido en estado totalmente unido a Ca^{2+} tiene el mismo valor que la fluorescencia emitida por el indicador totalmente libre de Ca^{2+} al ser excitado en la longitud de onda para medir indicador libre. Además se asumió que las correspondientes fluorescencias medidas al excitar el indicador totalmente unido en la longitud de onda para el no unido es igual a la fluorescencia emitida por el indicador totalmente libre pero medido en la longitud de onda para el unido.

Posteriormente se hicieron una serie de adquisiciones variando la intensidad de luz del microscopio de manera progresiva desde luz apagada hasta intensidad máxima, entonces se toman los pares de imágenes como sigue: la última con la primera, la penúltima con la segunda, etc. Esto se hace así por que la última imagen tiene mayor intensidad de luz que sería el caso de una fluorescencia máxima por ejemplo medida en la longitud de onda para el indicador unido, por lo que su contraparte para calcular R debe tener un valor mínimo ya que es la fluorescencia donde se mide el indicador libre, y al no haber esta es mínima, casos parecidos suceden para los otros pares solo que en menor grado, de tal forma que a la

mitad en ambos casos la fluorescencia es básicamente la misma. Por otra parte se asumió que la fluorescencia de fondo es cero.

La imagen captada por el CCD que se muestra a continuación, se trata de un frotis donde se pueden observar una gran cantidad de eritrocitos, de los cuales se seleccionó el que se encuentra encerrado en el rectángulo.

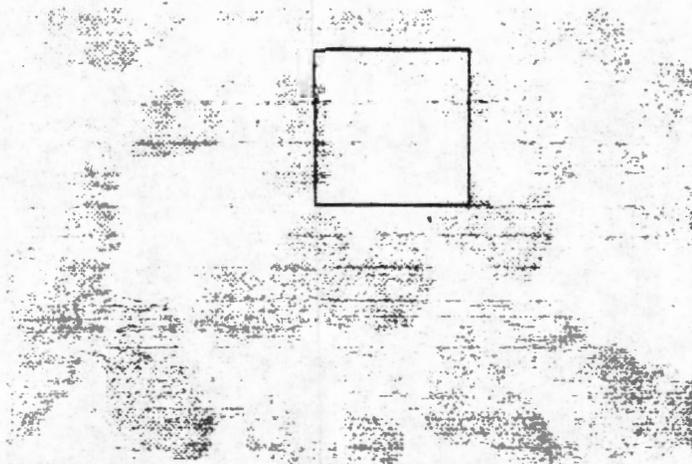


Figura 4.19 Frotis captado por una cámara CCD (Laboratorio de biofísica de la Universidad Autónoma Metropolitana).

Las figuras siguientes muestran los resultados de los cálculos hechos al calibrar el equipo como se describe en la página anterior (al ir variando la intensidad luminosa). Se trata de imágenes en pseudocolor que representan la razón de las variaciones en intensidad luminosa de la fuente de luz del microscopio, durante los primeros pasos, empezando desde una iluminación baja. En las primeras (figura 4.20) se puede observar un tono azul representando una “concentración baja”, luego conforme se incrementa la intensidad de luz de la fuente ese tono azul cambia a uno amarillo que representaría una concentración un poco más alta.

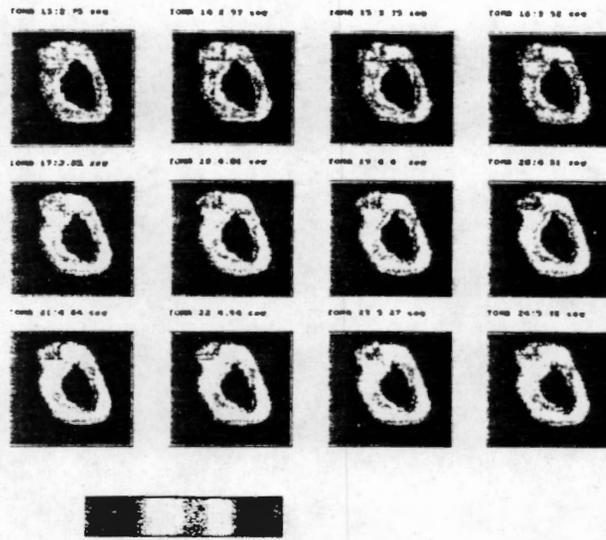


Figura 4.20 Imágenes en pseudocolor al inicio de la simulación.

En las figuras 4.21 y 4.22 se muestran los cambios en las etapas siguientes en donde la fuente luminosa se ha llevado casi a su valor máximo.

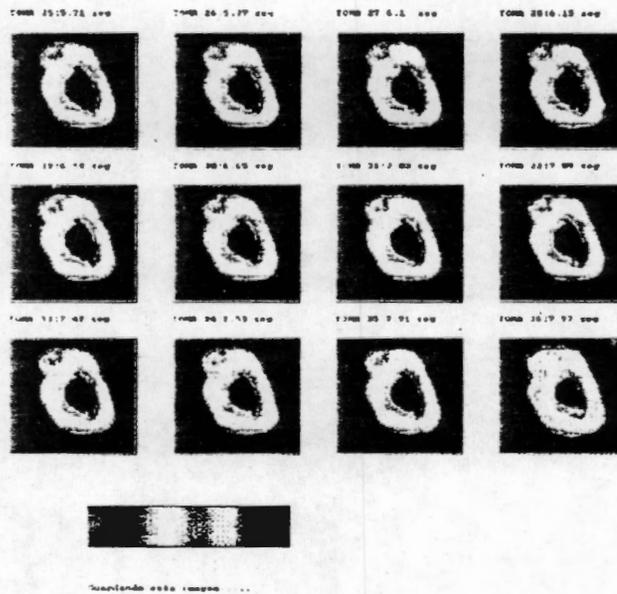
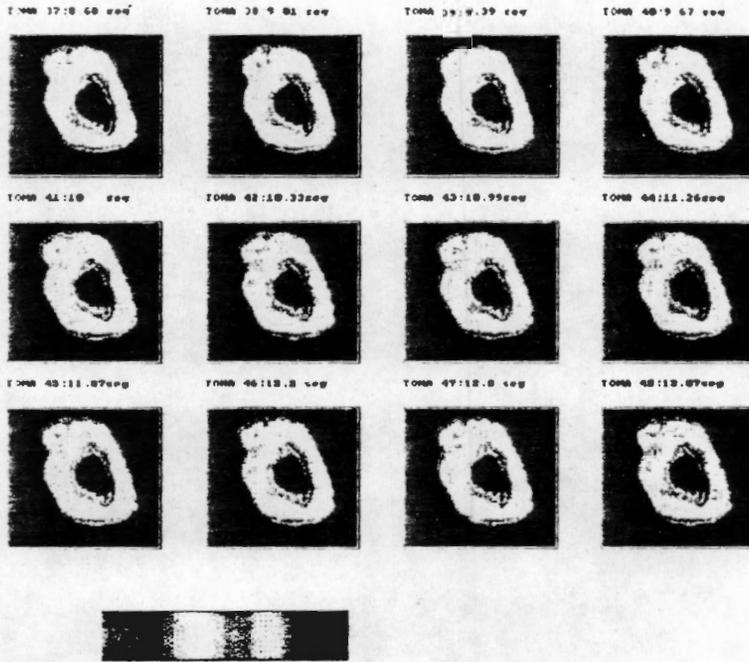


Figura 4.21 Imágenes a la mitad de la simulación

En estas tomas ya se observan cambios de tonos llegando al rojo, indicando que se está llegando a la escala máxima del pseudocolor.

Finalmente estas tomas ya no varían mucho sus tonos pues la intensidad máxima a la que fue elevada la intensidad de la fuente luminosa no fue suficiente para llevarla a la máxima escala.



Guardando esta imagen.....

Figura 4.22 Imágenes al final de la simulación

En esta simulación se puede observar que el fondo de la imagen aunque permanece casi siempre en azul, ya empieza a cambiar su tono, esto no sucedería en un caso real ya que la fluorescencia solo proviene del interior de la célula.

Si lo que deseamos es elevar la resolución temporal del sistema es posible realizar las mediciones utilizando el sistema en el modo de una sola longitud de onda, que por software puede ser elegido. En cuyo caso la calibración se realiza en base al protocolo mencionado en el capítulo 2 o bien como el descrito por Neher en 1992 [10 A].

Las figuras 4.23 y 4.24 muestran el aspecto del sistema.

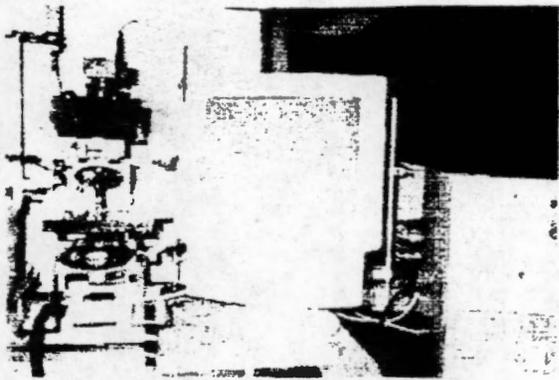


Figura 4.23 Sistema montado

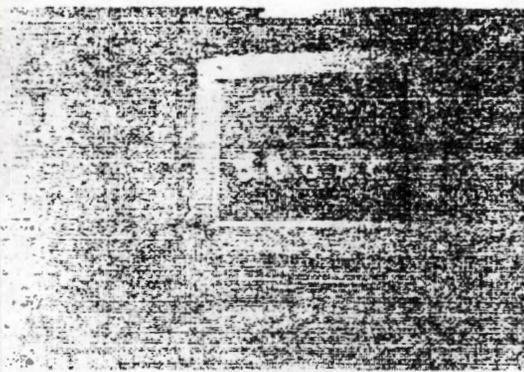


Figura 4.24 Sistema funcionando

4.4 FILTROS OPTICOS.

Los filtros KODAK WRATTEN son filtros de gelatina de excelente calidad óptica, que se pueden adaptar a diferentes sistemas fotográficos. Debido a su construcción, éstos se pueden recortar a las medidas necesarias. Para la aplicación que nos interesa, los filtros que son susceptibles de emplearse son los filtros Wratten 33, 34A y 47. La figura muestra las características espectrales de estos filtros. Se puede observar que en el rango de excitación para Fura-2, se puede encontrar una combinación de filtros que permita pasar la luz en un rango y que la rechaza en el rango complementario. La línea punteada en la figura 4.25 muestra las longitudes de 340 y 380 nm, de tal manera que el filtro 34A permite el paso de luz a 380 nm y rechaza a 340, mientras que los filtros 33 y 47 tienen características algo complementarias. Se podría emplear una combinación de filtros 34 con alguno de los otros dos en nuestro diseño experimental.

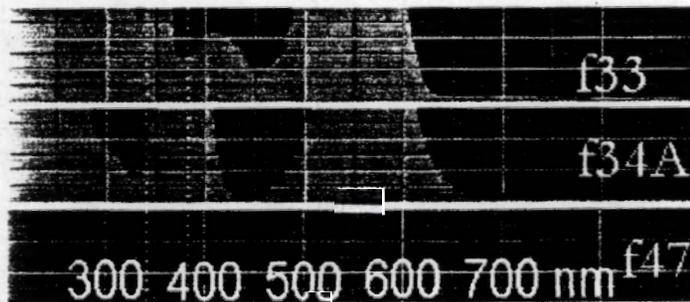


Figura 4.25 Características espectrales de los filtros wratten 33, 34A y 47.

5. DISCUSION Y COMENTARIOS.

5.1 SOFTWARE.

Este trabajo de tesis concluye con la última prueba de simulación descrita al final del capítulo 4. Con este experimento se comprobó que el software de adquisición, procesamiento y almacenamiento de imágenes, control de la cámara y del cambio de filtros están funcionando correctamente. Este software permite elegir si se utilizará al equipo con indicador en modo de una longitud de onda de excitación con el fin de aumentar la resolución temporal pero con las desventajas de que se han venido hablando a lo largo de la tesis, como el riesgo de errores por fluctuaciones en la intensidad de la fuente luminosa, por la redistribución o distribución no homogénea del indicador en el interior de la célula y fluorescencia de fondo; o bien el equipo se puede utilizar en modo de excitación dual de la fluorescencia, en donde los errores por las causas descritas arriba son eliminados pero la resolución temporal disminuye.

5.2 EQUIPO.

Al equipo solo le hace falta completar la parte óptica, pues deben emplearse los filtros reales para el indicador fluorescente Fura-2 (340 nm y 480 nm en excitación) o del indicador que se vaya a utilizar, que aunque en la tesis se ha mencionado que es Fura-2 nada impide que puede ser cualquier otro pues en las ecuaciones del cálculo de la concentración de Ca^{2+} solo habría que cambiar una constante de disociación Por otra parte también se debe contar con un microscopio con capacidad de epifluorescencia y la fuente de iluminación de luz xenón.

5.3 ALMACENAMIENTO MASIVO TEMPORAL DE INFORMACIÓN.

El software de almacenamiento hasta ahora se encuentra limitado en capacidad a mas o menos 4MB de memoria, sin embargo existe la posibilidad de incrementar esta capacidad y además hacerlo de manera más fácil de lo que se ha hecho ahora donde se tiene acceso a esos 4MB de espacio solo en paginas de 64KB. Esta idea de como hacerlo llego ya cuando la tesis se habia concluido y por ello no se ha implementado, pero no esta de mas decir cual es; se trata de crear una unidad de disco virtual a través del programa RAMDRIVE.SYS del sistema operativo MS-DOS cargado a través del archivo config.sys. Esta unidad de disco es tal que los archivos que en ella se creen se encuentran en la memoria RAM (hasta 32MB), pero al apagar la computadora estos se borran, pero pues los archivos que se deseen conservar pueden ser pasados al disco duro real antes de apagarla. Por ser un "disco" hecho de RAM tiene una gran velocidad de transferencia de datos, por lo que su acceso es muy rápido y por ejemplo para nuestra aplicación, la velocidad de transferencia de los datos de las imágenes a este disco es suficiente para seguir conservando una buena resolución temporal general del equipo, para el acceso a todo el espacio reservado en este disco no hay que hacer nada, para nosotros es transparente y se tiene de manera continua sin tener que dividirlo..

5.4 VELOCIDAD DE CAMBIO DE LOS FILTROS.

Como comentario podemos aclarar que durante los experimentos de velocidad del sistema de cambio de filtros la velocidad máxima mostrada no es tan grande como se quisiera, sin embargo no fue por que el motor ya no pueda hacerlo, si no por que la forma en que se armó el prototipo tiene poca estabilidad mecánica, y al aumentar la velocidad del motor la estructura comenzaba a vibrar y el disco golpeaba a los sensores del paso de los filtros, y entonces lo que ahí se presento fue la velocidad máxima sin que esto sucediera, pero al armar el sistema en una estructura mas sólida y de mejores cualidades entonces la velocidad de cambio de filtros seguramente puede ser incrementada aún mas.

5.5 NUEVAS TÉCNICAS.

Con el tiempo han aparecido nuevos indicadores para Ca^{2+} , los cuales necesitan de excitación con luz visible, sin embargo esta luz por lo general proviene de una fuente laser y las imágenes se forman haciendo un barrido y tomando la fluorescencia que emite cada punto de la imagen al excitar una pequeña zona de la célula. Además la óptica de estos microscopios es confocal [11 A], una óptica de precio muy poco accesible. Esto se menciona por que son las técnicas más actuales y ya es común que en artículos de divulgación científica esta sea la técnica que se utilizó en sus experimentos para realizar sus mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ y otros iones.

5.6 OTRAS FORMAS DE PLANTEAR EL EQUIPO.

Una propuesta que suena interesante se nos sugirió hace algún tiempo, pero que no fue posible realizar por no contar con la infraestructura para hacerlo, esta forma de hacerlo no se ve reportada en la literatura y parece no haber sistemas comerciales que lo hagan de esta forma. La idea consiste en utilizar un indicador con doble longitud de onda en la emisión, y en lugar de tomar imágenes en tonos de gris, hacerlo a color. Posteriormente se puede hacer un análisis espectral del color de la imagen y se observan las componentes en longitudes de onda donde se encuentra la emisión y así podemos saber con una sola imagen las cantidades de la fluorescencia emitida por indicador unido e indicador no unido, con ello se logra incrementar la resolución temporal del sistema y además no hay los errores que se cometen al hacer la medición en una sola longitud de onda pues los cálculos seguirán haciéndose con la ecuación para un indicador dual.

También se nos dio otra idea que consiste en no solo tener una cámara sino dos, con un indicador de emisión dual, a cada cámara se le coloca enfrente su filtro respectivo para dejar pasar la longitud de onda deseada, y entonces una de las cámaras recoge la información de fluorescencia del indicador unido y al mismo tiempo la otra recoge la fluorescencia del indicador libre, de esta forma no hace falta un sistema de cambio de filtros y además la resolución temporal solo dependerá de las cámaras.

5.7 COMENTARIO FINAL.

Independientemente de las nuevas sugerencias planteadas resaltamos el hecho de que con la utilización adecuada de los filtros de gelatina "wratten", disponibles a bajo costo en el mercado, el equipo solo requiere de la adquisición del microscopio y de la fuente de luz para emplearse en experimentos reales.

BIBLIOGRAFIA.

- [1L] Nicholas Sperelakis (1995) . CELL PHYSIOLOGY. Editado por Nicholas Sperelakis
- [2L] R. H. Burroon y P. H. Van Knippenberg (1988). LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Editorial Elsevier.
- [3L] Bruce Alberts, Dennis Bray (1989). MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. Segunda Edición, editorial Garland.
- [4L] Thomas RC (1978). ION-SENSITIVE INTRACELLULAR MICRO-ELECTRODES HOW TO MAKE AND USE THEM. London Academic Press.
- [5L] Grynkiewicz G.,Poenie M.,Tsien R. Y.. (1985). A NEW GENERATION OF Ca⁺⁺ INDICATORS WITH GREATLY IMPROVED FLUORESCENCE PROPERTIES.
- [6L] Connor J. A. (1986).DIGITAL IMAGING OF FREE CALCIUM CHANGES AND SPATIAL GRADIENTS IN GROWING PROCESSES IN SINGLE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM CELLS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- [7L] Gregory A. Baxes (1984). DIGITAL IMAGE PROCESSING. Editorial Cascade Press.
- [8L] Inoué y Spring (1997). VIDEO MICROSCOPY THE FUNDAMENTALS. Segunda edición .Editorial Plenum Press.
- [9L] M. Morris Mano (1992). LOGICA DIGITAL Y DISEÑO DE COMPUTADORES. Editorial Prentice-Hall.
- [10L] Wang y Herman (1996).FLUORESCENCE IMAGING SPECTROSCOPY AND MICROSCOPY. Editorial John Wiley & Sons.

[11L] William F. Ganong (1996). FISILOGIA MEDICA. 15ª Edición, editorial El Manual Moderno S.A. de C.V.

[12L] James G. McCormack (1991) CELLULAR CALCIUM. Editado por James G. McCormack y P. H. Cobbold

[13L] Christopher C. Ashley & Anthony K. Campbell (1979). DETECTION AND MEASUREMENT OF FREE Ca^{2+} IN CELLS. Editorial Elsevier/ Norli-Holland Biomedical Press Amsterdam-NewYork-Oxford.

[14L] Dieter Merme (1985). CALCIUM AND CELL PHYSIOLOGY. Editado por Dieter Merme Springer-Verlag Berlín Heidelberg New York Tokyo.

[15L] Way Yiu Cheung (1982). CALCIUM AND CELL FUNCTION. Academic Press.

[16L] Leopold J. Anghileri, Anne Marie Tuffer- Anghileri (1982), THE ROLE OF CALCIUM IN BIOLOGICAL SYSTEMS. CRC Press.

ARTICULOS.

[1A] Christian Lushner, Peter Lipp, Hans-Rudof Lushter and Ernest Niggli (1996). CONTROL ON ACTION POTENTIAL PROPAGATION FOR INTRACELLULAR Ca^{++} IN CULTURED RAT DORSAL ROOT GANGLION CELLS. Journal of Physiology No. 490 pags. 319-324

[2A] A. W. Trafford, P. Lipp, S. C. O'Neill, E. Niggli y D. A. Eisner (1995). PROPAGATING CALCIUM WAVES INITIATED BY LOCAL CAFFEINE APPLICATION IN RAT VENTRICULAR MYOCYTES. Journal of Physiology No. 489 pags. 319-326.

[3A] Govindan Dayanithi, Hélène Widner y Philippe Richard (1996). VASOPRESSIN-INDUCED INTRACELLULAR Ca^{++} INCREASE IN ISOLATE RAT SUPRAOPT CELLS. *Journal of Physiology* No. 490 pags. 713-727.

[4A] Laura Haro Ortiz, Rafael Godinez Fernandez, Edmundo G. Urbina Medal (1994). SIMULACION DE LOS MECANISMOS DE REGULACION DEL Ca^{++} INTRACELULAR Y SU POSIBLE PARTICIPACION EN PROCESOS CELULARES DEPENDIENTES DE L Ca^{++} . *Revista Mexicana de Ingeniería Biom edica* , Vol. XV No. 2

[5A] Laura Haro Ortiz, Rafael Godinez Fernandez, Edmundo G. Urbina Medal (1994). MODELADO DE TRES PROCESOS QUE AFECTAN LA DISTRIBUCIONM DE Ca^{++} LIBRE INTRACELULAR. *Revista Mexicana de Ingeniería Biom edica* , Vol. XV No. 2

[6A] William N. Ross y Nechama Lasser-Ross ((1992). HIGH TIME RESOLUTION IMAGING OF CALCIUM TRANSIENTS WITH A CCD CAMERA. *Practical Electrophysiological Methos*, pags. 378-381.

[7A] Roger C. Thomas (1992). MEASUREMENT OF ION ACTIVITY WITH SELECTIVE MICROELECTRODES. *Practical Electrophysiological Methos*, pags. 373-377.

[8A] Jos A. H. Verheugen y Henrri Korn (1997). A CHARYBDOTOXIN-INSENSITIVE CONDUCTANCE IN HUMAN T LYMPHOCYTES. T CELL MEMBRANE POTENTIAL IS SET BY DISTINCT K^{+} CHANNELS. *Journal of Physiology* No. 503.2 pags. 317-331

[9A] Verheugen, J. A. H., Le deist, F., Devingnot, V. & Korn H. (1997) ENHANCEMENT OF CALCIUM SIGNALING AND PROLIFERATION RESPONSES IN ACTIVATED HUMAN T LYMPHOCYTES. INHIBITORY EFFECTS OF K⁺ CHANNEL BLOCK BY CHARYBDOTOXIN DEPEND ON THE T CELL ACTIVATION STATE. *Cell Calcium* 21, pags. 1-17.

[10A] Erwin Neher y George j. Augustine (1992). CALCIUM GRADIENTS AND BUFFERS IN BOVINE CHROMAFFIN CELLS. *Journal of Physiology* No. 450 pags. 273-301.

[11A] Hernandez-Cruz A. Sala, F. & Adams, P.R. (1990). SUBCELLULAR CALCIUM TRANSIENTS VISUALIZAD BY CONFOCAL MICROSCOPY IN A VOLTAJE-CLAMPED VERETBRATE NEURON. *Science* 247, pags. 858-867.

[12A] Williams, D.A., Fogarty, K.E., Tsien, R.Y. & Fay, F.S. (1995). CALCIUM GRADIENTS IN SINGLE SMOOTH MUSCLE CELLS REVALED BY THE DIGITAL IMAGING MICROSCOPE USING FURA-2. *Nature* 318, pags. 558-561.

[13A] Kasai, H. & Augustine, G. J. (1990). CYTOSOLIC Ca²⁺ GRADIENTS TRIGGERING UNIDIRECTIONAL FLUID SECRETION FROM EXOCRINE PANCREAS. *Nature* 348, pags. 735-738

[14A] Dallman Julia E., Davis Anna K. & Moody William J. (1998) SPONTANEOUS ACTIVITY REGULATES CALCIUM-DEPENDENT K⁺ CURRENT EXPRESSION IN DEVELOPING ASCIDIAN MUSCLE. *Journal of Physiology* 511-3 pags. 683-693.

[15A] Irving Andrew J & Collingridge Graham L. (1998). A CHARACTERIZATION OF MUSCARINIC RECEPTOR-MEDIATED INTRACELLULAR Ca²⁺ MOBILIZATION IN CULTURED RAT HIPPOCAMPAL NEURONES. *Journal of Physiology* 511-3, pags. 747-759.

[16A] Otani Sotoru & Connor John A. (1998). REQUERIMENT OF RAPID Ca^{2+} ENTRY AND SYNAPTIC ACTIVATION OF METABOTROPIC GLUMATE RECEPTORS FOR THE INDUCTION OF LONG-TERM DEPRESSION IN ADULT RAT HIPPOCAMPUS. *Journal of Physiology* 511-3, pags. 761-770

[17A] Shmigol A.V., D.A. Eisner & Wray Susan (1998) PROPERTIES OF VOLTAGE-ACTIVATED $[Ca^{2+}]_i$ TRANSIENTS IN SINGLE SMOOTH MUSCLE CELLS ISOLATED FROM PREGNANT RAT UTERUS. *Journal of Physiology* 511.3 , pags. 803-811.

[18A] P.R. Mounfield y L. Robson (1998).THE ROLE OF Ca^{2+} IN VOLUME REGULATION INDUCED BY Na^+ _COUPLED ALANINE UPTAKE IN SINGLE PROXIMAL TUBULE CELLS ISOLATED FROM FROG KIDNEY. *Journal of Physiology* 510.1 pags. 145-153.

[19A] J. Ashot Kozak, Stanley Misler y Diomedes E. Logothetis (1998). CHARACTERIZATION OF A Ca^{2+} -ACTIVATED K^+ CURRENT IN INSULIN SECRETING MURINE BTC-3 CELLS. *Journal of Physiology* 509.2, pags. 355-370.

[20A] Kyoichi Ono, Miki Nakao y Toshihiko Iijima (1998). CHLORIDE-SENSITIVE NATURE OF THE HISTAMINE-INDUCED Ca^{2+} ENTRY IN CULTURED HUMAN AORTI ENDOTHELIAL CELLS. *Journal of Physiology* 511.3.

[21A] M. Kohda, S. Komori, T. Unno y H. Ohashi (1998). CARBACHOL-INDUCED OSCILATIONS IN MEMBRANE POTENTIAL AND $[Ca^{2+}]_i$ IN GUNEA-PIG ILEAL SMOOTH MUSCLE CELLS. *Journal of Physiology* 511.2