



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
ELÉCTRICA - INSTRUMENTACIÓN

INSTRUMENTACIÓN DE UN NANOSCOPIO ÓPTICO PARA VISUALIZAR LA LIBERACIÓN DE  
SEROTONINA EN NEURONAS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
GUILLERMO ALEJANDRO HERNÁNDEZ MENDOZA

TUTORES PRINCIPALES  
DR. NASER QURESHI, ICAT-UNAM  
DR. FRANCISCO FERNÁNDEZ DE MIGUEL, IFC-UNAM

COMITÉ TUTOR  
DR. CARLOS G. TREVIÑO PALACIOS, INAOE  
DR. JESÚS GARDUÑO MEJÍA, ICAT-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. FEBRERO 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dr. García Valenzuela Augusto

Secretario: Dr. Treviño Palacios Carlos Gerardo

1er. Vocal: Dr. Qureshi Naser

2do. Vocal: Dr. Fernández De Miguel Francisco R.

3er. Vocal: Dr. Wood Christopher David

Lugar donde se realizó la tesis: Ciudad Universitaria, CD. MX.

## **TUTORES DE TESIS:**

DR. NASER QURESHI

DR. FRANCISCO FERNÁNDEZ DE  
MIGUEL

FIRMA

FIRMA

*A mis padres.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, mi papá, mi hermano y mi hermana, el motivo de todo este esfuerzo.

A mi china por la compañía y el apoyo.

A Francisco, Carlos y Naser por todos estos años de aprendizaje, descubrimiento y trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio presentes y pasados: Caro, Montse, Richi, Vanessa, Adriana, Marco, Héctor, Sharlen, Dilia y Celeste.

A mi gran amigo Bruno.

A Sara Flores, nuestra auxiliar de laboratorio y a Olivia Farfán nuestra secretaria.

A los proyectos que financiaron este trabajo: Human Frontier Science Program (RGP0060/2019); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (130031, 253754, J47552-Y); Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IG100519, IN208618, IN210317).

Por las becas a CONACYT CVU/becario: 377026/252063, DGAPA-UNAM IN210317 y Human Frontier Science Program (RGP0060/2019).

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a mi alma mater la Facultad de Ingeniería, al Instituto de Fisiología Celular y al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología.

## Resumen

En este trabajo se describen el diseño y la construcción de un nanoscopio vertical multifotónico para estudiar los mecanismos finos mediante los cuales el neurotransmisor serotonina es liberado desde el cuerpo de neuronas y cómo se difunde al espacio extracelular para cambiar la respuesta de circuitos neuronales. La serotonina en el sistema nervioso modula los estados de ánimo, el sueño, conductas sexual y patrones rítmicos como la locomoción. Alteraciones en el funcionamiento del sistema serotoninérgico están asociadas a trastornos como la depresión, la ansiedad y los trastornos obsesivos compulsivos. La serotonina dentro del cuerpo de las neuronas esta contenida en vesículas de 100 nm de diámetro a una concentración de 270 mM, que en reposo están alejadas de la membrana plasmática y asociadas al citoesqueleto. Ante estimulaciones eléctricas, cúmulos enteros de vesículas son transportados hacia a la membrana, usando como riel al citoesqueleto, para fusionarse y liberar su contenido al espacio extracelular. Nuestro instrumento tiene la capacidad de visualizar el mecanismo de la movilización vesicular a partir de dos efectos ópticos no lineales complementarios usando un láser pulsado en el rango del infrarrojo (IR): la fluorescencia multifotónica de la serotonina en el rango visible del espectro electromagnético y la generación de segundos armónicos producidos por el citoesqueleto responsable del transporte. El nanoscopio tiene la capacidad de capturar 4 canales de emisión simultáneamente a una tasa de cuatro imágenes por segundo formadas por 512 X 512 píxeles. Dos canales están dedicados a la captura de fluorescencia y otros dos a la captura de las componentes en polarización vertical y horizontal de los segundos armónicos, que nos dan información sobre el nivel de anisotropía del citoesqueleto. La flexibilidad del equipo permitió además montar un monocromador y hacer espectroscopia de la molécula de serotonina. Detectamos 3 emisiones no lineales de fluorescencia que dependen de la concentración de serotonina, de la longitud de onda y potencia de excitación. Nuestro equipo esta a la par de sus contrapartes comerciales en cuanto a velocidad, resolución, captura y despliegue de imágenes, y puede ser modificado en función de la experimentación que se requiera. Al final se describe una técnica de superresolución que permitirá a corto plazo resolver estructuras de una fracción de la resolución óptica teórica como lo son las vesículas. Hasta donde tenemos conocimiento este nanoscopio es el primero construido totalmente en latinoamérica y crea un antecedente para su reproducción a bajo costo.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1. Liberación de serotonina sináptica y extrasináptica . . . . .	5
1.2. El sistema nervioso de la sanguijuela y la liberación somática . . . . .	7
1.3. ¿Cómo estudiar la liberación somática de serotonina? . . . . .	10
1.3.1. Microscopia multifotónica . . . . .	11
1.3.2. Generación de segundos armónicos . . . . .	13
1.3.3. Fotoquímica de la serotonina . . . . .	14
1.4. Planteamiento del problema . . . . .	15
1.4.1. De microscopia a nanoscopia . . . . .	16
<b>2. Desarrollo</b>	<b>17</b>
2.1. Excitación multifotónica . . . . .	19
2.1.1. Control de potencia del láser . . . . .	20
2.1.2. Sistema de barrido . . . . .	23
2.2. Detección de las emisiones . . . . .	26
2.2.1. Conversión de corriente a voltaje . . . . .	27
2.3. Formación de imágenes . . . . .	29
2.4. Iluminación y visualización de la muestra con luz transmitida . . . . .	31
2.5. Automatización del eje Z . . . . .	31
2.6. Espectroscopia . . . . .	32

<b>3. Resultados</b>	<b>33</b>
3.1. Espectroscopia de la molécula serotonina . . . . .	34
3.1.1. Fotoconversión de la serotonina . . . . .	39
3.2. Representación geométrica de la fluorescencia multifotónica de la serotonina . . . . .	42
3.3. Generación de segundos armónicos . . . . .	44
3.4. Fluorescencia y SHG de las neuronas de Retzius . . . . .	46
<b>4. Conclusiones y trabajo a futuro</b>	<b>48</b>
4.1. Nanoscopia . . . . .	51
4.2. Señal óptica rápida (FOS) . . . . .	53
<b>A. Componentes ópticas del microscopio multifotónico</b>	<b>55</b>
<b>B. Diagrama eléctrico del circuito de transimpedancia</b>	<b>56</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>57</b>

# Índice de figuras

1.1. Sistema nervioso central de la sanguijuela . . . . .	7
1.2. Micrografías electrónicas de una neurona de Retzius . . . . .	8
1.3. Ciclo de liberación extrasináptica de serotonina . . . . .	9
1.4. Absorción multifotónica y generación de segundos armónicos . . . . .	12
1.5. Generación de segundos armónicos en fibras . . . . .	13
1.6. Estructura molecular de la serotonina . . . . .	14
1.7. Espectro de absorción y emisión de la molécula de serotonina . . . . .	14
2.1. Diagrama general del microscopio . . . . .	18
2.2. Curva de emisión del láser . . . . .	19
2.3. Diagrama del control de potencia del láser . . . . .	20
2.4. Planta del PID . . . . .	21
2.5. Respuesta del controlador de potencia . . . . .	22
2.6. Sistema de barrido . . . . .	23
2.7. Patrón de barrido . . . . .	25
2.8. Monturas mecánicas para los fotomultiplicadores . . . . .	26
2.9. Diagrama del circuito de transimpedancia . . . . .	27
2.10. Señales de voltaje del circuito de transimpedancia . . . . .	28
2.11. Formación de imagen . . . . .	29
2.12. Distorsión del barrido en los bordes de la imagen . . . . .	30
2.13. Cámara de luz transmitida . . . . .	31

2.14. Diagrama del monocromador . . . . .	32
3.1. Diagrama de la adquisición y formación de imágenes . . . . .	33
3.2. Calibración del área de barrido del microscopio . . . . .	34
3.3. Espectro de emisión de serotonina y su análisis con el algoritmo de SSA . . . . .	35
3.4. Espectros de fluorescencia de la molécula de serotonina . . . . .	37
3.5. Espectros de fluorescencia de serotonina excitada con 700, 720 y 740 nm . . . . .	38
3.6. Espectro de absorción de 5-HT irradiada . . . . .	39
3.7. Espectro de fluorescencia multifotónica de 5-HT irradiada . . . . .	40
3.8. Espectro de absorción y emisiones fluorescentes de la serotonina . . . . .	41
3.9. Segmento de heptágono de la fluorescencia verde . . . . .	42
3.10. Representación gráfica de las emisiones de fluorescencia . . . . .	43
3.11. Representación gráfica del cociente de los heptágonos verde-violeta . . . . .	43
3.12. Representación gráfica del cociente de los heptágonos azul-verde . . . . .	44
3.13. Segundos armónicos en cola de rata . . . . .	45
3.14. Componentes en polarización de los SHG . . . . .	45
3.15. Imágenes de la serotonina y corteza de actina en una neurona de Retzius . . . . .	46
3.16. Imagen de fluorescencia y SHG de una neurona de Retzius . . . . .	47
4.1. Fotografía del microscopio . . . . .	49
4.2. Haz dona para la microscopia STED . . . . .	51
4.3. Implementación de la nanoscopia STED . . . . .	52
4.4. Señal óptica rápida en la neurona de Retzius . . . . .	54

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Liberación de serotonina sináptica y extrasináptica

La serotonina, también conocida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), esta ampliamente distribuida en el sistema nervioso central de vertebrados e invertebrados, y modula comportamientos como la agresión, los patrones rítmicos motores, como los encargados de la alimentación y la locomoción. En los vertebrados la serotonina modula el sueño, el estado de excitación y comportamientos sexuales. Deficiencias en el sistema serotoninérgico en humanos están asociadas a desordenes de sueño, de alimentación, de ansiedad, trastorno obsesivo compulsivo, esquizofrenia y depresión [1, 2].

La serotonina afecta al sistema nervioso actuando en circuitos completos. Una característica importante que tiene el sistema serotoninérgico es que el funcionamiento de complejos comportamientos depende sorprendentemente de una cantidad relativamente pequeña de neuronas serotoninérgicas. La serotonina en el sistema nervioso puede actuar de tres distintas formas: como neurotransmisor clásico, como neuromodulador o como neurohormona. Un neurotransmisor clásico es liberado por la terminal nerviosa y actúa directamente en terminales postsinápticas de una célula contigua, un neuromodulador puede cambiar la respuesta de un circuito completo y una neurohormona es liberada en la circulación, y por lo tanto puede ejercer efectos a través de todo el organismo.

En particular en este trabajo estamos interesados en el estudio de la liberación de serotonina como neuromodulador a partir de la liberación no sináptica de la serotonina, la que ocurre en cualquier parte de la célula nerviosa. Clásicamente la comunicación química en el cerebro se lleva a cabo cuando una neurona libera neurotransmisores en el espacio sináptico y activa receptores postsinápticos en otra neurona, este proceso permite una comunicación rápida y puntual y asegura que la información fluya de manera ordenada. Por otro lado, los neuromoduladores se difunden en el espacio extracelular del sistema nervioso, actúan en receptores alejados de los sitios de liberación y varían la forma en que el cerebro procesa la información. Cuando el neurotransmisor esta restringido al espacio sináptico se asemeja a un circuito estático, en contraste, como neuromodulador la información fluye a una variedad de sitios en un espacio más amplio [3].

La serotonina dentro de las neuronas esta contenida en vesículas en las terminales sinápticas de las dendritas y de varicosidades axonales y extrasinápticas (cuerpo neuronal o soma) [4]. Los requerimientos para funcionar como neuromodulador, incluyendo la difusión del transmisor entre sitios de liberación y los receptores,

sugieren que se requiere de grandes cantidades de moléculas transmisoras. Sin embargo, la sinapsis libera solo pequeñas cantidades ante la llegada de potenciales de acción. Además enzimas y transportadores restringen su difusión fuera de la región sináptica, por lo tanto la salida del neurotransmisor hacia el espacio extracelular desde la sinapsis es poco probable [1]. Ante estimulación química o eléctrica, la serotonina puede ser detectada en lugares distantes de los sitios de liberación, sugiriendo que ha sido liberada desde sitios extrasinápticos [1, 5].

Estudios aplicando diferentes técnicas han evidenciado que no solo la serotonina, sino también la dopamina, noradrenalina, el trifosfato de adenosina (ATP) y péptidos son liberados desde el espacio extrasináptico en vertebrados e invertebrados, aunque los mecanismos finos mediante los cuales este tipo de liberación se lleva a cabo aún no se han comprendido del todo [2].

Debido a la complejidad del cerebro humano, los estudios acerca de la liberación de serotonina y sus efectos en el sistema nervioso se pueden llevar a cabo en invertebrados, donde se puede estudiar la contribución de neuronas individuales a la conducta, por ejemplo, en invertebrados como las sanguijuelas o en los crustáceos, los circuitos serotoninérgicos han sido estudiados célula a célula. Los efectos de modulación de serotonina han sido demostrados desde las neuronas sensoriales hasta los elementos motores. En la sanguijuela, la red formada por 5 tipos de neuronas serotoninérgicas modulan el nado, el acortamiento, la flexión local, la mucosidad, la alimentación y formas simples de aprendizaje [1, 6, 7].

Para estudiar la liberación de serotonina en el soma y sus efectos en el sistema nervioso, en el laboratorio usamos como modelo de estudio a las neuronas serotoninérgicas de Retzius del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, en las cuales muchos de los mecanismos finos de liberación de 5-HT en sinapsis y soma han sido dilucidados [8, 9]. Las neuronas de Retzius pueden ser fácilmente aisladas y mantenidas en cultivo donde conservan su capacidad para sintetizar, almacenar y liberar serotonina [10]. Además, su gran tamaño provee de excelentes condiciones experimentales para entender principios celulares que también han sido confirmados en otro tipo de neuronas, incluyendo las de los mamíferos [9].

El objetivo de este proyecto doctoral fue construir un nanoscopio óptico con la capacidad de detectar la serotonina contenida en vesículas dentro de las neuronas y estudiar el mecanismo por el cual viajan hacia la membrana, se fusionan y liberan su contenido desde el soma, así como también detectar su difusión hacia sitios lejanos para modular el sistema nervioso. A continuación se describe el mecanismo de liberación somática y los principios físicos necesarios para detectar y formar imágenes en el nanoscopio. Posteriormente se plantea el problema específico a resolver. El capítulo 2 describe la construcción y el funcionamiento del equipo.

Al final se muestran los resultados obtenidos y se detalla el trabajo a futuro que permitirá expandir las capacidades en resolución de nuestro nanoscopio para resolver vesículas individuales durante la liberación somática o verla en los estrechos espacios intercelulares. Ello permitirá expandir nuestro conocimiento acerca del funcionamiento de la serotonina en el sistema nervioso. De este trabajo también se deriva un mejor entendimiento de los procesos fotoquímicos de la fluorescencia de serotonina, que no son tan simples como se han reportado en otros trabajos [11, 12]. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer nanoscopio no lineal construido en Latinoamérica con capacidades de cómputo, velocidad y resolución para estudiar este tipo de mecanismo biológicos.

## 1.2. El sistema nervioso de la sanguijuela y la liberación somática

El sistema nervioso central de la sanguijuela está formado por una cadena de ganglios, cada uno de los cuales controla de manera independiente un segmento del animal. Los 21 ganglios segmentales son muy similares entre sí, con alrededor de 400 neuronas distribuidas de una manera estereotipada [13]. El gran tamaño de los cuerpos neuronales los hace accesibles a registros electrofisiológicos y a la inyección de colorantes, lo que ha permitido que la mayoría de las neuronas del ganglio hayan sido identificadas por su función, sus conexiones y su contribución a la conducta [14]. Hay 7 neuronas serotoninérgicas en cada ganglio, entre las que destacan el par de neuronas de Retzius, que son las mayores, alcanzando un diámetro somático de  $80 \mu\text{m}$  [15] (Figura 1.1).

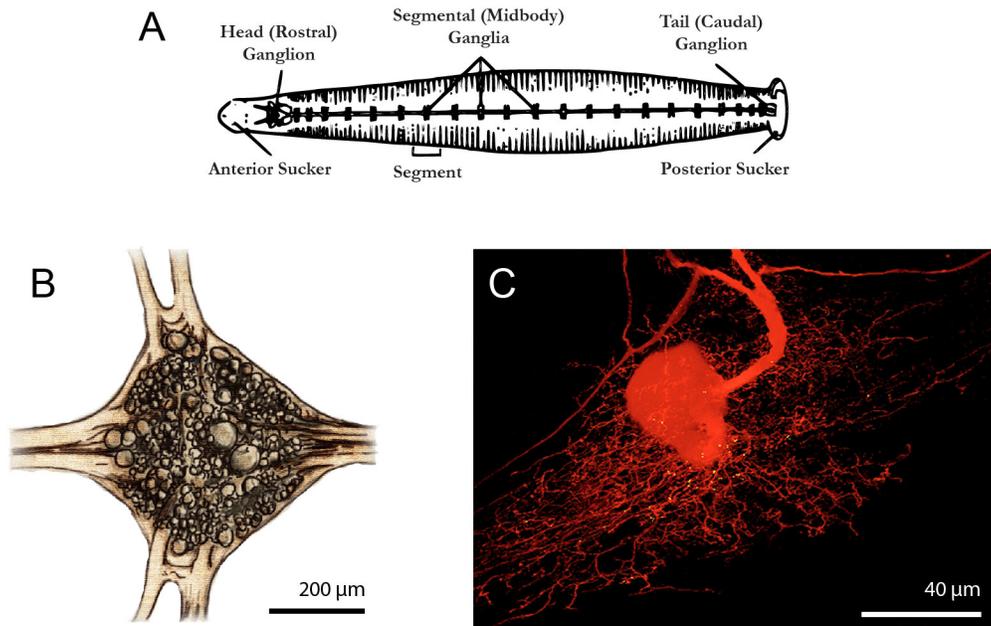


Figura 1.1: Sistema nervioso central de la sanguijuela. (A) compuesto por 21 ganglios intermedios. Cada ganglio contiene 400 neuronas, la mayoría de las cuales ha sido plenamente identificadas. Las neuronas de Retzius resaltan por su tamaño (B) y son las principales sintetizadoras y liberadoras de 5-HT. (C) Reconstrucción de una neurona de Retzius en el ganglio teñida mediante la inyección de rojo de Texas. La imagen fue obtenida mediante sobreposición de imágenes confocales en planos x,y,z después de ser deconvolucionadas, imagen tomada de [16].

El soma de las neuronas de Retzius contiene serotonina en vesículas densas de  $100 \text{ nm}$  de diámetro [10], que en reposo están ensambladas en cúmulos asociados al citoesqueleto (formado por microtubulos) y permanecen distantes de la membrana plasmática. En respuesta a trenes de 10 potenciales de acción generados con una frecuencia de  $20 \text{ Hz}$  mediante inyección de corriente, los cúmulos son movilizados por motores hacia la membrana usando a los microtubulos como rieles. Todas las vesículas de un cúmulo liberan su contenido en un lapso de tiempo que va entre los 100 y los 400 segundos que sigue a la estimulación eléctrica. Trabajos en el laboratorio han estimado que el tren de impulsos evoca exocitosis de aproximadamente 60,000 a 100,000 vesículas del cuerpo celular. Por el contrario, la estimulación con 10 impulsos a  $1 \text{ Hz}$  no evoca este tipo de exocitosis a gran escala [9, 17]. En la Figura 1.2 se muestran micrografías electrónicas de una neurona de Retzius cuando es estimulada a  $1 \text{ Hz}$  y a  $20 \text{ Hz}$ . Estimulando a  $20 \text{ Hz}$  las vesículas fueron movilizadas hacia la membrana para ser

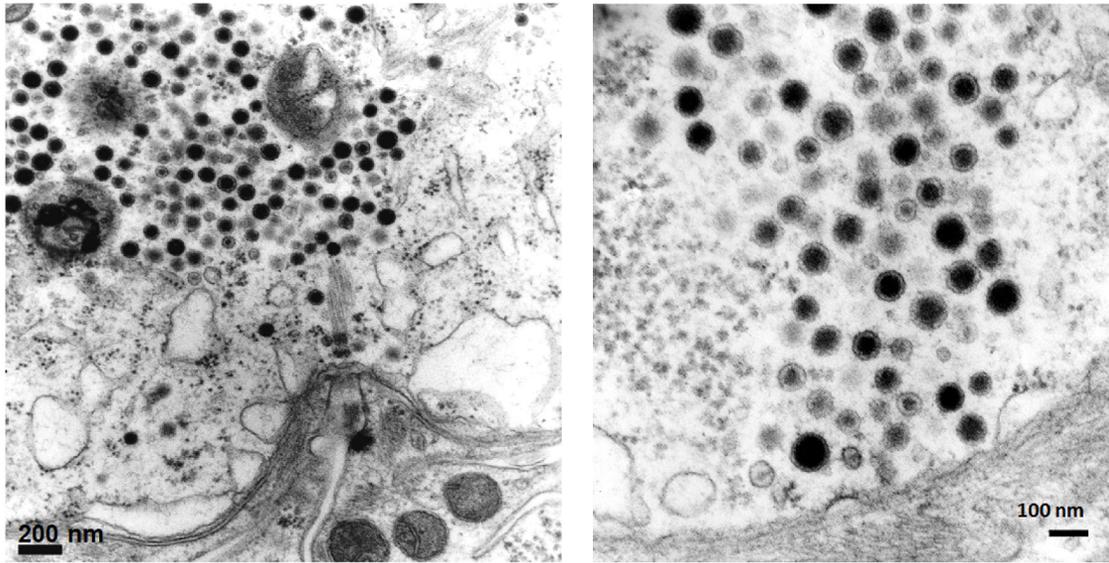


Figura 1.2: Micrografías electrónicas de una neurona de Retzius. A la izquierda la célula fue estimulada con trenes de impulsos a 1 Hz. Las vesículas se mantuvieron alejadas de la membrana. A la derecha estimulada con trenes de impulsos a 20 Hz, las vesículas ya se han movilizad y se encuentran cercanas a la membrana plasmática.

fusionadas [9].

La liberación de serotonina desde el soma se inicia cuando 10 impulsos con una frecuencia de 20 Hz producen un transitorio rápido de calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) que activa el transporte de vesículas. La liberación es mantenida mediante una retroalimentación positiva en la cual la liberación de la misma serotonina activa autoreceptores 5 –  $HT_2$  acoplados al PLC (fosfolipasa C). Esto produce un incremento submembranal de  $Ca^{2+}$  incrementando aún más la exocitosis. Este sistema de lazo cerrado acaba cuando la última vesícula del cúmulo llega a la membrana y libera su contenido. El mecanismo de liberación se detalla en la Figura 1.3. Se ha visto que una segunda exocitosis puede ocurrir ante la ausencia de una estimulación eléctrica adicional, dado que el transitorio submembranal de  $Ca^{2+}$  no ha terminado. Esto sugiere que un solo tren de impulsos a 20 Hz también induce el transporte de cúmulos de vesículas distantes, asociados al mismo tipo de transporte de rieles microtubulares, estos cúmulos se aproximan pero no siempre llegan a la membrana plasmática, constituyendo la reserva de serotonina para responder a una nueva estimulación eléctrica [9].

El transporte vesicular que lleva las vesículas a la membrana se lleva a cabo con base en los microtúbulos. Este tipo de transporte es mediado por motores moleculares y por lo tanto la liberación somática depende indirectamente de la síntesis del ATP. La cantidad de  $Ca^{2+}$  inducido por la estimulación eléctrica determina el número de cúmulos de vesículas transportados y fusionados mediante la síntesis de ATP por la mitocondria. La concentración de  $Ca^{2+}$  decae conforme se propaga al interior de la neurona, como consecuencia, las mitocondrias asociadas a cúmulos cercanos a la membrana reciben mas  $Ca^{2+}$  respecto a los que se encuentra mas alejados. Por lo tanto, los motores moleculares asociados a estos cúmulos externos detectan mas ATP y el transporte vesicular es más eficiente que el de aquellos mas alejados. De esta manera el número de cúmulos de vesículas transportadas y fusionadas es proporcional a la amplitud del primer transitorio rápido de  $Ca^{2+}$  [9].

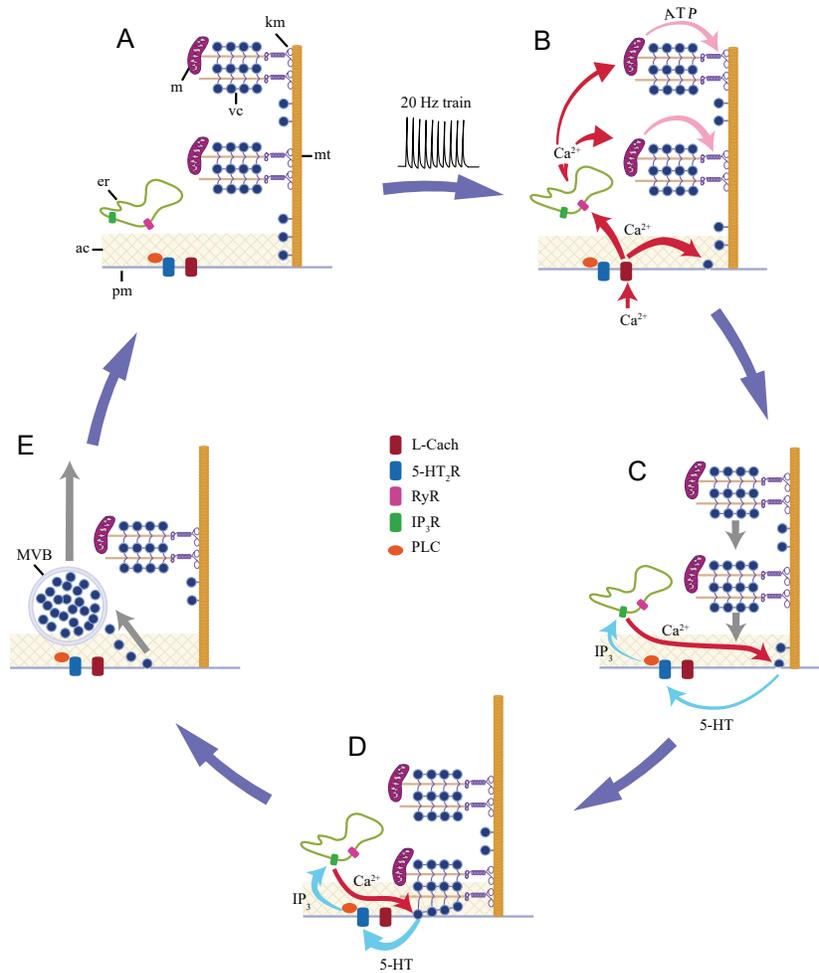


Figura 1.3: Ciclo de liberación extrasináptica de serotonina. El ciclo inicia con las vesículas y la mitocondria en reposo alejadas de la membrana. Ambas están asociadas a los microtubulos anclados a la membrana. El retículo endoplasmico (er) se encuentra entre la membrana y los cúmulos en reposo (A). Un tren de impulsos evoca la entrada de  $Ca^{2+}$  transmembranal (B) que inicia la exocitosis de vesículas que llegan a la membrana. La entrada de  $Ca^{2+}$  activa los receptores de rianodina (RyR) lo cual induce la liberación de más  $Ca^{2+}$ . Este primer transitorio de  $Ca^{2+}$  llega hasta la mitocondria, que en respuesta produce ATP que activa a los motores de cinesina. En (C) las vesículas son transportadas hacia la membrana plasmática. Conforme las vesículas llegan a la membrana y se fusionan, la corteza de actina (ac) se abre y la liberación de 5-HT activa los receptores  $5HT_2$  ( $5HT_2R$ ) iniciando una liberación en cascada. Como consecuencia se activa fosfolipasa C (PLC) que induce la producción de  $IP_3$ . Este actúa en sus receptores ( $IP_3R$ ) lo cual produce liberación de  $Ca^{2+}$  que produce mas fusión vesicular (D). Cuando la liberación acaba y la última vesícula es fusionada, la endocitosis produce cuerpos multivesiculares (MVB) que son transportados de vuelta al interior del soma (E). Los niveles de calcio regresan a sus niveles basales y el sistema regresa al reposo (A). Imagen tomada y modificada de [9].

La concentración de serotonina dentro de las vesículas es de 270 mM, formando un gel, que en el volumen vesicular corresponde a aproximadamente 90,000 moléculas [4]. Cada cúmulo de vesículas se mueve distancias de 0.6-6.0  $\mu\text{m}$  con una velocidad de 15-90 nm/s. Antes de llegar a la membrana son recibidas por la corteza de actina que es una malla donde los motores de miosina se acoplan a la actina para impulsar a las vesículas a la membrana y liberar su contenido [18, 19].

Este tipo de liberación es importante en la modulación del sistema nervioso. La evidencia experimental sugiere que el mecanismo anteriormente mencionado opera en sistemas serotoninérgicos en neuronas de mamíferos [11, 20]. La serotonina liberada puede ser capturada por transportadores en las células gliales que rodean las neuronas para ser distribuida en el sistema nervioso.

### 1.3. ¿Cómo estudiar la liberación somática de serotonina?

Para estudiar el mecanismo de liberación somática de serotonina existen distintas técnicas, entre las más usadas son: las amperométricas [4, 10], las micrografías electrónicas [7, 21] y las de microscopia óptica [11, 22], siendo estas últimas las menos invasivas y permitiendo estudiar los mecanismos biológicos en muestras vivas con una resolución limitada por las propiedades de la luz y las componentes ópticas. La molécula de serotonina tiene la propiedad de fluorescer naturalmente en el rango visible del espectro electromagnético cuando es excitada con luz ultravioleta (UV) [23, 24], esta propiedad es de gran utilidad ya que evita el uso de colorantes en la muestra. Lamentablemente el estudio de la serotonina en neuronas usando esta propiedad se ha visto limitado por la toxicidad de la luz UV que excita a la serotonina de manera natural.

Para el estudio de la liberación somática de serotonina en nuestro nanoscopio, usamos dos efectos ópticos complementarios no lineales producidos al irradiar una muestra con un campo electromagnético muy intenso: la fluorescencia ante la absorción multifotónica y la generación de los segundos armónicos. La absorción multifotónica consiste en irradiar a una neurona que contiene serotonina con longitudes de onda de baja energía en el rango del infrarrojo cercano (IR). Al interactuar con la muestra los fotones suman sus energías individuales para producir una excitación equivalente a la de un fotón de alta energía, por ejemplo (UV) [25]. Por otro lado, estructuras como los microtubulos y la corteza de actina pueden doblar la frecuencia del láser de excitación y por lo tanto emitir luz con la mitad de la longitud de onda y el doble de la energía (segundo armónico) [26]. Estas dos señales nos dan información complementaria que, por un lado, nos permite visualizar a la serotonina en los cúmulos de vesículas, y por otro permite ver a los rieles mediante los cuales los cúmulos son llevados hacia la membrana.

A continuación se describen los principios físicos de la absorción multifotónica y los segundos armónicos, así como también las propiedades ópticas y químicas de la molécula de serotonina.

### 1.3.1. Microscopia multifotónica

Desde su invención en 1957 [27], el microscopio confocal fue la técnica de microscopia usada por excelencia para obtener volúmenes en 3 dimensiones a partir de cortes en planos focales [28], tuvieron que pasar más de tres décadas para que apareciera una nueva alternativa llamada (primero) microscopia de dos fotones implementada por Denk y Webb en 1989 [29]. Su principal característica radica en que su fluorescencia es producida a partir de una excitación no lineal. Como consecuencia el volumen de excitación está regido completamente por la fuente de iluminación. En contraste, en el microscopio confocal el volumen depende tanto de la fuente de iluminación como de las componentes ópticas usadas para la detección [30]. Otra consecuencia de la dependencia no lineal de la excitación es la necesidad de un láser pulsado para iluminar la muestra. A pesar de ello, las componentes mecánicas y de formación de imágenes de ambos tipos de microscopios son esencialmente las mismas. Debido a ello los primeros microscopios de dos fotones fueron construidos modificando microscopios confocales [31-33]. Incluso su implementación es más simple ya que no necesita de un *pinhole*.

La teoría de la excitación con dos fotones fue descrita por Maria Göppert-Mayer en 1931. Una molécula que absorbe simultáneamente dos fotones de baja energía puede emitir un fotón de alta energía. Sin embargo, debido a que la probabilidad de transición de este proceso no lineal es muy pequeña para ser producida por fuentes de iluminación incoherentes, solo pudo ser comprobada experimentalmente hasta 1961 en cristales [34] con la invención del láser. El principio de dos fotones se puede extender a la absorción de tres o más fotones [22, 35-38], o incluso a procesos más complejos donde una absorción de  $n$  fotones se deriva de un estado intermedio producido por una absorción previa de  $m$  fotones [39]. Por eso en este trabajo preferimos el uso del término *microscopia multifotónica*, más adecuado y cada vez más usado actualmente [40-43].

Los procesos ópticos no lineales están descritos por la ecuación de polarizabilidad  $P$ , inducida por campos eléctricos muy intensos [44, 45] y que se expresa de la siguiente forma:

$$P(t) = \epsilon_0[\chi^{(1)}E(t) + \chi^{(2)}E^2(t) + \chi^{(3)}E^3(t) + \dots] \quad (1.1)$$

Donde  $E$  es el campo eléctrico,  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío y  $\chi^{(n)}$  es la susceptibilidad eléctrica de orden  $n$ . Para medios centrosimétricos los términos de orden par de  $\chi^{(n)}$  desaparecen. Así el menor término no lineal para este tipo de medios es  $\chi^{(3)}$ , que describe procesos como la absorción de dos fotones y la generación del tercer armónico,  $\chi^{(5)}$  describe el proceso de absorción de tres fotones, etc. Para medios no centrosimétricos  $\chi^{(2)}$  describe la generación de segundo armónicos y la suma de frecuencias por mencionar algunos [37].

En la Figura 1.4 se muestra el diagrama de *Jablonski* para la absorción multifotónica de la molécula de serotonina. Esta molécula naturalmente puede absorber un fotón con una longitud de onda de 275 nm (UV) y emitir fluorescencia centrada en 340 nm (violeta). Esta misma fluorescencia es producida cuando tres fotones (830 nm), cada uno con  $1/3$  de la energía necesaria para la excitación monofotónica, interaccionan simultáneamente en el espacio y tiempo con la molécula.

Una característica importante de la excitación multifotónica es que se escala exponencialmente con la fuente de iluminación:

$$W_f = \sigma_{nf} I_i^n \quad (1.2)$$

Donde  $I_i$  es la intensidad de la iluminación incidente en la molécula,  $n$  es el número de fotones absorbidos y  $\sigma_{nf}$  es la sección transversal (*action cross-section*, correspondiente al área efectiva de la muestra vista por el

haz de excitación) [30, 46]. Debido a la naturaleza ineficiente de los procesos multifotónicos, se requiere de una iluminación intensa para compensar las secciones transversal pequeñas. La consecuencia de esto es un ventaja, ya que la excitación multifotónica esta intrínsecamente confinada a volúmenes muy pequeños donde la intensidad de iluminación es muy alta, como cuando el láser es enfocado en la muestra. Desafortunadamente los láseres convencionales no generan las intensidades necesarias para que el efecto se lleve a cabo. Por ello el uso de láseres pulsados es necesario.

La excitación multifotónica es particularmente útil para capturar imágenes en medios turbios como lo son las muestras biológicas. Cuando el láser es enfocado en la muestra en microscopios convencionales monofotónicos, parte del haz es dispersado y se produce fluorescencia fuera del plano focal de interés. En la microscopia confocal, mucha de esa fluorescencia fuera de foco es rechazada por el *pinhole*, en el caso de la excitación multifotónica la probabilidad de que la luz dispersada genere fluorescencia es prácticamente nula, produciendo imágenes de un solo plano focal. Otra ventaja es que la excitación es típicamente producida por láseres en el rango del IR, que son particularmente benéficos ya que causan menos daño en la muestra, debido a que luz IR es menos absorbida y dispersada que la luz UV [47], además la separación en longitud de onda entre la luz de excitación y la detectada simplifica considerablemente el uso de componentes ópticas [30].

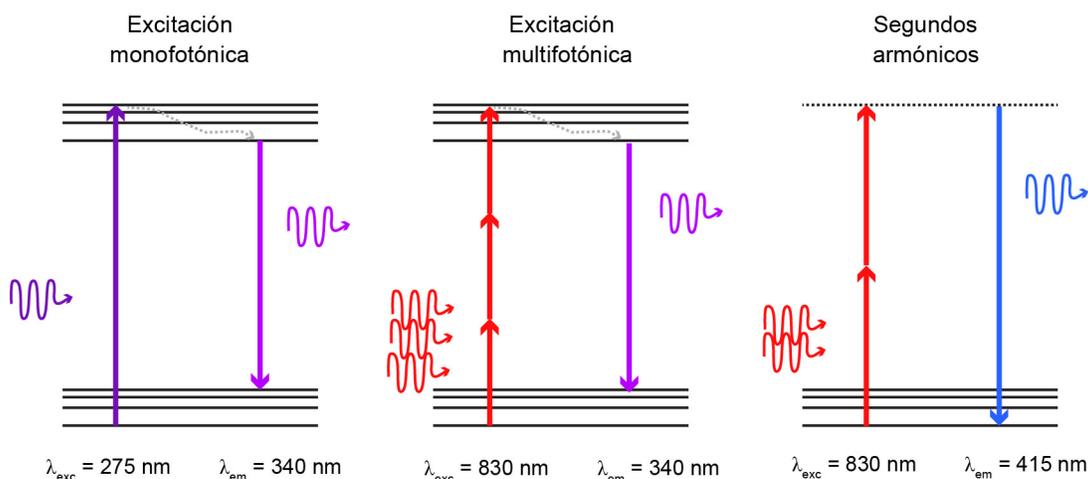


Figura 1.4: Diagramas de *Jablonski* para la absorción monofotónica (izquierda) y multifotónica (centro) de la molécula de serotonina. Tres fotones con una longitud de onda de 830 nm pueden sumarse para producir una excitación equivalente a la de un solo foton de 275 nm, la relación de energías es de 1 a 3 respectivamente. Los dos tipos de excitación producen fluorescencia centrada en 340 nm. Usando la misma longitud de onda (830 nm) estructuras no centrosimétricas pueden doblar la frecuencia del haz de excitación y emitir luz a la mitad de la longitud de onda (415 nm) o el doble de la frecuencia (derecha).

### 1.3.2. Generación de segundos armónicos

La generación de segundos armónicos (SHG por sus siglas en inglés) en biología ha sido útil para la caracterización de algunas estructuras como tendones, piel y cornea [48, 49]. En particular el colágeno ha sido extensamente analizado debido a que genera SHG eficientemente [50, 51]. Este efecto no lineal, al igual que la excitación multifotónica, necesita de una iluminación intensa producida por un láser pulsado. Como consecuencia su implementación en un microscopio multifotónico es directa [52]. En la Figura 1.4 a la derecha se muestra el diagrama de *Jablonski* de SHG, en nuestra aplicación pueden ser generados por la corteza de actina y los microtubulos usando la misma longitud de onda de excitación para producir la fluorescencia de la serotonina.

El proceso de emisión de SHG es un proceso coherente donde la energía se conserva (no involucra un estado de excitación) y depende de la inducción del momento dipolar en las moléculas que forman la muestra, estrictamente la emisión esta condicionada al empate de fase (*phase matching*) y esta descrita por la siguiente ecuación:

$$\vec{\Delta k} = \vec{k}_{2\omega} - 2\vec{k}_{\omega} = 0 \quad (1.3)$$

Donde  $\vec{k}_{2\omega}$  es el vector de onda de SHG y  $2\vec{k}_{\omega}$  es el vector de onda de la luz incidente, por lo tanto la conversión es máxima cuando  $\vec{\Delta k} = 0$ . En muestras biológicas, la señal de SHG es un proceso cuasi coherente donde la eficiencia de la conversión depende de la organización de las fibras. Fibras orientadas con la polarización de la luz incidente amplificarán la señal (Figura 1.5) [53, 54]. Esto es de gran utilidad ya que permite estudiar el nivel de anisotropía de la muestra, que en estructuras biológicas es un proceso dinámico. Debido a la naturaleza no lineal de SHG, su emisión se escala con el cuadrado de la intensidad de excitación, que es confinada a un volumen muy pequeño donde la probabilidad de emisión es alta, y por lo tanto tiene la capacidad de generar volúmenes en 3D.

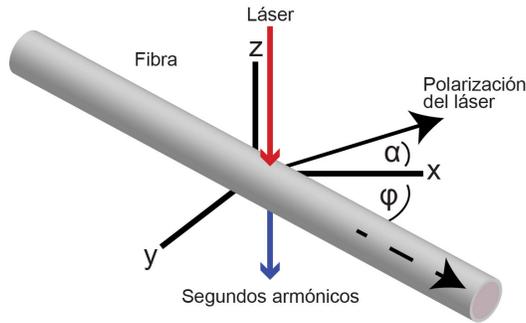


Figura 1.5: Generación de segundos armónicos (SHG) en fibras biológicas como el colágeno. La emisión de la señal depende de la orientación de las fibras que forman la muestra. Las fibras alineadas con la polarización de la luz incidente generarán SHG eficientemente, lo cual permite usar la polarización como herramienta para el estudio del nivel de anisotropía de la muestra. Imagen modificada de [53].

### 1.3.3. Fotoquímica de la serotonina

La serotonina tiene una estructura molecular relativamente simple, que consiste en un anillo indol con dos grupos funcionales: un grupo ácido HO en la posición 5 y una cadena flexible de etilamina en la posición 3 (Figura 1.6). Debido a su composición, la serotonina puede estar cargada positiva o negativamente. Moléculas como la serotonina con el anillo indol y el grupo HO, conocido como núcleo 5-hidroxi-indol, pueden absorber luz en el rango UV del espectro electromagnético y fluorescer en el rango de la luz visible [55-57].

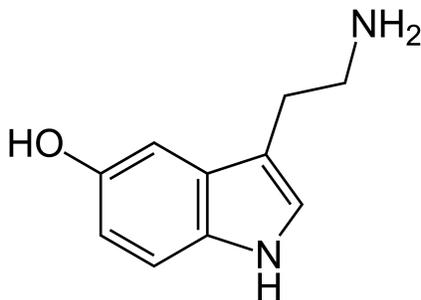


Figura 1.6: Estructura molecular de la serotonina. Compuesto por un anillo indol con un grupo ácido HO en la posición 5 y una cadena de etilamina en la posición 3.

En la Figura 1.7 se muestra el espectro de absorción de la molécula de serotonina obtenido por nosotros con un fluorímetro (*Cary Eclipse, Agilent*). La banda de absorción está en la región del UV, entre 200 y 320 nm, con picos de absorción en 220 nm, 275 nm y 295 nm, la emisión está centrada en 340 nm.

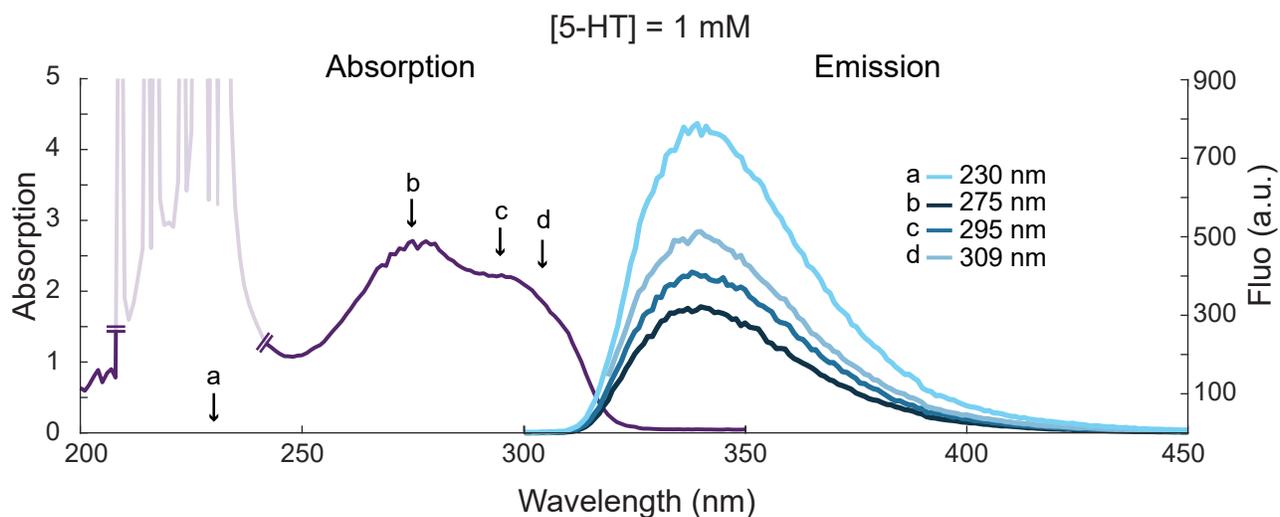


Figura 1.7: Espectro de absorción y emisión de la molécula de serotonina a una concentración de 1 mM. La curva violeta entre 200 nm y 320 nm es el espectro de absorción. Excitando con cualquier longitud de onda ( $\lambda_{exc}$ ) dentro de ese rango (a, b, c, o d) se produce una emisión en 340 nm con amplitudes que varían dependiendo de  $\lambda_{exc}$ . Las barras dobles indican donde el instrumento de medición se saturó.

La fluorescencia de la serotonina puede ser producida mediante excitación mono- [23] y multifotónica [11]. La excitación multifotónica ha permitido su estudio en muestras biológicas usando longitudes de onda de baja energía (en el rango del infrarrojo). Por ejemplo, fluorescencia de 5-HT en núcleos de rafe en rata ha sido detectada excitando con luz de 740 nm mediante la absorción de tres fotones [22]. La emisión depende de la concentración de la serotonina, de la longitud de onda con la que se excita, de la intensidad del láser y del pH. Estudios con pHs fisiológicos [58] y ácidos [56] han mostrado que en el rango de 5-8 los espectros de absorción y emisión no cambian.

Tres emisiones multifotónicas han sido reportadas para la serotonina, la más conocida en violeta (340 nm, equivalente a la monofotónica) producto de la absorción de tres fotones [11, 38], otra en verde ( $\sim 500$  nm) como consecuencia de una absorción de 6 fotones [12, 39] y una más en azul ( $\sim 400$  nm) [59]. Esta última ha sido reportada como un corrimiento al rojo de la fluorescencia violeta cuando la concentración de 5-HT es muy alta. El estudio de la dependencia en concentración de 5-HT de estas fluorescencias es de suma importancia debido a que la serotonina se encuentra en altas concentraciones dentro de las vesículas (270 mM) y al ser liberada y diluida al espacio extracelular su concentración disminuye.

## 1.4. Planteamiento del problema

Para estudiar el mecanismo de liberación somática de serotonina y sus efectos en el sistema nervioso se construyó primero un microscopio óptico con la capacidad de excitar y capturar la fluorescencia multifotónica de 5-HT en un rango amplio de concentraciones, así como también detectar las componentes en polarización de los segundos armónicos producidos por los microtubulos y la corteza de actina cuando los cúmulos de vesículas son movilizados hacia la membrana.

En nuestro microscopio las imágenes se forman mediante el barrido de un láser pulsado. Para el estudio de la anisotropía del citoesqueleto se usa un cubo polarizador que separa las dos componentes en polarización de los segundos armónicos para ser detectadas independientemente. Debido a su coherencia y al requerimiento de *phase matching*, los SHG capturados en reflexión contienen información distinta de los capturados en transmisión. Sin embargo tejido biológico puede considerarse como muestra delgada donde los segundos armónicos son preferentemente generados con la misma dirección de propagación del haz de excitación [30]. Por lo tanto el microscopio fue diseñado para capturar la fluorescencia como luz reflejada y los SHG como luz transmitida. Durante el proceso de liberación se plantean tres escenarios:

1. **Neurona en reposo.** Los cúmulos de vesículas llenas de serotonina con una concentración de 270 mM se encuentran en el interior de la neurona, alejadas de la membrana plasmática. La serotonina fluoresce en respuesta a la iluminación multifotónica, los microtubulos y la corteza de actina generan segundos armónicos en la periferia.
2. **Neurona estimulada eléctricamente.** Los cúmulos de vesículas son transportados hacia la membrana donde las vesículas se fusionan y liberan su contenido al espacio extracelular. La serotonina fluoresce en respuesta a la iluminación multifotónica; los microtubulos sirven como rieles y la corteza de actina se abre para dejar pasar las vesículas y transportarlas. Por lo tanto los segundos armónicos varían en intensidad en sus dos componentes de polarización.
3. **Difusión extracelular.** La serotonina en el espacio extracelular es diluida y capturada por las células gliales para ser transportada a lugares distantes. Los patrones de fluorescencia indican la concentración y con ello la dinámica temporal.

Se habilitaron dos canales para la captura de la fluorescencia, uno para la fluorescencia violeta o azul y otro para la verde. En total el microscopio tiene la capacidad de capturar cuatro imágenes por segundo en cuatro canales simultánea e independientemente. La configuración del microscopio es vertical, para posteriormente hacer experimentos directamente en cerebro de ratones.

En esta trabajo además hicimos un estudio sistemático de las fluorescencias multifotónicas de serotonina a diferentes concentraciones en condiciones fisiológicas ( $\text{pH} = 7.4$ ) con un láser pulsado usando longitudes de onda de 690 - 760 nm, la potencia fue acotada a 60 mW que es la máxima potencia soportada por nuestras muestras biológicas antes de ser dañadas. Nuestro estudio permitió por un lado entender los procesos fotoquímicos de fluorescencia de la serotonina, y por otro su posible detección dentro y fuera de una neurona a diferentes concentraciones.

### 1.4.1. De microscopia a nanoscopia

El microscopio tiene un poder de resolución restringido por el límite de difracción de Abbe, donde la capacidad para diferenciar dos puntos cercanos depende de la longitud de onda de iluminación y de las condiciones ópticas. En nuestro caso, una de las desventajas de la microscopia multifotónica es que al usar longitudes de onda en el infrarrojo el tamaño de la mancha focal aumenta y reduce la resolución. Concretamente iluminando la muestra con una longitud de onda de 800 nm y usando un objetivo de microscopio con una apertura numérica de 1, solo podemos diferenciar estructuras separadas por aproximadamente 400 nm. Esto es inapropiado para ver una vesícula de 100 nm. El resolver el movimiento de vesículas individuales durante la liberación se antoja imposible, y lo es aún más la visualización de la captura y transporte de las moléculas de serotonina a través de las capas de las células gliales, separadas aproximadamente por 100 nm en el espacio extracelular.

En las últimas dos décadas han surgido diversas técnicas para sobrepasar el límite de Abbe en microscopio ópticos. Las más importantes son: STORM [60], PALM [61], SIM [62] y STED [63]. Siendo esta última la opción para ser usada en microscopios como el nuestro, ya que sin mayores modificaciones se puede implementar en un microscopio multifotónico.

El principio básico de la microscopia STED implica inhibir la fluorescencia de moléculas en lugares específicos de la muestra mediante el proceso de emisión estimulada. Para ello dos haces colineales llegan a la muestra separados por un tiempo  $\tau$ . El primero con un perfil gaussiano y el segundo con forma de dona. El primer haz, conocido como de excitación, excita a las moléculas como en un microscopio de fluorescencia convencional; un tiempo  $\tau$  después el segundo haz con forma de dona llega a la muestra e inhibe la fluorescencia en los bordes de la muestra excitada. Así la fluorescencia proviene del centro de la dona alcanzando resoluciones menores a los 50 nm [64]. Esta inhibición se logra, mediante emisión estimulada, forzando el decaimiento de los electrones excitados a un estado que emite un fotón ajeno a la fluorescencia. El tiempo  $\tau$  es el tiempo que le toma a los electrones relajarse vibracionalmente en los estados excitados de la molécula antes de decaer naturalmente y emitir fluorescencia. Con esta técnica se han logrado imágenes de dendritas [65] y vesículas [66] con resoluciones por debajo de los 100 nm.

Para aplicarlo a nuestro trabajo, nuestros resultados indican que la fluorescencia multifotónica de 5-HT en verde es producida como consecuencia de los estados excitados de la fluorescencia en violeta. Por lo tanto, excitando la serotonina con el haz normal para producir la fluorescencia violeta y forzando la transición a verde con el haz dona, detectando solo la fluorescencia proveniente del centro de la dona teóricamente podemos romper el límite de difracción y resolver vesículas individuales en nuestro modelo de estudio. Esta técnica se plantea con detalle más adelante.

## Capítulo 2

# Desarrollo

El microscopio vertical multifotónico se empezó a construir como parte de mi proyecto de maestría [67], donde se presentó un equipo con la capacidad de capturar 4 imágenes por segundo en dos canales simultáneamente formadas por 512X512 píxeles y cortes en planos focales de 1  $\mu\text{m}$ . Para la adquisición y procesamiento de imágenes se presentó la primera versión del programa de control y captura. También se construyó el soporte principal para el microscopio, el cual tiene buena estabilidad mecánica, una simulación hecha en *Solidworks* mostró que sus frecuencias de resonancia distaban mucho de las frecuencias naturales de oscilación de los edificios, los pasos de persona o vibraciones de aparatos electrónicos. En la practica esto se refleja con imágenes sin distorsiones y la capacidad de hacer experimentos por tiempos largos sin que la muestra se mueva o vibre.

Como trabajo a futuro se propusieron una serie de modificaciones al microscopio que mejorarían cada una de sus componentes electrónicas, ópticas y de programación. Esto permitiría expandir su funcionalidad. En esta tesis doctoral se muestran esas mejoras. Además el hecho de tener acceso a cada parte del microscopio permitió implementar nuevas técnicas de microscopia y expandir las mediciones en muestras biológicas. También se propone adaptar una técnica de superresolución para resolver estructuras mas pequeñas que las que resuelve el límite de difracción descrito por Abbe.

La Figura 2.1 muestra el diagrama del microscopio. El haz del láser pulsado es llevado a los objetivos (10x, 40x o 60x) mediante un par de espejos galvanométricos. Antes de ingresar al objetivo, el haz es acondicionado usando un par de lentes en arreglo telescópico que se conocen como lente de barrido y lente de tubo. La muestra es excitada y se capturan simultáneamente la fluorescencia multifotónica de la serotonina (violeta y verde) como luz reflejada y los segundos armónicos como luz transmitida. Para evitar cualquier cambio mecánico en el camino óptico del microscopio durante la experimentación, se usaron espejos diecricos para la separación del haz de excitación de las señales de fluorescencia y SHG (en el apéndice A se listan las componentes ópticas del microscopio).

Las emisiones fluorescentes son separadas usando un espejo diecrico y capturadas en canales independientes. Los segundos armónicos son capturados con un condensador de alta apertura numérica y llevados a un cubo polarizador, la polarización de los segundos armónicos contiene información sobre la orientación de las fibras de los microtúbulos y de la corteza de actina. Cada componente de polarización de los segundos armónicos es capturado en canales diferentes usando fotomultiplicadores de alta sensibilidad. Cada canal tiene su respectivo filtro de emisión y un filtro líquido de sulfato de cobre que elimina cualquier señal IR proveniente del láser. Debido a la capacidad de nuestro equipo para modificarse, pudimos acoplar un monocromador (*SpectraPro-500*, *Action*

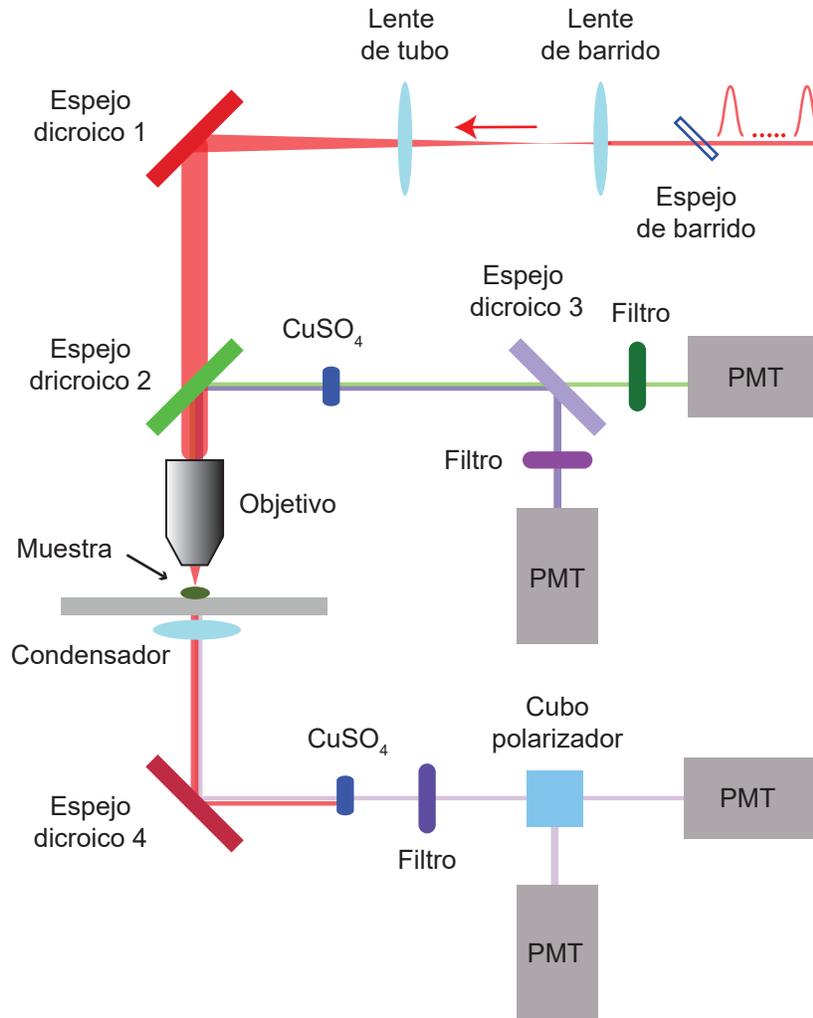


Figura 2.1: Diagrama del microscopio vertical. El láser es acondicionado para llenar la apertura de entrada del objetivo. El patrón de barrido es producido por un par de espejos galvanométricos. El microscopio captura simultáneamente las dos fluorescencias multifotónicas de la serotonina como luz reflejada (líneas verde y azul) y la generación de segundos armónicos como luz transmitida (línea lila). Las señales son separadas usando espejos dicroicos y además cada canal tiene su filtro de emisión, mas un filtro líquido de sulfato de cobre saturado que elimina remanentes del láser. Un cubo polarizador separa las componentes de polarización de los segundos armónicos.

*Research Corporation*) que nos permitió estudiar las componentes espectrales de la molécula de serotonina.

El control de las componentes electromecánicas del microscopio, así como la captura, procesamiento y despliegue de imágenes se hicieron con tarjetas de adquisición de *National Instruments* programadas con el lenguaje de programación *LabView*. A continuación se describen cada uno de los módulos por los que esta formado el microscopio.

## 2.1. Excitación multifotónica

La fuente de excitación es un láser pulsado (*Chameleon Ultra II, Coherent*) que emite pulsos de 140 fs a una frecuencia de 80 MHz. Se puede sintonizar longitudes de onda desde 680 nm hasta 1080 nm, a una potencia promedio máxima de 4 Watts (Figura 2.2). Para acoplar el láser a la muestra se diseñaron un control de potencia y el sistema de barrido.

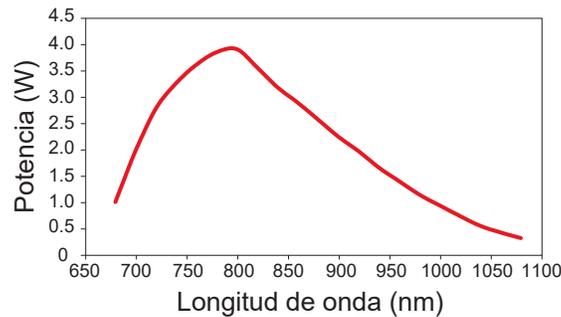


Figura 2.2: Curva de emisión del láser pulsado *Chameleon Ultra II*. Sintonizable de 680 a 1080 nm, 140 fs de duración de pulso a 80 MHz y una potencia promedio máxima de 4W.

Para controlar la potencia del láser existen varias alternativas. Dos son las más comunes y parten del mismo principio: cambiar la orientación de polarización de la fuente de luz y posteriormente hacerla pasar por otro polarizador cuyo eje de polarización es fijo. Así la luz transmitida es proporcional al ángulo entre la polarización de la luz incidente y el polarizador, como es descrito por la ley de Malus [68]. La diferencia entre los métodos radica en la forma en que se rota la polarización de la luz incidente. La primera es usar un retardador de media onda, donde un cristal birrefringente introduce una diferencia de fase entre las ondas *e* y *o*, y al recombinarse la luz emerge del retardador a un ángulo  $\theta$  [68]. La otra alternativa es usar una celda de Pockels, donde la luz es rotada bajo el mismo principio (cambio de índice de refracción), pero el efecto se logra al aplicar un campo eléctrico a un cristal carente de centro de simetría [44]. La ventaja de esta segunda alternativa es la velocidad del cambio de polarización, aunque el precio se incrementa considerablemente. Nosotros utilizamos la primera opción para el control de potencia del microscopio por cuestiones de precio, pero sobre todo por que cumplía con los requerimientos de nuestro equipo. El segundo módulo es el sistema de barrido, el cual fue diseñado *ad hoc*, trabajamos con óptica corregida a infinito y el barrido se hizo con espejos galvanométricos de baja inercia.

### 2.1.1. Control de potencia del láser

El principio de funcionamiento del control de potencia del láser es rotar el retardador de media onda hasta encontrar el ángulo en el cual la potencia deseada emerge del polarizador fijo. Para que esta potencia se mantenga a pesar de variaciones de temperatura o de potencia de salida del láser se necesita un sistema de retroalimentación que continuamente mida la potencia de salida y corrija el ángulo del retardador de onda. El diagrama del controlador de potencia se muestra en la Figura 2.3, donde el retardador de media onda (*10RP52-4, Coherent*) esta montado en una platina rotatoria motorizada (*PR50CC, Coherent*) controlada por el driver *SMC100CC (Coherent)*. El polarizador fijo es un polarizador de calcita Glan-Laser (*10GL08AR.16, Coherent*) que solo deja pasar luz orientada con su eje de polarización (paralelo a la mesa de trabajo) y el resto es desviada hacia un *beam dump* que disipa la potencia no deseada como calor. Para el sistema de retroalimentación se usó un muestreador de haz (BS, beam sampler *10B20-01NC.2 Coherent*) que refleja una porción del haz hacia un fotodiodo de silicio (*FDS100, Thorlabs*) calibrado para todas las longitudes de onda de nuestro láser. Parte fundamental de la calibración e implementación del controlador fue hecho por el estudiante de servicio social Héctor Leal.

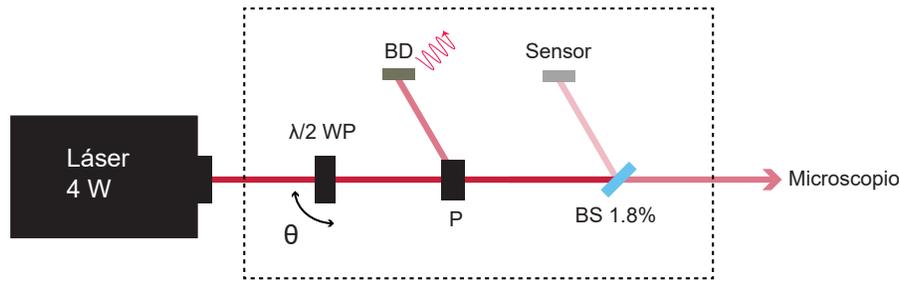


Figura 2.3: Diagrama del controlador de potencia. Un retardador de media onda rota la polarización del láser (WP) y solo pasa luz orientada con el eje de polarización del polarizador Glan-Laser (P). La potencia de salida es regulada mediante un sistema de retroalimentación PID usando un fotodiodo de silicio (Sensor) que mide una parte de la potencia de salida usando un muestreador de haz (BS). La potencia no usada es arrojada hacia un tubo de cobre (BD) que la disipa como calor.

El algoritmo de control usado fue un PID (Proportional, Integral and Derivative controller), cuyo comportamiento esta descrito por la siguiente ecuación:

$$u(t) = K_p e(t) + K_i \int_0^{\infty} e(t) dt + K_d \frac{de(t)}{dt} \quad (2.1)$$

Donde  $u(t)$  es el cambio de ángulo en el retardador de onda, esencialmente este controlador compara la salida del sistema (potencia que es función de  $\theta$ ) con un valor deseado de potencia (*set point*), calcula un error y corrige el ángulo del retardador, de tal forma que el error  $e(t)$  converja a cero lo más rápido posible. Cambiando cada ganancia ( $K_p, K_i, K_d$ ), se determina qué tan sensible es la respuesta del controlador. Una parte importante para el correcto funcionamiento del PID es el modelado de la planta, entendida como el sistema trabajando en lazo abierto (sin retroalimentación). En nuestro caso es el valor de potencia que le corresponde a cada ángulo del retardador de onda (de 0 a 45 grados) a una longitud de onda dada. La función de la planta es proveer del primer valor de ángulo cuando se requiera una potencia y a partir del cual el controlador empezará a corregir hasta que el error sea cero. El tiempo de respuesta del controlador PID depende en buena manera de la precisión con la que se mida la planta. La planta medida para nuestro sistema se muestra en la Figura 2.4.

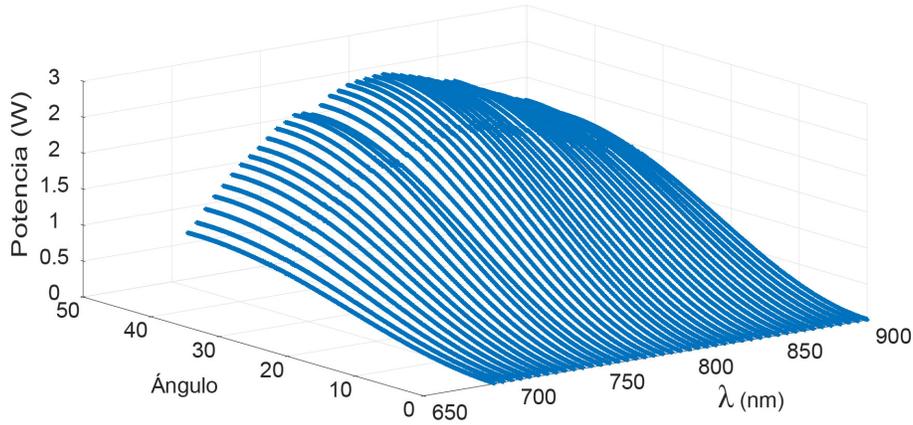


Figura 2.4: Planta para el controlador PID de potencia. El ángulo  $\theta$  del retardado varia de 0 a 45 grados, se muestra la potencia medida para cada longitud de onda del láser pulsado.

La curva en la Figura 2.4 se puede reproducir con la siguiente ecuación:

$$\theta = 34,3 - 0,08\lambda + 834P + 4,9 \times 10^{-5}\lambda^2 - 1,97\lambda P - 30,8P^2 + 1,17 \times 10^{-3}\lambda^2 P + 0,033\lambda P^2 + 1,17P^3 \quad (2.2)$$

Donde  $\theta$  es el ángulo del retardador de onda para una potencia  $P$  a una longitud de onda  $\lambda$ .

Un detalle más que se tomó en cuenta para al diseño del controlador fue medir la potencia entregada en la muestra. Para esto se hizo un mapeo entre la potencia a la salida del controlador y la potencia después de cada objetivo del microscopio usando un medidor comercial *S40C1* (*Thorlabs*). Se obtuvieron factores de atenuación que corresponden a la suma de las pérdidas de potencia debida a las componentes ópticas del camino óptico.

El incremento mínimo de potencia de nuestro controlador es de  $300 \mu W$  con un tiempo de respuesta de 50 ms. La potencia máxima se acotó a 60 mW (potencias mayores quemar la muestra). En la figura 2.5 el trazo azul es la potencia requerida y el trazo rojo la respuesta del controlador PID, el tiempo que le toma al controlador cambiar la salida de 0 a 60 mW es 7 segundos, tomando en cuenta el sobrepaso natural del algoritmo de regulación. Se le llama sobrepaso a potencias entregadas por el controlador mayores a la deseada, es un artefacto inherente al algoritmo de regulación. Entre menor sea la diferencia, el controlador puede llegar al valor deseado en menor tiempo. Es importante señalar que para incrementos de potencia menores a 10 mW el controlador no tiene sobrepaso (como se muestra en la parte final de la curva en la Figura 2.5). El controlador responde más rápido a costo de tener mas sobrepaso antes de llegar al valor deseado. El controlador fue sintonizado de tal forma que cumpliera con los requerimientos de nuestros experimentos.

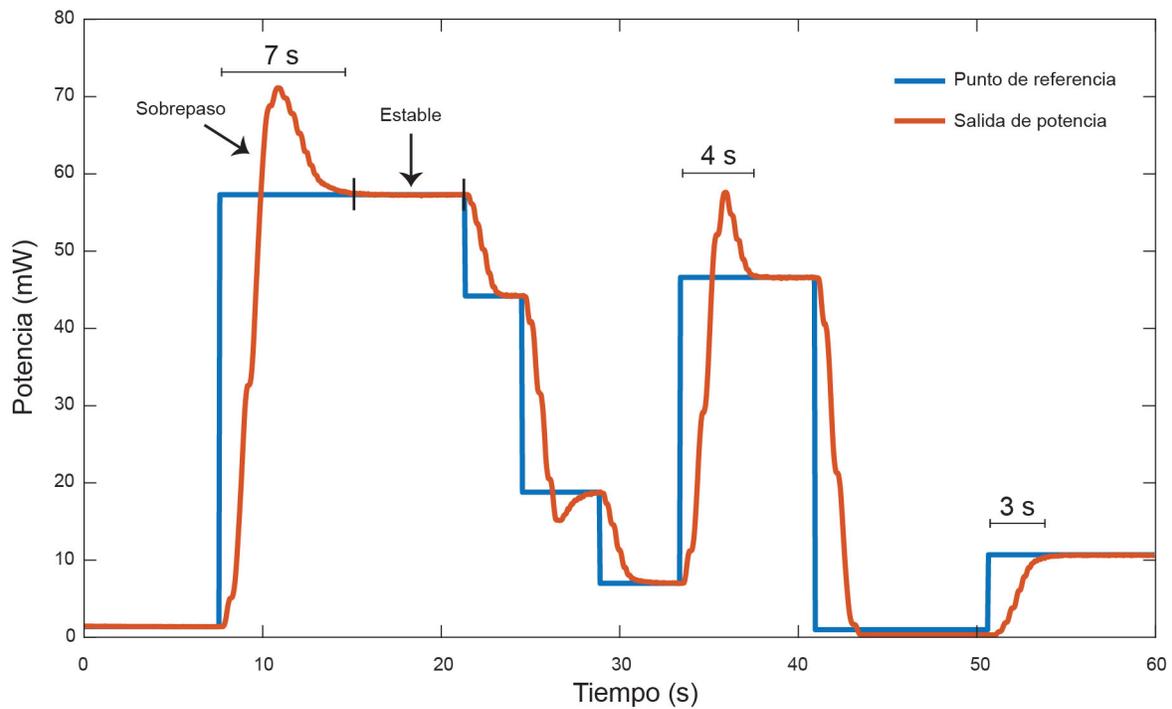


Figura 2.5: Potencia en la muestra regulada por nuestro controlador de lazo cerrado PID. La línea azul representa el valor deseado de potencia y la línea roja el valor entregado. En la gráfica se muestran tres diferentes cambios: de 1 a 60 mW, de 5 a 40 mW y de 1 a 10 mW. Los tiempos en los que el controlador es estable (cuando la diferencia entre el valor deseado y entregado es cero) fueron de 7, 4 y 3 segundos respectivamente. El incremento menor de potencia es de  $300 \mu W$  con un tiempo de respuesta de 50 ms. El sobrepaso es menor entre menor sea el incremento de potencia.

### 2.1.2. Sistema de barrido

Para realizar el barrido del láser en la muestra, en este tipo de microscopios se usan cuatro componentes: espejos de barrido, un par de lentes en arreglo telescópico (lente de barrido y lente de tubo) y un objetivo con corrección a infinito. El diagrama del sistema se muestra en la Figura 2.6.

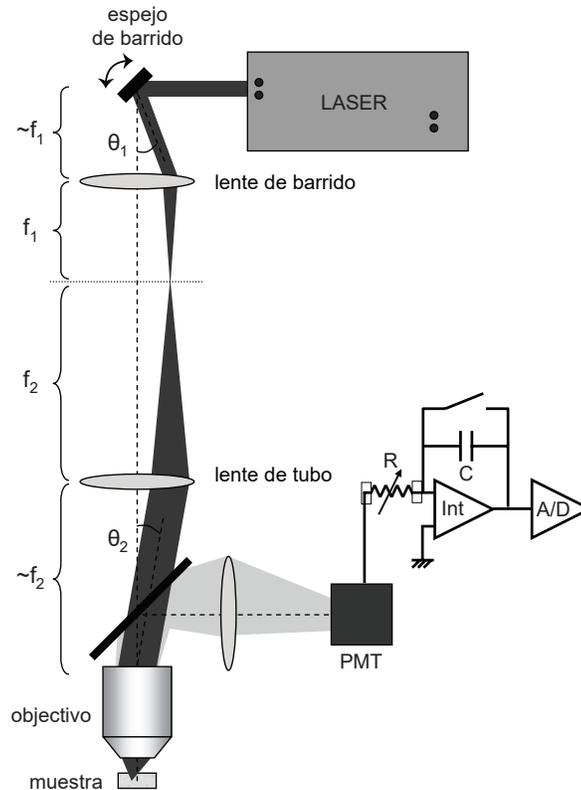


Figura 2.6: Diagrama del sistema de barrido. Los espejos de barrido rotan  $\pm\theta_1$  el haz del láser. La lente de barrido proyecta la imagen de los espejos en un plano focal intermedio que a su vez es tomada por la lente de tubo y proyectada en la entrada posterior del objetivo. La función de las lentes telescópicas es ensanchar el haz para llenar la apertura de entrada de los objetivos y transformar el movimiento de rotación del haz debido a los espejos en movimiento de translación en un plano 2D. El haz entra al objetivo con un ángulo de rotación  $\pm\theta_2$  que es proyectado en la muestra. La fluorescencia capturada por el objetivo como luz reflejada es llevada a un fotomultiplicador (PMT) donde es transformada a voltaje para posteriormente ser digitalizada. Imagen modificada de [69].

El sistema en conjunto funciona de la siguiente forma: dos espejos galvanométricos crean un barrido en 2D (uno se mueve en el eje X y otro en el eje Y); la lente de barrido proyecta una imagen real de los espejos (y por lo tanto del barrido) en su plano focal. Posteriormente la lente de tubo toma esa imagen y la proyecta en la apertura de entrada del objetivo que finalmente enfoca la luz en la muestra. Las funciones del arreglo telescópico son: colimar y ensanchar el haz de tal forma que sobre llene la apertura de entrada del objetivo para aprovechar toda su apertura numérica y transformar el movimiento de rotación de los espejos galvanométricos en translación en el plano focal del objetivo.

Para implementar el sistema de barrido es necesario calcular la distancia  $d_1$  (Figura 2.6) de separación entre los espejos galvanométricos y la lente de barrido manteniendo fija la distancia del arreglo telescópico. A partir de la ecuación de lente plana se puede llegar a la siguiente expresión:

$$d_1 = \frac{(f_1)^2}{f_2} + f_1 - d_3 \left(\frac{f_1}{f_2}\right)^2 \quad (2.3)$$

Esta ecuación resuelve la proyección del barrido en la entrada posterior del objetivo a partir de los focos de la lente de barrido ( $f_1$ ) y la lente de tubo ( $f_2$ ). Para la solución de esta ecuación se propone la distancia  $d_3$  entre la lente de tubo y el objetivo, la cual teóricamente puede extenderse sin mayor problema (de ahí la utilidad de los objetivos corregidos a infinito). Adicionalmente para cumplir el requerimiento de la apertura numérica se necesitó ensanchar  $\sim 4$  veces el haz ya que a la salida del láser tiene un diámetro de 3 mm. El ensanchamiento también es función de los focos de las lentes y esta dado por la relación  $M = \frac{f_2}{f_1}$ . Para nuestro sistema encontramos los siguientes valores:

$$\begin{aligned} d_1 &= 2,5mm \\ f_1 &= 50mm \\ f_2 &= 200mm \\ d_3 &= 250mm \\ M &= 4 \end{aligned}$$

Para el sistema de barrido usamos un par de espejos galvanométricos modelo *6210H* de *Cambridge Instruments*. Las lentes son dobles de 2 pulgadas de diámetro para evitar aberraciones. Los objetivos 10x, 40x y 60x son corregidos a infinito y pertenecen a la misma serie (*CFI - Chrome-Free Infinity, W - Water dipping, Nikon*). Debido a que conservan las mismas dimensiones mecánicas, nuestro sistema no debe recalcular las distancias del sistema de barrido cuando se cambia de objetivo. En la tabla siguiente se muestran las especificaciones de los objetivos.

Magnificación	NA	W.D. (mm)	Distancia focal (mm)
CFI Fluor 10x W	0.30	2.0	20.0
CFI Fluor 40x W	0.80	2.0	5
CFI Fluor 60x W	1.0	2.0	3.3

El movimiento de los espejos galvanométricos que genera el patrón de barrido en la muestra es controlado mediante una señal de voltaje. Cero Volts corresponden a los espejos sin rotación y  $\pm 15$  Volts corresponden a  $\pm 20$  grados de rotación. El voltaje para los dos ejes fue generado con la tarjeta de adquisición *PCI-6110* (*National Instruments*) con una resolución de 16 bits. La frecuencia de la señal de voltaje para el eje X fue  $F_1 = 1024$  Hz o 2048 líneas por segundo y para el eje Y  $F_2 = 2$  Hz. La frecuencia del eje Y corresponde al barrido de 4 imágenes por segundo, cada medio ciclo es una imagen con 512 líneas. En la figura 2.7 se muestra el patrón de barrido en forma de señal triangular que usamos, el ángulo de rotación para cada espejo fue de  $\pm 0,75$  grados (1 Volt de amplitud de la señal). Se escogió este patrón de barrido por ser el más eficiente, el viaje de regreso del espejo también se aprovecha para adquirir píxeles en la muestra. Por el contrario con el patrón de barrido diente de sierra (uno de los más usados) el viaje de regreso de la rotación del espejo no es aprovechado. Cabe señalar es muy importante que las dos señales inicien al mismo tiempo para la correcta formación de la imagen.

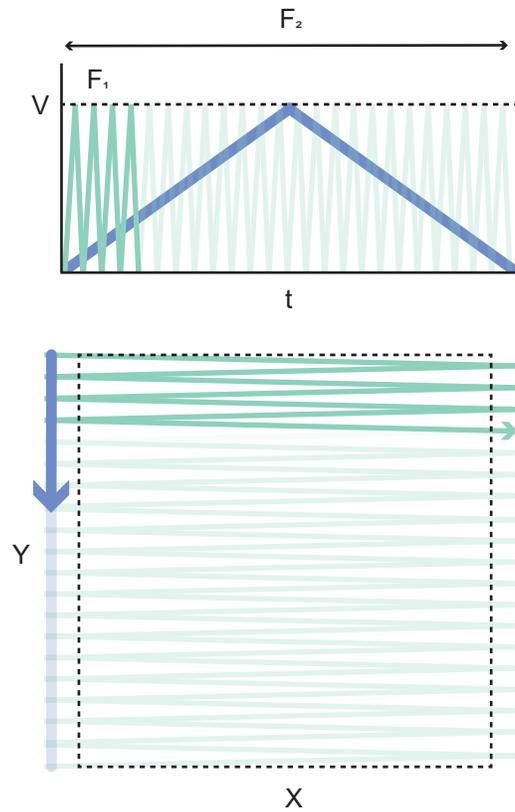


Figura 2.7: Patrón de barrido generado con los espejos galvanométricos, el arreglo telescópico y el objetivo. El patrón en voltaje es una señal triangular para los dos ejes, donde el movimiento de ida y regreso del eje X corresponde a dos líneas de la imagen; cada medio ciclo del eje Y es una imagen. En la parte de arriba se muestra la señal de control en voltaje y en la parte de abajo su correspondencia en la formación de la imagen, la línea punteada corresponde al área de la imagen.

## 2.2. Detección de las emisiones

La captura de la luz, tanto fluorescente como de segundos armónicos, se hace con fotomultiplicadores (PMT) de *Hamamatsu*. Para cada posición del láser en la muestra cuatro señales son adquiridas simultáneamente usando la misma tarjeta de *National Instruments (PCI-6110)*. La tasa de captura de 4 imágenes por segundo (512 X 512 píxeles) implica que cada píxel es procesado con un tiempo de 954 ns, la profundidad del píxel es de 12 bits.

Las señales de los galvanómetros y la captura de las emisiones con los detectores son sincronizados desde el *software* de adquisición usando pulsos digitales. Los corrimientos de píxeles entre líneas de las imágenes, producto de pequeños retardos acumulados durante la generación y captura de las señales, son corregidos digitalmente por nuestro programa de captura.

Para la adquisición de fluorescencia se usan dos fotomultiplicadores *R928HA*; para los segundos armónicos se usan otro par de fotomultiplicadores de mayor sensibilidad *H7422-40*. Las monturas de los fotomultiplicadores se muestran en la Figura 2.8. Cada fotomultiplicador tiene una lente colectora con una distancia focal de 60 mm y un filtro líquido de sulfato de cobre diluido en agua a una concentración saturada. El sulfato de cobre filtra longitudes de onda mayores a 600 nm.

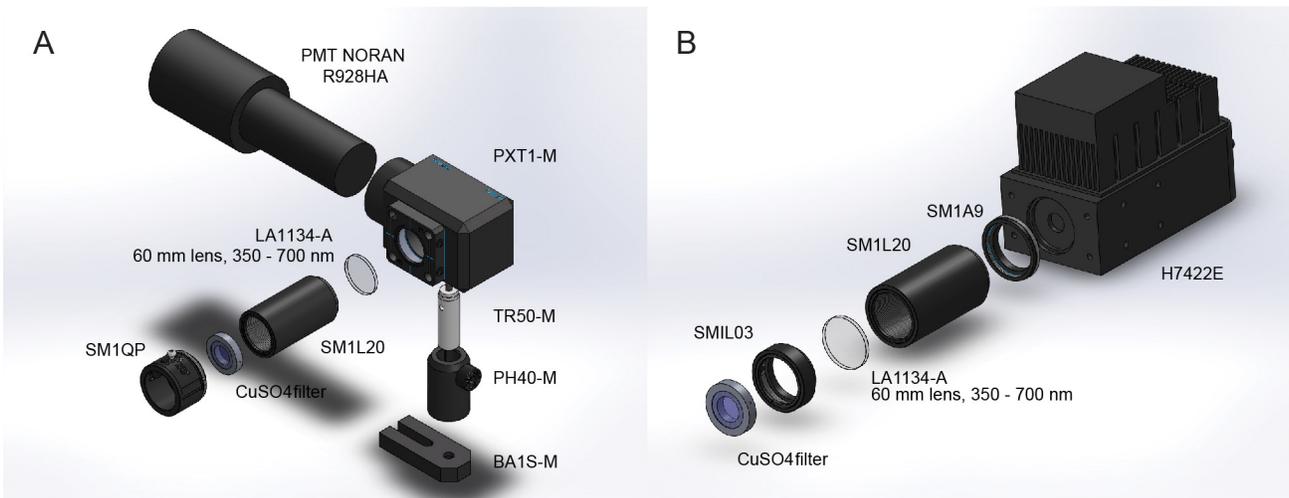


Figura 2.8: Monturas mecánicas para los fotomultiplicadores. (A) Montura de los PMTs para la captura de la fluorescencia multifotónica. (B) Monturas para los segundos armónicos. Cada montura contiene un filtro de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) y una lente colectora de 60 mm *LA1134-A*. Las lente y el el filtro son centrados y posicionados con el tubo *SM1L20*. Las monturas *SM1QP* y *SM1L03* se usan para colocar filtros de emisión. Todas la monturas y componentes ópticas tiene un diámetro de 1 pulgada.

### 2.2.1. Conversión de corriente a voltaje

La señal de salida de los fotomultiplicadores es una corriente eléctrica muy pequeña, del orden de los micro amperios, proporcional a la luz detectada. Esta debe ser transformada en voltaje para ser procesada por la tarjeta de adquisición. Este módulo no es parte del fotomultiplicador y se vende por separado o se construye ex profeso. La buena relación señal ruido y tiempo adecuado de respuesta del detector dependen del buen diseño del circuito encargado de la conversión. Así aunque el tiempo de respuesta del fotomultiplicador este en el orden de las decenas de nanosegundos, un mal diseño del circuito puede generar señales lentas y una mala relación señal ruido.

Para la transducción de corriente a voltaje primero usamos un preamplificador comercial *SR445A* (*Stanford Research Systems*) que tiene 4 amplificadores en cascada con un ancho de banda de 350 MHz. A pesar de sus características, este amplificador comercial no tuvo la respuesta necesaria para nuestras aplicación, ya que al trabajar en cascada el ancho de banda decreció bastante y solo pudo procesar señales con tiempos de respuesta en el orden de centenas de microsegundos. La alternativa fue construir nuestro propio circuito de conversión.

Para ello el circuito mas confiable es llamado de transimpedancia (Figura 2.9), formado por un amplificador operacional con una resistencia en retroalimentación encargada de convertir la corriente en voltaje. Esta resistencia debe tener un valor muy bajo para mantener el tiempo de respuesta lo más corto posible. La señal de voltaje que se genera es muy pequeña para poder ser procesada por las tarjetas de adquisición, así que la amplificamos 1600 veces usando 3 amplificadores en cascada diseñados con un arreglo inversor. En el apéndice B se muestra el diagrama del circuito eléctrico diseñado.

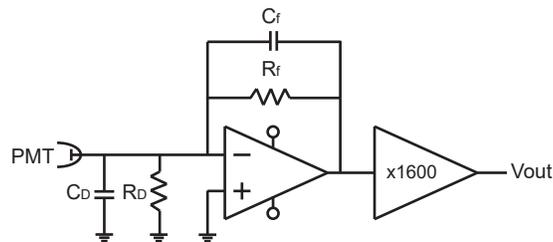


Figura 2.9: Diagrama del circuito de transimpedancia. Circuito de conversión de corriente a voltaje, la conversión se lleva a cabo en la resistencia  $R_f$ . El voltaje (en el orden de los micro volts) es amplificado 1600 veces para ser leído por la tarjeta de adquisición.

Para medir la constante de tiempo del circuito construido usamos un LED modulado con una señal cuadrada en el orden de los kHz como entrada al PMT. Se usó una intensidad baja en el LED y poca ganancia en el fotomultiplicador para evitar dañar el sensor. La Figura 2.10 muestra la respuesta de la etapa de conversión de corriente a voltaje con el circuito de transimpedancia (señal anaranjada) y dos etapas de amplificación (en verde y rojo). La primera etapa de conversión es muy rápida con una constante de tiempo de alrededor de 500 ns, posteriormente debido a las amplificaciones en cascada la señal conserva su constante de tiempo pero presenta un retardo entre el pulso de entrada y el pico de la señal. La amplificación máxima fue hasta 10V, el mayor voltaje soportado por nuestra tarjeta de adquisición. Al final la señal se acotó hasta 4V donde el tiempo de retardo más el tiempo de respuesta es menor a 900 ns. El tiempo de respuesta por píxel necesario para cumplir con los requerimientos en velocidad de nuestro microscopio debe ser igual o menor a 954 ns. Además nuestro circuito cuenta con una buena relación señal ruido igual a 100.

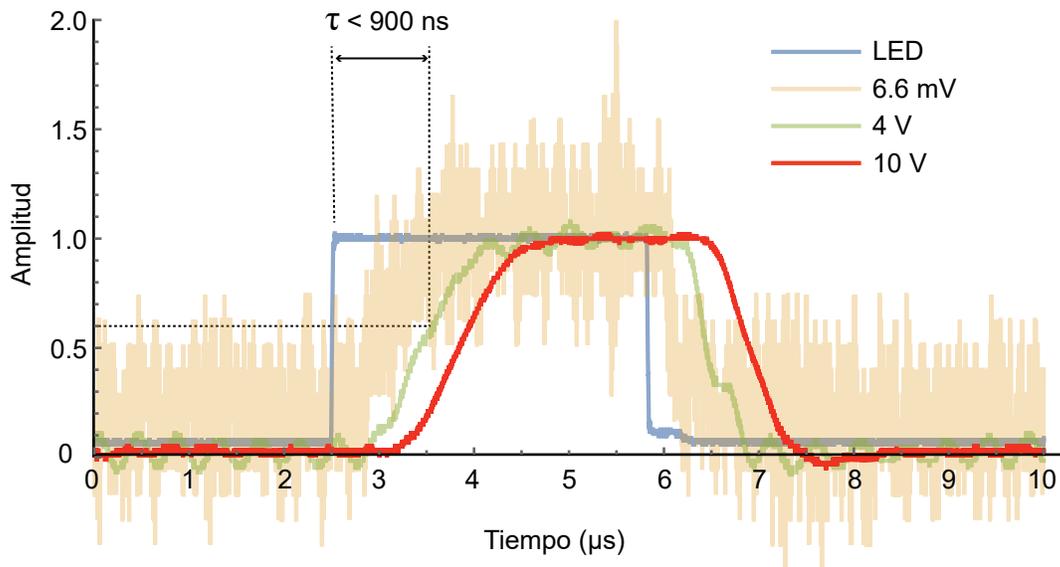


Figura 2.10: Señales de voltaje del circuito de transimpedancia. La figura muestra la conversión de corriente a voltaje con el circuito de transimpedancia (trazo anaranjado) y dos amplificaciones. Un LED fue usado (trazo azul) como entrada para poder medir los tiempos de respuesta. La constante de tiempo  $\tau$  es menor a 900 ns. Todas las señales están normalizadas.

El circuito construido es superior al encontrado en el mercado y es muy confiable para la adquisición de señales muy pequeñas que varían muy rápido. La resolución temporal de la captura esta limitada por el circuito construido y permite en principio capturar el doble o el triple de imágenes por segundo reduciendo el número de píxeles por imagen. Finalmente el costo de manufactura es de 20 dolares comparado con los 1000 dolares que cuesta el amplificador comercial.

### 2.3. Formación de imágenes

El patrón de barrido que mueve el haz del láser es una señal triangular, tanto para el eje X como Y, donde cada posición del láser en la muestra corresponde a un píxel. La Figura 2.11 muestra el principio del movimiento del láser y la captura de píxeles. Las líneas impares de la imagen están ordenadas en un sentido y las líneas pares en el contrario. A pesar que el movimiento del barrido es en 2D, la tarjeta de adquisición captura todo como un vector de una dimensión y posteriormente nuestro programa crea una matriz en 2D de 512 X 512 invirtiendo el sentido de las líneas pares de la imagen. Por la misma razón en el eje Y, las imágenes se forman la primera línea de arriba hacia abajo y para la siguiente imagen de abajo hacia arriba. Nuestro programa despliega todas las imágenes con el mismo orden.

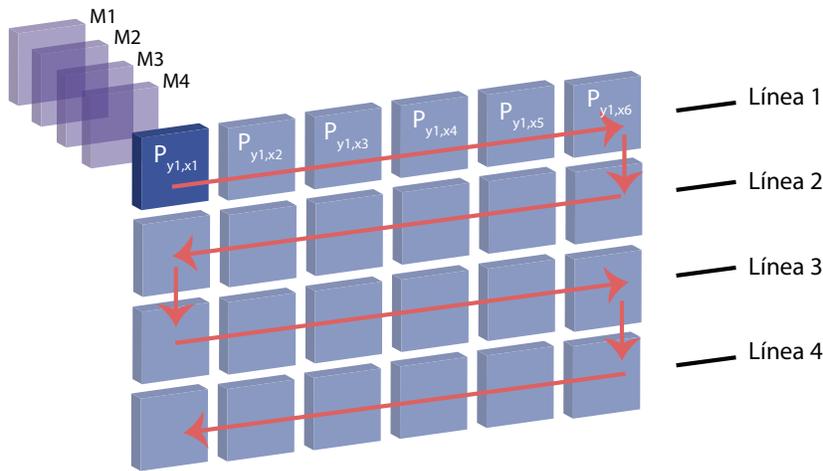


Figura 2.11: Formación de imagen. La figura muestra el principio de funcionamiento del barrido y la captura de píxeles para la formación de imagen. Las líneas pares e impares son adquiridas en orden inverso. Cada píxel ( $P_{x,y}$ ) está compuesto por cuatro muestras ( $M_n$ ) que se pueden sumar o promediar. La profundidad del píxel es de 12 bits; la imagen se forma por 1024 X 1024, 512 X 512 ó 256 X 256 píxeles.

Cuatro imágenes por segundo de 512 X 512 píxeles requiere de 1 048 576 muestras, que equivale a que cada píxel se procese en un tiempo de 954 ns. Nuestra tarjeta de adquisición tiene la capacidad de adquirir 4 canales analógicos simultáneos a una tasa de 5 mega muestras por segundo, mas de cuatro veces las muestras necesarias para formar una imagen. Debido a esto, capturamos 4 muestras por píxel para poder posteriormente sumarlas o promediarlas. Un detalle adicional respecto al barrido, es que debido a la velocidad del movimiento del espejo galvanométrico correspondiente al eje X, cuando el espejo cambia de dirección, al desacelerarse en un sentido y posteriormente acelerarse en el contrario la velocidad no es constante lo que provoca una distorsión en los bordes de la imagen. Para solucionarlo, incrementamos el número de píxeles en el eje X a 600, y para el despliegue solo se toma la parte central correspondiente a 512 X 512. Así el barrido en un eje es mayor al del otro eje y solamente el centro del barrido contribuye a la imagen final (Figura 2.12). En total, las cuatro muestras por píxel para las cuatro imágenes por segundo para un barrido de 600X512 píxeles corresponden a la adquisición de 4 915 200 muestras por segundo.

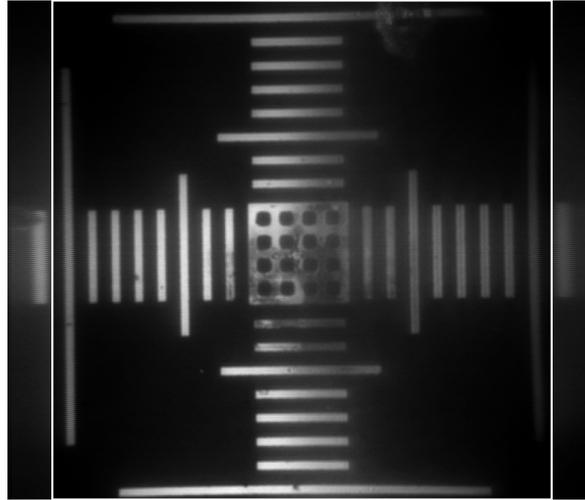


Figura 2.12: Distorsión del barrido en los bordes de la imagen. Imagen de una rejilla adquirida con nuestro microscopio usando un objetivo de 10x. El barrido se hizo con una longitud de onda de 690 nm. La señal se adquirió sin filtros de emisión. La imagen muestra en el eje X la distorsión en los bordes producida por el cambio de velocidad del espejo. El eje Y no se presenta distorsiones debido a que la velocidad es considerablemente menor. El despliegue final corresponde a la parte central del barrido.

Manteniendo el número de muestras adquiridas constante se puede variar la distribución de los píxeles adquiridos. Así en una relación geométrica se puede formar por segundo una imagen de 1024 X 1024 píxeles, cuatro de 512 X 512 píxeles u ocho de 256 X 256 píxeles. También se programó una rutina de pseudo-coloración para la gama RGB, LowHI (saturación) e imagen en escala de grises. Además nuestro programa tiene la capacidad de sumar en tiempo real dos imágenes de distintos canales con diferentes colores.

En resumen, las imágenes en nuestro microscopio se forman de la siguiente manera:

1. Una vector de 1D es capturado.
2. Se promedian o suman cuatro muestras para un píxel.
3. El programa arregla los datos en una matriz 2D.
4. Las líneas pares son invertidas.
5. Si la imagen fue formada de abajo hacia arriba se invierte.
6. Los primeros y últimos 44 píxeles en el eje X se cortan.
7. La imagen se despliega en blanco y negro o pseudocoloreada.

## 2.4. Iluminación y visualización de la muestra con luz transmitida

Un arreglo más con el que cuenta nuestro microscopio es una cámara para luz transmitida que nos permite ver y enfocar la muestra antes de ser expuesta al láser. Para esto se instaló en la parte inferior del microscopio una iluminación tipo Köhler. La fuente de luz fue un LED de luz blanca. En la parte superior se colocó una cámara *Hamamatsu C2400-77* controlada por nuestro programa de adquisición. En la Figura 2.13 se muestra la rejilla de la imagen anterior obtenida con la cámara en transmisión.

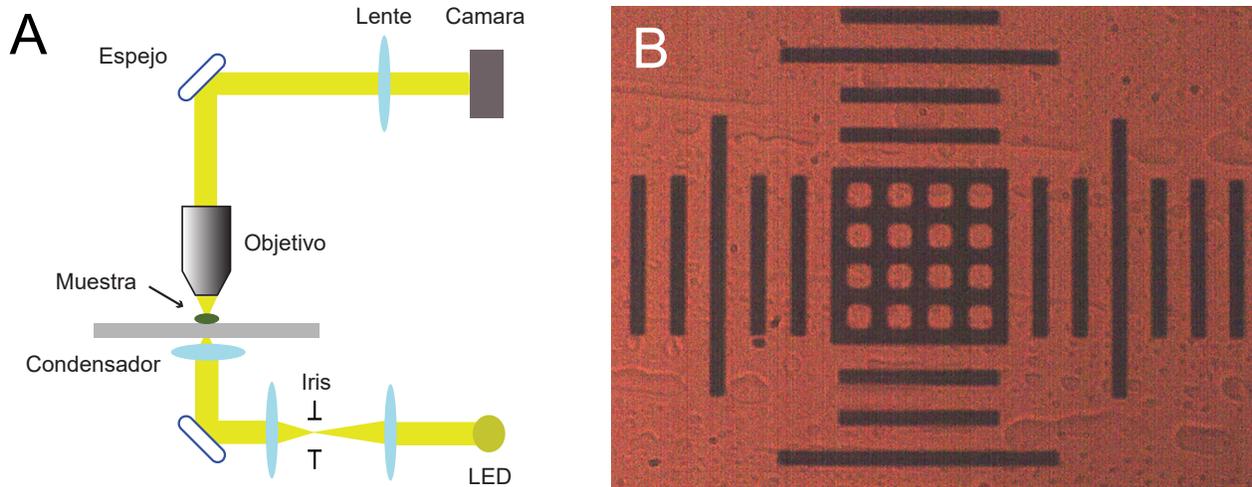


Figura 2.13: Cámara de luz transmitida. (A) Diagrama de la iluminación y captura de la cámara digital. (B) imagen de la rejilla capturada con una cámara digital en configuración de transmisión iluminada con luz blanca. El objetivo fue de 40x, la separación entre las líneas es de  $10 \mu\text{m}$ . Este componente permite enfocar el área de interés en la muestra antes del experimento.

## 2.5. Automatización del eje Z

El revolver con los objetivos y la lente condensadora están montados sobre platinas micrométricas las cuales son desplazadas por actuadores de *Thorlabs*. Para enfocar con el revolver se usa el actuador *ZFS25B* que puede soportar una carga de hasta 2 kg de manera vertical, tiene una carrera de 25 mm y una resolución de 1 nanómetro. Para enfocar la lente condensadora se usa el actuador *ZST213*, que tiene una carrera de 13 mm y una resolución de 1 nanómetro. El movimiento fino de los objetivos nos permite cambiar el plano focal de interés en la muestra, por otro lado el movimiento de la lente condensadora esta asociado a la eficiencia de la captura de los segundos armónicos y a una buena iluminación en la muestra con la lampara para obtener imágenes nítidas en la cámara digital.

Al estar motorizadas; estas dos componentes del microscopio pueden capturar distintos planos focales en la muestra. También se pueden automatizar para generar reconstrucciones de volúmenes en 3D.

## 2.6. Espectroscopia

Con la finalidad de conocer las emisiones de la serotonina en respuesta a las variables de la iluminación multifotónica en nuestro equipo montamos un monocromador para capturar fluorescencia como luz transmitida. Esto permitió hacer un estudio espectral de la fluorescencia de la serotonina a diferentes concentraciones. El monocromador de la empresa *Action Research Center* modelo *Spectra Pro 500* se instrumentó y caracterizó por completo debido a que había estado abandonado desde hace 20 años.

La rejilla del monocromador de 1200 líneas por mm trabaja en el rango del espectro visible con un ángulo Blaze de 500 nm. Su rotación se controló usando comunicación serial programada en *LabView*. La curva de eficiencia de la rejilla se midió usando una lámpara de Xenon, comparamos su espectro en el monocromador con otro medido con un espectrómetro comercial (*Ocean Optics*). La figura 2.14 muestra el diagrama del monocromador montado en el microscopio. La fluorescencia es capturada por el condensador y pasada por un filtro de sulfato de cobre para eliminar remanentes de IR. Posteriormente una lente enfoca la fluorescencia en la ranura de entrada del monocromador, el haz se expande y es colimado hacia la rejilla de difracción. La rejilla separa las componentes ópticas de la fluorescencia con resolución de 1 nm y envía la señal al fotomultiplicador *H7422P-40*. Rotando la rejilla se puede capturar el espectro visible de emisión de la serotonina entre 350 y 600 nm, el cual esta limitado principalmente por las componentes ópticas.

Un espectro completo es adquirido en menos de 5 min promediando 15 000 muestras de adquisición A/D para cada posición del espectro. Una mayor resolución es posible a costo de perder amplitud en la señal y con ello resolución a bajas concentraciones de serotonina o potencias del láser. La instrumentación e implementación del monocromador en nuestro equipo nos permitieron escalar en forma significativa nuestra comprensión de los procesos fotoquímicos de la fluorescencia del neurotransmisor serotonina.

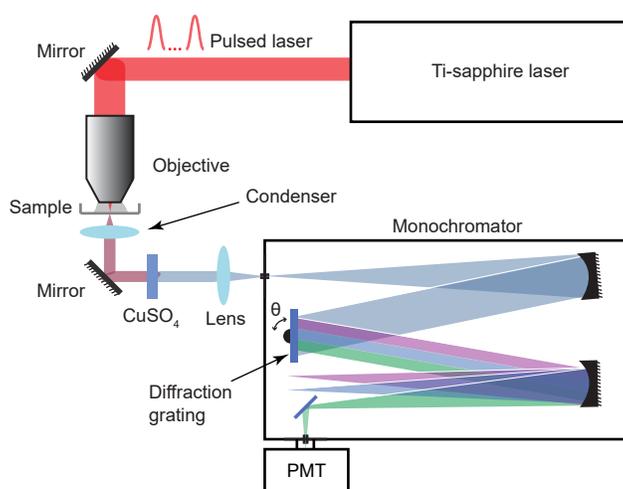


Figura 2.14: Diagrama del dispositivo para el estudio espectral de la serotonina. El láser pulsado excita una muestra en el microscopio. La fluorescencia es capturada por la lente condensadora y enviada al monocromador como luz transmitida. Una lente enfoca y colima la fluorescencia a la entrada del monocromador. Rotando la rejilla se puede descomponer el espectro de emisión de fluorescencia. La captura se hace con un fotomultiplicador de alta sensibilidad.

## Capítulo 3

# Resultados

La Figura 3.1 resume el funcionamiento de la adquisición y formación de imágenes en nuestro microscopio multifotónico. Un pulso digital generado dentro del programa de captura y formación de imágenes inicia las señales de control de los espejos galvanométricos y la adquisición de datos de los fotomultiplicadores (PMT). El pulso digital sincroniza el barrido con la captura de las muestras que formarán los píxeles de la imagen. El programa adquiere las  $\sim 1.2$  millones de muestras, arregla el vector de datos y la despliega la imagen en 250 ms.

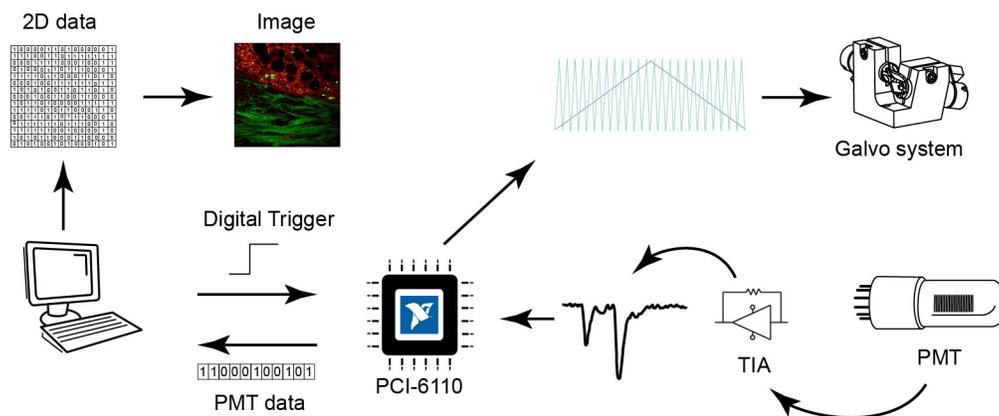


Figura 3.1: Diagrama de la adquisición y formación de imágenes. El programa de adquisición envía un pulso digital (Digital Trigger) que inicia la generación de las señales de control de los espejos galvanométricos y la adquisición de datos provenientes del fotomultiplicador (PMT) en la tarjeta de adquisición PCI-6110 de *National Instruments*. La señal antes de ser digitalizada es transformada en voltaje usando un circuito de transimpedancia (TIA). El vector de datos (PMT data) es transformado en un arreglo en 2D para posteriormente ser pseudo coloreado y desplegado como imagen. El tiempo por imagen que le toma al programa desde la captura hasta el despliegue es de 250 ms.

En la Figura 3.2 se muestran imágenes de una rejilla de calibración usada para calibrar el barrido del microscopio, la separación entre líneas es de  $10 \mu m$ . Usando el objetivo de 10x tenemos un área de barrido de  $300 \mu m^2$ , para 40x el área es de  $80 \mu m^2$  y para 60x es de  $50 \mu m^2$ .

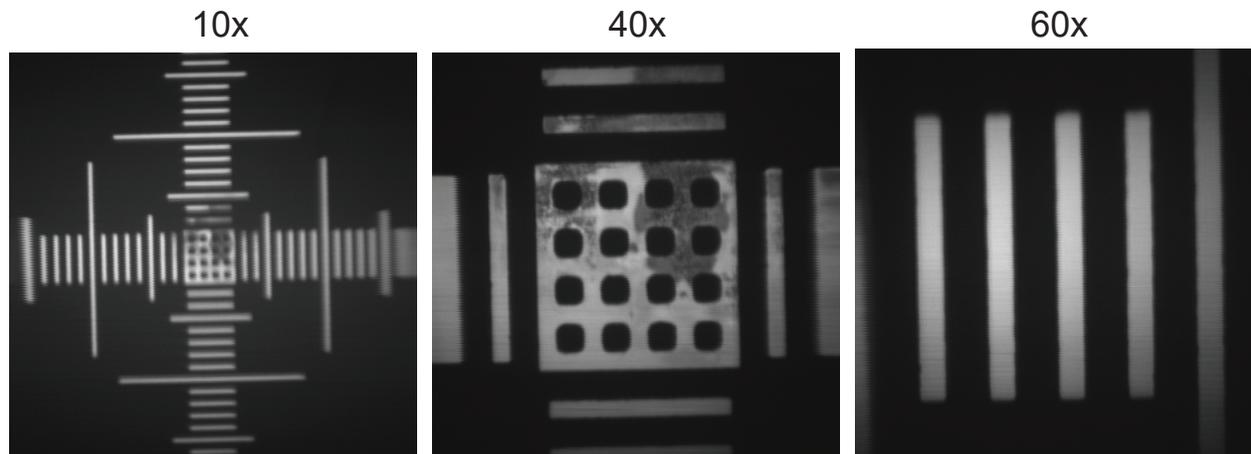


Figura 3.2: Calibración del área de barrido del microscopio. Imágenes de una rejilla de calibración obtenidas con el microscopio. La separación entre líneas es igual a  $10 \mu m$ , de izquierda a derecha obtenidas con un objetivo de 10x, 40x y 60x, las áreas de barrido son  $300$ ,  $80$  y  $50 \mu m^2$  respectivamente.

A continuación se describe por separado los procesos de caracterización que se hicieron para la captura tanto de la fluorescencia como de los segundos armónicos en muestras biológicas para posteriormente aplicarlo al estudio de la serotonina en neuronas. Los espectros de emisión de la fluorescencia de serotonina en función de la concentración, longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) y potencia permitió escalar la especificidad con la que se pueden capturar imágenes de 5-HT dentro y fuera de las neuronas.

### 3.1. Espectroscopia de la molécula serotonina

Existe tres fluorescencias producto de la absorción de dos o mas fotones (fluorescencias multifotónicas) conocidas para la serotonina. Una fluorescencia producida por la absorción simultánea de tres fotones para emitir fluorescencia (**violeta**) equivalente a la absorción lineal de UV característica de la molécula [11], otra es una emisión en la parte **verde** del espectro visible producida por un mecanismo de ionización que en principio se puede explicar como la absorción de 4 o más fotones [39] y una más en el rango **azul** del espectro, reportada anteriormente como un corrimiento de la fluorescencia de tres fotones cuando la concentración de serotonina es muy alta [59]. A pesar de la cantidad de estudios hechos desde su descubrimiento y el buen conocimiento que se tiene de la estructura molecular de la serotonina, los procesos químicos y físicos de su emisión de fluorescencia multifotónica no se han entendido del todo. Nosotros hicimos un amplio estudio espectral de la molécula en función de su concentración, longitud de onda y potencia de excitación.

Para estas pruebas usamos serotonina sintética a varias concentraciones (270, 100, 30, 10, 3, 1 y 0.3 mM) diluida en medio fisiológico Ringer. El objetivo fue trabajar en condiciones similares a las de una neurona. El Ringer no es fluorescente y por lo tanto cualquier fluorescencia detectada proviene de la molécula de 5-HT. La serotonina fue comprada a *Sigma Aldrich*, el Ringer tiene la siguiente composición:

NaCl	115 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.5 mM
KCl	4 mM
Glucosa	11 mM
HEPES	10 mM

Se usó agua tridestilada para las soluciones y el pH se ajustó a 7.4 usando NaOH.

Para los experimentos se usaron gotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada concentración. El láser se enfocó en la muestra usando el objetivo de 60x de inmersión en agua. El espectro de emisión se obtuvo con el monocromador descrito en la Figura 2.14. Para cada concentración se obtuvieron espectros excitando con longitudes de onda ( $\lambda_{exc}$ ) de 690, 700, 710, 720, 730, 740 y 760 nm y potencias de 30 a 60 mW con incrementos de 5 mW.

En la Figura 3.3 se muestra el espectro adquirido con el monocromador para una concentración de 270 mM excitada con 700 nm y una potencia de 60 mW. Los puntos representan los datos obtenidos en el sensor ya corregidos tanto para la eficiencia de la rejilla de difracción como la del PMT. Los datos fueron ajustados a una curva usando el algoritmo de componentes principales SSA (Singular Spectrum Analysis). Los espectros fueron acotados de 350 a 600 nm, rango correspondiente al de la luz visible. El espectro de fluorescencia esta compuesto por la emisión en 340 nm (violeta), de la cual solo detectamos una parte desde 350 a 380 nm debido a las limitaciones de las componentes ópticas usadas, otra azul con un máximo en 405 (flecha) y una verde en 494 nm que es considerablemente mayor en magnitud que las dos anteriores.

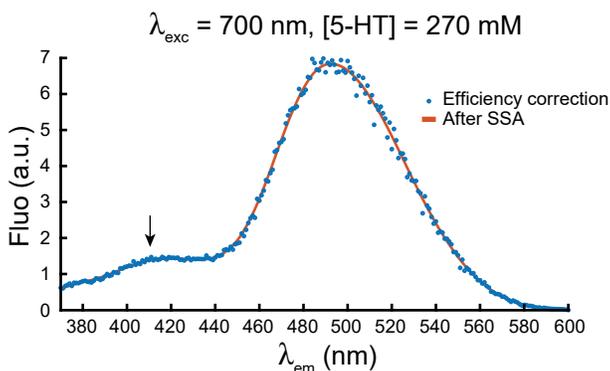


Figura 3.3: Espectro de emisión de serotonina y su análisis con el algoritmo de SSA. Espectro de la fluorescencia de una gota de serotonina a una concentración de 270 mM iluminada con una longitud de onda de 700 nm. Los puntos azules son los datos obtenidos para cada posición del espectro ya corregidos para la eficiencia de la rejilla del monocromador y la del PMT. La curva en anaranjado es el resultado del algoritmo SSA usado.

La Figura 3.4 muestra la fluorescencia obtenida de todas las longitudes de onda de excitación, las potencias y las concentraciones de serotonina usadas en el estudio. La amplitud de los espectros varían no linealmente con la longitud de onda de excitación. Las amplitudes de cada emisión detectada fueron marcadamente mayores para  $\lambda_{exc} = 700\text{nm}$  y menores para  $\lambda_{exc}$  de 710 nm y 730 nm. Así mismo todas las emisiones decayeron para  $\lambda_{exc} > 760\text{nm}$ . En la Figura 3.4A se muestra el efecto de la potencia del láser en el espectro de fluorescencia de la serotonina a una concentración de 270 mM. La intensidad de la emisión verde, que es claramente la más grande, incrementa en amplitud a tasas altas conforme la potencia aumenta, indicando que es el resultado de procesos no lineales de excitación. Las emisiones azul y violeta están presentes en todas las  $\lambda_{exc}$  con diferentes amplitudes. La Figura 3.4B muestra el efecto de la concentración de serotonina en la emisión de fluorescencia para una potencia fija de 60 mW. Las no linealidades son más notables en concentraciones altas de serotonina.

Nuevamente la emisión en verde domina el espectro, mientras la emisión en azul fue claramente detectada a concentraciones mayores a 100 mM. Una comparación visual de los trazos anaranjados y rojos en las gráficas muestran un claro efecto de *quenching* para la emisión en verde para todas las longitudes de onda de excitación, excepto 760 nm.

La Figura 3.5 compara los espectros de emisión de la serotonina en respuesta a tres longitudes de onda de excitación: 700, 720 y 740 nm, las cuales fueron las más eficientes para producir las tres emisiones. En la Figura 3.5A la concentración de serotonina es de 270 mM y se muestra la amplitud de las fluorescencias en función del incremento de potencia. Solo parte de la emisión violeta pudo ser detectada por encima de 350 nm. La emisión azul aparece con un pico en 405 nm en respuesta a  $\lambda_{exc} = 700$  nm incluso a concentraciones bajas de 30 mM. La amplitud de estas dos emisiones decae conforme la longitud de onda de excitación incrementa. La emisión en verde tiene un pico en 494 nm. A potencias bajas de 30 ó 35 mW la emisión azul es mayor a la verde y esta tendencia se invierte conforme la potencia aumenta. La Figura 3.5B muestra el incremento de fluorescencia en función de la potencia para los picos de las fluorescencias detectadas: 373, 405 y 494 nm. Se puede observar que las fluorescencias se escalan no linealmente con la potencia, mostrando que son producto de absorciones multifotónicas. El eje Y de la amplitud está linealizado con la función logaritmo, por lo tanto la pendiente de la recta nos dice el número de fotones que fueron absorbidos para emitir fluorescencia. La emisión violeta es producto de la absorción de tres fotones, la azul de dos y la verde de 4 a 5 fotones.

En la figura 3.5C la potencia es fija a 60 mW y los espectros de fluorescencia corresponden a diferentes concentraciones de serotonina. Para concentraciones de 270 mM con  $\lambda_{exc} = 700nm$  las tres emisiones aparecen claramente, aunque las amplitudes tienen marcadas diferencias. Conforme la concentración aumenta de 100 a 270 mM, las emisiones verde y violeta decayeron mientras la azul aumentó para  $\lambda_{exc}$  de 700 y 740 nm. La cola de la emisión violeta fue más evidente con  $\lambda_{exc}$  de 700 y 720 nm. La Figura 3.5D muestra los máximos de las tres emisiones a las distintas concentraciones. Con concentraciones altas aparece un efecto de *quenching*.

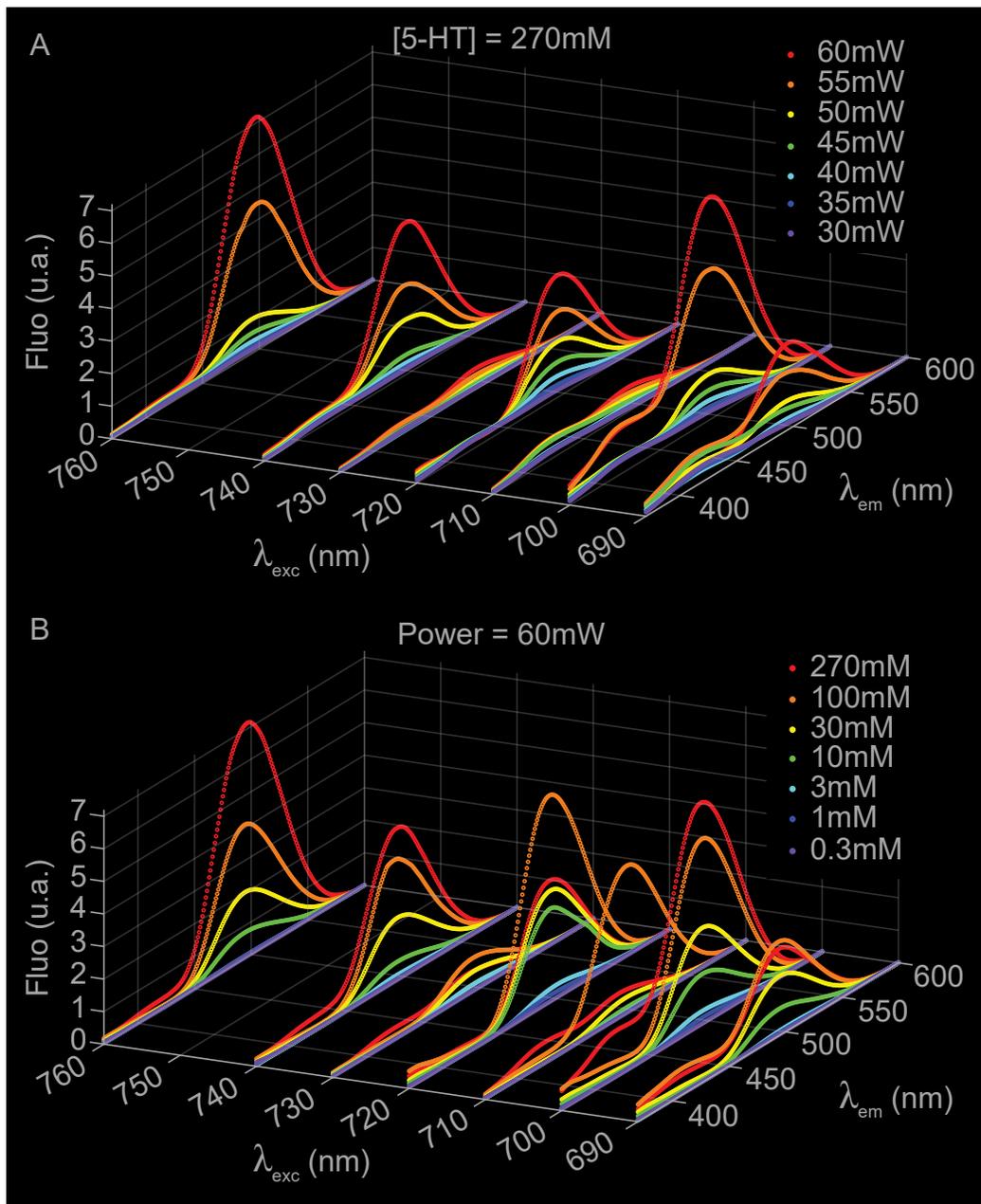


Figura 3.4: Espectros de fluorescencia de la serotonina para todas las concentraciones, longitudes de onda y potencias de excitación. En A la concentración de serotonina es constante e igual a 270 mM, se muestra sus espectros de emisión en función de la longitud de onda y potencias de excitación. La fluorescencia no sigue una tendencia, pero se escala con el incremento de la potencia. Las emisiones más eficientes se encontraron en respuesta a la excitación con 700 y 720 nm, por el contrario las menos eficientes fueron 710 y 730 nm. En B la potencia es fija en la muestra y la concentración cambia. No linealidades son claras en concentraciones altas. Nuevamente las tres emisiones de fluorescencia aparecen con longitudes de onda de excitación de 700 y 720 nm. Hay un efecto de *quenching* para concentraciones de 270 mM.

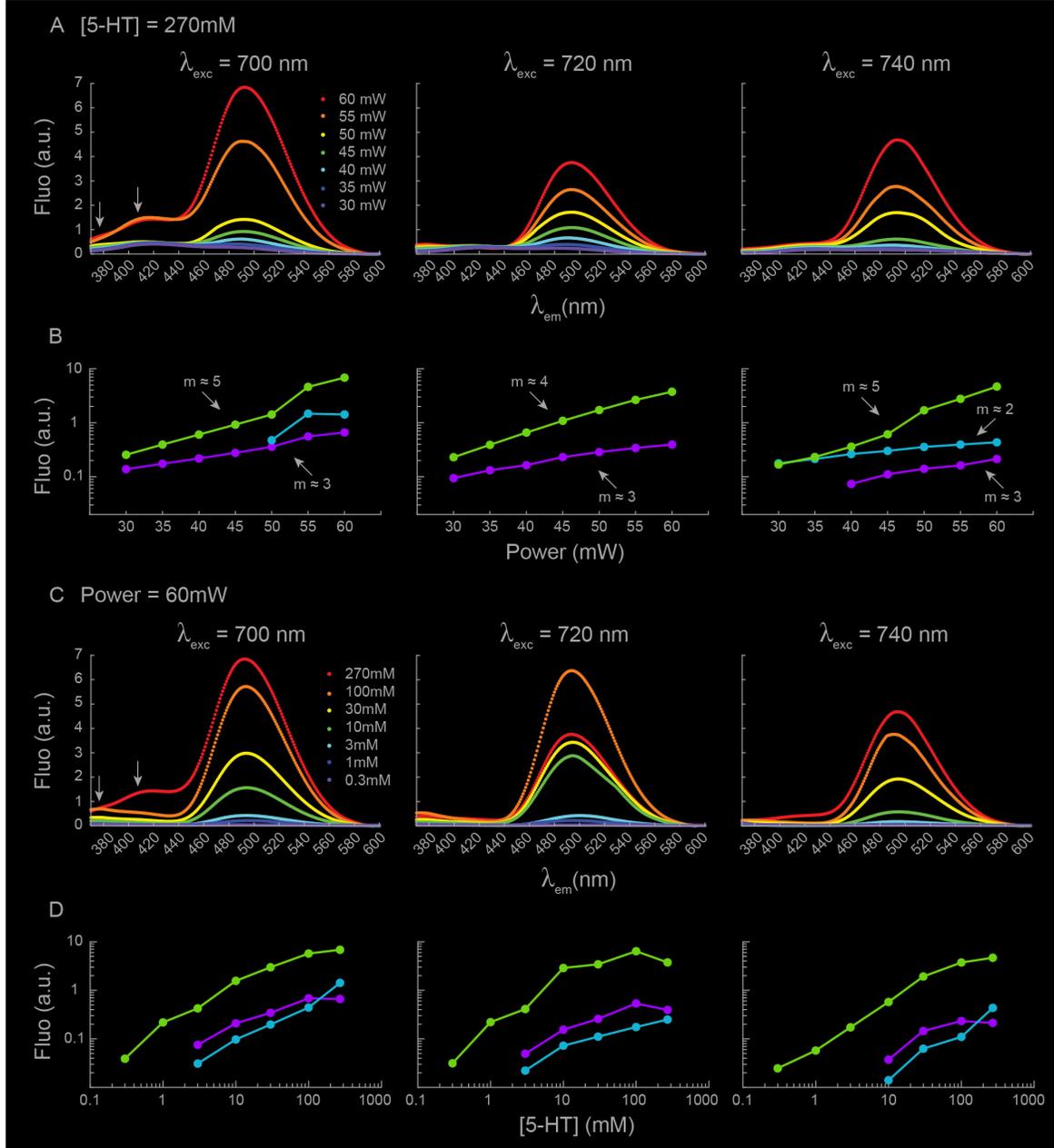


Figura 3.5: Espectros de fluorescencia de serotonina excitada con 700, 720 y 740 nm. Los tres picos máximos (flechas) corresponden a las emisiones violeta (detectada en el rango de 350-380), azul (405 nm) y verde (494 nm). En A la concentración en la muestra es 270 mM y se muestran los espectros para potencias crecientes de 30 a 60 mW. La  $\lambda_{exc}$  más eficiente para producir las tres emisiones fue 700 nm. En B se muestran las intensidades para los picos máximos de las fluorescencias detectas. Las flechas indican la pendiente de la recta que corresponde al número de fotones absorbidos para la emisión de fluorescencia. En C se muestran los espectros para una potencia en la muestra igual a 60 mW y diferentes concentraciones de serotonina. Con altas concentraciones aparece un efecto de *quenching*. D muestra los picos de las emisiones en función de la concentración.

### 3.1.1. Fotoconversión de la serotonina

Una explicación a los mecanismos de emisión de las fluorescencias verde y azul es que la serotonina es fotoconvertida en productos fluorescentes diferentes a la serotonina. Para probar esto irradiamos una muestra con una concentración de  $300 \mu\text{M}$  por 30 mn con  $700 \text{ nm}$  y una potencia de  $60 \text{ mW}$  (la longitud de onda más eficiente en la generación de las tres emisiones). Comparamos con un fluorímetro (*Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Agilent*) los espectros de absorción de la serotonina irradiada con una muestra del mismo lote que no fue irradiada. En la Figura 3.6A se observa que el espectro de absorción de la serotonina irradiada se expande hacia el rojo. Esto indica que en la muestra irradiada existen dos poblaciones, la serotonina normal y otra más que ha sido fotoconvertida. Abajo en B, excitando monofotónicamente con  $275 \text{ nm}$  en esta región nueva del espectro aparece una emisión en azul con un pico en  $388 \text{ nm}$ , que posiblemente es el mismo que estamos produciendo por excitación multifotónica. La fluorescencia en verde no fue detectada.

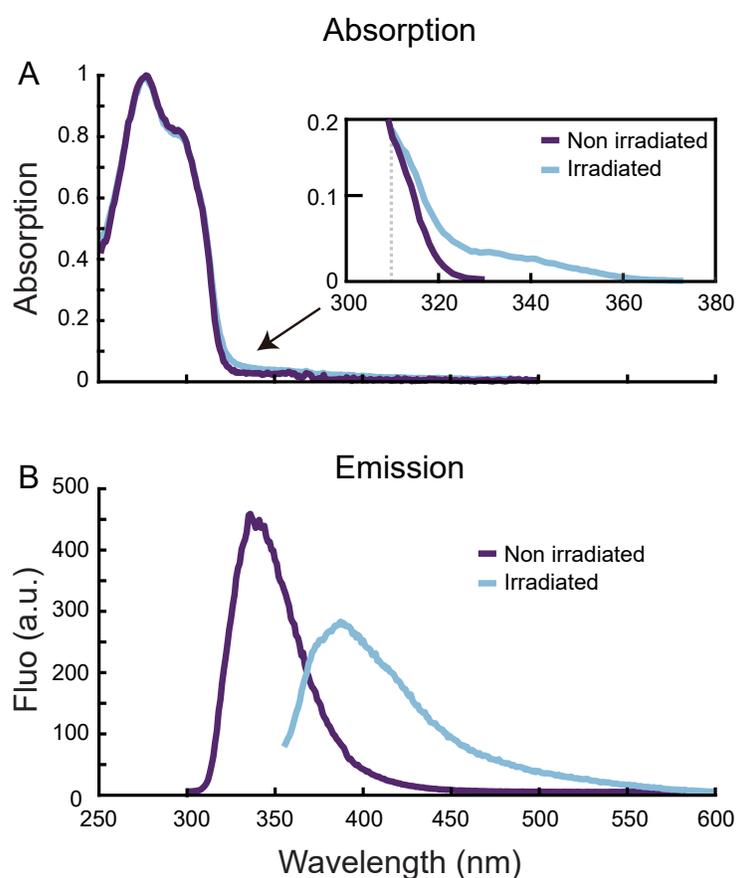


Figura 3.6: Espectro de absorción de 5-HT irradiada. En A, comparación de los espectros de absorción de una muestra de 5-HT irradiada (trazo azul) por 30 mn ( $700 \text{ nm}$  y  $60 \text{ mW}$ ) con una muestra no irradiada (trazo morado). El espectro de absorción de la muestra irradiada se expande hacia al rojo (el recuadro muestra una ampliación de esta nueva parte del espectro de absorción). En B, excitando monofotónicamente en la región de  $320 \text{ - } 360 \text{ nm}$  de la serotonina irradiada, se produce una fluorescencia azul con pico en  $\sim 400 \text{ nm}$ .

El origen de estas emisiones (azul y verde) puede deberse a que la iluminación multifotónica esta fotoconvirtiendo a la serotonina en dos productos: uno estable que detectamos con la expansión del espectro de absorción (este responsable de la emisión azul y que puede producirse excitando monofotonicamente en el rango del UV o con dos fotones en el rango del infrarrojo) y otro fotoproducto transitorio y responsable de la emisión verde [12]. Para corroborar que la emisión azul fue la misma que detectamos en los espectros de excitación multifotónica, comparamos dos espectros en nuestro equipo, uno a tiempo cero y otro después de haber irradiado la muestra por 30 mn igualmente con 700 nm. Las diferencias se muestran en la Figura 3.7. Se puede observar que el tiempo de exposición incrementó la emisión en azul, con un incremento también en la emisión verde.

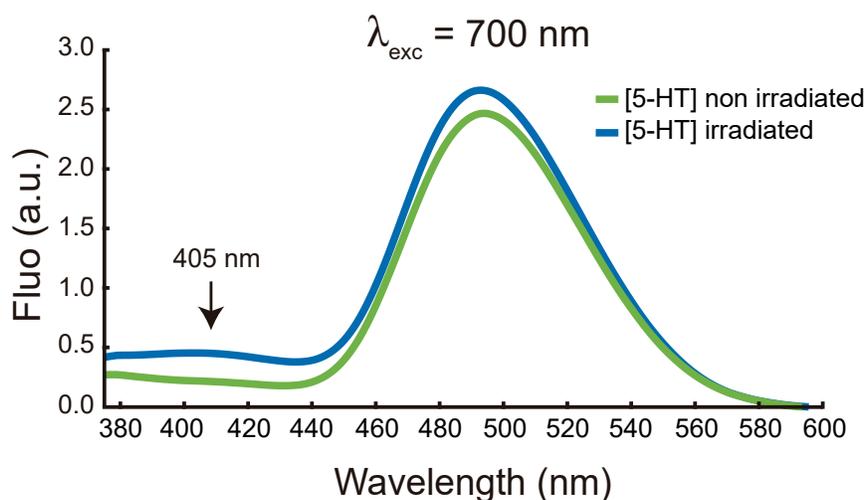


Figura 3.7: Espectro de fluorescencia multifotónica de 5-HT irradiada. La irradiación multifotónica favorece la emisión azul. La curva azul muestra la serotonina sin irradiar y la curva verde a la serotonina después de haber sido irradiada por 30 min con 60 mW y 700 nm. El espectro irradiado incrementó su componente en azul seguido de un incremento en verde.

Finalmente en la Figura 3.8 se muestran el espectro de absorción de la serotonina y las emisiones detectadas en nuestro estudio.

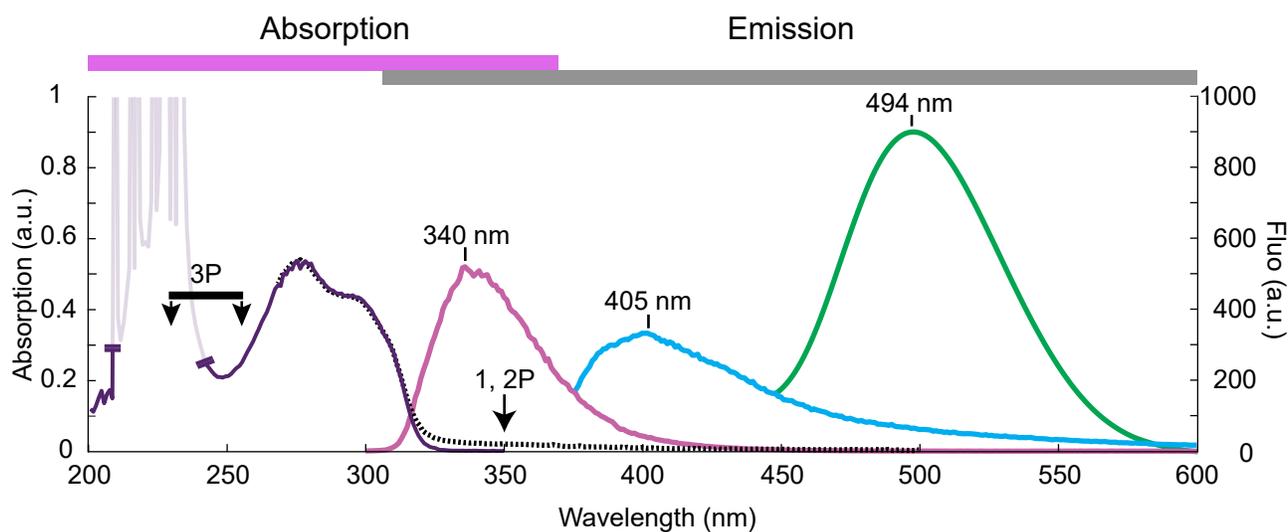


Figura 3.8: Espectro de absorción y emisiones fluorescentes de la serotonina. En la figura se muestra el espectro de absorción de la serotonina (trazo morado) y las emisiones de fluorescencia multifotónicas analizadas en este estudio. La línea punteada es el espectro de absorción expandido de la serotonina irradiada. La emisión con pico en 340 nm puede ser producida monofotónicamente con luz UV o multifotónicamente mediante la absorción simultánea de tres fotones (señalado con la barra 3P). La emisión azul es producida por la serotonina fotoconvertida y puede ser igualmente producida monofotónicamente o con dos fotones en IR. La emisión en verde es producida en principio por una absorción de 4 a 6 fotones o por una fotoconversión transitoria como consecuencia de la iluminación multifotónica.

## 3.2. Representación geométrica de la fluorescencia multifotónica de la serotonina

Con la intención de visualizar y crear rutas críticas de la emisión de fluorescencia para el diseño experimental de la detección de serotonina dentro y fuera de una neurona a diferentes concentraciones, se ideó una forma cuantitativa de presentar los datos. Partiendo que se tienen 7 concentraciones, 7 longitudes de onda y 7 potencias, se creó un heptágono que contiene toda la información. Para explicar cómo se forma esta representación geométrica, la Figura 3.9 muestra un segmento del heptágono donde la intensidad y el color corresponden a la emisión verde. Un eje es la potencia en incrementos de abajo hacia arriba. El otro eje es la longitud de onda de excitación que aumenta en escalones de izquierda a derecha. De esta manera podemos mostrar cómo la fluorescencia se escala en función de dos variables. La emisión por ejemplo es despreciable cuando la longitud de onda de excitación es igual a 710 y 730 nm.

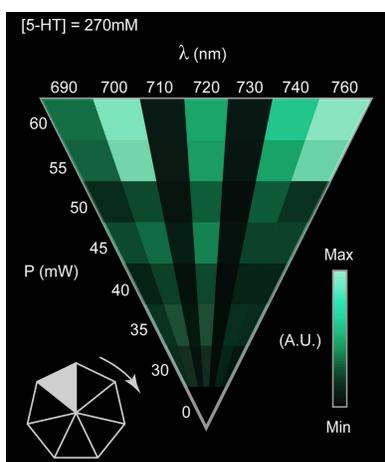


Figura 3.9: Segmento del heptágono que forma la representación geométrica de fluorescencia verde de serotonina. El triángulo se puede leer como una gráfica normal en dos dimensiones, donde un eje es la potencia que incrementa de abajo hacia arriba y la longitud de onda de excitación aumenta de izquierda a derecha. El color representa la fluorescencia y esta normalizada respecto al máximo. La gráfica corresponde a la concentración de 270 mM, la longitud de onda más eficiente es de 700 nm. Para 710 y 730 nm la emisión de fluorescencia decae considerablemente.

Así para cada color de fluorescencia existe un heptágono compuesto por 7 triángulos (Figura 3.10). Cada triángulo corresponde a una concentración de serotonina. De los heptágonos podemos observar que la emisión en verde aparece con concentraciones mayores de 3 mM y la azul preferentemente para altas concentraciones de 100 y 270 mM con longitudes de onda de 700 y 720 nm. La emisión violeta aparece para todas las concentraciones. La intensidad del color está normalizada respecto a la intensidad máxima.

Como resultado de la espectroscopia conocimos las componentes principales por las que está formado el espectro de fluorescencia de la serotonina, y también pudimos observar que cada concentración tiene una marca específica en la emisión, de tal forma que no solo podemos detectar la serotonina dentro y fuera de neuronas, sino que también podemos conocer la concentración a la cual se encuentra. Una de las técnicas más usadas y simples para medir concentraciones es a partir del cociente de dos emisiones [20, 70]. El tener los datos de fluorescencia arreglados geoméricamente permite expresar los cocientes gráficamente. En la Figura 3.11 y 3.12 se muestran ejemplos del cociente de las emisiones verde-violeta y azul-verde respectivamente.

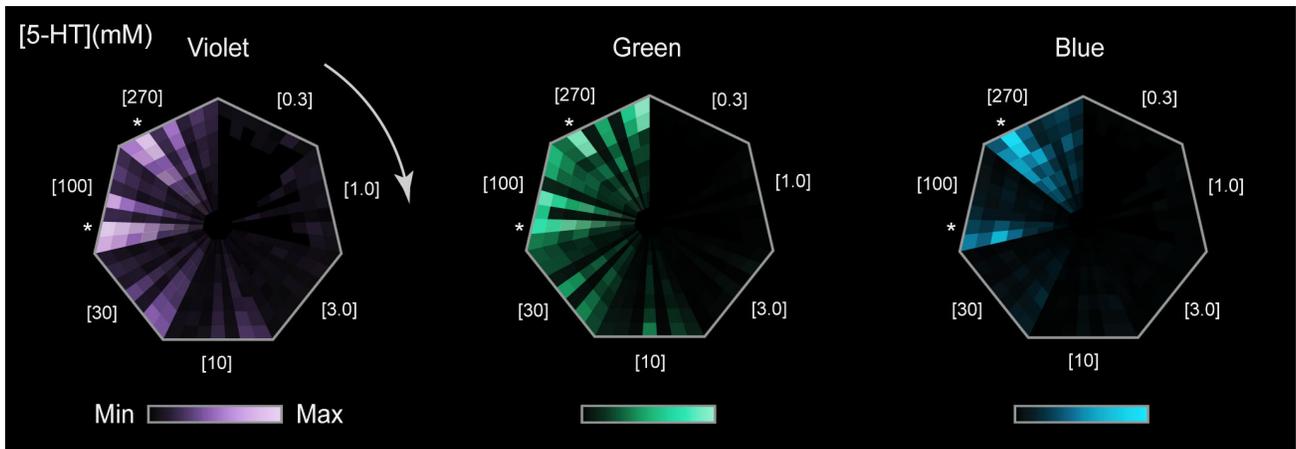


Figura 3.10: Representación gráfica de las emisiones de fluorescencia. La figura muestra los heptágonos correspondientes las emisiones violeta, azul y verde. La concentración en cada heptágono incrementa conforme a las manecillas del reloj. La fluorescencia violeta esta presente para todas las concentraciones, la verde aparece con concentraciones mayores a 3 mM y la azul es característica para concentraciones altas como 100 y 270 mM. Las intensidades están normalizadas respecto a la intensidad máxima.

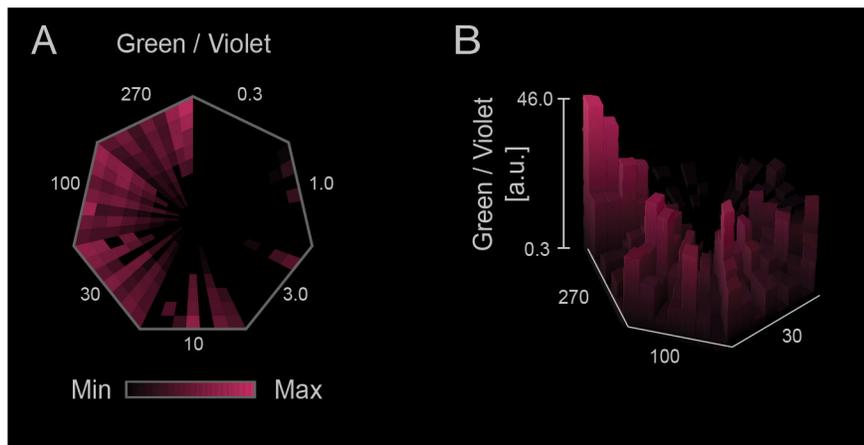


Figura 3.11: Representación gráfica del cociente de los heptágonos verde-violeta. El propósito de este heptágono es usarse como una guía visual para conocer los cocientes de concentración y generar estrategias experimentales cuantitativas para medir concentraciones en neuronas. Se puede ver en la extrusión 3D a la derecha que al incrementar la concentración aparece una tendencia para cada patrón de excitación.

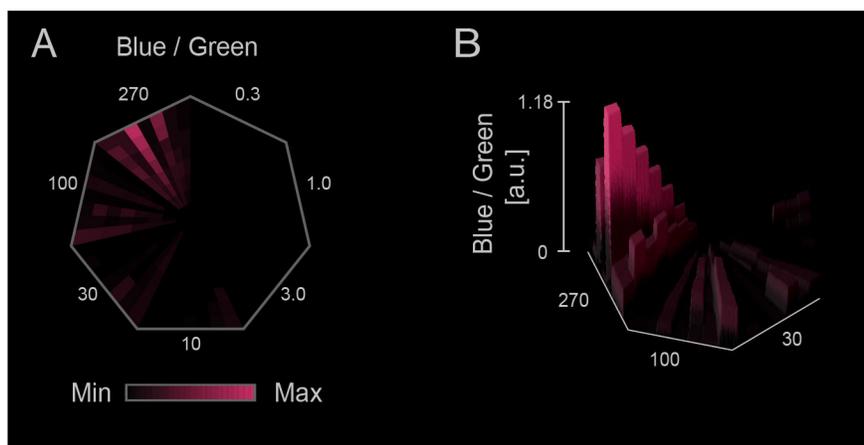


Figura 3.12: Representación gráfica del cociente de los heptágonos azul-verde. En comparación con la figura anterior, el cociente entre estas emisiones genera un patrón diferente (heptagono). Como se encontró en nuestro estudio, la emisión azul es mas evidente a concentraciones altas de 100 y 270 mM. El uso de dos cociente puede servir como información complementaria para medir concentraciones.

### 3.3. Generación de segundos armónicos

Hicimos las primeras capturas de los segundos armónicos (SHG) en muestras biológicas usando colágeno en cola de rata, debido a que la fibras del colágeno se comportan como cristales carentes de simetría y pueden doblar la frecuencia del láser de excitación. Los segundos armónicos en colágeno se han estudiado ampliamente en estructuras como la cornea [71] y la piel [72], y la distribución inhomogénea de sus fibras permite caracterizar las emisiones en función de la polarización incidente de la luz [73].

Usamos rebanas de cola de rata de  $10 \mu\text{m}$  de espesor montadas entre dos cubreobjetos. Para producir los segundos armónicos iluminamos con 800 nm y captamos la emisión con un filtro centrado en 400 nm con un ancho de banda de  $\pm 5\text{nm}$ . Se usó siempre un filtro de sulfato de cobre de 1 cm de largo. La potencia en la muestra fue de 20 mW. En la figura 3.13A se muestra una imagen tomada con la cámara en transmisión iluminando con luz visible de una parte de la rebanada de cola de rata. A la derecha (en B) la imagen de los segundos armónicos producidos por el colágeno. La imagen muestra la especificidad de los segundos armónicos, ya que no existe emisión fuera de 400 nm.

El siguiente experimento fue obtener los segundos armónicos en función de sus componentes de polarización, para lo cual usamos el cubo polarizador descrito en la Figura 2.1. La polarización de salida del láser es horizontal y después de pasar por los espejos que lo llevan al objetivo la polarización es vertical desde el punto de vista del usuario. Nuevamente se usó una longitud de onda de excitación de 800 nm y el filtro de emisión de 400 nm, más el filtro de sulfato de cobre. En la Figura 3.14 la flecha blanca indica la orientación de la polarización del haz de iluminación. Las flechas amarillas indican la orientación de polarización de los segundos armónicos capturados en cada canal. Las imágenes están pseudo coloreadas. El canal paralelo a la polarización incidente en rojo y su componente ortogonal en verde. Fibras orientadas con la polarización del haz de iluminación generarán mas eficientemente los SHG. En C se muestra la suma de las imágenes. El color amarillo indica donde la información común se sobrepone. En nuestra imagen corresponde al sitio donde las fibras giran y cambian de dirección. Estas imágenes muestran como con nuestro sistema podemos estudiar el nivel de anisotropía de estructuras que generan los segundos armónicos.

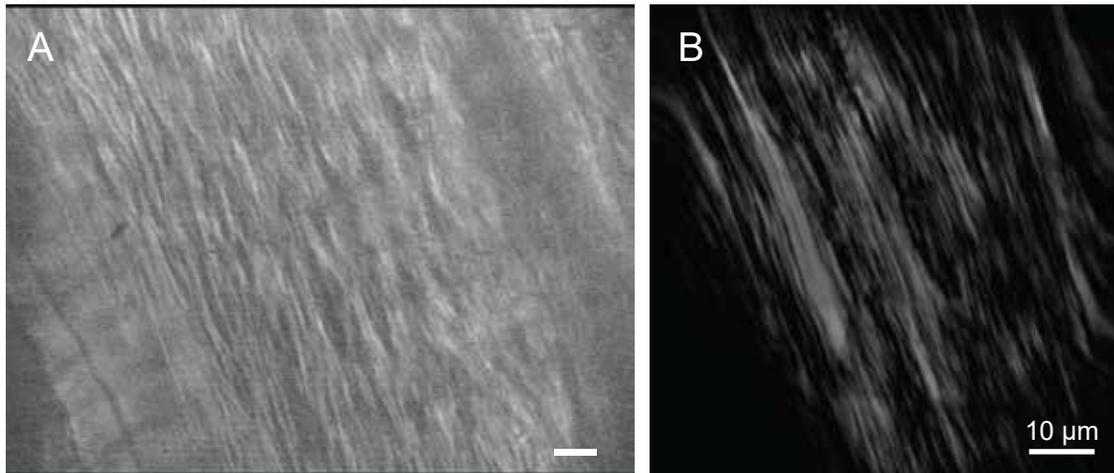


Figura 3.13: Segundos armónicos en cola de rata. La muestra tiene un espesor de  $10 \mu\text{m}$  y fue colocada entre dos cubreobjetos. En A, imagen de las fibras del colágeno en la cola de rata obtenida con la cámara digital en transmisión. En B, imagen de los SHG, la  $\lambda_{exc}$  fue de  $800 \text{ nm}$  y la potencia en la muestra de  $20 \text{ mW}$ . Se usaron un filtro de emisión centrado en  $400 \pm 5 \text{ nm}$  y un filtro líquido de sulfato de cobre. Solamente fibras que se encuentran en el plano focal de iluminación generan los segundos armónicos, la especificidad de la emisión corrobora que las fibras doblan la frecuencia del haz de iluminación. Las fibras y su orientación pueden observarse. El objetivo usando fue de  $40\times$  y la barra en las dos imágenes es igual a  $10 \mu\text{m}$ .

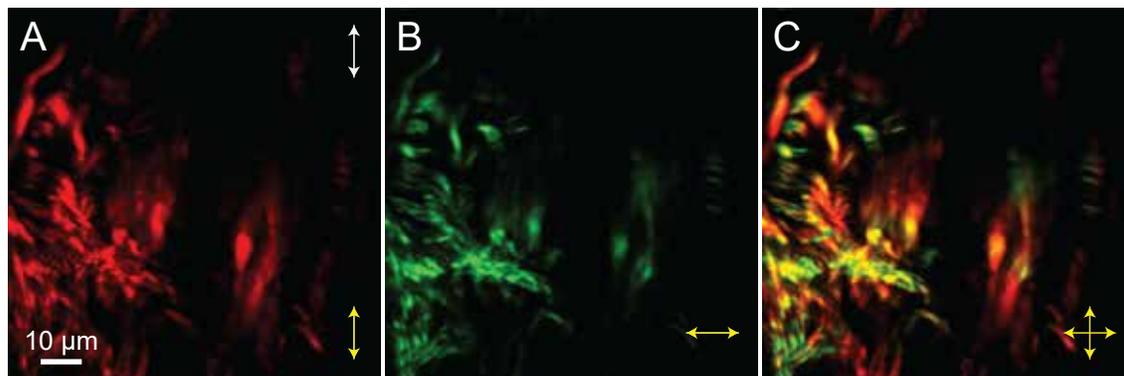


Figura 3.14: Componentes en polarización de los SHG. La flecha blanca indica la orientación de la polarización del haz de iluminación, las flechas amarillas la polarización capturada en cada canal después de haber pasado por el cubo polarizador. La eficiencia de la generación de los segundos armónicos depende de la orientación de las fibras respecto al haz de iluminación. Fibras paralelas al haz generan SHG eficientemente. Cada canal es pseudo coloreado digitalmente y en C se muestra la suma de los canales A más B. El color amarillo es la suma de los colores verde más rojo, e indica donde las fibras tienen componentes en los dos canales. En un proceso dinámico la información en cada canal varía conforme las fibras cambian de orientación. La longitud de onda de excitación fue de  $800 \text{ nm}$ , los filtros de emisión fue uno centrado en  $400 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  más el de sulfato de cobre. El objetivo usado fue  $40\times$  con  $40 \text{ mW}$  de potencia en la muestra.

### 3.4. Fluorescencia y SHG de las neuronas de Retzius

Como se mencionó anteriormente el objetivo de la construcción de este microscopio fue estudiar el mecanismo de liberación somática de serotonina en neuronas. Para los experimentos se usaron ganglios extraídos del sistema nervioso central de la sanguijuela y se colocaron en platos de petri con fondo de vidrio en Ringer. Los ganglios contienen dos neuronas de Retzius, cada una tiene un diámetro de 60 a 80  $\mu m$ . Como referencia la Figura 3.15 muestra imágenes de un ganglio completo, donde la serotonina se encuentra en el interior de la neurona y alrededor del núcleo mientras la corteza de actina se encuentra en la periferia asociada a la membrana plasmática.

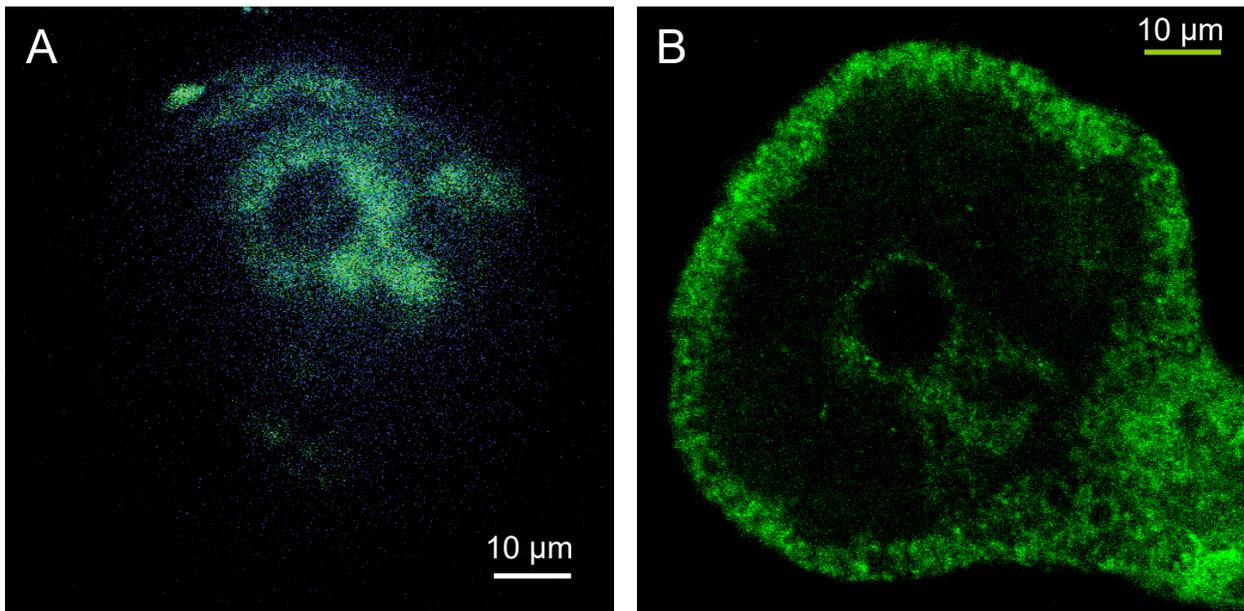


Figura 3.15: Imágenes de la serotonina y corteza de actina en una neurona de Retzius. En A la serotonina se encuentra en el interior de la neurona y alrededor del núcleo. La fluorescencia fue detectada en 494 nm con una  $\lambda_{exc}$  de 720 nm, 40 mW de potencia en la muestra y el objetivo de 40x. En B, la corteza de actina teñida con Faloidina acoplada al colorante Alexa en la periferia de la neurona y asociada a la membrana plasmática, imagen tomada de [74].

En la Figura 3.16 se muestra un segmento de una neurona de Retzius en reposo (sin ser estimulada eléctricamente) obtenida con nuestro microscopio. Las primeras dos figuras (A y B) corresponden a las componentes en polarización de los segundos armónicos producidos por los microtubulos y la corteza de actina. Adicionalmente se usó el colorante FM1-43 que se adhiere a la membrana para romper su simetría y producir SHG [75]. La figura C suma las dos componentes ortogonales de los SHG, azul mas verde virtualmente producen el color cyan. En C se aprecian partes dentro de la neurona donde los segundos armónicos contienen información diferente conservando sus colores originales, mientras que en otras regiones hay sobreposición. En D se muestra la fluorescencia multifotónica (494 nm) de la serotonina en color rojo. Esta se encuentra lejos de la membrana plasmática. La suma de la fluorescencia mas las componentes de los segundos armónicos se muestra en E. La longitud de onda de excitación fue 720 nm con 40 mW de potencia en la muestra y el objetivo de 40x.

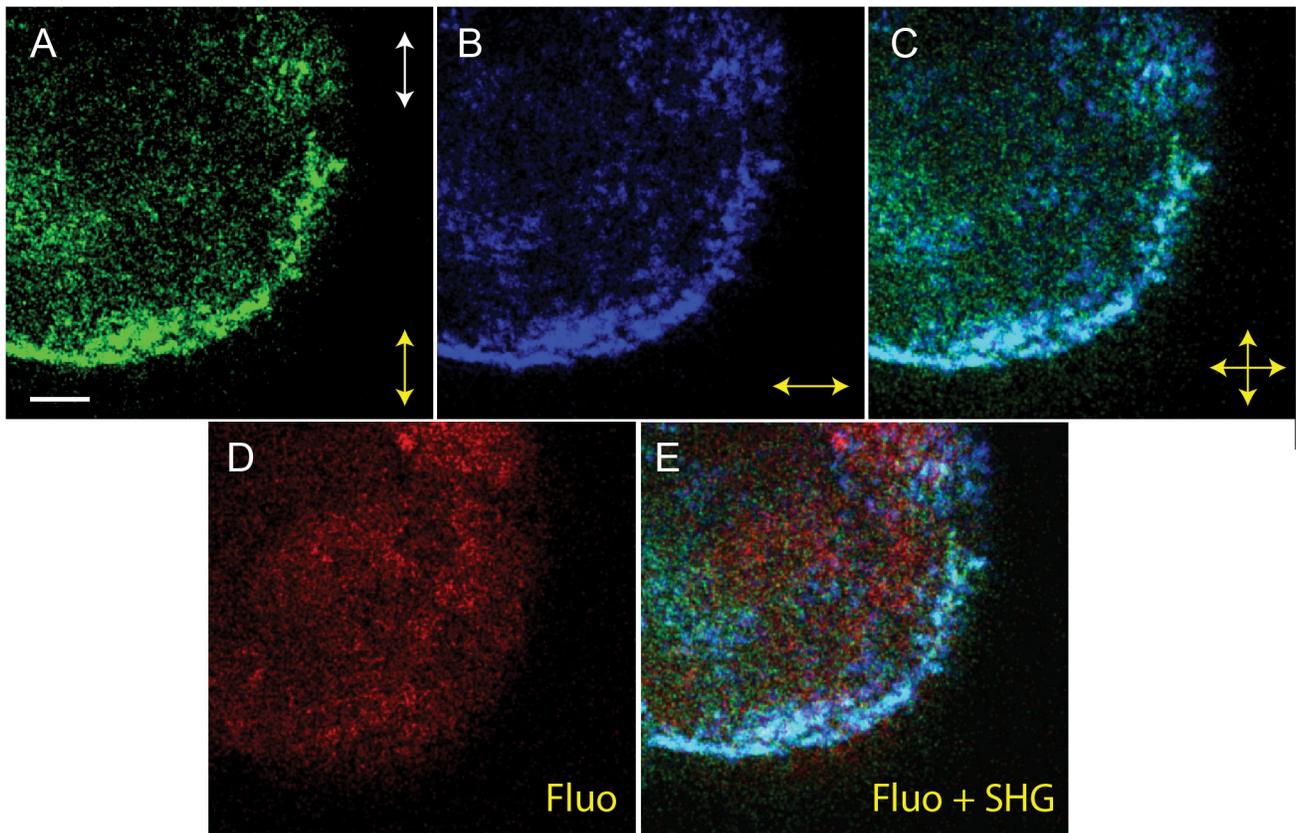


Figura 3.16: Imagen de fluorescencia y SHG de una neurona de Retzius. Imagen de neurona de Retzius sin estimulación eléctrica. A y B son las componentes ortogonales de polarización de los segundos armónicos, su suma se muestra en C. La flecha blanca indica la polarización de la luz de excitación y las flechas amarillas la componente detectada después de pasar por el cubo polarizador. La fluorescencia de la serotonina se muestra en D y en E la suma de los SHG mas la fluorescencia. Cada canal contienen información diferente pero complementaria, la serotonina se encuentra en el interior de la célula alejada de la membrana y asociada a los microtubulos.

## Capítulo 4

# Conclusiones y trabajo a futuro

En este trabajo se presentó un microscopio óptico multifotónico construido en su totalidad en el laboratorio. El microscopio tiene la capacidad de detectar fluorescencia producida por serotonina a diferentes concentraciones. También puede resolver estructuras como los microtubulos y la corteza de actina con la generación de segundos armónicos, así como en un futuro, los estudios de la dinámica de sus cambios conformacionales y su grado de anisotropía estudiando sus componentes en polarización.

Nuestro microscopio es comparable con sus contrapartes comerciales en velocidad de captura, procesamiento de imágenes y resolución, con la ventaja de poder ser modificado según se requiera. Tiene la capacidad de ajustar las condiciones experimentales mediante software, camino óptico o detectores. En resumen nuestro equipo tiene las siguientes características:

- 4 imágenes por segundo (ips) de 512 X 512 píxeles, o modificarse por software a 8 ips de 256 X 256 o 1 ips de 1024 X 1024.
- 4 canales simultáneos de captura.
- Cortes en planos focales de media micra.
- Captura de fluorescencia como luz reflejada en dos canales.
- Captura de las componentes de polarización de segundos armónicos en luz transmitida.
- Despliegue y procesamiento de imágenes en tiempo real.
- Capacidad de obtener los espectros de fluorescencia de muestras biológicas en el rango de la luz visible

El equipo cumple con los requerimientos en velocidad, resolución y sensibilidad para estudiar el problema biológico planteado y muchos más. El equipo esta listo para registrar el movimiento de los cúmulos de vesículas de serotonina ante la estimulación eléctrica y reconstruir la maquinaria del movimiento vesicular ya sea en series de tiempo de imágenes o volúmenes en 3D. En la Figura 4.1 se muestra una fotografía de cómo se ve el equipo actualmente.

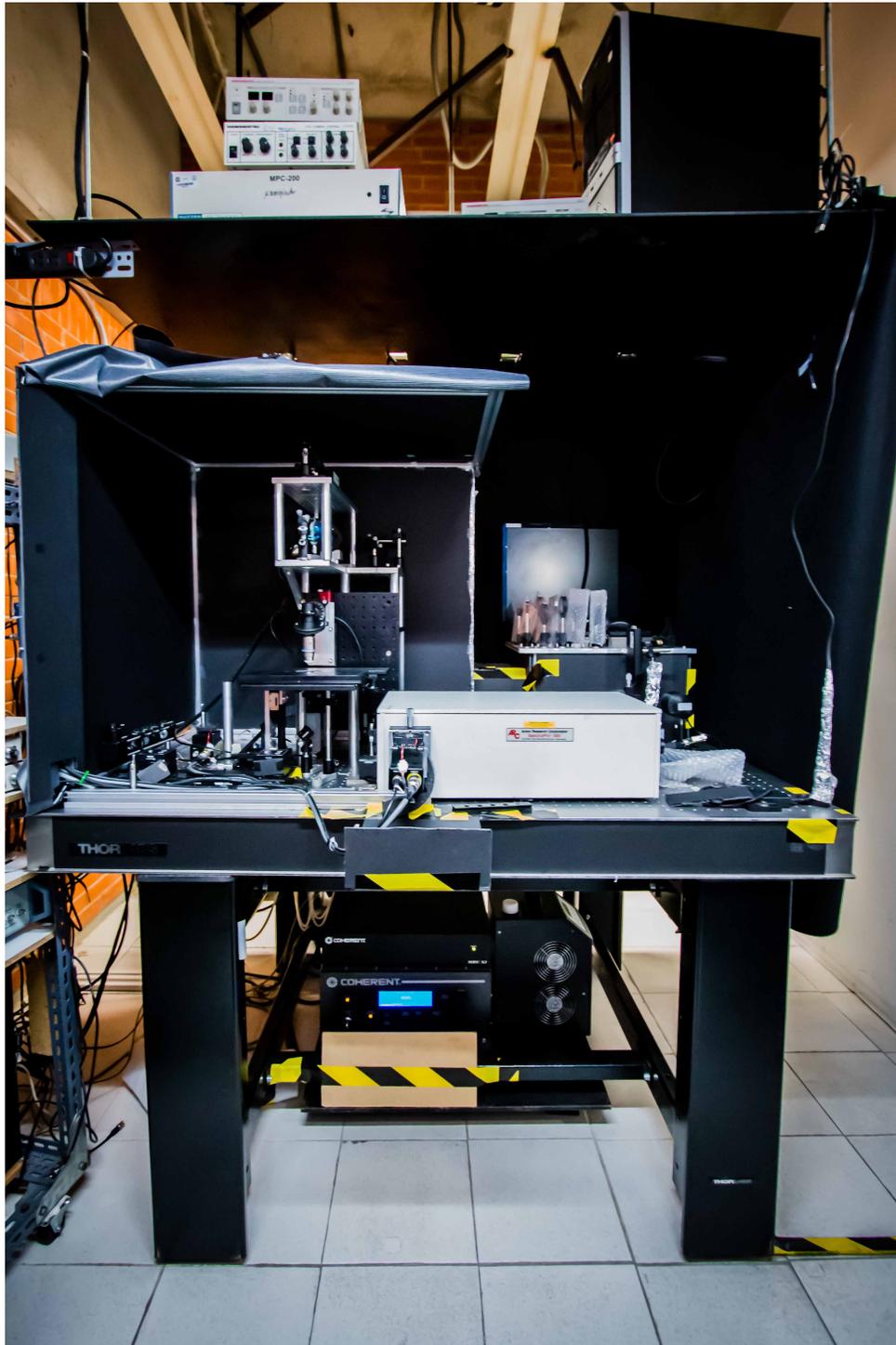


Figura 4.1: Fotografía del microscopio construido durante este proyecto. El microscopio está montado en una mesa antivibratoria y cada una de sus componentes puede ser modificada según se requiera.

Del estudio de la fluorescencia de la serotonina en respuesta a la excitación multifotónica en el rango del IR, encontramos tres emisiones de fluorescencia con diferentes dependencias en concentración, longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) y potencia.

La emisión violeta es la autofluorescencia en respuesta a la excitación de tres fotones, como la describió Webb y sus colegas [11]. Tal emisión ha sido usada para detectar serotonina en células vivas [11, 20, 22, 38, 76, 77]. Las otras dos emisiones tienen un origen no lineal en respuesta a excitación multifotónica, pero están ausentes en respuesta a iluminación monofotónica. Una fluorescencia azul similar fue encontrada previamente, pero ha sido interpretada como un corrimiento de la emisión UV hacia el rojo a concentraciones altas [59]. Sin embargo, nuestros datos sugieren una interpretación completamente diferente, como un producto fotoconvertido como consecuencia de la excitación multifotónica.

Para la fluorescencia verde se ha sugerido que es resultado de una ionización de la serotonina [58]. Sin embargo, protonación o reacciones de oxidación no pueden ser excluidas [56], dado que por ejemplo la protonación o la ionización pueden convertir la serotonina en una molécula capaz de producir fluorescencia verde [56, 78].

La formación de la emisión azul tiene dos posibles orígenes. Uno es que la emisión es producida por un fotoproducto de la serotonina formado independientemente del compuesto que emite en verde. El segundo posible origen es ser una cadena de reacciones que producen el compuesto de la emisión verde y la azul. Nuestras evidencias experimentales apuntan a la fotoconversión directa de la serotonina para producir el compuesto azul.

La longitud de onda más eficiente para producir las tres emisiones fue 700 nm. La emisión en verde fue considerablemente mayor en amplitud que la violeta y la azul y aparece en respuesta a todas las  $\lambda_{exc}$  usadas. Sus características son muy similares a las reportadas por Shear et al [12] en respuesta a longitudes de onda más largas. La fluorescencia azul fue producida mediante la fotoconversión de la serotonina en un compuesto relativamente estable que puede ser excitado mono- o multifotónicamente. Nuestros experimentos hechos en condiciones y pH fisiológicos fueron planeados para ser usados en estudios cuantitativos de sitios de liberación y de la dinámica de serotonina en tejido nervioso. La detección simultánea de dos emisiones puede permitir cuantificar precisamente la concentración de serotonina. También presentamos una representación geométrica multivariable para mostrar cuantitativamente los datos de cada emisión. Tal procedimiento permite seleccionar rutas críticas de experimentación para el estudio de la serotonina en neuronas.

Un aspecto no explorado en este estudio es si los fotoproductos experimentalmente producidos tienen un deterioro o un efecto farmacológico en el tejido vivo. Experimentos preliminares capturando la fluorescencia verde por largos periodos de iluminación de hasta dos horas han mostrado que las neuronas se mantienen vivas y activas. Sin embargo, observaciones similares no existen aún para la emisión azul.

De este proyecto se plantea un problema más a resolver, que de lograrlo expandirá en buena medida nuestro entendimiento del funcionamiento de la comunicación nerviosa, y es romper el límite de difracción óptica para obtener imágenes de vesículas individuales durante la liberación de 5-HT ante estimulación eléctrica, y además ver la captura de la serotonina por parte de las células gliales. Para esto la Dra. Dilia Aguirre Olivas ya caracterizó un modulador espacial de luz y generó el haz dona para implementar la técnica STED (Figura 4.2).

A continuación se describe los pasos necesarios para montar esta técnica de superresolución. Por último se menciona un proyecto más planteado por el Dr. Carlos Treviño llamado FOS (*Fast Optical Signal*), donde con cambios triviales al camino óptico del microscopio podremos medir directamente activada eléctrica en neuronas usando luz.

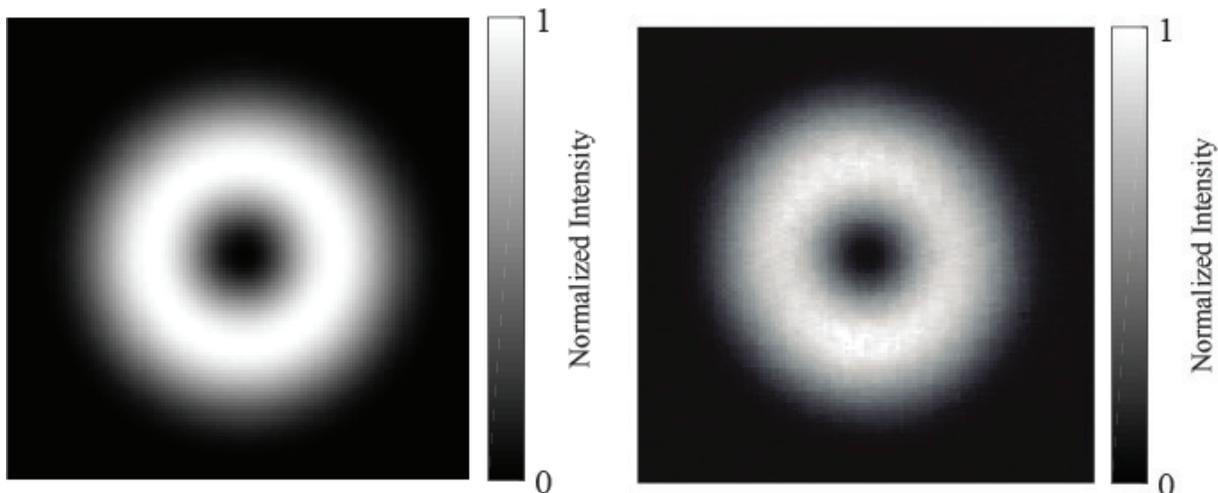


Figura 4.2: Haz dona para la microscopia STED. La Figura muestra el haz dona generado con un modulador espacial de luz. A la izquierda la simulación y a la derecha el generado experimentalmente. La intensidad esta normalizada.

## 4.1. Nanoscopia

Del estudio espectral de la serotonina, los datos indican que a potencias menores a 35 mW las fluorescencias violeta y azul son preferentemente producidas, por el contrario a potencias mayores a los 50 mW la fluorescencia verde domina el espectro. Además se ha propuesto que esta última es el producto de absorber más fotones desde el estado excitado responsable de la emisión violeta [39]. Esta característica de la serotonina abre la posibilidad de generar una emisión o la otra conforme se requiera, en función de la longitud de onda y potencia de excitación. Este propiedad se puede usar para implementar la técnica STED, donde un haz de excitación con perfil Gaussiano produce fluorescencia como en un microscopio convencional y posteriormente con la llegada del haz dona en los bordes del haz de excitación se favorece la transición a otro estado excitado que produce luz que no es parte de la fluorescencia. Al filtrar la luz generada con el haz dona, la fluorescencia de la muestra proviene del centro de la dona. Barriendo los dos haces con los espejos galvanométricos se pueden resolver estructuras más pequeñas que las descritas por el límite de difracción de Abbe.

La Figura 4.3 resume la técnica STED propuesta para nuestro microscopio. El haz del láser es dividido en dos brazos, cada brazo tiene una potencia diferente usando atenuadores. Un brazo del haz es enviado al modulador espacial de luz que cambia su perfil al de un haz dona. El otro brazo mantiene su perfil gaussiano y es adelantado un tiempo  $\tau$  de 3.8 ns, que es el tiempo de vida de la fluorescencia de serotonina [79]. Posteriormente son recombinados y viajan colineales para ser enviados al microscopio. Ya en la muestra el haz normal de excitación induce la fluorescencia violeta con un perfil normal regido por la ecuación del límite de difracción, posteriormente el haz dona llega a la muestra e induce la transición a verde en la periferia. Al final con filtros solo tomamos la fluorescencia proveniente del centro de la dona.

La implementación de esta técnica nos permitirá resolver en principio vesículas individuales dentro de las neuronas.

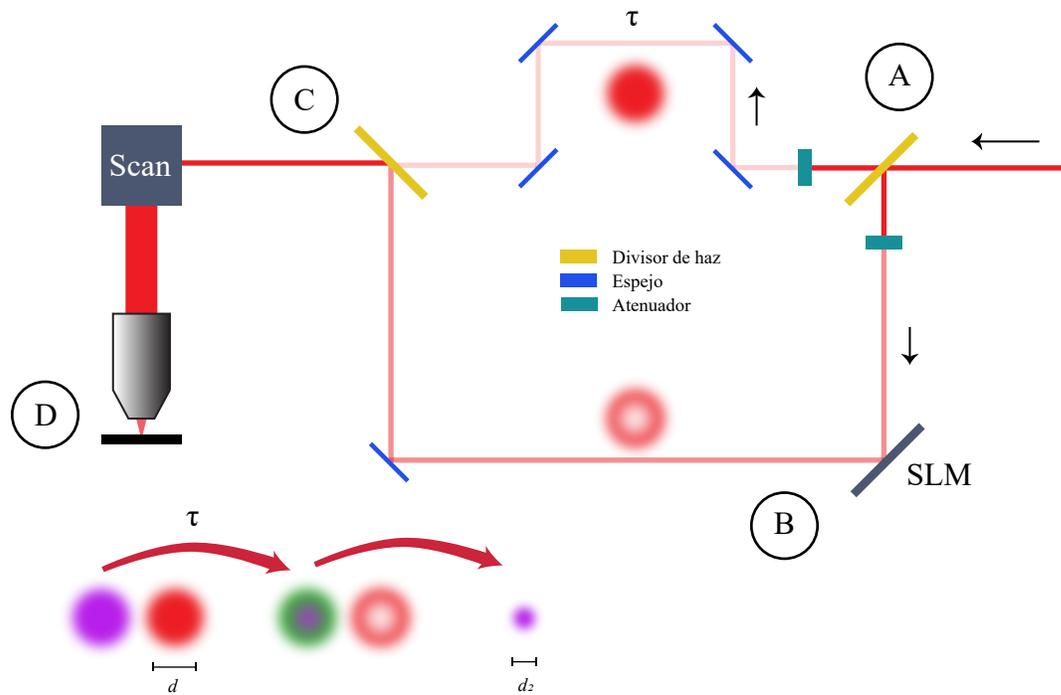


Figura 4.3: Implementación de la nanoscopia STED. Diagrama de la implementación de la técnica STED en nuestro microscopio. En A el haz del láser es dividido en dos brazos, uno es enviado a B donde el haz es transformado a un haz con forma de dona y el otro conserva su perfil gaussiano. En C los dos haces son recombinados y enviados al microscopio. En D el haz normal de excitación induce la fluorescencia violeta con un perfil definido por la ecuación de límite difracción, posteriormente en un tiempo  $\tau$  llega el haz con forma de dona e inicia la transición a la emisión verde en la periferia. Usando filtros eliminamos la fluorescencia verde proveniente de los bordes y solo la fluorescencia del centro de la dona contribuye a la formación de la imagen con una resolución por debajo de los 100 nm.

## 4.2. Señal óptica rápida (FOS)

El estudio de la actividad neuronal usando luz se deriva de los trabajos de Gabrielle Gratton, en los cuales se pretendía detectar indirectamente la actividad neuronal en cerebro de humanos estudiando la atenuación de luz debido al cambio en la concentración de oxy- y deoxyhemoglobina [80]. Ellos notaron que los cambios en la señal óptica eran demasiado cortos para atribuirse a fenómenos hemodinámicos [81] (de ahí el nombre de señales ópticas rápidas). Supusieron que estos cambios podían estar relacionados a la actividad neuronal producidos por el movimiento de iones, cambios en el grosor de la pared membranal como función de la diferencia entre potenciales dentro y fuera de la misma, cambios en la densidad de las vesículas en la terminación presináptica o cambios en la concentración de las sustancias que afectan el índice de refracción del agua, entre otros factores. Gratton apunta que es difícil discernir uno de otro factor, ya que más de un fenómeno parece contribuir a la señal detectada. A partir de esto se han publicado ya gran cantidad de trabajos enfocados en estudiar la actividad neuronal con luz, principalmente en humanos [82].

Aunque los orígenes de la señal óptica rápida fueron en los años 40s, a partir de los trabajos de Keynes y sus colegas Hille y Cohen, donde observaron cambios en la intensidad de la dispersión de la luz en nervios de cangrejo durante la actividad eléctrica [83]. Pero debido a las limitaciones técnicas de la época la idea se abandonó. En trabajos más recientes se ha medido la transmisión de luz en neuronas de moluscos cuando son estimuladas eléctricamente [84] y el cambio en absorción se correlacionó uno a uno con los potenciales de acción de la neurona. Nosotros queremos retomar la idea de medir actividad eléctrica en una sola neurona, como lo es la neurona de Retzius, con un pulso de luz. Gracias a que en el laboratorio se conocen los procesos biofísicos del potencial de acción y la liberación de transmisores, podemos estudiar los cambios en las propiedades de la luz ante actividad neuronal, como son los cambios de polarización, birrefringencia, fluorescencia o bioluminiscencia, etc [85]. El adjetivo de *rápida* se debe a que es más rápida que la hemodinámica y puede estar en el orden de los microsegundos, y su detección se puede hacer con electrónica actual que trabaja en los ordenes de los MHz o incluso usar técnicas de medición de pulsos ultracortos [86] que amplían la escala temporal con la que se pueden resolver los mecanismos biológicos.

Esto promete contribuir al entendimiento de la actividad cerebral, ya que conociendo la distribución temporal de la luz debido a un proceso específico de una sola neurona, nos ayudará a mapear con más precisión circuitos neuronales [87, 88].

En el laboratorio este se plantea como un proyecto nuevo del que tenemos resultados preliminares [89]. Una neurona de Retzius fue iluminada con el láser usando baja potencia de 1 mW. Con un sensor de silicio medimos la luz transmitida. Al incrementar la concentración externa de potasio ( $K^+$ ) a 40 mM en el baño en el que esta inmersa la neurona, se induce una depolarización sostenida durante la presencia del potasio. Detectamos entonces un cambio en la intensidad de la luz transmitida que por el momento no podemos asociar a algún cambio biofísico específico en la neurona (Figura 4.4). A futuro usaremos el equipo de electrofisiología acoplado al microscopio para estimular eléctricamente a la neurona y medir los cambios en absorción de la luz con un diodo con un tiempo de respuesta corto y posteriormente con técnicas más elaboradas analizaremos si hubo un cambio temporal o en frecuencia de la luz durante los potenciales de acción.

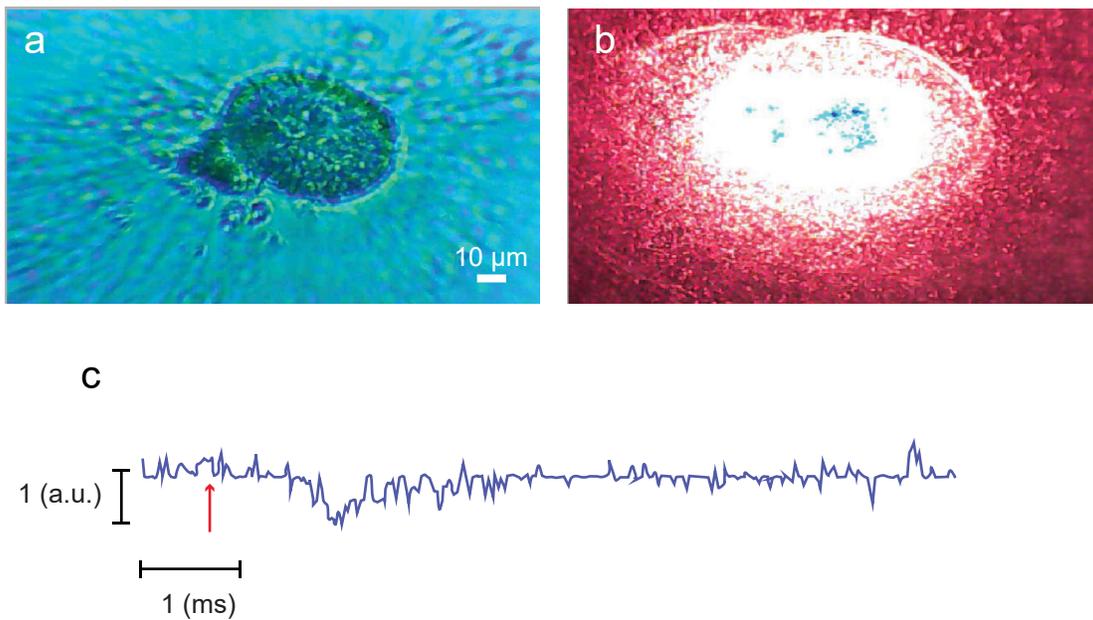


Figura 4.4: Señal óptica rápida en la neurona de Retzius. (a) Una neurona de Retzius en un plato de petri con fondo de vidrio en Ringer. En (b) es irradiada con el láser usando 1 mW de potencia. Simultáneamente se mide en transmisión luz del láser con un sensor de silicio. Al incrementar la concentración de potasio en el baño de la neurona a 40 mM (marcado con la flecha roja) se induce una depolarización sostenida en la neurona. En C se muestra un cambio en la señal ante la estimulación con alto potasio

## Apéndice A

# Componentes ópticas del microscopio multifotónico

<b>Elemento</b>	<b>Número de parte</b>	<b>Fabricante</b>
Espejo dicróico 1	ET650sp-3P	Chroma Technology
Espejo dicróico 2	T585lpxr	Chroma Technology
Espejo dicróico 3	420dclp	Chroma Technology
Espejo dicróico 4	59003bs	Chroma Technology
Lente condensadora	U-TLO	Olympus
Lente de barrido	AC300-050B	Thorlabs
Lente de tubo	AC508-200-B	Thorlabs
Cubo Polarizador	CM1-DCH/M	Thorlabs



# Bibliografía

1. De-Miguel, F. F. y Trueta, C. Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cellular and Molecular Neurobiology* **25**, 297-312. ISSN: 0272-4340 (abr. de 2005).
2. Trueta, C. y De-Miguel, F. F. Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: A source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. *Frontiers in Physiology* **3 SEP**, 1-19. ISSN: 1664042X (2012).
3. Bunin, M. A. y Wightman, R. Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends in Neurosciences* **22**, 377-382. ISSN: 0166-2236 (sep. de 1999).
4. Bruns, D. y Jahn, R. *Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles*. 1995. doi:10.1038/377062a0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7659162>.
5. Bunin, M. A., Prioleau, C., Mailman, R. B. y Wightman, R. M. Release and Uptake Rates of 5-Hydroxytryptamine in the Dorsal Raphe and Substantia Nigra Reticulata of the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* **70**, 1077-1087. ISSN: 00223042 (nov. de 1998).
6. Weiger, W. A. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **72**, 61-95. ISSN: 1464-7931 (mar. de 1997).
7. Trueta, C., Sánchez-Armass, S., Morales, M. A. y De-Miguel, F. F. Calcium-induced calcium release contributes to somatic secretion of serotonin in leech Retzius neurons. *Journal of Neurobiology* **61**, 309-316. ISSN: 00223034 (2004).
8. Nicholls, J. y Kuffler, D. Quantal release of serotonin from presynaptic nerve terminals. *Neurochemistry International* **17**, 157-163. ISSN: 0197-0186 (ene. de 1990).
9. Leon-Pinzon, C., Cercos, M. G., Noguez, P., Trueta, C. y De-Miguel, F. F. Exocytosis of serotonin from the neuronal soma is sustained by a serotonin and calcium-dependent feedback loop. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, 1-17. ISSN: 1662-5102 (2014).
10. Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J. y Jahn, R. Quantal release of serotonin. *Neuron* **28**, 205-220. ISSN: 08966273 (2000).
11. Maiti, S., Shear, J. B., Williams, R. M., Zipfel, W. R. y Webb, W. W. Measuring Serotonin Distribution in Live Cells with Three-Photon Excitation. *Science* **275**, 530-532. ISSN: 00368075 (ene. de 1997).
12. Shear, J. B., Xu, C. y Webb, W. W. Multiphoton-Excited Visible Emission by Serotonin Solutions. *Photochemistry and photobiology* **65**, 931-936. ISSN: 0031-8655 (jun. de 1997).
13. Nicholls, J. G. y Baylor, D. A. Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *Journal of neurophysiology* **31**, 740-56. ISSN: 0022-3077 (sep. de 1968).
14. Kristan, W. B., Calabrese, R. L. y Friesen, W. O. Neuronal control of leech behavior. *Progress in Neurobiology* **76**, 279-327. ISSN: 0301-0082 (ago. de 2005).

15. De-Miguel, F. F., Leon-Pinzon, C., Noguez, P. y Mendez, B. Serotonin release from the neuronal cell body and its long-lasting effects on the nervous system. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **370**, 20140196-. ISSN: 1471-2970 (2015).
16. García-Pérez, E., Vargas-Caballero, M., Velazquez-Ulloa, N., Minzoni, A. y De-Miguel, F. F. Synaptic Integration in Electrically Coupled Neurons. *Biophysical Journal* **86**, 646-655. ISSN: 00063495 (ene. de 2004).
17. Trueta, C., Méndez, B. y De-Miguel, F. F. Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *Journal of Physiology* **547**, 405-416. ISSN: 00223751 (2003).
18. Noguez, P., Rubí, J. M. y De-Miguel, F. F. Thermodynamic Efficiency of Somatic Exocytosis of Serotonin. *Frontiers in Physiology* **10**, 473. ISSN: 1664-042X (mayo de 2019).
19. Del-bel, E., De-miguel, F. F. y Rice, M. E. Extrasynaptic Neurotransmission Mediated by Exocytosis and Diffusive Release of Transmitter Substances. *Frontiers in synaptic neuroscience* **10**, 13. (2018).
20. Das, A. K., Maity, B. K., Surendran, D., Tripathy, U. y Maiti, S. Label-Free Ratiometric Imaging of Serotonin in Live Cells. *ACS Chemical Neuroscience* **8**, 2369-2373. ISSN: 1948-7193 (nov. de 2017).
21. Szule, J. A. *y col.* Regulation of synaptic vesicle docking by different classes of macromolecules in active zone material. *PLoS ONE* **7**. ISSN: 19326203. doi:10.1371/journal.pone.0033333 (2012).
22. Kaushalya, S. K. *y col.* Three-photon microscopy shows that somatic release can be a quantitatively significant component of serotonergic neurotransmission in the mammalian brain. *Journal of Neuroscience Research* **86**, 3469-3480. ISSN: 1097-4547 (nov. de 2008).
23. Udenfriend, S., Bogdanski, D. F. y Herbert, W. Fluorescence Characteristics of 5-Hydroxytryptamine (Serotonin ). *Science* **122**, 972-973 (1955).
24. Udenfriend, S., Titus, E. y Weissbach, H. THE IDENTIFICATION OF 5-HYDROXY-3-INDOLEACETIC URINE AND A METHOD FOR ITS ASSAY. *Journal of Biological Chemistry* (1955).
25. Svoboda, K. y Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* **50**, 823-39. ISSN: 0896-6273 (jun. de 2006).
26. Campagnola, P. J., Clark, H. A., Mohler, W. A., Lewis, A. y Loew, L. M. Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *Journal of Biomedical Optics* **6**, 277-286 (2001).
27. Minsky, M. *Microscopy Apparatus* 1961.
28. Wilson, T. ( y Sheppard, C. J. R. *Theory and practice of scanning optical microscopy* 213. ISBN: 0127577602 (Academic Press, 1984).
29. Denk, W., Strickler, J. H. y Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science (New York, N.Y.)* **248**, 73-6. ISSN: 0036-8075 (1990).
30. Mertz, J. *Introduction to Optical Microscopy* 1st Editio. English, 413. ISBN: 9780981519487 (Roberts y Company Publishers, Greenwood Village, Colo, mayo de 2009).
31. Majewska, A., Yiu, G. y Yuste, R. A custom-made two-photon microscope and deconvolution system. *Pflgers Archiv European Journal of Physiology* **441**, 398-408. ISSN: 0031-6768 (dic. de 2000).
32. Lechleiter, J. D., Lin, D.-T. y Sieneart, I. Multi-photon laser scanning microscopy using an acoustic optical deflector. *Biophysical journal* **83**, 2292-2299. ISSN: 00063495 (2002).
33. Tsai, P. S. *y col.* en *In Vivo Optical Imaging of Brain Function* (ed. Frostig, R. D.) 1.<sup>a</sup> ed., 113-171 (CRC Press/Taylor & Francis, 2002).
34. Kaiser, W. y Garrett, C. G. B. Two-Photon Excitation in CaF<sub>2</sub>:Eu<sup>2+</sup>. *Physical Review Letters* **7**, 229-231. ISSN: 0031-9007 (sep. de 1961).

35. He, G. S., Reinhardt, B. A., Bhawalkar, J. D. y Prasad, P. N. Three-photon-absorption-induced fluorescence and optical limiting effects in an organic compound. *Optics Letters* **20**, 1524. ISSN: 0146-9592 (jul. de 1995).
36. He, G. S., Markowicz, P. P., Lin, T.-C. y Prasad, P. N. Observation of stimulated emission by direct three-photon excitation. *Letters to nature* **415**, 767. ISSN: 1476-4687 (feb. de 2002).
37. Liaros, N. y Fourkas, J. T. The Characterization of Absorptive Nonlinearities. *Laser & Photonics Reviews* **1700106**, 1700106. ISSN: 18638880 (2017).
38. Balaji, J., Desai, R. y Maiti, S. Live Cell Ultraviolet Microscopy: A Comparison between Two- and Three-Photon Excitation. *Microscopy Research and Technique* **63**, 67-71. ISSN: 1059910X (ene. de 2004).
39. Gostkowski, M. L. y col. Multiphoton-excited serotonin photochemistry. *Biophysical Journal* **86**, 3223-9. ISSN: 0006-3495 (mayo de 2004).
40. Zipfel, W. R., Williams, R. M. y Webb, W. W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology* **21**, 1369-77. ISSN: 1087-0156 (nov. de 2003).
41. Shear, J. B., Brown, E. B. y Webb, W. W. Multiphoton-excited fluorescence of fluorogen-labeled neurotransmitters. *Analytical chemistry* **68**, 1778-83. ISSN: 0003-2700 (mayo de 1996).
42. Williams, R. M., Zipfel, W. R. y Webb, W. W. Multiphoton microscopy in biological research. *Current opinion in chemical biology* **5**, 603-8. ISSN: 1367-5931 (oct. de 2001).
43. Benninger, R. K. P., Hao, M. y Piston, D. W. Multi-photon excitation imaging of dynamic processes in living cells and tissues, 71-92 (2008).
44. New, G. *Nonlinear Optics 257*. ISBN: 9780521877015 (Cambridge University Press, 2011).
45. Boyd, R. W. *Nonlinear optics* 613. ISBN: 9780123694706 (Academic Press, 2008).
46. Xu, C. y Webb, W. W. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. EN. *Journal of the Optical Society of America B* **13**, 481. ISSN: 0740-3224 (mar. de 1996).
47. Horton, N. G. y col. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature photonics* **7**, 205-209. ISSN: 1749-4885 (mar. de 2013).
48. Stanciu, S. G. *Microscopy and Analysis* (ed. Stanciu, S. G.) ISBN: 978-953-51-2578-5. doi:10.5772/61531. <http://www.intechopen.com/books/microscopy-and-analysis> (InTech, sep. de 2016).
49. Freund, I. y Deutsch, M. Second-harmonic microscopy of biological tissue. *Optics Letters* **11**, 94. ISSN: 0146-9592 (1986).
50. Han, M., Giese, G. y Bille, J. F. Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Optics Express* **13**, 5791-5797 (2005).
51. Williams, R. M., Zipfel, W. R. y Webb, W. W. Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical Journal* **88**, 1377-86. ISSN: 0006-3495 (feb. de 2005).
52. Mertz, J. Nonlinear microscopy: new techniques and applications. *Current opinion in neurobiology* **14**, 610-6. ISSN: 0959-4388 (oct. de 2004).
53. Stoller, P., Reiser, K. M., Celliers, P. M. y Rubenchik, A. M. Polarization-Modulated Second Harmonic Generation in Collagen. *Biophysical Journal* **82**, 3330-3342. ISSN: 0006-3495 (2002).
54. Stoller, P., Celliers, P. M., Reiser, K. M. y Rubenchik, A. M. Quantitative Second Harmonic Generation Microscopy in Collagen. *Appl. Opt.* **42**, 5209-5219 (2003).
55. Szeitz, A. y Bandiera, S. M. Analysis and measurement of serotonin. *Biomedical Chromatography* **32**. ISSN: 10990801. doi:10.1002/bmc.4135 (2018).

56. Chen, R. F. Fluorescence of protonated excited-state forms of 5-hydroxytryptamine (serotonin) and related indoles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **60**, 598-605. ISSN: 0027-8424 (1968).
57. Duggan, D. E., Bowman, R. L., Brodie, B. B. y Udenfriend, S. A Spectrophotofluorometric Study of Compounds of Biological Interest. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **68**, 1-14. ISSN: 10960384 (1957).
58. Chattopadhyay, A., Rukmini, R. y Mukherjee, S. Photophysics of a neurotransmitter: ionization and spectroscopic properties of serotonin. *Biophysical Journal* **71**, 1952-60. ISSN: 0006-3495 (1996).
59. Kaushalya, S. K., Nag, S., Balaji, J. y Maiti, S. Serotonin Multiphoton Imaging and Relevant Spectral Data. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* **6860**, 68601C-68601C-8. ISSN: 0277786X (2008).
60. Rust, M. J., Bates, M. y Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* **3**, 793-795. ISSN: 1548-7091 (oct. de 2006).
61. Betzig, E. y col. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 1642-1645. ISSN: 0036-8075 (sep. de 2006).
62. Gustafsson, M. G. L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13081-6. ISSN: 0027-8424 (sep. de 2005).
63. Hell, S. W. y Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters* **19**, 780-782 (1994).
64. Dyba, M., Jakobs, S. y Hell, S. W. Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy. *Nature biotechnology* **21**, 1303-4. ISSN: 1087-0156 (nov. de 2003).
65. Nägerl, U. V., Willig, K. I., Hein, B., Hell, S. W. y Bonhoeffer, T. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18982-7. ISSN: 1091-6490 (dic. de 2008).
66. Westphal, V. y col. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 246-249. ISSN: 0036-8075 (abr. de 2008).
67. Hernandez-Mendoza, G. A. *Desarrollo de un microscopio multifotonico para la captacion de fluorescencia y segundos armonicos para estudios biologicos* 80 (2013).
68. Hecht, E. *Optics* 625-627. ISBN: 0022-3727. doi:10.1088/0022-3727/42/9/095010 (Pearson, 2016).
69. Yuste, R. y Konnerth, A. *Imaging in neuroscience and development : a laboratory manual* 854. ISBN: 0879696893 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005).
70. Sato, K., Ozaki, H. y Karaki, H. Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura 2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **246**, 294-300. ISSN: 0022-3565 (1988).
71. Tan, H. Y. y col. Multiphoton fluorescence and second harmonic generation imaging of the structural alterations in keratoconus ex vivo. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **47**, 5251-5259. ISSN: 01460404 (2006).
72. Tanaka, Y., Hase, E., Fukushima, S. I., Araki, T. y Yasui, T. Fast Polarization-resolved SHG Microscopy for in Vivo Imaging of Collagen Orientation. *Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering* **51**, 38-45. ISSN: 1347443X (2013).
73. Yasui, T., Tohno, Y. y Araki, T. Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Applied optics* **43**, 2861-2867. ISSN: 0003-6935 (2004).

74. Noguez, P., Rubí, J. M. y De-Miguel, F. F. Thermodynamic Efficiency of Somatic Exocytosis of Serotonin. *Frontiers in physiology* **10**, 473. ISSN: 1664-042X (2019).
75. Moreaux, L., Sandre, O. y Mertz, J. Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. EN. *Journal of the Optical Society of America B* **17**, 1685. ISSN: 0740-3224 (oct. de 2000).
76. Williams, R. M., Shear, J. B., Zipfel, W. R., Maiti, S. y Webb, W. W. Mucosal mast cell secretion processes imaged using three-photon microscopy of 5-hydroxytryptamine autofluorescence. *Biophysical journal* **76**, 1835-1846. ISSN: 00063495 (1999).
77. Maity, B. K. y Maiti, S. Label-free imaging of neurotransmitters in live brain tissue by multi-photon ultraviolet microscopy. *Neuronal Signaling* **2**, NS20180132. ISSN: 2059-6553 (2018).
78. Kishi, T., Tanaka, M. y Tanaka, J. Electronic Absorption and Fluorescence Spectra of 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). Protonation in the Excited State. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **50**, 1267-1271 (1977).
79. Botchway, S. W., Parker, A. W., Bisby, R. H. y Crisostomo, A. G. Real-time cellular uptake of serotonin using fluorescence lifetime imaging with two-photon excitation. *Microscopy research and technique* **71**, 267-73. ISSN: 1059910X (abr. de 2008).
80. Ferrari, M. y Quaresima, V. A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application. *NeuroImage* **63**, 921-935. ISSN: 10538119 (nov. de 2012).
81. Gratton, G., Corballis, P. M., Cho, E., Fabiani, M. y Hood, D. C. Shades of gray matter: noninvasive optical images of human brain responses during visual stimulation. *Psychophysiology* **32**, 505-9. ISSN: 0048-5772 (sep. de 1995).
82. Wolf, M., Ferrari, M. y Quaresima, V. Progress of near-infrared spectroscopy and topography for brain and muscle clinical applications. *Journal of biomedical optics* **12**, 062104. ISSN: 1083-3668 (2014).
83. Hill, D. K. y Keynes, R. D. Opacity changes in stimulated nerve. *Journal of Physiology* **108**, 278-281 (1948).
84. Stepnoski, R. a. y col. Noninvasive detection of changes in membrane potential in cultured neurons by light scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 9382-6. ISSN: 0027-8424 (nov. de 1991).
85. Medvedev, A. V., Kainerstorfer, J., Borisov, S. V., Barbour, R. L. y VanMeter, J. Event-related fast optical signal in a rapid object recognition task: improving detection by the independent component analysis. *Brain research* **1236**, 145-58. ISSN: 0006-8993 (oct. de 2008).
86. Monmayrant, A., Weber, S. y Chatel, B. A newcomer's guide to ultrashort pulse shaping and characterization. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics* **43**, 103001. ISSN: 09534075 (mayo de 2010).
87. Blasi, a. y col. Investigation of depth dependent changes in cerebral haemodynamics during face perception in infants. *Physics in medicine and biology* **52**, 6849-64. ISSN: 0031-9155 (dic. de 2007).
88. Gratton, G. y col. Rapid changes of optical parameters in the human brain during a tapping task. *Journal of cognitive neuroscience* **7**, 446-56. ISSN: 0898-929X (ene. de 1995).
89. Chen, Y. y Kateb, B. *Neurophotonics and brain mapping* ISBN: 9781482236859 (2017).