



Proyecto Final de Carrera

Sistema de fotometría de fibra óptica para registrar actividad neuronal en animales en libre movimiento

Autor:

Franco Chiesa Docampo - 53224

Tutor:

Dr. Joaquin Piriz

ÍNDICE

1. Introducción	6
1.1. Objetivo	6
1.2. Optogenética	6
2. Dispositivo	11
2.1. Implementación	11
2.1.1. Teoría de fibras ópticas	12
2.1.2. Camino óptico	28
2.1.3. Time-Division Multiplexing	37
2.1.4. Parámetros	38
2.2. Hardware y Software	43
2.2.1. Arduino Mega 2560	43
2.2.2. Drivers y LEDs	44
2.2.3. Inversión de los PWMs de estimulación	48
2.2.4. Cámara FLIR y programa FlyCap2	49
2.2.5. Bonsai Software	56
2.2.6. 16-bit Timer/Counter (1, 3, 5)	58
3. Instrucciones del sistema	62
3.1. Instalación	62
3.2. Seguridad	63
3.3. Calibración y uso	64
4. Prueba del sistema	70
5. Análisis de los datos	89
5.1. Secuencia de procesamiento	89
5.1.1. Cuadrados Mínimos Penalizados	91
5.1.2. AirPLS	93

6. Futuros desarrollos y conclusiones	109
7. Anexo	110
7.1. Lista de materiales del sistema	110
7.2. Especificaciones técnicas de los LEDs	116
8. Bibliografía	122

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

LED	<i>Light-emitting diode</i>
GECI	<i>Genetically Encoded Calcium Indicator</i>
BAPTA	<i>1, 2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid</i>
MYLK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
CaM	<i>Calmodulin</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GCaMP6f	<i>GCaMP6 fast</i>
SNR	<i>Signal-to-Noise ratio</i>
TIR	<i>Total Internal Reflection</i>
NA	<i>Numerical aperture</i>
UV	Ultravioleta
ULC	<i>Underfilled Launch Condition</i>
OLC	<i>Overfilled Launch Condition</i>
PWM	<i>Pulse Width Modulation</i>
FC/PC	<i>Fiber Channel/Physical Contact</i>
MM	<i>Mirror mount</i>
CC	Cage cube
CMOS	<i>Complementary metal-oxide-semiconductor</i>
AC	Acople de cubos

V	Varillas
LC	Lente colimadora
F1	Filtro dicroico para combinar los dos haces de luz
F2	Filtro dicroico reflector de fluorescencia
F3	Filtro pasabanda de emisión
MFD	<i>Mode-Field Diameter</i>
W	Diámetro del rayo en el plano focal principal de la lente
D	Diámetro de fibra óptica
IDE	<i>Integrated Development Environment</i>
TDM	<i>Time-Division Multiplexing</i>
FPS	<i>Frames Per Second</i>
DC	<i>Duty-cycle</i>
UART	<i>Universal Asynchronous Receiver-Transmitter</i>
TTL	<i>Transistor-Transistor Logic</i>
DC	<i>Direct current</i>
AC	<i>Alternating current</i>
GPIO	<i>General Purpose Input/Output</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
COMnx	<i>Compare Output Mode</i>
WGMnm	<i>Waveform Generation Mode</i>
CSnm	<i>Clock Select</i>

TCCR _n x	<i>Timer/Counter Control register</i>
ICR _n	<i>Input Capture Register</i>
TCNT _n	<i>Timer/Counter register</i>
GUI	<i>Graphical User Interface</i>
AirPLS	<i>Reweighted Penalized Least Squares</i>

1. Introducción

1.1. Objetivo

El objetivo de este trabajo es presentar la investigación y desarrollo de un sistema cuyo fin es registrar por medios ópticos la actividad poblacional de neuronas identificables genéticamente. Se trata de una iniciativa conjunta para armar un equipo de fácil uso y mantenimiento. Detallando su forma de instalación, calibración y funcionamiento.

El presente trabajo además busca aportar una alternativa a la tecnología científica vigente en la industria, ofreciendo un dispositivo accesible y de bajo costo. Hoy en día los precios de los productos científicos provenientes de empresas internacionales representan una barrera a la investigación. Las soluciones comerciales comienzan alrededor de los 10.000 dólares y se elevan hasta los 25.000. El costo del dispositivo desarrollado en este proyecto es de 2600 dólares en total.

1.2. Optogenética

La Neurociencia de Sistemas estudia cómo diferentes regiones del cerebro dan lugar al comportamiento. Esto se lleva a cabo analizando la dinámica del funcionamiento celular, cubriendo desde el nivel molecular al comportamental. La aparición de la optogenética en 2005 [1] revolucionó esta sub-disciplina de la neurociencia al permitir la manipulación precisa de la actividad de grupos definidos de neuronas. El principio general de la optogenética es la inserción de proteínas quiméricas que cambian su conformación en presencia de luz y permiten medir o modificar procesos celulares, como la excitabilidad neuronal [2; 3].

GCaMP6 es una proteína comúnmente utilizada en optogenética, la cual se destaca por ser un fluoróforo que permite medir la actividad neuronal cuando se lo irradia con un haz de longitud de onda determinada [4].

GCaMP6 pertenece a la familia de los indicadores de calcio genéticamente codificados (GECIs por sus siglas en inglés). Los GECIs cambian su fluorescencia dependiendo de si están enlazados o no al calcio. Se considera al calcio un buen *proxy* (representante) de la actividad neuronal debido a que cuando las mismas disparan potenciales de acción se abren canales de calcio voltaje dependientes produciendo un aumento transitorio en su concentración intracelular que resulta en un transiente de fluorescencia por parte del GECI [5]. A continuación se desarrollará en mayor profundidad la función del calcio y las distintas técnicas que se fueron adoptando a lo largo del tiempo para poder utilizarlo como un representante de la actividad neuronal.

La concentración intracelular de iones libres de calcio divalentes, $[Ca^{+2}]$, regula un amplio rango de funciones en nuestro organismo [6; 7]. Lo que distingue a dicho elemento respecto del resto de los iones intracelulares, es que la magnitud de los cambios en $[Ca^{+2}]$ es particularmente alta durante los procesos fisiológicos que dan lugar a la comunicación neuronal [8]. En las neuronas, el disparo de potenciales de acción provoca grandes flujos entrantes de Ca^{+2} a través de los canales de calcio voltaje dependientes localizados en la membrana celular [9]. Generando un patrón espacio-temporal que está fuertemente correlacionado a la actividad neuronal [10]. Por lo tanto, el estudio de los disparos neuronales y patrones sinápticos en el tiempo puede ser llevado a cabo monitoreando la dinámica de los flujos de calcio intracelular [10; 11; 12].

Históricamente, la concentración de calcio era monitoreada empalando células con microelectrodos sensibles a dicho ion [13], mediante microinyecciones de proteínas bioluminiscentes [14] o con colorantes sintéticos no-fluorescentes metalocrómicos [15]. La era moderna de los indicadores de calcio comenzó con la síntesis de colorantes fluorescentes basados en BAPTA, un agente quelante calcio-específico [13]. Estos marcadores tienen propiedades deseables como: elevada fluorescencia (*100-fold*) dependiente de la concentración de Ca^{+2} , alta especificidad a iones Ca^{+2} respecto de otros cationes divalentes, cinética rápida y un amplio espectro de

excitación y emisión [16]. Por estas cualidades, se considera que estos indicadores fluorescentes pueden cuantificar de forma confiable los cambios en la concentración de calcio intracelular asociados a la actividad neuronal [11]. Sin embargo, estas pequeñas moléculas tienen también sus limitaciones: pueden ser muy difíciles de introducir dentro de las neuronas de interés en un cerebro intacto [17], pueden acumularse de forma contraproducente en determinados compartimientos intracelulares [18] y también pueden ser extruidas del citoplasma luego de varias horas [18]. Además, mediante el uso de este tipo de colorante, resulta imposible efectuar mediciones crónicas de las mismas células *in vivo*. Y los pigmentos fluorescentes no pueden ser aplicados a determinadas células de forma específica. Tampoco es posible dirigirlos a poblaciones o áreas subcelulares en particular [19].

Los GECIs, basados en proteínas recombinantes fluorescentes, tienen la capacidad de lidiar con todos los problemas anteriormente mencionados [7]. Estos indicadores pueden ser dosificados de forma mínimamente invasiva para determinados tipos de células o compartimientos subcelulares específicos [20]. Y además son compatibles con mediciones *in vivo* repetibles a largo plazo [21].

La GCaMP es una proteína quimérica conformada por una proteína alostérica como la calmodulina CaM, que sufre un cambio conformacional luego de la unión con el calcio, acoplada a un señalizador óptico [20] y un actuador conformacional que magnifica el cambio dependiente de calcio [20]. Este actuador es el péptido M13 (M13pep), proveniente de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MYLK). Dicho péptido es capaz de unirse a la CaM cuando la misma se encuentra ligada a un ion Ca^{+2} [20]. La conjunción de los términos *green fluorescent protein* (GFP por sus siglas en inglés), CaM y M13pep dan lugar al nombre GCaMP. La arquitectura molecular de la GCaMP y su mecanismo de emisión de fluorescencia se ilustran en la Figura 1.

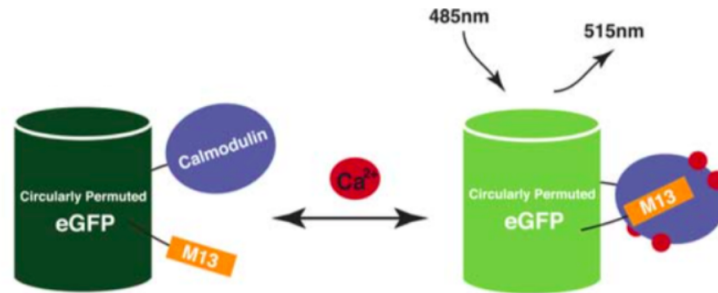


Figura 1. Representación esquemática del funcionamiento de GCaMP. Al unirse un ion calcio, el cambio conformacional de la CaM y la formación del complejo CaM-M13pep incrementa la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) circularmente permutada [7]. Nótese que cuando un haz de longitud de onda de 485 nm incide sobre dicha estructura, ocurren cambios conformacionales que van a dar lugar a la emisión de fluorescencia (515 nm).

Como se puede ver en el gráfico reciente, debe haber una fuente lumínica de estimulación que pertenezca a una longitud de onda específica para que la emisión de fluorescencia dependiente de calcio ocurra. Por ejemplo, la GCaMP6 puede ser excitada con luz azul de 470 nm para emitir luz verde en presencia de calcio. Permitiendo medir de forma indirecta la actividad neuronal a través de sus cambios en fluorescencia.

A continuación se puede observar el espectro de excitación y emisión para la proteína GCaMP6f. Una de las últimas versiones de la GCaMP6 que tiene un tiempo de decaimiento corto, lo cual le permite representar dinámicas de calcio más rápidas.

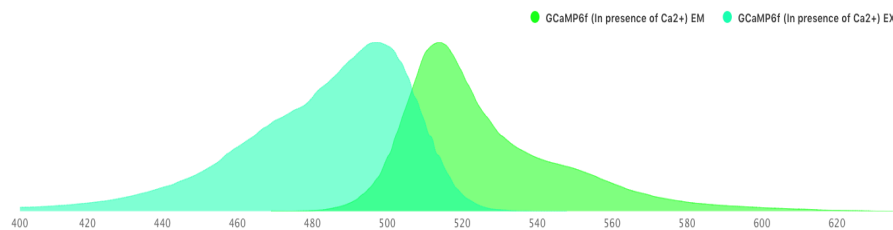


Figura 2. Espectro de emisión y excitación para la proteína GCaMP6f [22].

Como se puede ver en el siguiente gráfico, para la proteína GCaMP6f bajo estimulación lumínica entre 450 y 490 nm, la mayor parte de la información se encuentra dentro de los primeros 2 segundos luego de que se dispara un potencial de acción [5]. El pico de la señal está alrededor de los primeros 250 milisegundos. En este experimento, la estimulación lumínica consistió en una onda sinusoidal de 1 Hz de frecuencia y duración de 4 segundos [5].

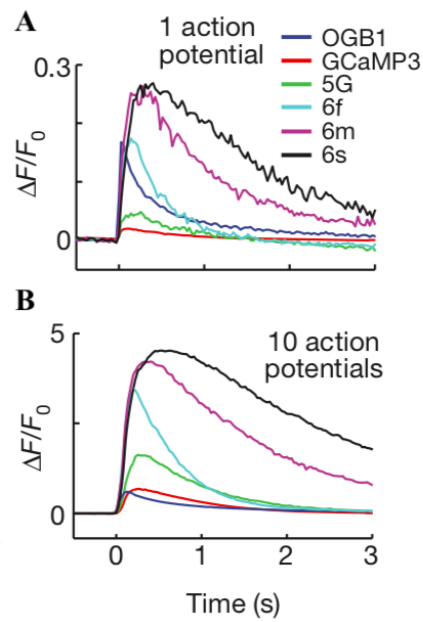


Figura 3. Respuestas promediadas a lo largo de múltiples neuronas para GCaMP3, 5G, 6f, 6m, 6s, and OGB1-AM. A) Cambios en la fluorescencia en respuesta a 1 potencial de acción [5]. B) 10 potenciales de acción. $\frac{\Delta F}{F_0}$ es una medida que cuantifica la fluorescencia. En la siguiente sección se va a desarrollar más sobre este concepto.

2. Dispositivo

2.1. Implementación

Fiber Photometry es un método en el que a través de una fibra óptica implantada en el cerebro del animal, se conduce luz de excitación de 470 nm dirigida a neuronas que expresan indicadores GCaMP6 y se recolecta la fluorescencia emitida [23]. Lo cual permite estimar la actividad neuronal a través de los cambios en fluorescencia. En esta técnica, se efectúa la suma de la fluorescencia total del conjunto de neuronas que expresan este indicador de calcio. Permitiendo estudiar el comportamiento de estructuras cerebrales (a nivel profundo) en animales moviéndose libremente. Esta herramienta se convirtió en la elección de muchos investigadores en el campo de la Neurociencia de Sistemas debido a diversos factores: su relativa simpleza comparada con otras técnicas de registro *in vivo*, la elevada relación señal/ruido que brinda y la flexibilidad a la hora de diseñar experimentos [23].

Luego de consultar distintas fuentes bibliográficas, se decidió incorporar una segunda longitud de onda violeta (que puede ser de 405 nm, 410 nm o 415 nm) en desfase de 180 grados respecto de la primera longitud de onda [23; 24; 25; 26; 27]. La GCaMP6 fluoresce también cuando se la excita con esta longitud de onda pero dicha fluorescencia no cambia con la concentración de calcio. Por esa razón se considera que la GCaMP6 (en presencia de calcio) es isobéptica en el rango de los 405 a 415 nm. En espectroscopia, el punto isobéptico es una longitud de onda específica en la que la absorbancia total de la muestra no cambia durante una reacción química. Con lo cual, un haz de luz cuya longitud de onda se encuentre en este rango, va a servir como línea de base para la señal de emisión de fluorescencia correspondiente a la de 470 nm [23; 24; 25; 29]. En el informe (para referirse a este segundo rayo de excitación) se va a hacer mención al LED de 410 nm o 415 nm. Sin embargo, se terminó instalando en el equipo un LED de 415 nm debido a que el de 410 nm sufrió un desperfecto técnico durante el transcurso del trabajo.

Para poder cuantificar los cambios en fluorescencia se va a emplear la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta F}{F_o} = \frac{F - F_o}{F_o} \cdot 100\% \quad (1)$$

Donde F_o es la intensidad de fluorescencia de la línea de base y F es la intensidad de fluorescencia de la señal que depende de la concentración de calcio. Para poder realizar la sustracción entre ambas señales, se va a ajustar la señal de 410 nm normalizada sobre la de 470 nm también normalizada para que coincidan en el vector de tiempo.

Un parámetro importante que sirve para medir la calidad de la señal es la relación señal ruido (*signal-to-noise ratio* o SNR):

$$SNR = \frac{\mu}{\sigma} \quad (2)$$

La variable μ es la media de la señal y σ es la desviación estándar de la misma.

Antes de seguir explicando cómo opera el sistema es necesario dar un poco de teoría acerca del funcionamiento general de las fibras ópticas. Para esta parte se utilizó principalmente la información técnica provista por [Thorlabs](#), la cual puede accederse a través de los links que figuran en la lista de materiales.

2.1.1. Teoría de fibras ópticas

Las fibras ópticas forman parte de una clase de componentes denominados guía de ondas, que hacen uso de la reflexión total interna (TIR por sus siglas en inglés) para confinar y conducir luz dentro de una estructura sólida. La TIR ocurre cuando un rayo de luz, que se encuentra en un medio de índice de refracción mayor, incide sobre otro medio a un ángulo de incidencia igual o mayor que el ángulo crítico. Como se puede ver en la siguiente representación:

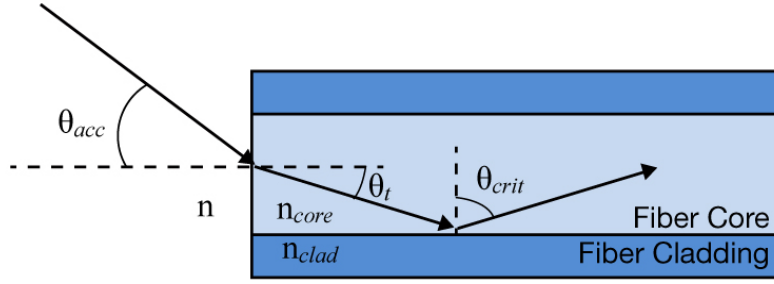


Figura 4. Reflexión total interna en una fibra óptica.

Las fibras utilizadas en este sistema están compuestas de sílice en su núcleo (*core*) y polímero en su revestimiento (*cladding*). Y poseen una estructura de índice escalonado (*step-index*). Las fibras de índice escalonado tienen un núcleo interno compuesto por un material cuyo índice de refracción es mayor que el material de revestimiento que rodea a dicho núcleo. Dentro de la fibra, existe un ángulo crítico de incidencia para que la luz se refleje en la interfaz núcleo/revestimiento (*core/cladding*) en lugar de refractar hacia el medio circundante a la fibra. En la capa más externa de la fibra óptica hay un recubrimiento final denominado *buffer coating*.

Para cumplir con las condiciones de TIR en la fibra, el ángulo de incidencia de la luz entrante a la misma debe ser menor que un cierto valor. El cual es definido como el ángulo de aceptación (*acc* por una abreviación del inglés). La ley de Snell es utilizada para calcular dicho ángulo:

$$\sin \theta_{crit} = \frac{n_{clad}}{n_{core}} = \cos \theta_t \quad (3)$$

$$n \sin \theta_{acc} = n_{core} \sqrt{1 - \cos^2 \theta_t} = \sqrt{n_{core}^2 - n_{clad}^2} \quad (4)$$

Donde n_{core} es el índice de refracción del núcleo de la fibra, n_{clad} es el índice de refracción del revestimiento de la fibra, n es el índice de refracción del medio externo a la fibra, θ_{crit} es el ángulo crítico y θ_{acc} es el ángulo de aceptación a la cara entrante a la fibra.

La apertura numérica (NA por sus siglas en inglés) es un parámetro adimensional que sirve para especificar el ángulo de aceptación de una fibra óptica y se lo define como:

$$NA = n \sin \theta_{acc} = \sqrt{n_{core}^2 - n_{clad}^2} \quad (5)$$

En fibras de índice escalonado, el NA puede ser calculado directamente usando esta ecuación. Los fabricantes de fibra óptica suelen dar este valor en la hoja de especificaciones. NA también define los ángulos del cono de luz que sale de la fibra en el otro extremo (denominado cánula). Una cánula con NA bajo provee de un cono de luz más angosto, resultando en intensidad de luz concentrada en un área más pequeña. Una cánula con NA alto genera un cono de luz que ilumina un área más grande con menor intensidad por unidad de área.

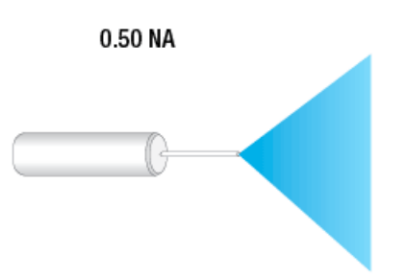


Figura 5. Cánula con NA de 0.50.

En este sistema la apertura numérica es igual a 0.5 para el caso de las fibras conectadas a los 2 LEDs y 0.48 para la fibra óptica que conduce la luz de estimulación lumínica hacia el cerebro del animal. Mientras más grande el NA de la

fibra insertada en el cerebro del animal, mayor va a ser el área irradiada y, por lo tanto, el área de la cual se recolectará fluorescencia.

Cada potencial camino (trayectoria) que la luz puede tomar dentro de una fibra óptica se lo conoce como un modo de transmisión a través de la fibra. Los modos de transmisión en una fibra son determinados por los siguientes factores:

1. Diámetro del núcleo y revestimiento.
2. Índices de refracción.
3. Longitud de onda.

Respecto a la clasificación de las fibras ópticas, las dos variantes más comunes son las fibras monomodo y multimodo. Las fibras monomodo soportan un solo modo de transmisión para un haz de luz. Las fibras multimodo soportan una gran cantidad de modos de transmisión para un haz de luz.

Al emplear fibras ópticas, ocurre un fenómeno denominado dispersión modal de la luz. Es el resultado de la reflexión de cada rayo individual sobre la pared interna de la fibra. Lo cual provoca que reboten de forma repetida sobre la interfaz núcleo/revestimiento trazando una trayectoria de zig-zag. Como se puede observar en la siguiente imagen.

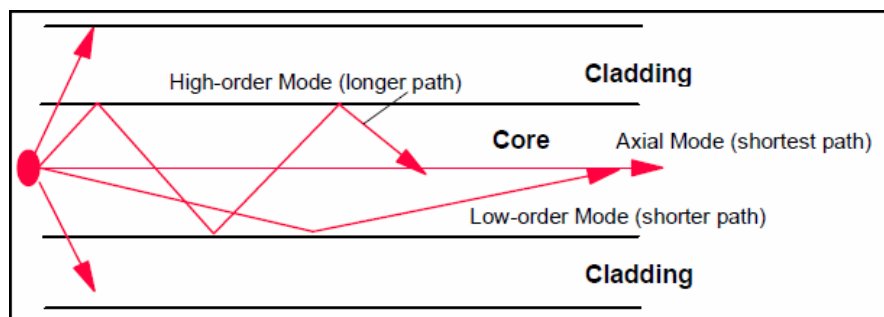


Figura 6. Modos en una fibra óptica multimodo.

Los modos que ingresan a la fibra en ángulos agudos se los denomina modos de alto orden. A estos modos les toma mucho más tiempo viajar a través de la fibra en comparación a los modos de orden bajo debido a que se reflejan muchas más veces.

Como cada modo ocurre en un ángulo diferente respecto al eje de la fibra, cada uno viaja una distancia particular a través de la misma. Solamente 1 modo, el modo de orden 0, atraviesa el largo de la fibra sin reflejarse con las paredes internas.

Una forma de reducir la dispersión modal es usando fibras de índice graduado (*graded-index fiber*). Donde no se utilizan únicamente dos materiales de índice de refracción distinto. En una fibra de índice graduado, el revestimiento de la fibra está dopado de forma tal que el índice de refracción decrece de forma gradual a través de las capas de la fibra. A continuación se muestra un esquema que resume todo lo mencionado.

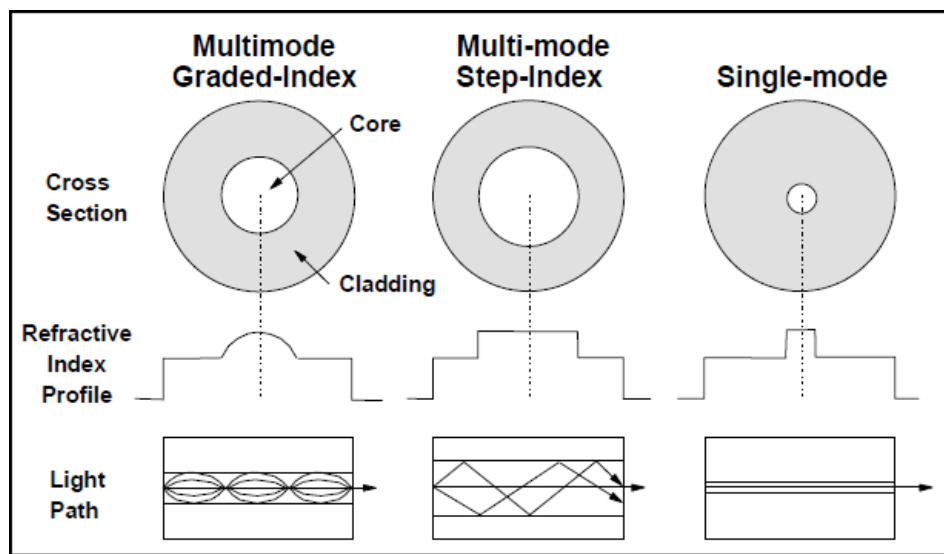


Figura 7. Modos y perfil del haz en distintas fibra ópticas.

Debido a que los modos de orden alto inciden y se reflejan numerosas veces sobre la pared interna de la fibra, la densidad lumínica de estos modos va a ser mayor

alrededor de la interfaz *core/cladding*. Los modos de transmisión de orden bajo tienden a confinarse espacialmente en el núcleo de la fibra.

La dispersión modal puede ser completamente eliminada usando una fibra monomodo y una fuente láser monocromática. De forma tal que la luz se transmita de un solo modo y no haya reflexiones internas. Sin embargo, solamente se utiliza un sistema óptico de estas características para distancias muy largas debido a su alto costo y complejidad.

Para distancias cortas, las fibras multimodo son la preferencia a la hora de diseñar sistemas de comunicación por fibra óptica debido a que pueden aceptar luz de fuentes más simples (como por ejemplo LEDs) y el alineamiento de las mismas es menos crítico.

La frecuencia óptica normalizada, también conocida como V , es una variable adimensional que es proporcional a la frecuencia del haz de luz multiplicada por propiedades de conducción de la fibra óptica.

Al número V se lo define como:

$$V = \frac{2\pi a}{\lambda} NA \quad (6)$$

Donde V es la frecuencia normalizada (número V), a es el radio del núcleo de la fibra y λ es la longitud de onda del haz que viaja dentro de la fibra.

A continuación calculamos el número V de la luz azul, violeta y la fluorescencia verde que transita por la fibra multimodo:

$$V_{532} = \frac{2\pi 200 \mu m}{0,532 \mu m} 0,48 = 1133,81$$

$$V_{410} = \frac{2\pi 200 \mu m}{0,410 \mu m} 0,48 = 1471,18$$

$$V_{470} = \frac{2\pi 200 \mu m}{0,470 \mu m} 0,48 = 1283,37$$

Y para fines meramente descriptivos calculamos la cantidad de modos de transmisión para las fibras presentes en este trabajo, la cual es estimada usando la siguiente expresión:

$$M \approx \frac{V^2}{2} \quad (7)$$

$$M_{532} \approx \frac{1133.81^2}{2} = 642762.55$$

$$M_{470} \approx \frac{1283.37^2}{2} = 823519.28$$

$$M_{410} \approx \frac{1471.18^2}{2} = 1082185.30$$

Cuando la luz se propaga, a través de la fibra óptica, pierde energía. La cual se traduce en una pérdida de potencia lumínica en función de la distancia recorrida. Esta pérdida depende de la longitud de onda de la señal y de las características físicas del medio. A dicho fenómeno se lo conoce como atenuación lumínica. A continuación se van a detallar fuentes comunes de atenuación en fibras ópticas.

- **Absorción:** hay pérdida de energía por absorción a medida que la luz se propaga a través del núcleo y el revestimiento de la fibra óptica que se encuentra compuesta por materiales sólidos. Los contaminantes dentro de la fibra también contribuyen a la pérdida de potencia por absorción.
- **Scattering** (dispersión): es una forma de pérdida que ocurre cuando la luz encuentra un cambio en el índice de refracción del medio que atraviesa. Esto puede ser causado por cambios extrínsecos como partículas, impurezas, burbujas; o intrínsecos, generados por fluctuaciones en la densidad del material que compone a la fibra. La pérdida por dispersión es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz que viaja, así que este fenómeno se vuelve significativo en longitudes de onda cortas como la luz UV o regiones azules en el espectro.
- **Bending loss** (pérdida por curvatura de la fibra): se la conoce por ser una pérdida de energía que ocurre por cambios en la geometría externa e interna de la fibra óptica. Este fenómeno puede ocurrir ya sea por *macro bending* o por *micro bending*.

La pérdida por *macrobending* está asociada con la curvatura física de la fibra, por ejemplo cuando el animal genera un movimiento brusco y provoca una flexión repentina. Como se puede apreciar en la figura a continuación, la luz guiada por la fibra se encuentra espacialmente distribuida en el núcleo y revestimiento de la misma.

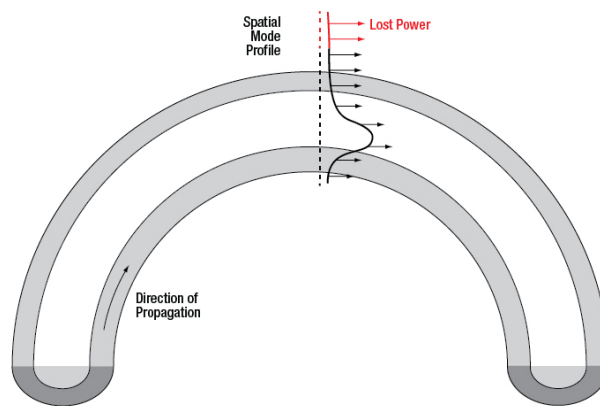


Figura 8. Atenuación debido a macrobend loss.

Cuando la fibra se dobla en un radio determinado, la luz cerca del radio externo de la curvatura no puede mantener la velocidad necesaria para conservar el perfil de intensidad del haz debido a que para lograr esto necesitaría superar la velocidad de la luz. Lo cual no puede suceder. Traduciéndose en una pérdida de energía por radiación [28].

Para radios de curvatura grandes, la pérdida asociada a la curvatura es pequeña. Sin embargo, las pérdidas de energía se tornan significativas cuando el radio de la flexión de la fibra se encuentra por debajo de la curvatura recomendada.

Pérdidas de energía por *microbending* ocurren por cambios en la geometría interna de la fibra. Particularmente en las capas que componen al núcleo y al revestimiento. Variaciones aleatorias en la estructura de la fibra perturban las condiciones necesarias para la reflexión total interna (TIR). Provocando que la luz que se propaga a través de la fibra pierda energía en puntos donde se encuentren dichas variaciones en el material (como se puede apreciar en la imagen a continuación). Este tipo de pérdidas no se

pueden evitar debido a que son generadas por defectos permanentes ligados a la fabricación de la fibra.

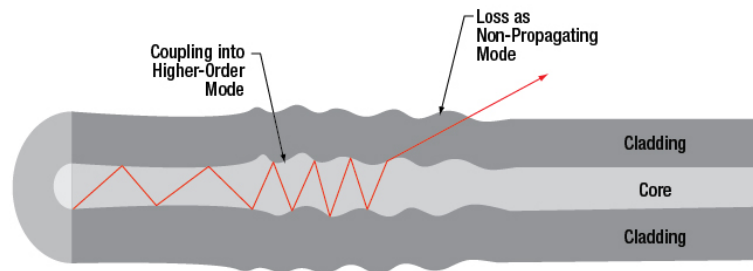


Figura 9. Atenuación debida a una pérdida por microflexión.

- **Cladding mode:** en fibras ópticas multimodo, la mayor parte del perfil de intensidad del haz (que se encuentra guiado por reflexión total interna) se halla en el núcleo de la fibra. Como se puede ver en la siguiente figura.

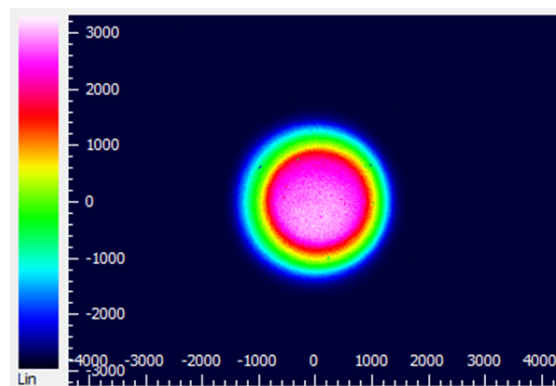


Figura 10. Diagrama ilustrando la concentración de intensidad luminica de un haz en el núcleo de una fibra óptica multimodo ([FT200EMT](#)).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los modos de transmisión de orden alto se encuentran confinados en la interfaz núcleo/revestimiento y en el revestimiento mismo de la fibra. Y puede haber veces en la que estos modos de transmisión de alto orden se presentan con mayor intensidad luminica en comparación con los de bajo orden. Generando una mayor intensidad de luz en el

revestimiento. A este fenómeno se lo conoce como *cladding mode*. Como puede apreciarse en la siguiente figura.

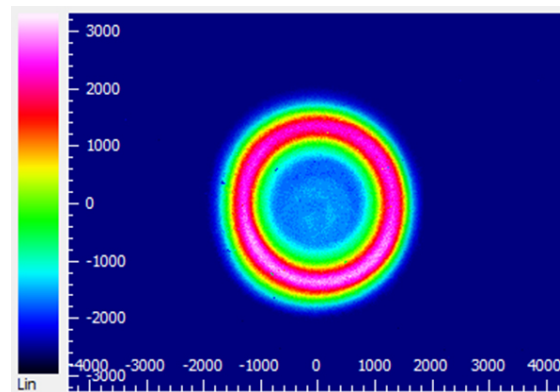


Figura 11. Perfil de un haz de luz en una fibra óptica multimodo (FT200EMT) mostrando una mayor concentración de intensidad en la región interfaz núcleo/revestimiento y revestimiento.

Debido al perfil de intensidad asociado al *cladding mode*, el mismo representa una fuente de pérdida considerable de energía en caso de que la fibra sufra de *macrobending* o defectos relacionados con *microbending*.

- **Launch Condition:** otros factores importantes a tomar en cuenta son la *Underfilled Launch Condition* (ULC) y la *Overfilled Launch Condition* (OLC).

ULC se da en situaciones donde el diámetro del haz de luz (en la interfaz de acople) es más pequeño que el diámetro del núcleo y NA de la fibra óptica. Esto sucede cuando se emplea una fuente láser en una fibra multimodo. Como se puede ver en la siguiente figura.

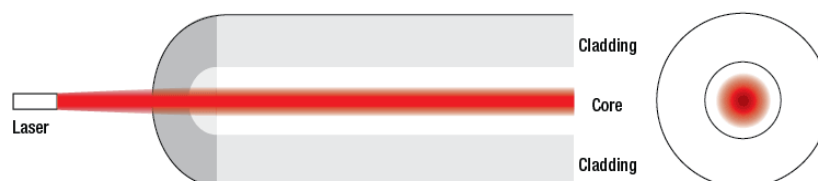


Figura 12. Diagrama ilustrando ULC.

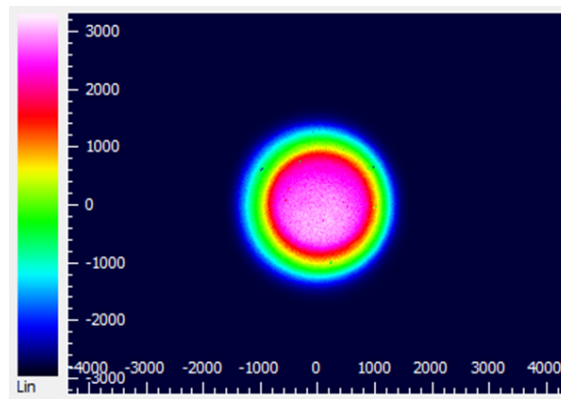


Figura 13. Diagrama ilustrando la concentración de intensidad luminica de un haz en el núcleo de una fibra óptica multimodo (FT200EMT).

ULC tiende a concentrar la luz espacialmente en el centro de la fibra, completando preferentemente los modos de transferencia de bajo orden en comparación con los de alto orden. Como resultado, cuando ocurre ULC, hay menos sensibilidad a pérdidas de energía ligadas a flexiones del estilo *macro bend* y no hay *cladding modes*. La pérdida por inserción (pérdida de energía por atenuación), para ULC tiende a ser más baja del nivel típico. Con una densidad de energía alta en el núcleo de la fibra óptica.

OLC se da en situaciones donde el diámetro del haz de luz en la interfaz de acople es más grande que el diámetro del núcleo y NA de la fibra óptica. Un método para lograr OLC es colocando un LED en una de las aperturas de una fibra óptica multimodo, donde el núcleo de la fibra y parte del revestimiento quedan completamente expuestos a la luz incidente. Permitiendo que los modos de orden alto y bajo queden ocupados de forma más homogénea (como se puede ver en las imágenes siguientes). Este es un método que se caracteriza por su simpleza técnica y garantiza que la potencia de salida sea alta en comparación con un sistema donde ocurra ULC.

Una desventaja que trae OLC es que incrementa la probabilidad de generación de *cladding modes* en la fibra. Lo cual va a devenir en una mayor cantidad de modos de transmisión de alto orden. Elevando la sensibilidad a la pérdida de energía por curvatura en comparación con un sistema láser/fibra.



Figura 14. Diagrama ilustrando una **Overfilled Launch Condition**.

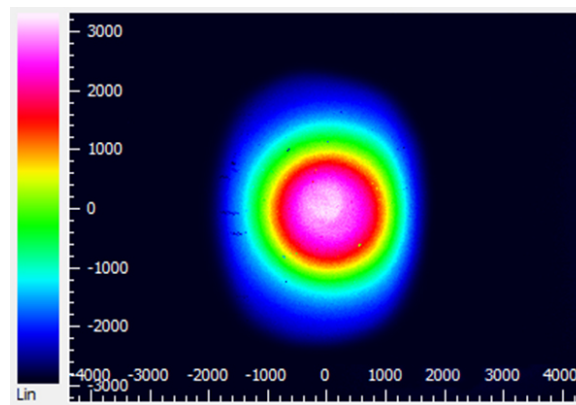


Figura 15. Perfil del rayo utilizando una fibra óptica multimodo ([FT200EMT](#)).

Respecto a las fibras multimodo es importante saber que el perfil del rayo a la salida de la fibra puede ser afectado por el ángulo de entrada del haz a dicha fibra. A modo ilustrativo se va a presentar un experimento realizado por [Thorlabs](#) para explicar este fenómeno.

Se utilizó una fibra óptica de índice escalonado (M38L01) de 200 μm de diámetro y 0.39 NA, a través de la cual se disparó un rayo láser. El haz de entrada fue configurado para estar a 0° , 11° y 15° respecto de la entrada a la fibra multimodo para crear 3 perfiles de salida diferentes (*near-Gaussian*, *Top Hat* y *Donut*). Luego se adquirieron imágenes con una exposición de 9 segundos y se evaluó la forma del rayo a la salida.

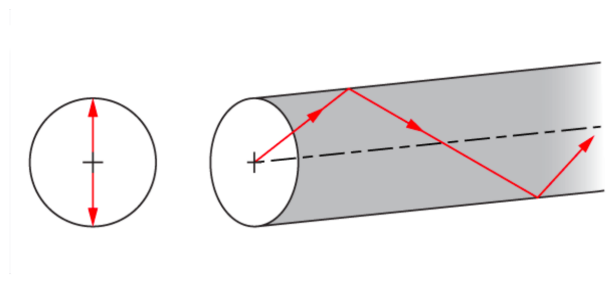


Figure 16. Meridional Ray Propagation. Corresponde a un Near-Gaussian Beam Profile.

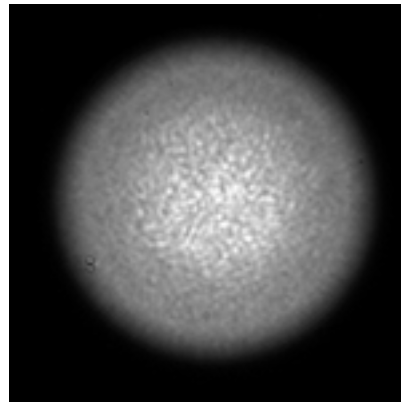


Figure 17. Near-Gaussian Beam Profile. Obtenido con un ángulo de entrada de 0° (normal a la cara de la fibra).

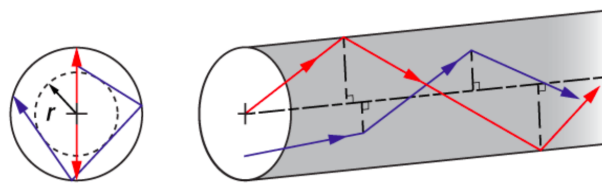


Figure 18. Meridional y Skew Ray Propagation. Corresponde a un Top Hat Profile.

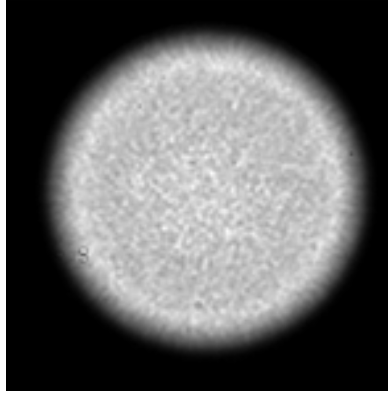


Figure 19. Top Hat Beam Profile. Obtenido con un ángulo de entrada de 11° .

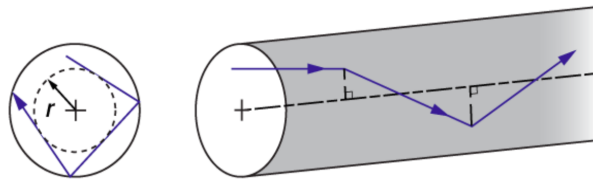


Figure 20. Perfil del rayo denominado Skew Ray Propagation. Corresponde a un Donut Profile.

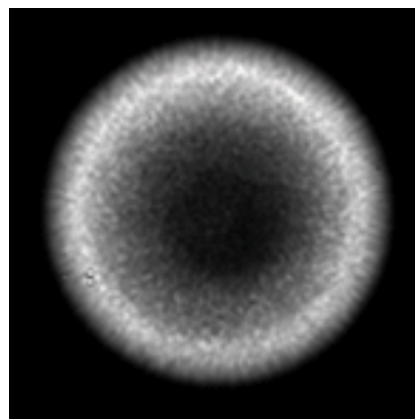


Figure 21. Donut Beam Profile. Obtenido con un ángulo de entrada de 15° .

Hay 2 tipos generales de rayos que se propagan a lo largo de una fibra multimodo: (a) rayos meridionales (*meridional rays*), que pasan a través del eje central de la fibra luego de cada reflexión y (b) rayos sesgados (*skew rays*), los cuales nunca pasan a través del eje central de la fibra.

Las figuras presentadas anteriormente ilustran los 3 escenarios básicos de propagación de un rayo observados durante el experimento. Las figuras 16 y 20 describen un rayo meridional y sesgado respectivamente a través de una fibra multimodo. En la figura 20, los rayos sesgados se propagan en una trayectoria helicoidal (a lo largo y alrededor del eje de la fibra) tangente a la cáustica óptica de radio r . La cáustica óptica es la envolvente de los rayos de luz reflejados o refractados por una superficie curva u objeto.



Figura 22. Luz atravesando una copa de vidrio y generando una cáustica óptica.

La figura 18 describe la propagación y distribución de la combinación de un rayo meridional y sesgado. Cambiando el ángulo de entrada de la luz que ingresa a la fibra multimodo, se puede modificar la proporción de los rayos de luz que se propagan como rayos meridionales vs sesgados. Y consecuentemente, modificar la salida que puede ser desde una distribución *near-Gaussian* (principalmente rayos meridionales, figura 16) a una *Top Hat* (mezcla de rayos meridionales y sesgados, figura 18) o *Donut* (principalmente rayos sesgados, figura 20).

Considerando lo desarrollado, en nuestro sistema, el perfil del rayo que se va a formar y va a incidir sobre la muestra probablemente sea una combinación de los 3 perfiles mencionados.

Como en el presente dispositivo el diámetro del haz de luz en la interfaz de acople es más grande que el diámetro del núcleo y NA de la fibra óptica, se va a dar una estado OLC. Dando lugar a una presencia más homogénea de modos de orden alto y bajo sobre la sección de la fibra óptica. Lo cual se va a traducir en una mayor potencia de salida (mejorando la relación señal/ruido) y en una mayor generación de *cladding modes*. Aumentando las chances de sufrir pérdidas de energía por *macro bending*.

2.1.2. Camino óptico

Entrando más en detalle respecto al funcionamiento del sistema, desde un microcontrolador se emiten dos señales PWM 1 y PWM 2 controladas por el *Timer* 1 y 3 del microcontrolador respectivamente. Desfasadas 180 grados entre sí.

A continuación se muestra un esquema del equipo y se describe el camino óptico de la luz emitida por ambos LEDs. Tres fibras ópticas, tres filtros y tres lentes colimadoras integran el sistema óptico destinado a maximizar la fluorescencia minimizando la radiación no deseada.

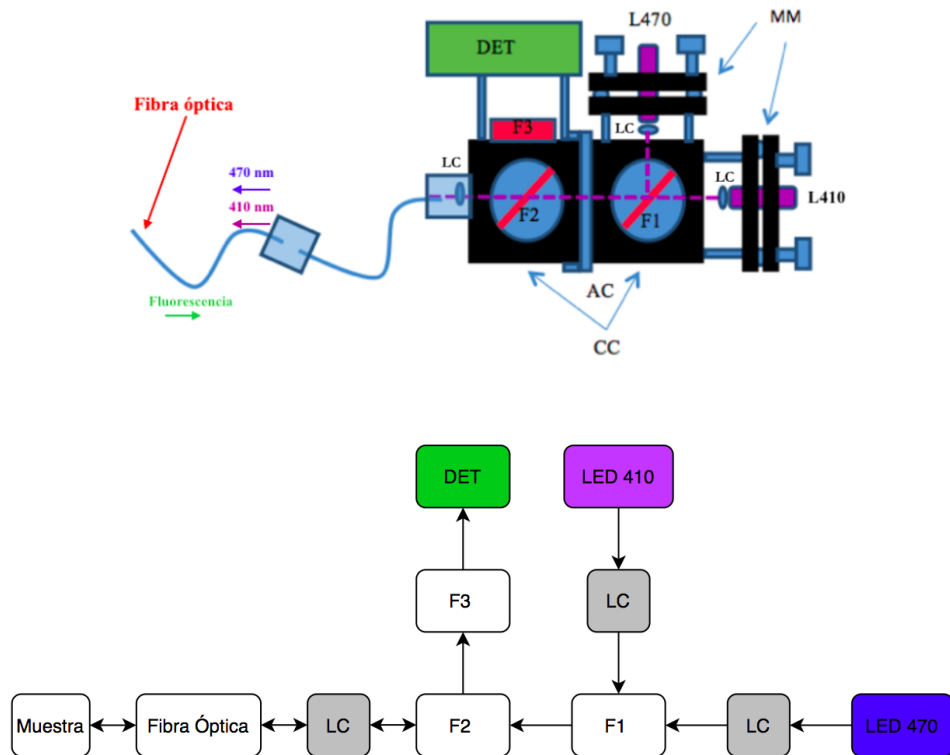


Figura 23. Esquema y diagrama de bloques del haz de 470 y 410 nm (L470 y L410) acoplados al sistema óptico del dispositivo experimental.

Cada elemento que conforma al sistema óptico se encuentra catalogado en la siguiente lista:

Código		Cantidad
MM	<i>Mirror Mount</i>	2
CC	<i>Cage cube</i> completo	2
DET	Cámara CMOS (FLIR)	1
AC	Acople de cubos	1
V	Varillas	12
LC	Lente colimadora para fibra con anillo adaptador SM1	3
F1	Filtro dicróico para combinar los dos haces de luz	1
F2	Filtro dicróico reflector de fluorescencia	1
F3	Filtro pasabanda de emisión	1

Primero los dos haces de luz van a viajar por sus respectivas fibras ópticas, pasar por su lente colimadora correspondiente (la cual homogeniza la dirección de los rayos) para terminar incidiendo contra el elemento F1 que se encuentra representado en la figura 23. Donde el haz de 470 nm va a reflejarse y el de 410 nm a refractarse.

El componente F1 es un filtro dicróico de color magenta que sirve para combinar ambos haces de luz. Este tipo de filtro está diseñado para reflejar luz que incide a un ángulo determinado y cuya longitud de onda se encuentre dentro de un rango de valores específicos. Ofreciendo una transmitancia de 84% para el haz de 410 nm, cuando el ángulo de incidencia es de 45 grados respecto a la normal del filtro F1, y una reflexión de aproximadamente 99% cuando el haz de 470 nm incide con un ángulo de 45 grados.

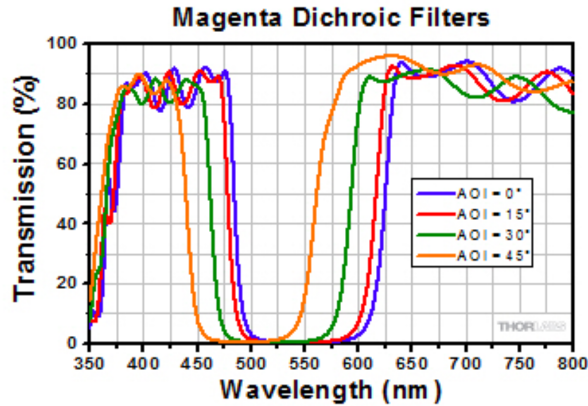


Figura 24. Porcentaje de transmitancia respecto del filtro F1 dicroico magenta para 4 ángulos de incidencia.

A continuación, los dos haces de luz inciden sobre el elemento F2. El cual es un filtro dicroico de color azul reflector de fluorescencia. Como el ángulo de incidencia es de 45 grados respecto de su normal, la transmitancia para el haz de 470 nm es de 89%, 92% para el de 410 nm y 1% para luz de $532,5 \pm 37,5$ nm. Es decir, que cuando la luz con longitud de onda que va de 495 nm a 570 nm incide sobre la lente F2, casi el 99% de la misma se va a reflejar para luego dar contra el filtro F3.

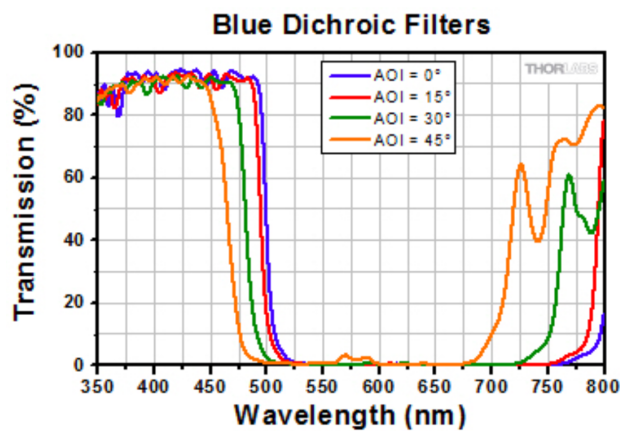


Figura 25. Porcentaje de transmitancia respecto del filtro F2 dicroico azul para 4 ángulos de incidencia.

La combinación de ambos haces de luz (que previamente atravesó el filtro F2) va a pasar luego por una lente esférica colimadora (LC en el esquema de la figura 23) que se encuentra dentro de un conector FC/PC (acrónimo por *Fiber Channel/Physical*

Contact) y que posee las mismas características que las LC correspondientes a cada LED.

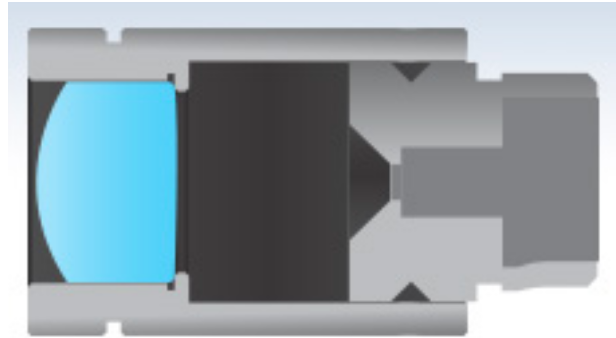


Figura 26. Conector FC/PC que contiene una lente esférica colimadora en su interior. Una lente esférica sirve para concentrar la luz que viaja de izquierda a derecha (en este esquema) en su punto focal.

Luego, la luz va a viajar a través de una fibra óptica de 400 micrones de diámetro hasta llegar a la región de interés en el cerebro. Estimulando de esta forma a la muestra.

La siguiente imagen muestra un esquema de cómo la fibra óptica ingresa al tejido cerebral para conducir la luz de excitación hacia las neuronas con GCaMP6:

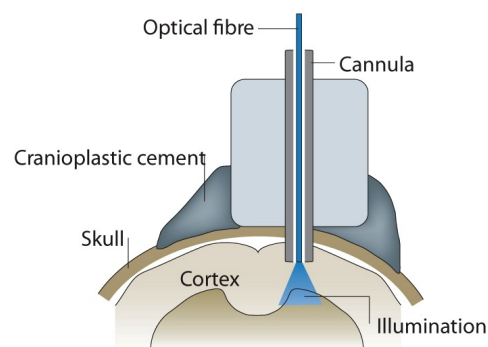


Figura 27. En este caso la luz pasa a través de una fibra directo a la corteza [30].

Dichas neuronas van a emitir fluorescencia verde durante los ciclos de estimulación lumínica. Esta fluorescencia va recorrer de regreso el camino óptico ya mencionado hasta encontrarse nuevamente con el colimador. Donde los rayos divergentes van a pasar a estar paralelos, con un leve ángulo de divergencia, respecto al eje óptico de la lente esférica.

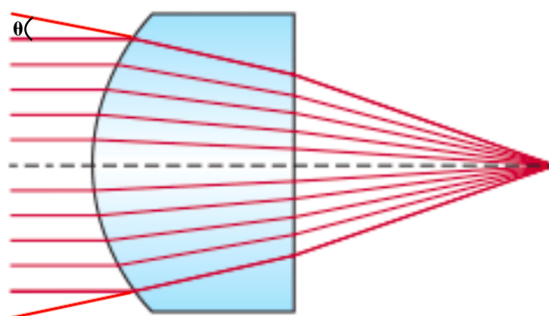


Figura 28. Ángulo de divergencia de una lente esférica.

Este colimador óptico va a desempeñarse de forma óptima en la longitud de onda para la cual fue diseñado: 532 nm. Homogeneizando en mayor medida la trayectoria de los rayos de luz de 532 nm y en menor medida al resto. La hoja de [especificaciones](#) del colimador provee el siguiente gráfico que detalla el efecto que genera sobre la luz:

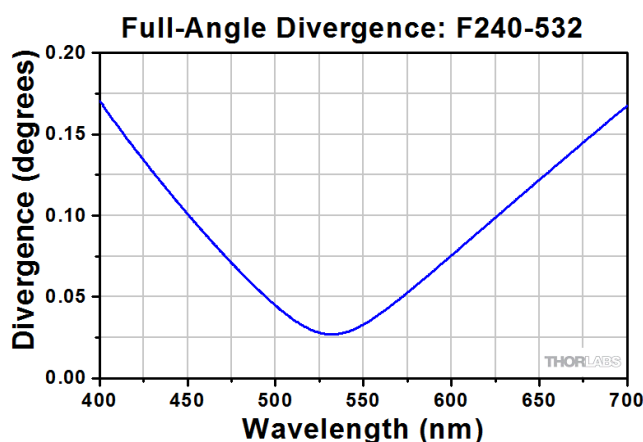


Figura 29. Ángulo de divergencia de la lente en función de la longitud de onda. Para luz de 532 nm la divergencia es mínima (0.0263°), lo que significa que luz de esta longitud de onda es la que adquiere la trayectoria más paralela en comparación con el resto.

El gráfico anterior fue calculado para luz que pasa a través de una fibra 460HP monomodo. La fórmula en cuestión es la siguiente:

$$\theta \approx \frac{D}{f} \cdot \frac{180}{\pi} \quad (8)$$

La cual supone que la luz que emerge de la fibra óptica tiene un perfil de intensidad aproximadamente Gaussiano (*Near-Gaussian*).

La variable D hace referencia al Diámetro de Campo Modal (*Mode-Field Diameter* o MFD), la cual es una medida del ancho del rayo de luz propagándose en una fibra monomodo. La variable f es la distancia focal del colimador.

La fórmula (8) sirve para fibras monomodo pero va a subestimar el ángulo de divergencia para fibras multimodo donde la luz que emerge de la fibra tiene un perfil de intensidad no Gaussiano.

Sin embargo, se puede usar la siguiente fórmula para calcular el diámetro del rayo en el plano focal principal de la lente (W) para una fibra multimodo con diámetro D y apertura numérica NA colimada con una lente de distancia focal f :

$$W = D + 2 * f * \tan(\arcsin(NA)) \quad (9)$$

Dando el siguiente resultado:

$$W = 0.4 \text{ mm} + 2 * 7.86 \text{ mm} * \tan(\arcsin(0.50)) = 9.476 \text{ mm}$$

Y utilizando la siguiente fórmula, se puede estimar el ángulo de divergencia θ :

$$D \cdot NA \approx W * \sin(\theta) \quad (10)$$

$$\theta \approx \arcsin\left(\frac{D * NA}{W}\right) \quad (11)$$

$$\theta \approx \arcsin\left(\frac{0.4 \text{ mm} * 0.5}{9.476 \text{ mm}}\right) = 1.209^\circ$$

En comparación con el ángulo de divergencia que figura en el gráfico anterior (0.0263°), este valor es considerablemente más grande.

Los rayos paralelos, provenientes del colimador, que inciden con un ángulo de incidencia de 30 grados sobre la lente F2 van a sufrir una reflexión cercana al 99% sobre dicho elemento óptico. Para luego incidir sobre la lente F3, la cual consiste en un filtro GFP pasabanda con longitud de onda central de 525 nm y ancho de banda de 39 nm. Dicho filtro permite que la fluorescencia deseada, proveniente de la muestra, alcance al detector. Bloqueando otras longitudes de onda que no interesen.

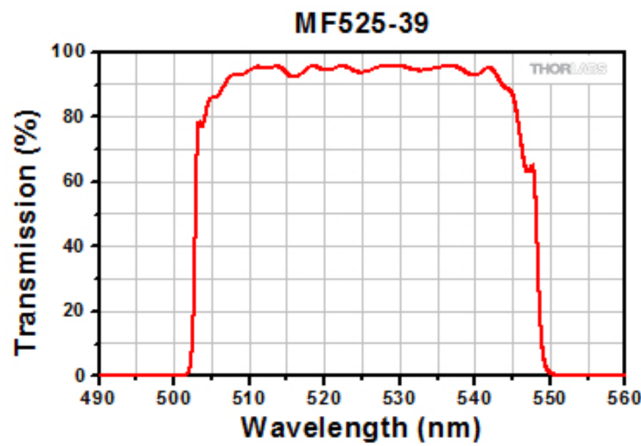


Figura 30. Porcentaje de transmitancia del filtro GFP. CWL = 525 nm, BW = 39 nm.

Finalmente la luz fluorescente proveniente del cerebro incide sobre un fotodetector ubicado a continuación del filtro F3.

El fotodetector es una cámara FLIR-BFLY-U3-23S6M-C (que incluye un sensor CMOS), la cual va a detectar la fluorescencia. La cámara CMOS puede medir la actividad GCaMP6 *in vivo* con una sensibilidad comparable a la de un fotomultiplicador convencional [31].

Diferentes aspectos de la cámara están controlados por distintos softwares: Python, Arduino IDE y FlyCap2 respectivamente. Como se va a detallar en secciones posteriores del informe, el usuario va a interactuar con una interfaz en Python, con el software FlyCap2 y con Bonsai Open Ephys.

Por medio de una interfaz en Python, el usuario va a poder introducir valores para configurar la velocidad de adquisición de la cámara. Arduino IDE va a transformar dichos valores en una señal que va a marcar el tiempo de muestreo del sensor. FlyCap2 es una interfaz de control que permite configurar parámetros de la cámara y método de adquisición de las fotos. Las fotos capturadas por la cámara están constituidas por píxeles, cuyos valores de brillo van de 0 a 255 en el caso de que las imágenes sean de 8 bits. Si las imágenes son de 16 bits los valores van de 0 a 65535. Los cuales representan distintos valores de fluorescencia correspondientes a las señales de calcio que proveen una métrica de la actividad neuronal del animal. Y un software denominado Bonsai va a procesar automáticamente las fotos en tiempo real para graficarlas y almacenarlas en un vector de datos.

Bonsai es un software que permite ubicar en un espacio de trabajo (denominado *workflow*) diferentes nodos de procesamiento de datos. Permitiendo armar flujos de trabajo para llevar a cabo distintos experimentos. Más adelante se va a desarrollar más sobre este software. Detalles adicionales se pueden encontrar en el siguiente link: <https://bonsai-rx.org/docs/editor/>.

La información lumínica emitida por las neuronas de interés es posteriormente procesada y analizada *offline* en Python o en Matlab para finalmente graficarla. En esta parte de post-procesado de la señal, se va a obtener una señal despojada de los ruidos provenientes de artefactos y movimientos bruscos de la fibra óptica.

A continuación se puede ver un resumen del sistema.

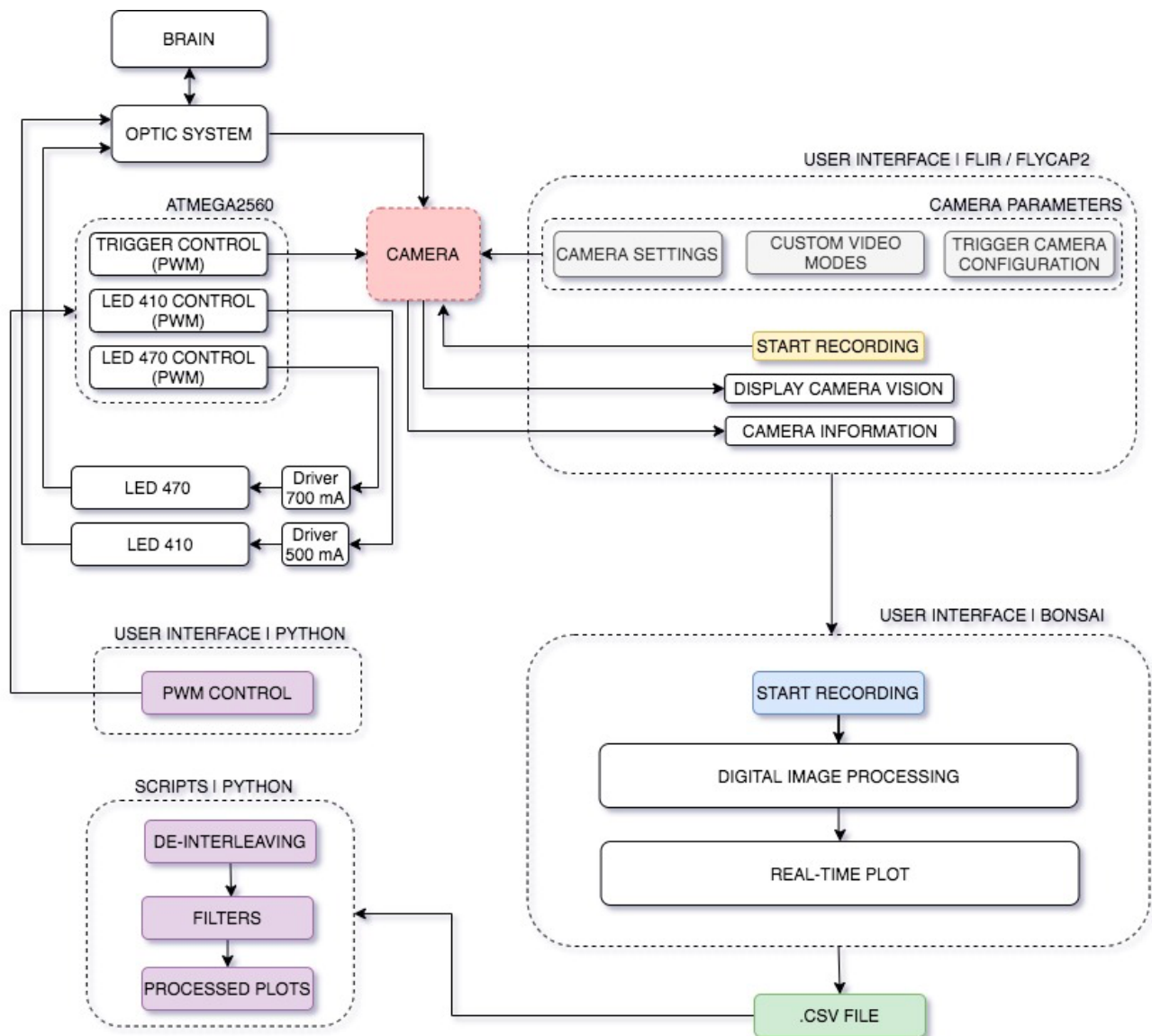


Figura 31. Diagrama en bloques del sistema Fiber Photometry.

2.1.3. *Time-division multiplexing*

La lectura independiente de la fluorescencia evocada por las 2 fuentes de excitación luminosa se logra alternando entre el estado de encendido y apagado de los LEDs azul y violeta. La secuencia de adquisición es la siguiente:

1. LED azul ON y LED violeta OFF. El sensor CMOS detecta la señal de fluorescencia producto de la excitación del LED azul durante su ciclo ON.
2. LED azul OFF y LED violeta ON. El sensor CMOS detecta la señal de fluorescencia producto de la excitación del LED violeta durante su ciclo ON.

Esta técnica se la denomina *Time-division multiplexing* (TDM). El cual es un método utilizado para transmitir y recibir señales independientes a través de un canal común (fibra óptica en este caso) haciendo uso del sincronismo existente entre señales.

A continuación se muestra una representación de la secuencia de adquisición:

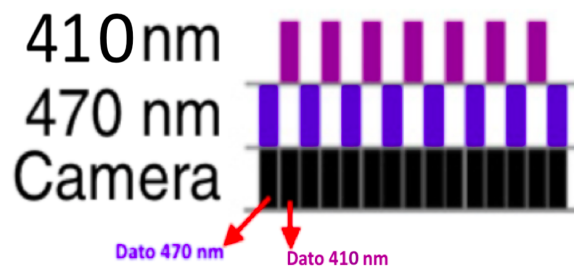


Figura 32. *Time-division multiplexing*. Donde el Duty-Cycle de las señales LED va a ser modificable debido a varias razones de diseño que próximamente van a ser explicadas.

Y a continuación se muestra la visión de la cámara:



Figura 33. Se puede ver cómo la luz que circula por la fibra óptica incide sobre la lente de la cámara FLIR.

2.1.4. Parámetros

Utilizando un sensor CMOS, la velocidad de adquisición para capturar la dinámica de calcio intracelular puede ir de 40 a 100 cuadros por segundo. Siendo 40 FPS la estándar [33; 34]. Por lo tanto, considerando FPS = 40 y un desfase de 180 grados entre ambas señales de estimulación GCaMP6, la frecuencia de la señal PWM debe ser de 20 Hz para ambos LEDs.

Al sistema se lo configuró para poder operar con las siguientes frecuencias de adquisición: 40 FPS, 50 FPS, 60 FPS, 70 FPS, 80 FPS, 90 FPS y 100 FPS. Donde siempre se va a cumplir la siguiente relación:

$$f_{PWM\ LEDs} * 2 = f_{cámara} \quad (12)$$

Utilizando el teorema de Nyquist, se puede determinar qué tan frecuentemente hay que muestrear una señal para poder luego representarla de forma correcta en el dominio digital. Este teorema determina que para poder reconstruir una señal, hay que muestrear a un ritmo mayor que el doble de su componente de frecuencia más grande.

$$F_s \geq F_{max} * 2 \quad (13)$$

Entonces, por ejemplo, tomando en cuenta una velocidad de adquisición de 40 FPS, cada canal se estaría muestreando a 20 FPS. Lo que implica, por el teorema de Nyquist, que solamente se pueden representar señales hasta 10 Hz en cada uno. Pero como el ancho de banda de interés del GCaMP6f va de 0.4 a 4 Hz, se considera que no va a haber pérdida de información [5; 32].

El ciclo ON para cada señal PWM de estimulación LED es variable. Modificando el *duty-cycle* (DC) se pueden adoptar distintos tiempos de exposición para la cámara. Lo que se traduce en valores más altos o más bajos al cuantificar la fluorescencia emitida producto de la excitación lumínica. Controlar el DC permite además regular la cantidad de luz que se irradia a la muestra durante la exposición de cada foto, lo que baja el riesgo de *photobleaching*. El *photobleaching* es la destrucción de un marcador debida a una excitación lumínica excesiva que termina dañando la

estructura de la molécula [4]. Dado el tipo específico de *driver* que se está implementando en este dispositivo, para poder controlar la potencia de los LEDs se necesitaría instalar un potenciómetro y un circuito inversor acorde. En la sección de “Futuros Avances” se va a desarrollar más al respecto. Debido a que actualmente la potencia de los LEDs no es regulable, la respuesta de fluorescencia de las proteínas es siempre la misma.

Como umbral a la potencia lumínica, se recomienda no utilizar una mayor a 5 mW (*light power from fiber tip*) a través de una fibra óptica de 200 micrómetros de diámetro [35]. El siguiente link es útil a la hora de estimar distintos valores relacionados al modo en que la luz se transmite a través del tejido cerebral mamífero, el cual permite calcular la profundidad del haz, la pérdida de potencia de la señal lumínica y la irradiancia utilizando parámetros de una fibra óptica:

<https://web.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>

Para configurar las 2 señales de estimulación GCaMP6 hay que tener en cuenta la siguiente relación:

$$t_{duty-cycle\ LEDs} \geq 2 * t_{trigger\ delay} + t_{shutter} \quad (14)$$

Donde $t_{trigger\ delay}$ es qué tan después se dispara el *trigger* de la cámara una vez iniciado un ciclo de estimulación lumínica. Este *delay* es necesario para garantizar que cada foto sea adquirida durante la emisión de fluorescencia. La variable $t_{shutter}$ es el tiempo de exposición por foto. A continuación se puede ver un ejemplo:

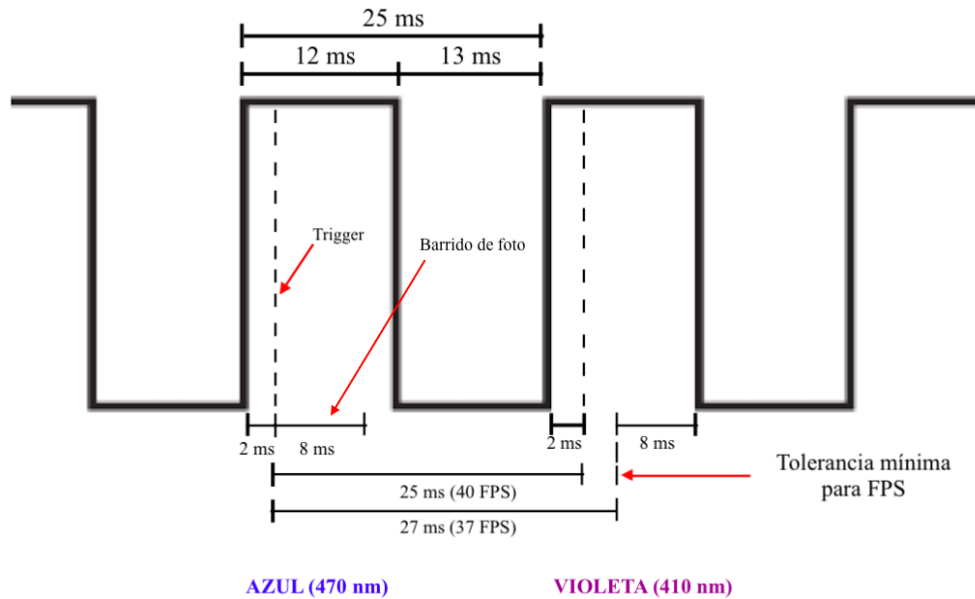


Figura 34. Esquema de señales PWM - trigger.

Al *delay* del *trigger* de la cámara se lo configuró para que sea de 2 ms en el caso de que adquiriera a 40 FPS debido a que se determinó, luego de adquirir aproximadamente 250000 fotos, que el mismo oscila principalmente 1.5 milisegundos respecto de su tiempo de muestreo original (figura 35).

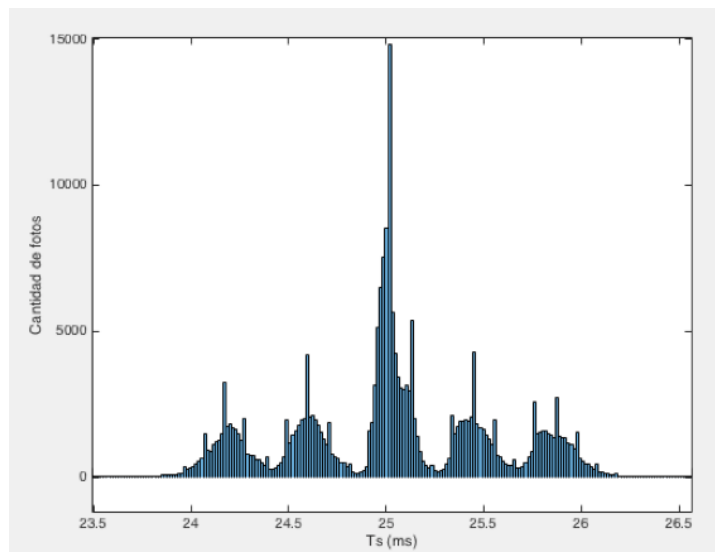


Figura 35. Histograma de fotos vs tiempo de adquisición (40 FPS). En el eje de ordenadas se observa la cantidad de fotos y en el eje de abscisas el momento en el que fueron tomadas. Las fotos fueron tomadas en un intervalo que va aproximadamente de 24 a 26 ms entre cada una.

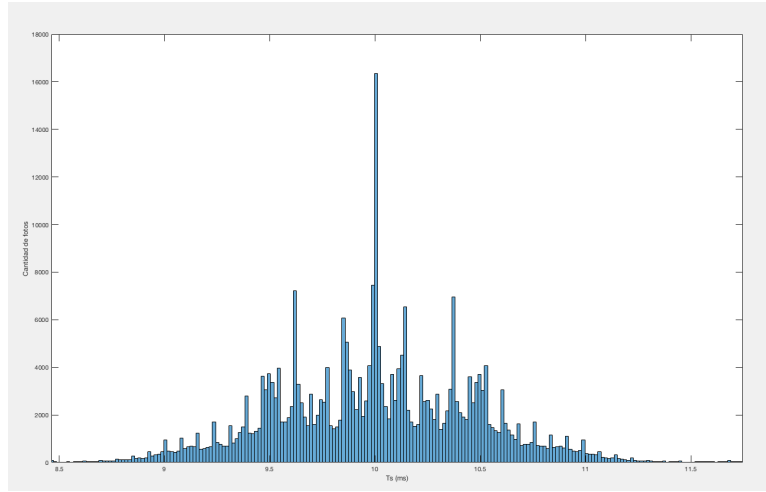


Figura 36. Histograma de fotos vs tiempo de adquisición (100 FPS). En el eje de ordenadas se observa la cantidad de fotos y en el eje de abscisas el momento en el que fueron tomadas. la mayor parte de las fotos fueron tomadas en un intervalo que va de 9 a 11 ms respecto de la anterior.

Para una velocidad de adquisición de 100 FPS, al *delay* del *trigger* de la cámara se lo configuró para que sea de 1 ms (figura 36). Se realizó la misma medición para las velocidades de adquisición restantes y se configuró el *delay* del *trigger* de la misma forma.

Respecto al *duty-cycle* de cada PWM, se deben respetar las siguientes condiciones:

$$DC_{LEDs} < 50\% \quad (15)$$

$$DC_{470\text{ nm}} = DC_{410\text{ nm}} \quad (16)$$

Para que el método TDM funcione, los DC de cada PWM de estimulación deben ser iguales. Si el *duty-cycle* fuera igual al 50%, la estimulación de la GCaMP6 sería constante. Lo que probablemente se traduciría en un problema de *photobleaching*. En caso de haber *photobleaching*, se observaría una rápida disminución de la señal de fluorescencia detectada por la cámara a lo largo del tiempo. Y si el DC fuera mayor al 50%, habría una mezcla de longitudes de onda en el haz de estimulación. Rindiendo inutil al método de TDM. Además, es conveniente tener un intervalo de “silencio” entre cada señal LED para evitar que la fluorescencia remanente en caso de haberla (producto de un ciclo de excitación lumínica anterior) contamine el ciclo de estimulación LED siguiente.

Tomando en cuenta los tiempos de *delay* mencionados, para 40 FPS el *duty-cycle* tiene que ser mayor a 8% y menor a 50%. Para 100 FPS el *duty-cycle* tiene que ser mayor a 15% y menor a 50%.

Si fueran 3 los LEDs, la relación entre los *duty-cycle* sería la siguiente:

$$DC_{LEDs} < 33.33\% \quad (17)$$

$$DC_{LED1} = DC_{LED2} = DC_{LED3} \quad (18)$$

Y habría que ajustar las fases relativas entre los 3 para que los LEDs estén sincronizados entre sí.

Cada foto adquirida es luego promediada y almacenada en un vector utilizando el software Bonsai. Luego, en Python / Matlab, este vector va a ser reorganizado mediante un proceso denominado *de-interleave*. Donde se forman dos vectores distintos. Un vector corresponde a la fluorescencia evocada producto de la luz azul y el otro de la luz violeta. Esto es el equivalente a un demultiplexado de la señal. Finalmente se llevan a cabo tareas de procesamiento *offline*, se grafican ambos vectores y se identifica cual es la línea de base y cuál es la señal de calcio. Posteriormente se realizan más operaciones que van a resultar en una señal de fluorescencia despojada de ruidos y artefactos.

2.2. Hardware y Software

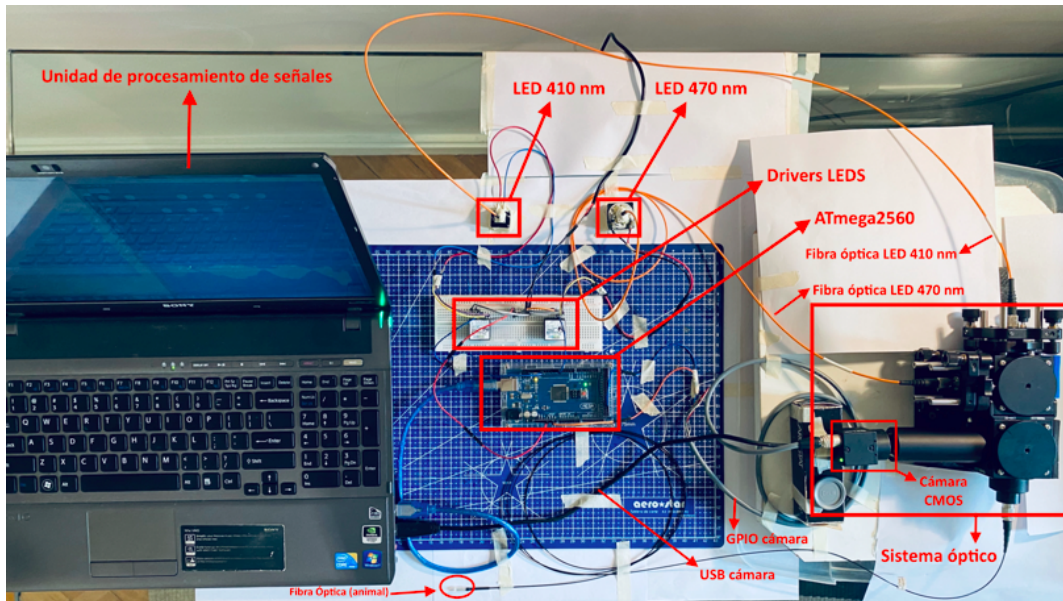


Figura 37. Sistema de fiber photometry. El microcontrolador activa los drivers, los cuales controlan los LEDs. Los dos haces de luz de 410 nm y 470 nm recorren el camino óptico dictado por el sistema para terminar saliendo por la abertura de la fibra óptica.

2.2.1. Arduino Mega 2560

Para el control de los LEDs y la cámara digital, se utilizó un microcontrolador Arduino Mega 2560. Este microcontrolador necesita de una fuente de alimentación de 5V para poder funcionar. Un cable USB permite conectar este dispositivo a una computadora, obteniendo energía de esa forma.

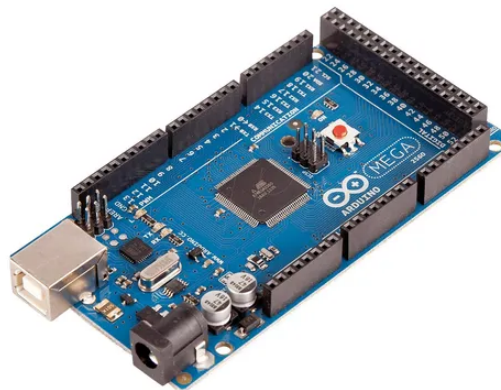


Figura 38. Microcontrolador Arduino Mega 2560.

La Arduino Mega 2560 es una placa basada en el ATmega2560. Tiene 54 pines de entrada/salida digitales (15 de los cuales pueden ser usados como salidas PWM), 16 entradas analógicas, 4 UARTs (puertos serie), un oscilador de 16 MHz y una entrada USB, entre otras cosas.

2.2.2. Drivers y LEDs

El *driver* 3021 es un módulo sirve para controlar LEDs de alta potencia. Su capacidad de respuesta rápida lo hace ideal para aplicaciones donde los LEDs deben parpadear rápidamente. Este *driver* se caracteriza por ser capaz de regular la corriente entrante al LED. Está diseñado para variar su tensión de salida al nivel requerido de forma tal que la corriente entregada al LED sea siempre constante y estable. Es de alta eficiencia y no requiere de resistores externos para limitar la corriente.

La señal PWM 1 va a controlar a un *driver* cuya salida máxima es de 700 mA y la señal PWM 2 va a estar conectada a un *driver* cuya salida máxima es de 500 mA. Estos 2 *drivers* van a dictar el comportamiento de sus respectivos LEDs de alta potencia. El *driver* de 700 mA va a estar conectado al LED azul y el de 500 mA al violeta.

La tensión de salida de los *drivers* puede ser controlada al conectarlos con un microcontrolador a través del pin de control denominado “CTL”. El cual puede recibir de 0 a 10V como máximo. La corriente de salida del *driver* va a ser 0 mA cuando la señal de control sea HIGH (5V) y va a ser máxima (500 mA o 700 mA dependiendo del modelo de *driver*) si la señal de control es LOW (0V). El input al pin de control debe ser como mínimo de $4.75 V_{DC}$ a una impedancia de entrada de 1.5 Kohm. Como muestra la siguiente figura:

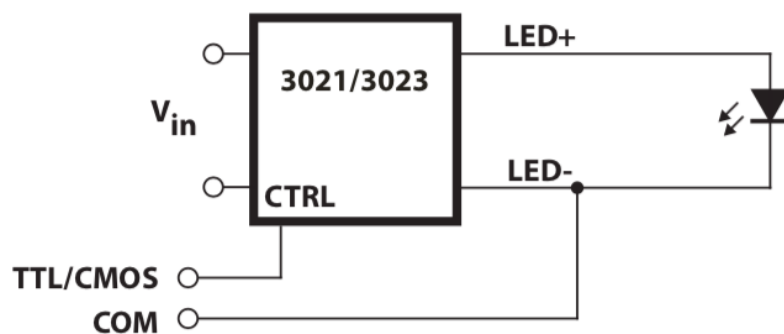


Figura 39. Arduino envía una señal TTL (0 a 5V y 40 mA) al driver para controlar el parpadeo del LED. Tanto el LED como el driver deben compartir la misma tierra (COM) proveniente del Arduino.

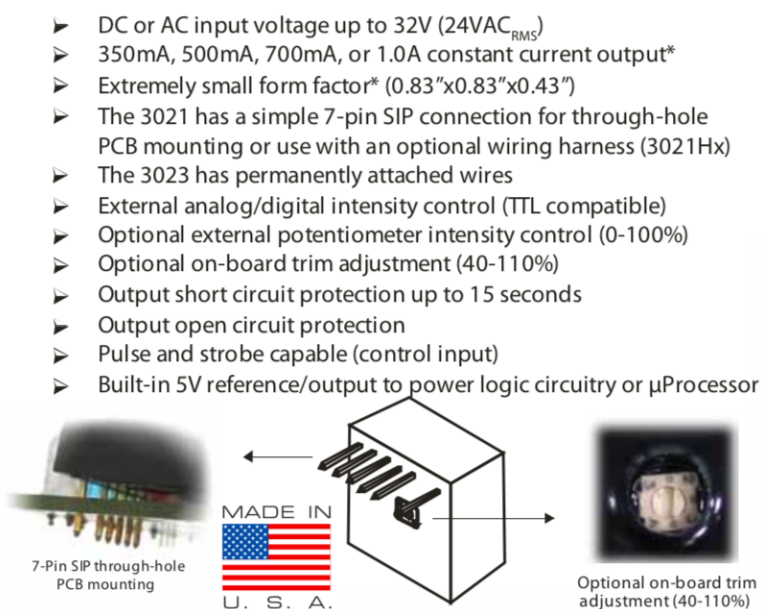


Figura 40. Características del driver. El driver posee un pin por medio del cual se puede controlar el parpadeo del LED con una señal TTL de 5V. La cual va a consistir en un PWM proveniente del Arduino.

CONEXIONES ATMEGA2560 | Driver 3021-D-E-700

ATMEGA2560	Driver 3021-D-E-700
PB5 (digital pin 11)	Ctrl
Gnd	Led (-)

CONEXIONES ATMEGA2560 | Driver 3021-D-E-500

ATMEGA2560	Driver 3021-D-E-500
PE3 (digital pin 5)	Ctrl
Gnd	Led (-)

Absolute Maximum Ratings

Input Voltage, DC Model	32V _{DC}
Input Voltage, AC Model	24V _{RMS}
Output Voltage	32V _{DC}
Control Pin Voltage	10V
Reference regulator current (5V _{DC}) Output	20mA

Typical Characteristics

Output tolerance (within specified temp. range)	±10%
Efficiency	95%
Input Voltage Minimum	5V _{DC} (N), 7V _{DC} (E or I), 7V _{RMS}
Input Margin (350mA unit ¹ , add to LED Vf MAX)	2.5V _{DC} 4V _{RMS}

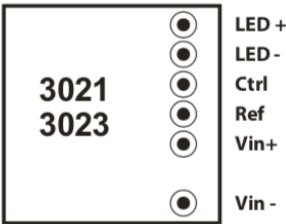


Figure 1.
Bottom view Pinout of the
3021/3023 BuckPuck

Figura 41. Características técnicas del driver.

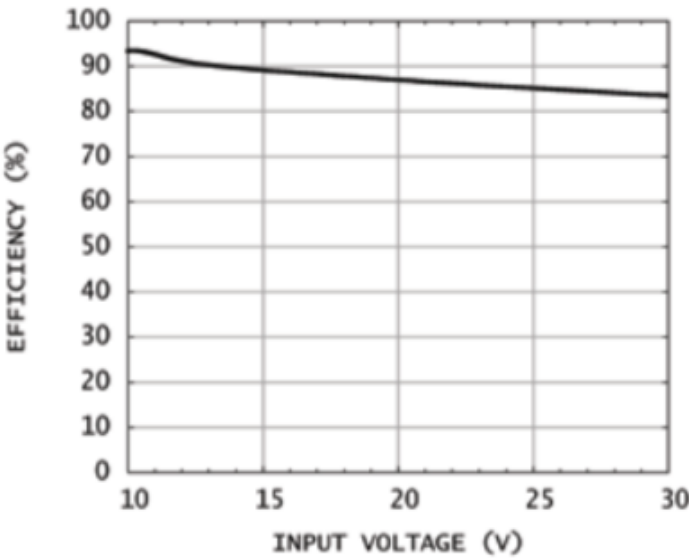


Figura 42. Eficiencia vs Vin

Tomando en cuenta que los *drivers* pueden recibir entre 10V y 30V para operar, se eligió una fuente de *switching* de 12V de tensión de salida y 2A de corriente de salida. Conectada en paralelo a los mismos.

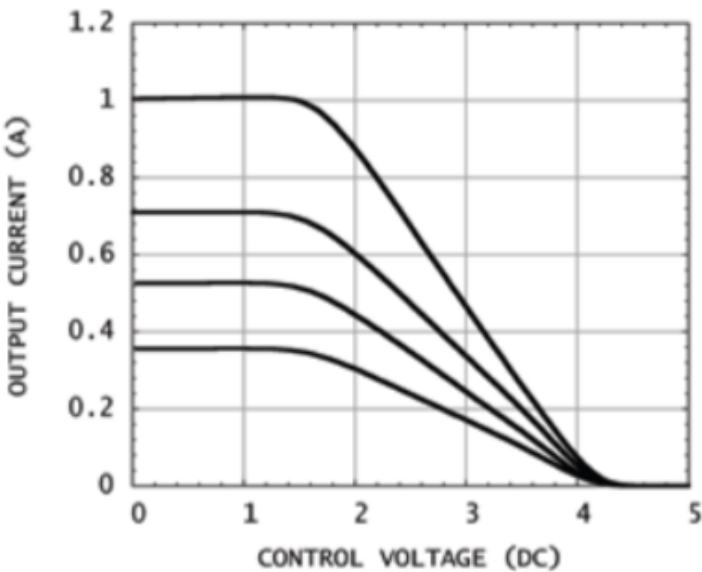


Figura 43. Corriente de salida vs tensión de control. 5V generan una corriente nula. 0V generan una corriente de 500 mA para un driver y 700 mA para el otro. Esto va a presentar un desafío a la hora de querer controlar los LEDs debido a que los mismos van a seguir un comportamiento opuesto al de los PWM que salen del módulo Arduino. Próximamente se va a explicar cómo se resolvió este punto.

Output current, 3021-x-x-350, 3023-x-x-350	350mA ¹
Output current, 3021-x-x-500, 3023-x-x-500	500mA ¹
Output current, 3021-x-x-700, 3023-x-x-700	700mA ¹
Output current, 3021-x-x-1000, 3023-x-x-1000	1000mA ¹
Control Pin, adjustment threshold	1.65 V ±5%
Control Pin, shutoff threshold	4.2 V ±5%
Control Pin, propagation delay to output	<15 μs
Control Pin, input impedance	1.5k ohm
Reference voltage (V _{in} = 7V or greater)	5 V _{DC} ±5% ²
Optional trim pot adjustment range	40%-110%
External pot adjustment range	0%,1-100% ²
Maximum flash frequency	10 kHz
Minimum strobe pulse width	50 μs
Output rise time	<10 μs ³
Output fall time	<350 μs ³
Quiescent current (no load or control pin high)	<4.5 mA ³
Operating temperature (Tcase).	-40-+80°C
Storage temperature	-40-+125°C

Figura 44. Especificaciones técnicas del driver.

2.2.3. Inversión de los PWM de estimulación

Los *drivers* que controlan a los LEDs tienen la característica de que interpretan 5V de señal como LOW y 0V como HIGH. Por ende cuando el PWM llega a los *drivers*, los LEDs se comportan de forma opuesta respecto a los PWMs.

Esto se arregla rápido si se invierte la señal modificando el código del microcontrolador. Se estaría invirtiendo la señal de PWM para que cuando el *driver* reciba dicha señal, el patrón de comportamiento del LED sea el deseado. De forma tal que cuando el usuario ingrese en la interfaz Python el *duty-cycle* deseado para los LEDs, va a estar configurando el ancho del ciclo OFF de los PWMs. A continuación se va a mostrar un ejemplo donde la parte 1) de la figura representa el patrón de comportamiento deseado para los LEDs:

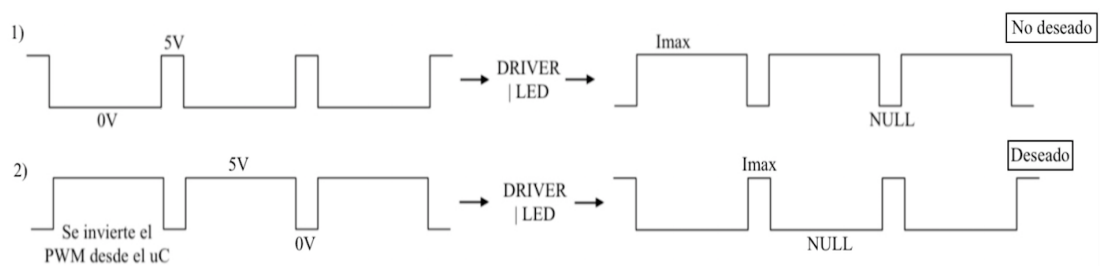


Figura 45. Esquema señal PWM - Driver.

2.2.4. Cámara FLIR y programa FlyCap2

La cámara FLIR cuenta con las siguientes características:

BFLY-U3-23S6M-C	
Firmware	1.8.3.0
Resolution	1920 x 1200
Frame Rate	41 FPS
Megapixels	2.3 MP
Chroma	Mono
Sensor	Sony IMX249, CMOS, 1/1.2"
Readout Method	Global shutter
Pixel Size	5.86 μ m
Lens Mount	C-mount
ADC	10-bit / 12-bit in Mode 7
Gain Range	0 dB to 29.996 dB
Exposure Range	0.019 ms to 3.9 seconds
Trigger Modes	Standard, bulb, overlapped, multi-shot
Partial Image Modes	Pixel binning, decimation, ROI
Image Processing	Gamma, lookup table, and sharpness
Image Buffer	16 MB
User Sets	2 memory channels for custom camera settings
Flash Memory	1 MB non-volatile memory
Opto-isolated I/O Ports	1 input, 1 output
Auxiliary Output	3.3 V, 120 mA maximum
Interface	USB 3.1
Power Requirements	5-24 V via GPIO or 5 V via USB 3.1 interface
Power Consumption	<3 W maximum
Dimensions/Mass	29 mm x 29 mm x 30 mm/36 g
Machine Vision Standard	USB3 Vision v1.0
Compliance	CE, FCC, KCC, RoHS. The ECCN for this product is: EAR099.
Temperature	Operating: 0° to 45°C Storage: -30° to 60°C
Humidity	Operating: 20% to 80% (no condensation) Storage: 20% to 95% (no condensation)
Warranty	3 years

Figura 46. Especificaciones técnicas de la cámara.

Para que el sensor CMOS realice una captura sincronizada respecto a los pulsos de estimulación PWM es necesario respetar la configuración GPIO de la cámara:


Diagram	Color	Pin	Function	Description
	Green	1	V _{EXT}	+12 V DC Camera Power
	Black	2	I/O	Opto-isolated input (GPIO 0)
	Red	3	NC / +3.3 V	+3.3 V output. Current 120 mA (nominal). Firmware enabled (OUTPUT_VOLTAGE_ENABLE: 19D0h)
	White	4	O1	Opto-isolated output (GPIO 1)
	Blue	5	OPTO_GND	Ground for opto-isolated I/O, not connected to camera ground
	Brown	6	GND	DC camera power ground

Figura 47. Esquema señal PWM - Driver.

Se procede entonces a conectar el pin 5 de la cámara FLIR (GND) a la tierra del Arduino. Luego se conecta el pin digital 46 al pin 2 de la cámara FLIR (I/O). De esta manera, la señal PWM que controla la velocidad de adquisición de la cámara (que sale del pin 46) va hacia el pin 2 del sensor CMOS.

CONEXIONES ATMEGA2560 | BFLY-U3-23S6M-C

ATMEGA2560	BFLY-U3-23S6M-C
PL3 (digital pin 46)	Opto-isolated input (GPIO 0) Black Pin 2
GND	GND for opto-isolated I/O Blue Pin 5

Para controlar la cámara, configurar sus parámetros y obtener imágenes se usa un software denominado FlyCap2. El cual se encuentra solo disponible para Windows.

A continuación se puede observar el panel de control para configurar el modo de *trigger* de la cámara.

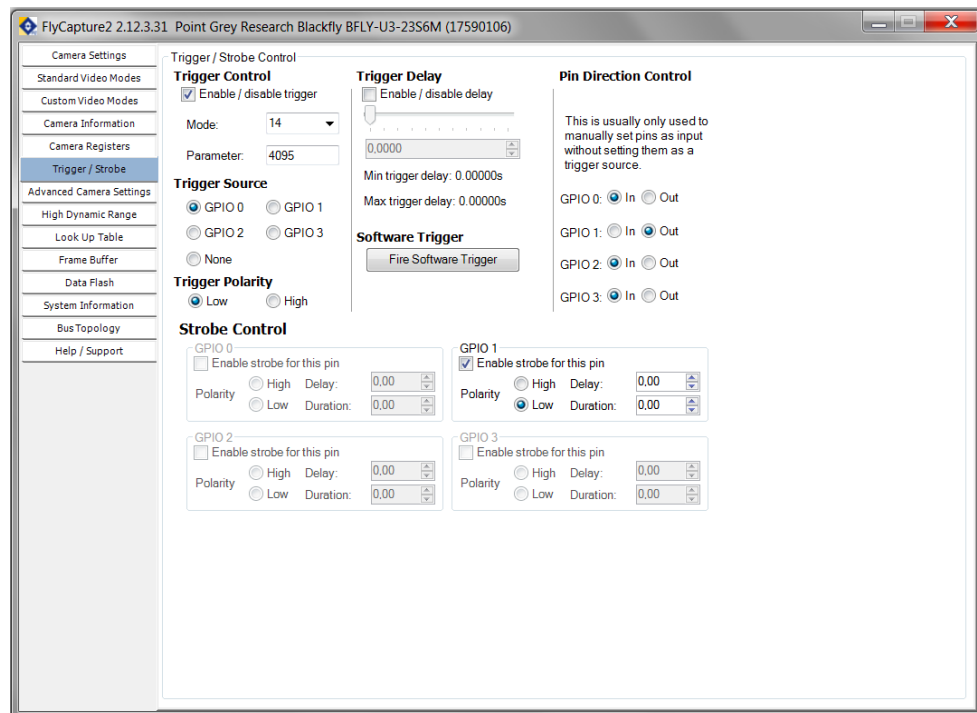


Figura 48. Parámetros de “Trigger Control” para la cámara FLIR. Correspondiente al software FlyCapture.

Hay que seleccionar la opción *Enable / disable trigger* en modo 14, denominada *Overlapped Exposure Readout Trigger*. Este modo prioriza el cumplimiento de los cuadros por segundo impuestos por el usuario desde una fuente externa. De forma tal que el *trigger* siempre mantenga el ritmo deseado (40 Hz, 80 Hz, etc). Este modo es el que permite alcanzar las velocidades más altas de lectura.

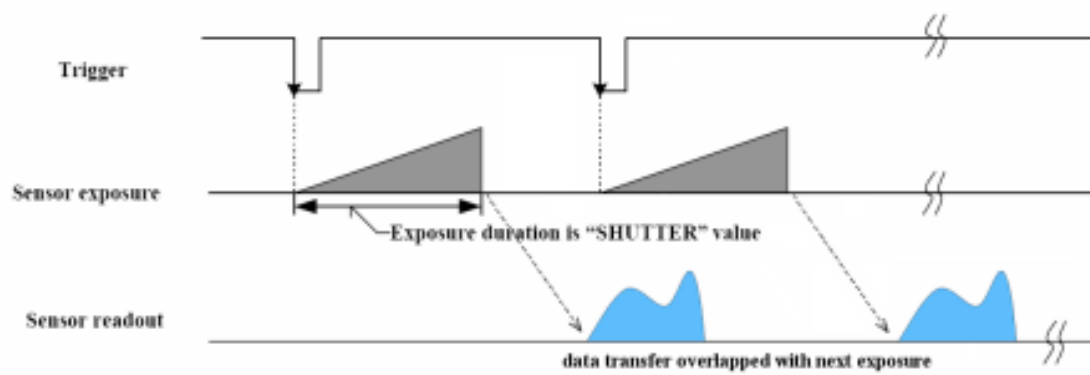


Figura 49. Relación entre shutter y frame rate para el Overlapped Exposure Readout Trigger (mode 14) [36].

Como se observa en la figura anterior, el *trigger* de la foto actual puede superponerse con la lectura (*data transfer*) de la imagen correspondiente al *trigger* anterior. Lo que provocaría que la transferencia de datos de la foto anterior se superponga temporalmente con la exposición de la foto actual [36].

Se presenta a continuación una imagen de la interfaz que provee el software FlyCap2 para poder configurar otros parámetros del sistema de adquisición:

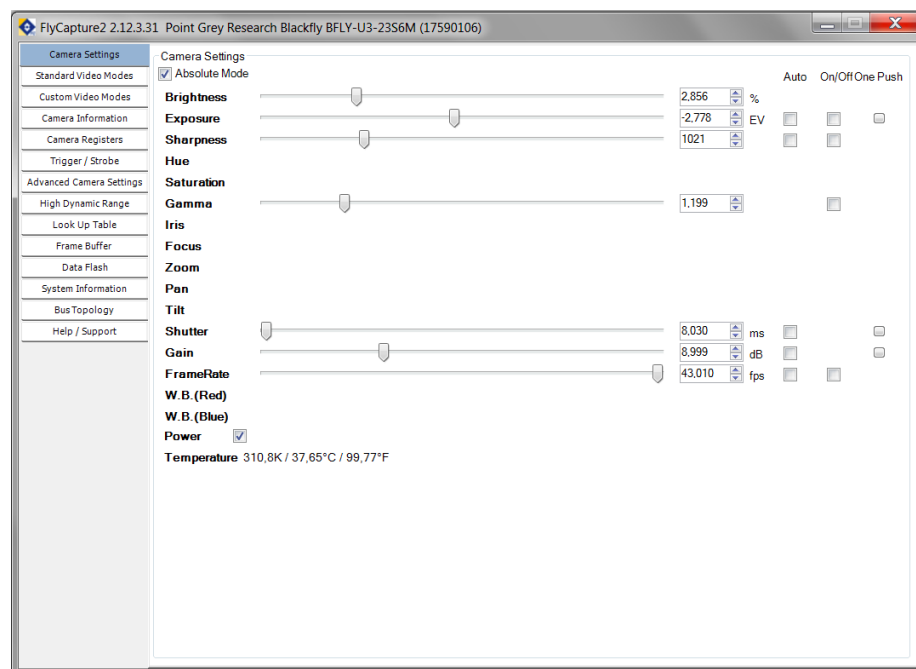


Figura 50. Parámetros de la cámara FLIR. El número que figura en FrameRate indica el límite superior para este parámetro.

Gamma, *sharpness*, *brightness* y *exposure* son parámetros que se ajustan automáticamente dadas las condiciones experimentales en las que se encuentre el equipo. *Shutter* y *gain* se ajustan manualmente acorde a lo especificado por el operador. Bajo el modo 14, el valor de *frame rate* va a ajustarse automáticamente al impuesto por el PWM 3 del microcontrolador.

A continuación veremos otras opciones que hay para la cámara en la sección *Custom Video Modes*.

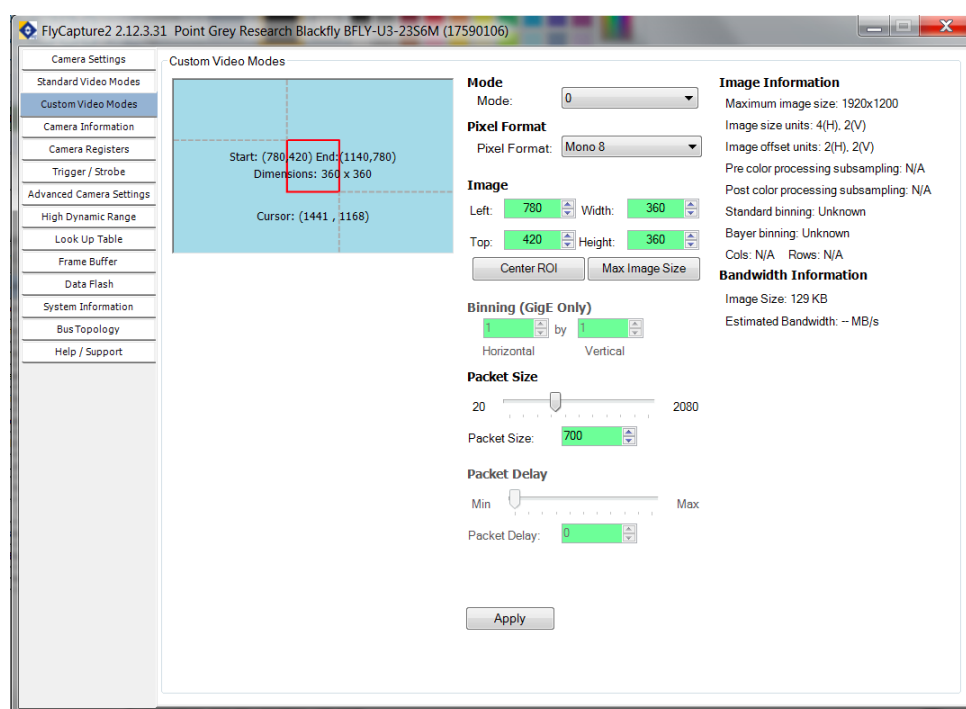


Figura 51. Parámetros de adquisición de la cámara FLIR. Se pueden regular las dimensiones de la región de interés acorde al diámetro y cantidad de fibras ópticas utilizadas.

Al sensor CMOS se lo configura para que opere en modo *8-bits* (formato de pixel *Mono 8*) debido a dos razones:

1. *8-bits* es más rápido. Permitiendo alcanzar velocidades de adquisición de hasta 100 FPS, lo cual hace que este modo sea la elección ideal a la hora de capturar transientes de calcio intracelular.

2. *8-bits* reduce el tamaño del archivo. En términos de almacenamiento de datos, *8-bits* conforman *1 byte*. Por lo tanto cualquier archivo por arriba de los *8 bits* va a ocupar por lo menos *2 bytes*. Esto implica que otros modos como *Mono 12* o *Mono 16* ocupen el doble de espacio que *Mono 8*.

Es importante maximizar siempre el tamaño de los paquetes (*Packet Size*) para asegurarse de que el sensor de la cámara pueda seguir la frecuencia de adquisición dictada por el tercer PWM proveniente del pin 46. Se puede ajustar el tamaño de los paquetes (y por ende el tamaño del buffer) de forma acorde como dicta la siguiente fórmula:

$$N \cdot \frac{Packet\ Size}{Desired\ FPS} = Buffer\ Size \quad (19)$$

Como se puede apreciar en la fórmula anterior, a mayor *Packet Size* mayor va a ser el tamaño del *buffer* (*Buffer Size*). Lo que resulta en un sensor que respeta los FPS deseados. *N* representa la cantidad de paquetes enviados desde la cámara hacia la computadora por segundo. Esta variable se encuentra regida por la siguiente fórmula:

$$N = FPS \cdot rows \cdot cols \cdot \frac{bytesPerPixel}{bytesPerPacket} \quad (20)$$

Donde *rows* representa las filas de píxeles en la imagen y *cols* las columnas de la misma.

Otra característica que hay que destacar es que el software FlyCap2 presenta los FPS de la cámara de 4 formas distintas [37]:

1. *Processed.*
2. *Displayed.*
3. *Requested.*
4. *Received.*

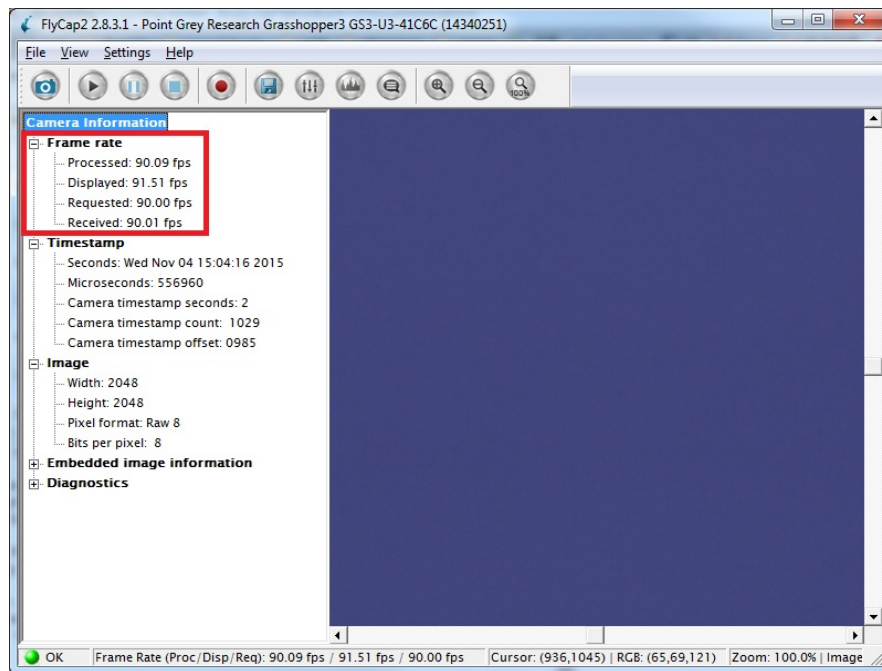


Figura 52. FlyCap2 muestra estos 4 tipos de FPS sobre la interfaz de usuario. En el recuadro azul es donde se van a presentar en tiempo real las imágenes adquiridas por la cámara.

Processed: este número es calculado una vez que la imagen fue procesada por el software FlyCap2. Es un parámetro que permite interpretar si la computadora utilizada por el usuario cuenta con el poder de procesamiento y memoria necesarios para correr los programas [37]. Normalmente este valor corresponde a los cuadros por segundo impuestos por el PWM 3 (solicitados por el usuario). Pero puede que a veces sea menor. Esto se debe a que la computadora requiere de un tiempo determinado para recibir y procesar cada imagen antes de enviarla al siguiente software, Bonsai Open Ephys.

Displayed: este valor es calculado luego de que la imagen haya sido presentada en la pantalla de la interfaz de usuario que muestra FlyCap2. No suele ser representativo de lo que está realmente pasando en el equipo.

Requested: este número es el *frame rate* máximo posible de la cámara dadas las configuraciones seleccionadas. Mientras más grande sea el tamaño del paquete empleado, más chico el tiempo de exposición, más pequeño el ROI y más bajo sea el modo del formato del píxel, mayor va a ser el *requested fps* del sistema. Por lo tanto

durante la configuración de estos parámetros siempre hay que asegurarse de que se cumpla la siguiente condición:

$$FPS_{Requested} > FPS_{microcontrolador} \quad (21)$$

Received: este valor es calculado a partir de las marcas temporales que la computadora impone desde el software FlyCap2 cuando le llega una foto.

BFLY-U3-23S6M

Firmware: 1.8.3.0

Mode 0

1920 x 1200	1280 x 960	1024 x 768	800 x 600	640 x 480	320 x 240	160 x 120
41	51	63	79	97	177	299

Mode 1

960 x 600	640 x 480	320 x 240	160 x 120
41	51	97	177

Mode 7

1920 x 1200	1280 x 960	1024 x 768	800 x 600	640 x 480	320 x 240	160 x 120
32	39	49	61	75	137	232

Figura 53. BFLY-U3-23S6 frame rates dependiendo de Video Mode.

Finalmente la computadora recibe la información proveniente de FlyCap2 y la procesa por medio de Bonsai para poder cuantificar los datos de las fotos promediadas y graficarlos en tiempo real.

2.2.5. Bonsai software

Bonsai es un software, disponible solo para Windows, que sirve para tomar las fotos provenientes de FlyCap2 y procesarlas. Mediante el uso de nodos, en un espacio de trabajo, se conforma una estructura que va a ejecutar operaciones de diferente índole sobre las fotos extraídas de FlyCap2.

En la siguiente imagen se ve a la izquierda el software de la cámara denominado FlyCap2. A la derecha se puede observar el software Bonsai que se encarga de procesar las fotos provenientes de FlyCap2. Los 2 programas se encuentran

conectados entre sí gracias al módulo *FlyCapture* que se encuentra en el *workflow* de Bonsai.

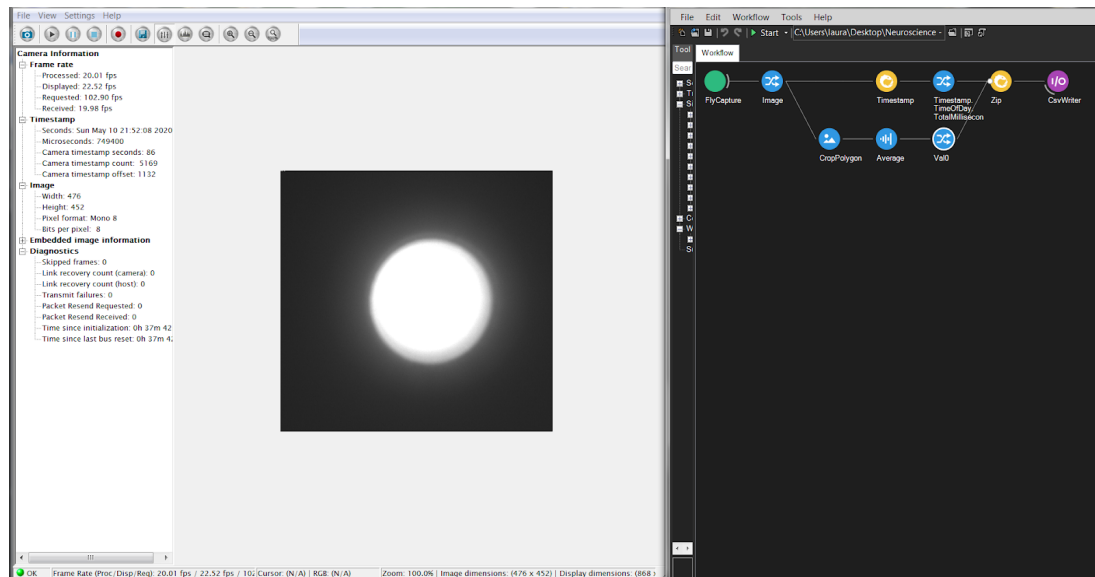


Figura 54. A la izquierda se ve la luz que llega de la fibra óptica hacia la cámara (visualizado mediante FlyCap2) y a la derecha el workflow de Bonsai que todavía está inactivo.

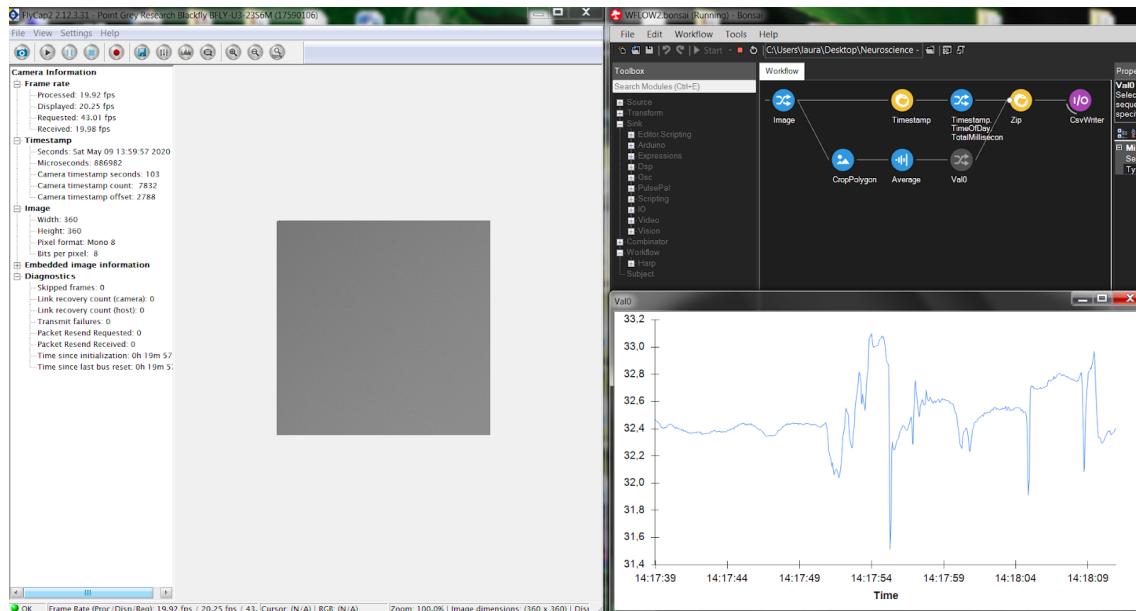


Figura 55. Una vez activado el procesamiento de datos en Bonsai, la pantalla que muestra la captura de imagen en FlyCap2 se congela (cuadrado gris) pero el sistema sigue funcionando. A la derecha abajo se puede apreciar el display gráfico de Bonsai en tiempo real al clicar en el nodo Val0.

En este caso Bonsai:

1. Toma las fotos provenientes de la cámara FLIR gracias al nodo *FlyCapture*.
2. Prepara una marca temporal (*timestamp*) para cada foto.
3. Realiza un recorte a la foto mediante el nodo *CropPolygon*, permitiendo aislar el área de píxeles de interés para posteriormente procesarlos.
4. Promedia los píxeles, obteniendo un solo valor.
5. Asocia cada valor a su respectiva marca temporal.
6. El output final de Bonsai es un archivo *.CSV*. Una tabla conformada por dos columnas: tiempo e intensidad de fluorescencia de calcio. Y filas dependiendo de la duración del experimento.
7. En paralelo, Bonsai va a generar un video a partir de las fotos adquiridas para luego poder corroborar que la fibra no se haya desacomodado respecto de la lente de la cámara durante el experimento. De forma tal que el usuario pueda entender qué fue lo que pasó en caso de observar una repentina caída en la señal.

La comunidad de Bonsai Open Ephys cuenta con numerosos tutoriales y foros para poder entender mejor cómo usar esta herramienta.

2.2.6. 16-bit Timer/Counter (1, 3, 5)

Esta sección del informe fue desarrollada para fines prácticos. No hubo intención de querer ahondar en la teoría de funcionamiento de los *Timers* o en la generación de las señales PWM.

Respecto a los 3 PWM utilizados, se los configuró de la siguiente forma en el microcontrolador:

16-bit Timer/Counter (Timer/Counter 1, 3, 5)

Mode	WGMn3	WGMn2 (CTCn)	WGMn1 (PWMn1)	WGMn0 (PWMn0)	Timer/Counter Mode of Operation	TOP	Update of OCRnx at	TOVn Flag Set on
14	1	1	1	0	Fast PWM	ICRn	BOTTOM	TOP

- Compare Output Mode, Fast PWM

COMnA1 COMnB1 COMnC1	COMnA0 COMnB0 COMnC0	Description
1	0	Clear OCnA/OCnB/OCnC on compare match, set OCnA/OCnB/OCnC at BOTTOM (non-inverting mode)
1	1	Set OCnA/OCnB/OCnC on compare match, clear OCnA/OCnB/OCnC at BOTTOM (inverting mode)

Figura 56. Información proveniente del ATmega2560 datasheet donde se muestran diferentes opciones de configuración para los Timer/Counter 1, 3, 5. Se muestran posibles configuraciones de los Waveform Generation Mode (WGMn3:0) y Compare Output mode (COMnx1:0) bits pertenecientes a los registros Clock Select (CSn2:0) localizados en el registro de control Timer/Counter A (TCCRnA) y Timer/Counter B (TCCRnB).

Se eligió:

- *Fast PWM* y *Compare Output Mode* en *inverting mode* como modo de operación para los *Timer/Counter* 1 y 3 con el objetivo de controlar las 2 señales LED de estimulación.
- *Fast PWM* y *Compare Output Mode* en *non-inverting mode* como modo de operación para el *Timer/Counter* 5 que controla el *trigger* de la cámara FLIR.

La frecuencia de salida para el PWM se calcula con la siguiente ecuación:

$$f_{OCnXPWM} = \frac{f_{clk_{I/O}}}{N(1+TOP)} \quad (22)$$

En caso de que se desee adquirir a 40 FPS, los parámetros de esta fórmula deben ser los siguientes:

$N = 64$; $f_{clk_{I/O}} = 16$ MHz; TOP (ICRn) = 12499 para $n = \{1, 3\}$ y

TOP (ICR5) = 6249.

Input Capture Register (ICRn) es un registro de 16 bits que configura la frecuencia del pulso PWM.

Estos valores terminan dando las siguientes frecuencias de PWM:

$$f_{OCR_{nx}PWM_{1/3}} = 20 \text{ Hz}$$

$$f_{OCR_{nx}PWM_5} = 40 \text{ Hz}$$

Aclaración importante:

- Si una señal de PWM es generada en *non-inverted mode*, OCRnx sirve para configurar el ancho del ciclo ON.
- Si una señal de PWM es generada en *inverted mode*, OCRnx sirve para configurar el ancho del ciclo OFF.

Donde OCRnA = 2999 para n = {1, 3}. De forma tal que el ancho del ciclo OFF es igual a:

$$\frac{2999}{ICR_{1/3}} * 50 \text{ ms} = \frac{2999}{12499} * 50 \text{ ms} = 11.9965 \text{ ms}$$

Si OCR5A = 50 para entonces el ancho del ciclo ON es igual a:

$$\frac{50}{ICR_5} * 25 \text{ ms} = \frac{50}{6249} * 25 \text{ ms} = 0.20 \text{ ms}$$

Para esta frecuencia, el ancho de pulso para el trigger de la cámara es de 0.20 ms.

TCNTn determina la fase entre los pulsos PWM. En este caso, si TCNT1 = 0 y TCNT3 = 6249, un PWM va a estar desfasado 180 grados respecto del otro. Es decir que los 2 PWM van a estar desfasados 25 ms mutuamente.

Considerando $\text{FPS} = 40$, el *trigger* de la cámara (PWM 3) va a tener un delay de 2 ms respecto al comienzo del ciclo OFF de los PWM 1 y 3 (ya que ambos están en *inverted-mode*) si $\text{TCNT5} = 5750$.

3. Instrucciones del sistema

3.1. Instalación (únicamente en Windows):

Todos los archivos necesarios para llevar a cabo esta parte se encuentran disponibles en la documentación del proyecto.

1. Instalar FlyCap2 +2.12.3.31. Asegurarse durante la instalación de seleccionar todos los *drivers* necesarios para que la cámara Blackfly S USB3 pueda ser detectada por la computadora.
2. Instalar Bonsai 2.4 en Open Ephys, descargar de la galería online los paquetes de *Video Processing* y *Point Grey*.
3. Instalar Arduino IDE.
4. Instalar Anaconda 3 Navigator.
5. Una vez con Anaconda Navigator abierto, ingresar a la pestaña *Environments* y crear un entorno para Arduino. Luego dentro de este entorno instalar los paquetes *numpy*, *tk*, *pyserial*, *pandas*, *scipy*, *matplotlib* y *scikit-learn*. Todos estos paquetes son necesarios para poder correr diferentes códigos de control y procesamiento de señales. Para hacer esto abrir la terminal de Anaconda correspondiente al entorno de Arduino. Dentro de la terminal escribir:

```
conda install -c anaconda <nombre del paquete>
```

3.2. Seguridad:

En el espectro visible, longitudes de onda cortas entre 415 nm y 455 nm se encuentran estrechamente relacionadas al daño ocular [38]. Por eso es necesario usar gafas de protección ocular durante la calibración y manipulación del equipo. Acorde al reporte de seguridad *Application Brief AB60* conformado por Philips Lumileds, los LEDs utilizados en este trabajo caen dentro de la categoría de riesgo número 2 (riesgo moderado).

Estos anteojos de seguridad proveen protección bajo los estándares de Conformidad Europea (CE) y ANSI Z136 frente a radiación láser. Su rango de protección se encuentra impreso sobre las lentes. Estas gafas tienen escudos laterales para proteger a los ojos del usuario, manteniendo su visión periférica. El interior es de 145 mm x 53 mm, lo cual da suficiente espacio como para poder usar lentes prescritos.

Specifications

Specification	Value	Specification	Value
Luminous Transmittance	48%	LB-Rating	
Optical Density		180 - 315 nm	D LB7
180 - 532 nm	7+	180 - 315 nm	IR LB4
		>315 - 532 nm	DIRM LB6

Graph

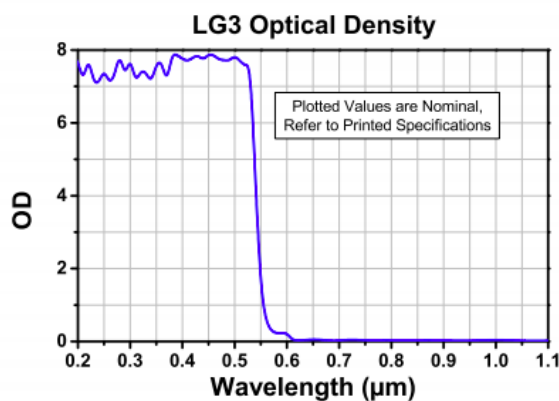


Figura 57. Especificaciones técnicas de los anteojos de seguridad.

Como se puede ver, las longitudes de onda 410 nm y 470 nm se encuentran dentro del rango de protección de las gafas de seguridad.

3.3. Calibración y uso:

A continuación se van a detallar las etapas de configuración y calibración de los distintos sistemas que integran al equipo para que los mismos funcionen de forma ordenada.

Interfaz Python:

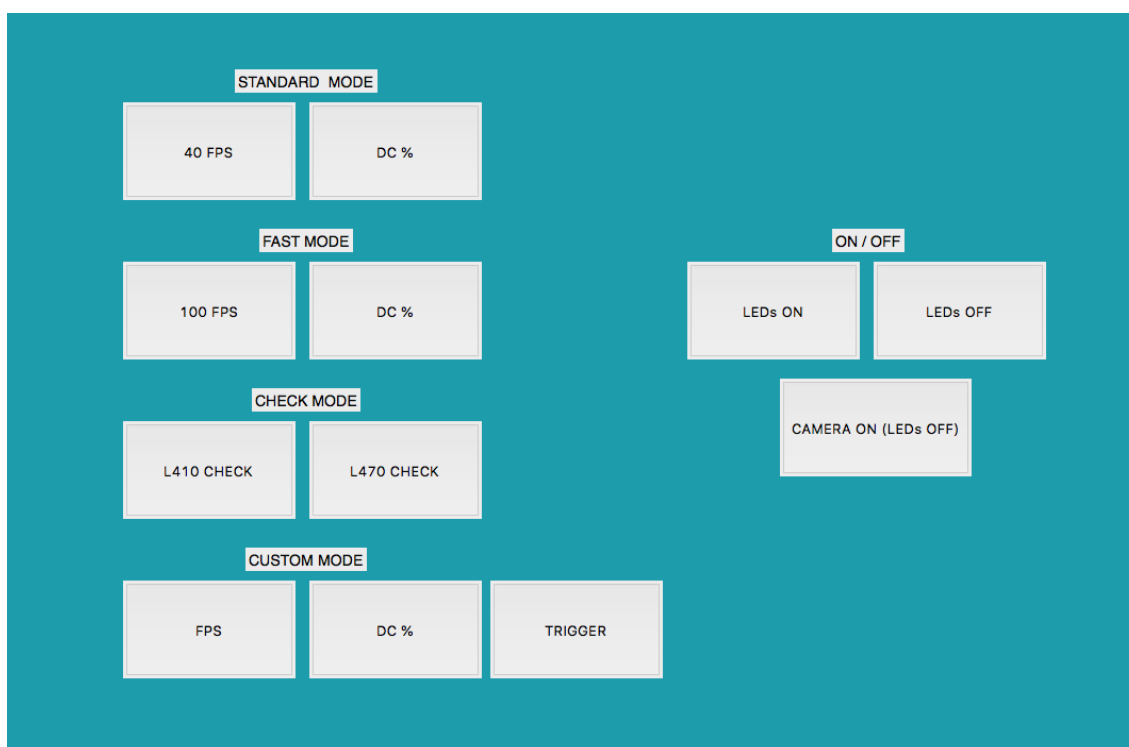


Figura 58. Interfaz de usuario en Python del sistema de Fiber Photometry. Cuenta con 4 modos de trabajo: “Standard Mode”, “Fast Mode”, “Check Mode” y “Custom Mode”.

Mediciones:

1. Por seguridad, la fuente que alimenta los LEDs debe estar inicialmente **desenchufada**.
2. Iniciar la interfaz corriendo el *script* “GUI” que se encuentra dentro de la carpeta “Interfaz-Control-Python” utilizando *Spyder* (Python 3.7).
3. Como medida de seguridad el sistema automáticamente va a enviar 2 señales que van a bloquear (mantener apagados) los LEDs.

4. Elegir la velocidad de adquisición de la cámara y *duty-cycle* deseado. Hacer esto va a configurar automáticamente las señales de estimulación LED. Se confeccionó la siguiente tabla de valores para el caso en el que se quiera adquirir a una frecuencia no estándar:

Ts*2 (ms)	FPS	Trigger Delay	DC min (%)	Exposición (ms)	Exposición máx (ms)
50	40	Automático	10%	50*DC	21
40	50	5285	8%	40*DC	17
33,33	60	3915	9%	33,33*DC	13.33
28,57	70	3320	11%	28,57*DC	11.28
25	80	2875	12%	25*DC	10.5
22,22	90	4170	13%	22,22*DC	9.11
20	100	Automático	15%	20*DC	8

Tabla 1. Diferentes combinaciones de FPS con el retardo temporal adecuado para el trigger de la cámara junto a los intervalos permitidos para duty-cycle y exposición. En la tabla figuran las frecuencias restantes que son posibles, el delay del trigger necesario, el duty-cycle mínimo que se puede implementar y la máxima exposición permitida para la cámara (con duty-cycle al 49%). No se especifican los delays para FPS = 40 y FPS = 100 debido a que se configuran de forma automática al elegir dichas velocidades de adquisición en la GUI.

Los valores de registro correspondientes a la columna “*Trigger Delay*” deben ser introducidos en el sistema haciendo click en la opción **TRIGGER** que figura en la interfaz de usuario. Logrando configurar un *delay* de 1 ms para el *trigger* de la cámara en el caso de elegir FPS no estándar (50 a 90 FPS) o estándar de 100 FPS. O un *delay* de 2 ms para el caso de 40 FPS.

- **Importante:** si se deciden cambiar los FPS luego de haber configurado el *duty-cycle*, recordar que se debe volver a configurar el *duty-cycle*.
5. Apretar **CAMERA ON (LEDs OFF)** para que el microcontrolador comience a enviar una señal de control a la cámara.

FlyCap2:

6. Abrir FlyCap2, tocar *Refresh* y *OK*. Luego *Play*. La cámara se activa siguiendo los FPS marcados por el microcontrolador. Puede que la cámara no sea todavía capaz de respetar el ritmo que le impone el microcontrolador debido a que falta todavía optimizar sus parámetros. Esto va a hacerse en los próximos pasos.
7. Recordar de tener puestos los **anteojos de seguridad**. **Enchufar** la fuente y tocar el botón **LEDs ON**. Esto se debe hacer para controlar como la cámara observa la luz proveniente de la punta de la fibra óptica y así poder calibrar el ROI de forma apropiada.
8. Ir luego a *Settings / Toggle Camera Control Dialog / Custom Video Modes*. Donde hay que configurar el tamaño del ROI buscado, maximizar *Packet Size*, centrar el ROI y seleccionar *Mono 8* (imagen de 8 bits).
9. Apagar los LEDs tocando el botón **LEDs OFF**.

Bonsai:

10. Los parámetros del nodo de FlyCapture en Bonsai deben estar en configuración *False/0* para que el mismo obedezca lo que le impone el software FlyCap2.
11. Configurar el nodo *VideoCapture* en Bonsai para que grabe a una frecuencia adecuada dependiendo de la velocidad de adquisición elegida anteriormente.
12. Luego en Bonsai tocar *Play* para iniciar la grabación y dar comienzo al procesamiento del *workflow*.

FlyCap2:

13. Mientras Bonsai corre, configurar de forma manual (en *Toggle Camera Control Dialog / Camera Settings*) el *Shutter* (tiempo de exposición) y *Gain*. El usuario puede modificar estos dos parámetros como desee siempre y cuando se respeten las condiciones ya explicadas.

- **Importante:** mientras funciona Bonsai no se puede modificar ningún parámetro de *Custom Video Modes* en FlyCap2 debido a que esto dispararía un error de consistencia de datos entre FlyCap2 y Bonsai. Una vez iniciado Bonsai sólo se van a poder modificar en tiempo real los parámetros correspondientes a *Camera Settings*.
- **Importante:** mientras mayor sea la velocidad de adquisición de la cámara, menor será el tiempo de exposición y por ende mayor será la ganancia necesaria para conservar la sensibilidad a los cambios en fluorescencia. Otro factor a tener en cuenta es que si se aumenta el tiempo de exposición los FPS máximos permitidos disminuyen. Todavía no se conocen las ganancias óptimas correspondientes a los FPS posibles para llevar a cabo experimentos de *Fiber Photometry*.
- **Importante:** si se modifican los parámetros de estimulación LED, durante un experimento, hay que tener en cuenta que al tocar *Activate* los timers que generan los PWMs se reinician. Esto puede representar un inconveniente en el caso de que justo se reinicien antes de que el ciclo ON de estimulación violeta ocurra. Lo que provocaría que el vector de datos reciba dos valores consecutivos de fluorescencia evocada correspondiente a la estimulación azul. Por eso, si se deciden modificar los parámetros de estimulación, lo que hay que hacer es detener Bonsai primero. Lo cual automáticamente genera un archivo nuevo con un vector de datos registrado. Y luego se debe reiniciar todo el proceso de configuración ya detallado anteriormente.

14. Prender los LEDs tocando el botón **LEDs ON**.

Bonsai

15. Una vez finalizada la grabación, presionar el botón **LEDs OFF** y luego **desconectar** la fuente.
- **Importante:** si no presiona **LEDs OFF** antes de cerrar la interfaz GUI en Python, el microcontrolador va a seguir emitiendo las señales PWM que activan los LEDs. Y al volver a enchufar la fuente los LEDs se van a encender de forma desprevénida.

Archivo .CSV:

16. Antes de procesar los datos con la interfaz Python, hay que ir al archivo .CSV formado y reemplazar todos los espacios por “,”. Luego, en la fila superior insertar una fila que diga “time,intensity”. Esto es necesario para que el procesamiento de Python pueda ejecutarse.

Revisión del estado de la señal de fluorescencia:

Para controlar si las proteínas GCaMP6 se codificaron con éxito en el cerebro del animal, es necesario realizar una revisión de la señal de fluorescencia.

1. Elegir los parámetros deseados para la cámara desde la interfaz GUI como ya se explicó anteriormente.
2. Abrir FlyCap2, tocar *Refresh* y *OK*. Luego *Play*.
3. Ir luego a *Settings / Toggle Camera Control Dialog / Custom Video Modes*. Donde hay que configurar el tamaño del ROI buscado, maximizar *Packet Size*, centrar el ROI y seleccionar *Mono 8* (imagen de 8 bits).
4. Luego en Bonsai tocar *Play* para iniciar la grabación y dar comienzo al procesamiento del *workflow*.
5. Mientras Bonsai corre, configurar de forma manual (en *Toggle Camera Control Dialog / Camera Settings*) *Shutter* y *Gain*.
6. Activar cualquiera de los 2 LEDs presionando el botón **L410 CHECK** o **L470 CHECK**.
7. El usuario debe buscar cambios en la medición de fluorescencia acorde a estímulos externos al animal o movimientos bruscos con el objetivo de establecer algún tipo de correlación con los datos cuantificados en tiempo real. Por ejemplo, si ocurre una flexión repentina de la fibra es de esperarse observar un cambio rápido en el gráfico de Bonsai.
8. Si se detectan trazas en paralelo formando surcos repentinos sin sentido con forma de zig-zag en el gráfico de Bonsai, se trata de que hay demasiado ruido o interferencia en la señal y la señal no es calcio dependiente.

9. Se puede observar también que la señal decrece repentinamente y a continuación incrementa de forma lenta y gradual. Esto es el resultado de que la fibra óptica se curvó más allá del radio recomendable, afectando la TIR. Por esto, se debe elegir un largo adecuado para la fibra que conduce luz al cerebro del animal. No muy corta que impida el libre movimiento del animal pero no tan larga como para enredarse.

4. Prueba del sistema

Se llevó a cabo un primer experimento con el fin de mostrar cómo funciona el método de *Time-Division Multiplexing* en este sistema.

El objetivo es dar un ejemplo donde se ilumina una muestra con ambos LEDs (410 y 470 nm) y se detecta la luz reflejada proveniente del material irradiado. Se realizó una pasada con la punta de la fibra óptica por encima de un papel blanco con tinta resaltadora de color amarillo (múltiples franjas sobre una hoja) a velocidad y altura constante. La tinta del resaltador va a reflejar la luz proveniente de los LEDs y la misma va a ser cuantificada y demodulada posteriormente.

El papel blanco sirve como control para el LED violeta y la tinta amarilla sirve como control para ambos colores.

La cámara adquirió 87 segundos en total. Las señales de estimulación consistieron en 2 PWM de 20 Hz cada uno, 180 grados de desfase y ciclos OFF de 22 milisegundos respectivamente.

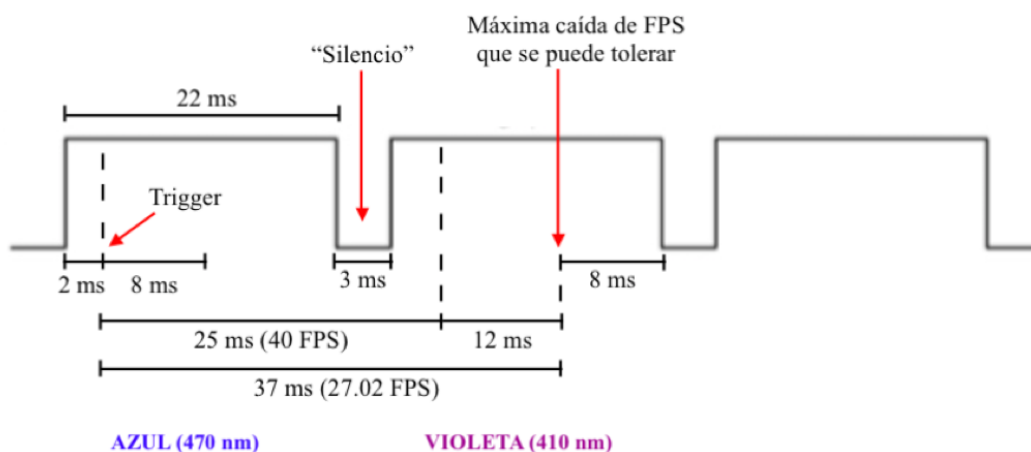


Figura 59. Comportamiento deseado de la luz de estimulación GCaMP6.

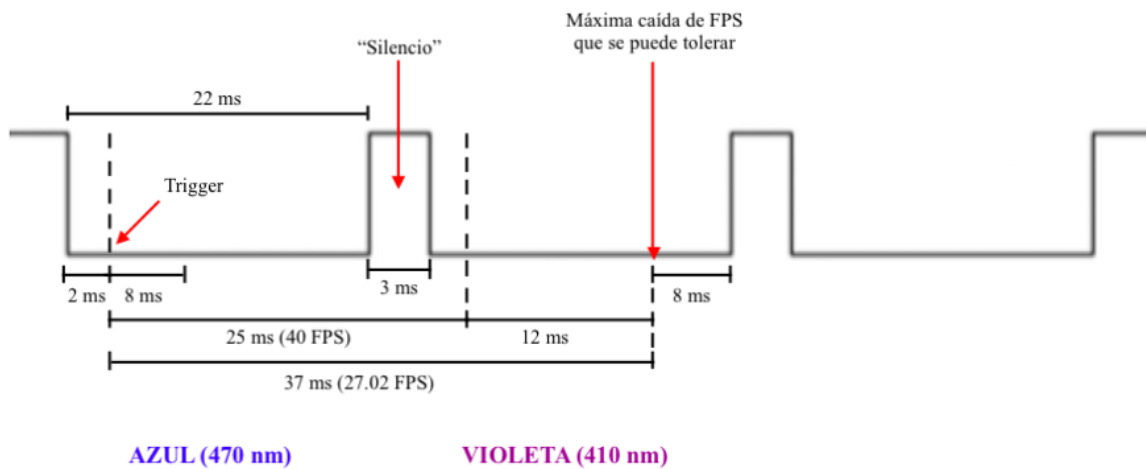


Figura 60. Esquema de ambos PWM - trigger (en un mismo canal) al salir del microcontrolador.

A continuación se muestra un histograma de los tiempos de adquisición.

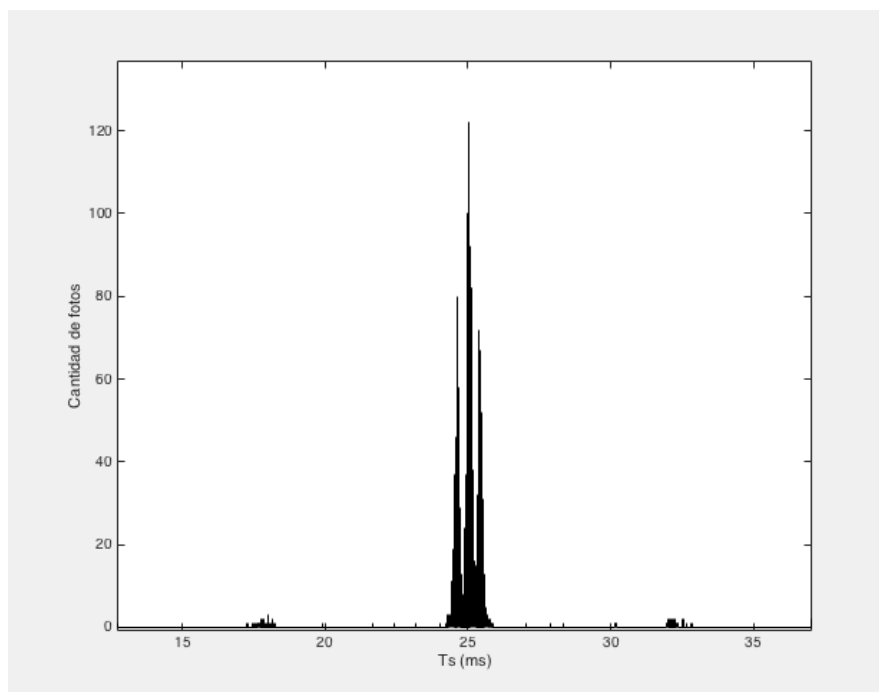


Figura 61. Histograma de fotos vs tiempo de adquisición. En el eje de ordenadas se observa la cantidad de fotos y en el eje de abscisas el tiempo transcurrido entre cada una.

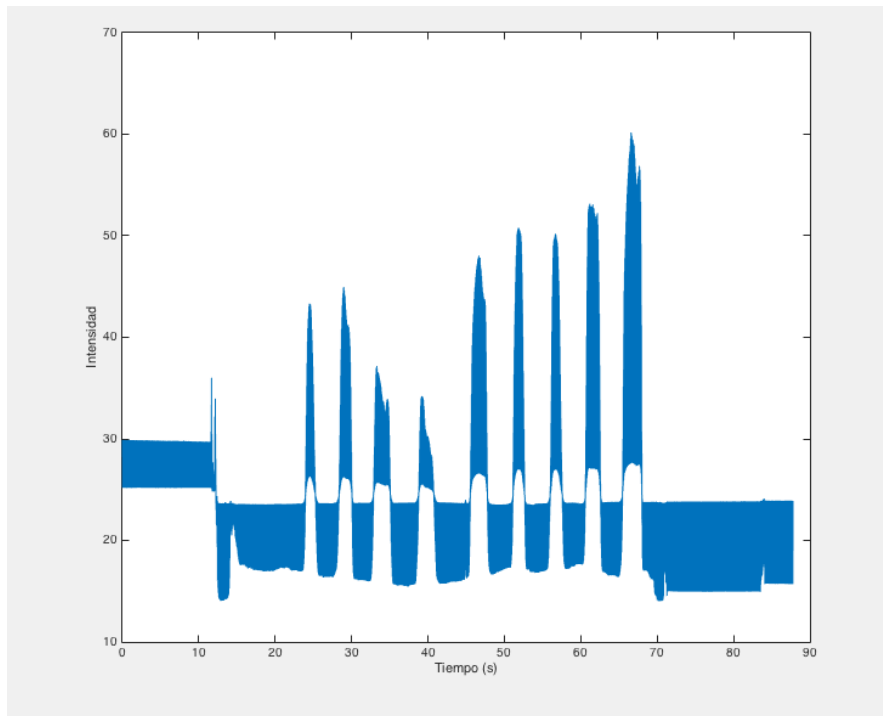


Figura 62. Gráfico de intensidad en el tiempo. Datos extraídos de Bonsai y graficados en Matlab. Cuando la punta de la fibra óptica pasa por encima de una franja de tinta, los valores de intensidad detectados por la cámara aumentan.

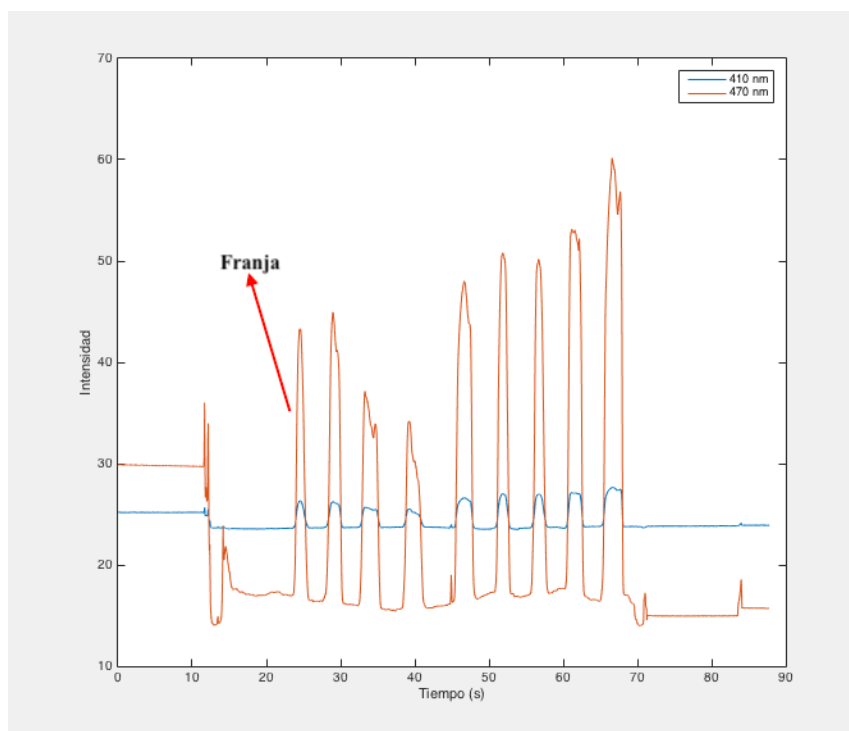


Figura 63. Gráfico de intensidad 470 nm (en rojo) y 410 nm (en azul) en el tiempo.

Estos resultados coinciden con lo enunciado por el *Benchtop Testing* de la compañía *Tucker-Davis Technologies*, donde los valores correspondientes al LED azul son mayores que los del LED violeta cuando se pasa por encima de una franja amarilla y viceversa cuando se pasa por encima de una zona blanca [39]:

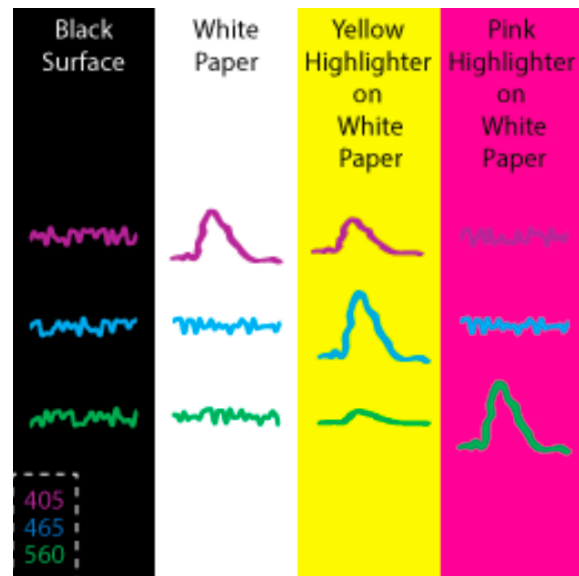


Figura 64. Resultados posibles de un Benchtop Testing proveniente de TDT [39].

Luego se llevaron a cabo una serie de experimentos en los cuales se irradiaron distintas disoluciones compuestas por agua y *green beads* fluorescentes (de 1 μm de diámetro), provenientes de *Bangs Laboratories* (Indiana), con un LED de 415 nm (violeta).

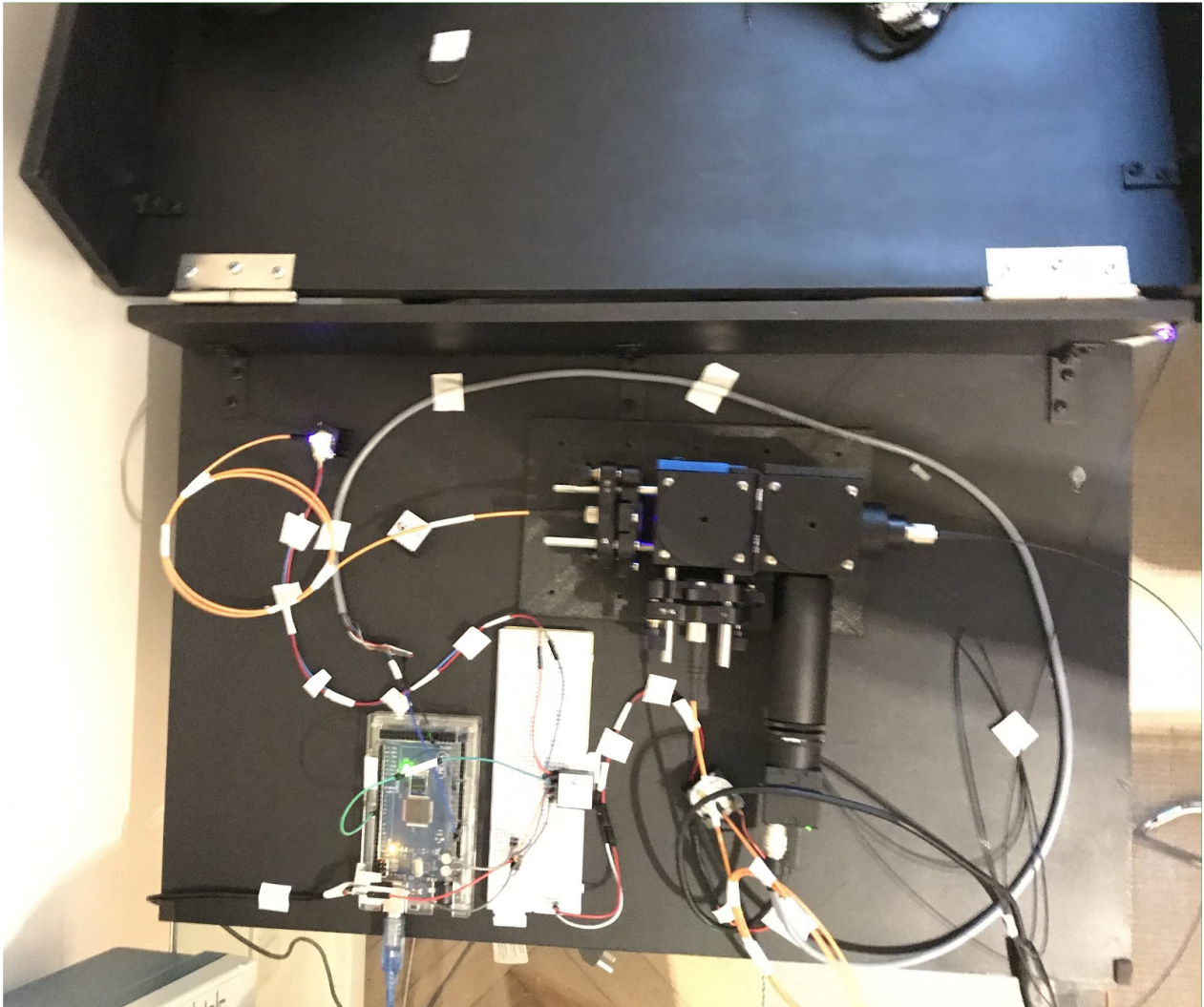


Figura 65. Vista superior del sistema funcionando durante un experimento.

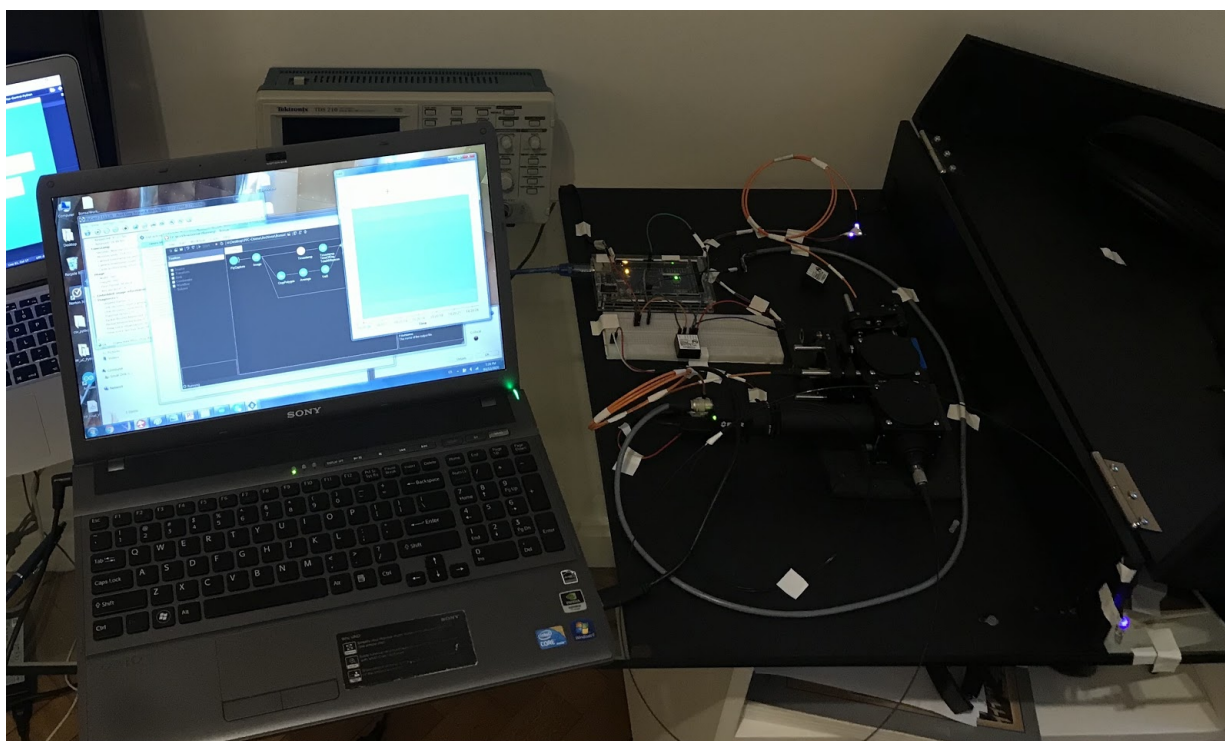


Figura 66. Vista global del sistema funcionando durante un experimento.

Se preparó una solución madre en base a una dilución 1:500 de las *green beads* concentradas. Luego, en relación a la solución madre se armaron 3 tubos de diferente concentración. El segundo tubo contenía la mitad de la concentración de *green beads* que el primero y el tercero la mitad respecto del segundo. Al tubo vacío se lo denominó *background*. A partir de estos experimentos, habría de esperarse que las intensidades de fluorescencia medidas en el preprocesamiento (que van de 0 a 255 en el caso de tratarse de imágenes de 8 bits) fueran proporcionales a la concentración de *green beads* en la muestra.

No se post-procesaron las señales detectadas por la cámara porque se buscó analizar exclusivamente la sensibilidad de la misma, sin alterar los valores con algoritmos que filtren los defectos provocados por la autofluorescencia de la fibra óptica y el decaimiento lumínico del LED generado por el aumento de su temperatura. Factores que se traducen luego en un decaimiento exponencial en la fluorescencia capturada por la cámara a lo largo del tiempo. También hay otros factores que pueden

contribuir a afectar negativamente las mediciones como cualquier movimiento del tubo relativo a la punta de la fibra óptica.

El criterio de detección que se estableció fue el siguiente: se midió con el equipo hasta observar que los valores de intensidad que figuran en el *display* de Bonsai oscilen en un rango límite de ± 1 en un intervalo de más de 10 segundos. Una vez cruzado este umbral temporal, se considera que el efecto del decaimiento exponencial disminuyó y se detiene la medición debido a que se considera que la señal que se está capturando es representativa de la muestra. Mientras más tiempo transcurra a partir de esos 10 segundos mencionados, más se va a contrarrestar el efecto del decaimiento exponencial inicial. Estos experimentos fueron llevados a cabo con la cámara operando a 40 cuadros por segundo, exposición de 21 ms y *duty-cycle* de estimulación del 49%.

Aún tomando en cuenta la falta de homogeneidad inicial respecto a la duración de cada medición y considerando el efecto del decaimiento exponencial, se pudo apreciar cierto patrón entre las mediciones llevadas a cabo. A continuación se muestran los resultados promediados en el tiempo de medición que duró cada prueba:

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9
Gain (dB)	8	9	9	9	9	9	0	0	0
Entero	169,761	193,508	192,729	189,037	197,875	210,217	-	-	72,022
Medio	148,149	172,481	176,043	174,557	179,713	182,240	-	-	59,474
Cuarto	133,570	168,062	158,251	158,361	171,382	153,218	-	-	53,873
Background	126,333	141,784	147,096	143,897	162,986	138,343	52,329	51,646	48,269

Tabla 2. Promedio de intensidades de fluorescencia detectadas en cada experimento. Primero se realizó un experimento con ganancia 8 dB, después 5 consecutivos con ganancia 9 dB. Luego se midió el ruido de fondo (background) dos veces con ganancia 0 dB y se cerró la tanda de experimentos midiendo la fluorescencia en los 4 tubos por última vez.

Con el objetivo de reducir la magnitud de la señal de *background*, se redujo la ganancia de la cámara a 0 dB y en el experimento 9 se observó que la sensibilidad frente a las distintas concentraciones de fluorescencia se mantuvo. Sin embargo, la relación señal/ruido en este caso sigue siendo problemática debido a que la fluorescencia detectada producto de los *green beads* se da sobre una base de autofluorescencia de 48,269. Esto se puede solucionar instalando un potenciómetro para bajar la intensidad del láser y así disminuir la autofluorescencia emitida por la fibra. Otra opción es bajar el *duty-cycle*.

En la siguiente tabla se restó la autofluorescencia de la fibra de los valores correspondientes a los tubos “entero”, “medio” y “cuarto” y se normalizaron los datos:

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9
Gain (dB)	8	9	9	9	9	9	0	0	0
Entero	1	1	1	1	1	1	-	-	1
Medio	0,5024	0,5935	0,6343	0,6792	0,4792	0,6107	-	-	0,4718
Cuarto	0,1667	0,5080	0,2444	0,3204	0,2406	0,2070	-	-	0,2359

Tabla 3. Intensidades de fluorescencia normalizadas. El promedio de las 5 mediciones con ganancia 9 dB para el tubo “medio” da 0,5994 y 0,3041 para el tubo “cuarto”.

A partir de estos resultados se puede concluir que los valores no se comportan de forma lineal si se utiliza una ganancia de 8 o 9 dB. En cambio respecto a los valores del experimento 9, con una ganancia de 0dB, se puede observar una conducta más lineal.

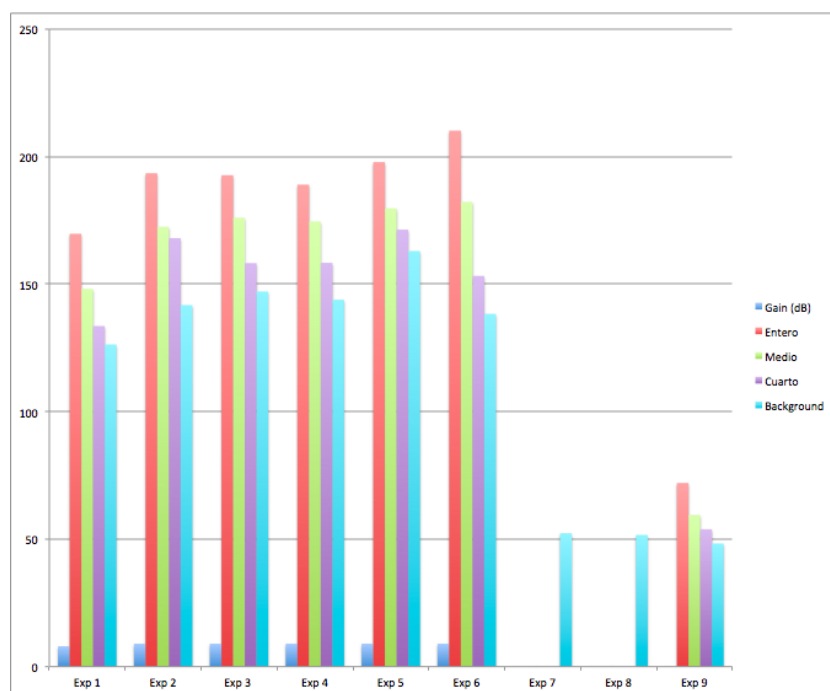


Figura 67. Gráfico de barras representando las distintas Intensidades de fluorescencia detectadas en cada experimento. Entre todas las pruebas realizadas se puede apreciar un mismo orden entre los distintos valores.

Finalmente se promediaron y se confeccionaron en una tabla los últimos 27 segundos de cada señal, que es cuando las señales se encuentran con un decaimiento exponencial menos pronunciado y más estabilizadas:

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9
Gain (dB)	8	9	9	9	9	9	0	0	0
Entero	168,4904	192,2920	191,4594	188,2358	197,3743	209,1612	-	-	69,8452
Medio	146,6274	170,5809	174,7219	173,3517	178,6969	181,5123	-	-	59,2043
Cuarto	131,6761	167,1799	156,7248	157,5411	171,3818	153,1574	-	-	53,5611
Background	124,7751	140,3692	145,1520	142,6805	163,1982	136,3685	50,9854	51,4469	47,8521

Tabla 4. Promedio de los últimos 27 segundos de las señales de fluorescencia detectadas en cada experimento.

Y la tabla normalizada tiene el siguiente aspecto:

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9
Gain (dB)	8	9	9	9	9	9	0	0	0
Entero	1	1	1	1	1	1	-	-	1
Medio	0,4998	0,5818	0,6385	0,6814	0,4535	0,6202	-	-	0,5162
Cuarto	0,1579	0,5163	0,2499	0,3262	0,2395	0,2306	-	-	0,2596

Tabla 5. Intensidades de fluorescencia normalizadas para los últimos 27 segundos de cada señal. Las proporciones 1, 1:2, 1:4 mejoraron en algunos casos.

Ahora se va a presentar la varianza de los últimos 27 segundos de cada una de las señales:

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9
Gain (dB)	8	9	9	9	9	9	0	0	0
Entero	0,1003	0,0460	0,0548	0,0672	0,2443	0,0480	-	-	0,0420
Medio	0,3492	0,1804	0,1194	0,1963	0,4349	0,0419	-	-	0,0279
Cuarto	0,0726	0,1776	0,0431	0,1146	0,3836	0,0600	-	-	0,0175
Background	1,2538	0,3780	0,6703	0,4796	1,0194	0,1412	0,0691	0,0145	0,0454

Tabla 6. Varianza de los últimos 27 segundos de las señales de fluorescencia.

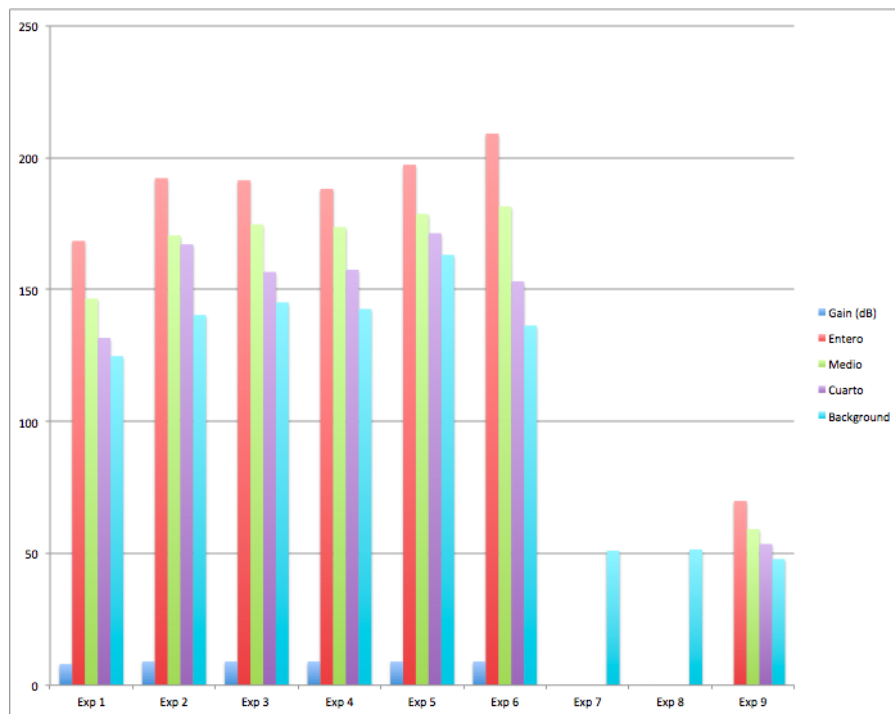


Figura 68. Gráfico de barras representando las distintas Intensidades de fluorescencia detectadas en los últimos 27 segundos de cada experimento.

A continuación se muestran los gráficos de las señales grabadas con el LED de 415 nm.

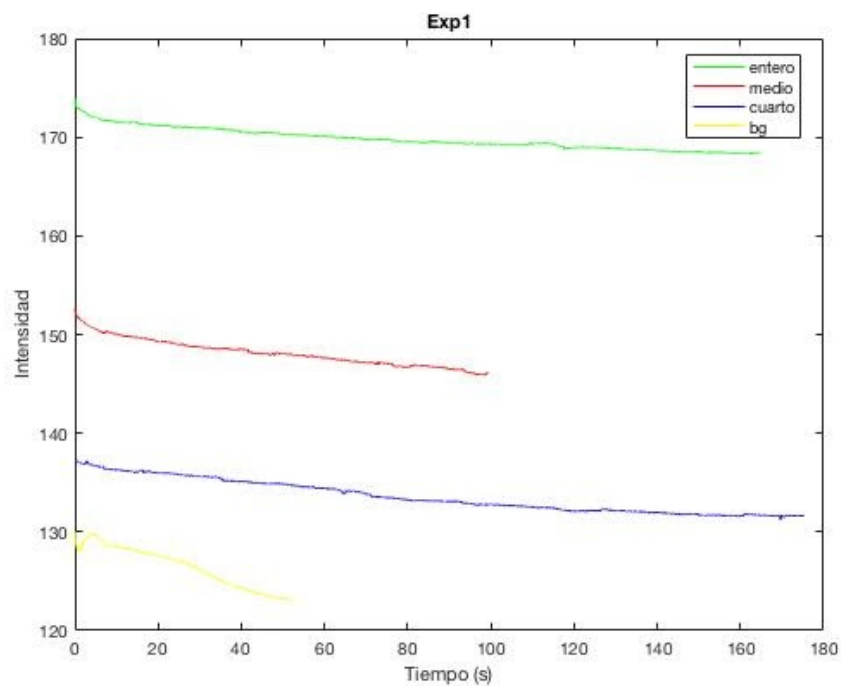


Figura 69. Señales grabadas con el LED de 415 nm durante el experimento 1.

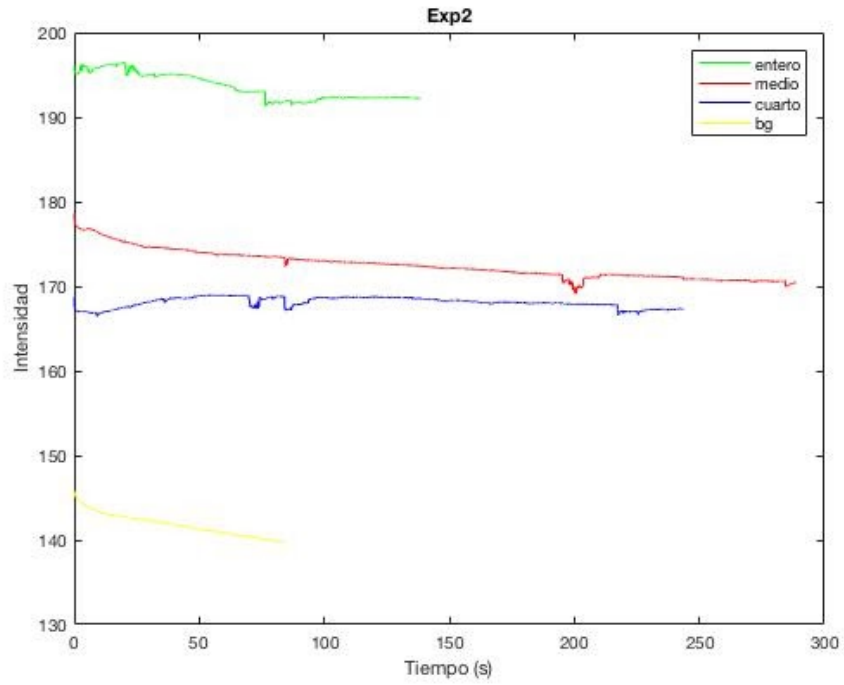


Figura 70. Señales grabadas con el LED de 415 nm durante el experimento 2.

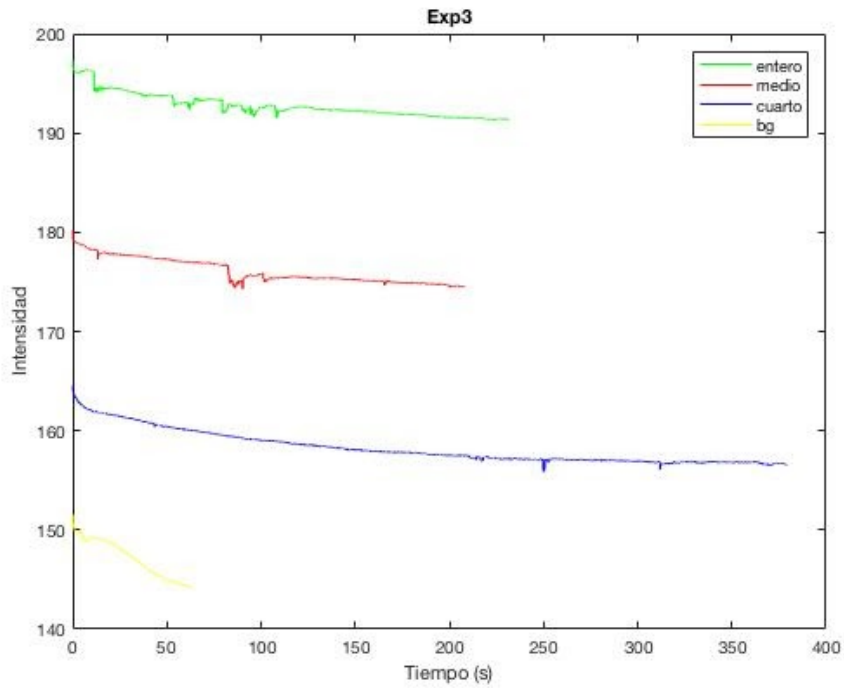


Figura 71. Señales grabadas con el LED de 415 nm durante el experimento 3.

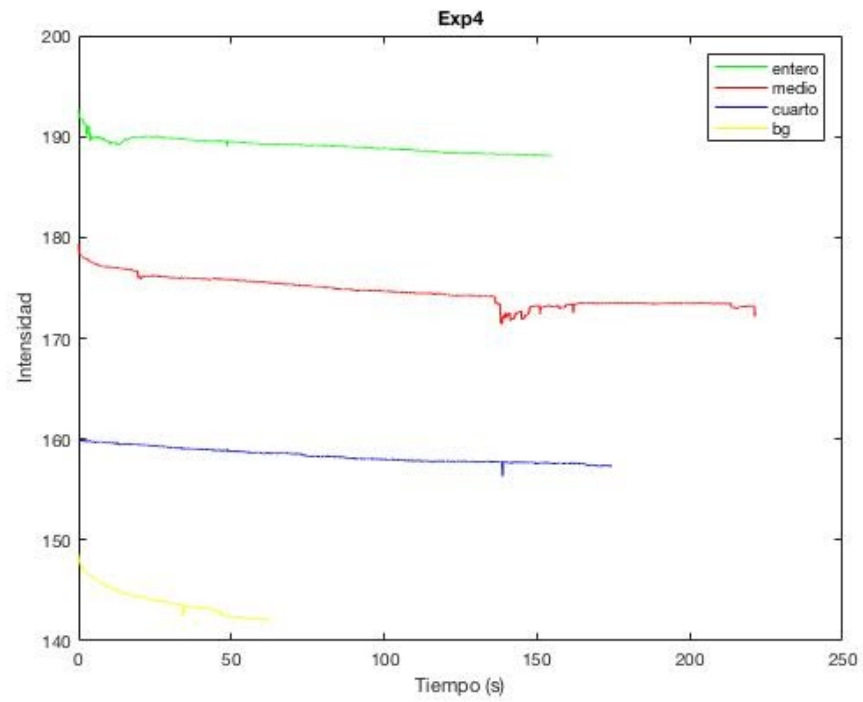


Figura 72. Señales grabadas con el LED de 415 nm durante el experimento 4.

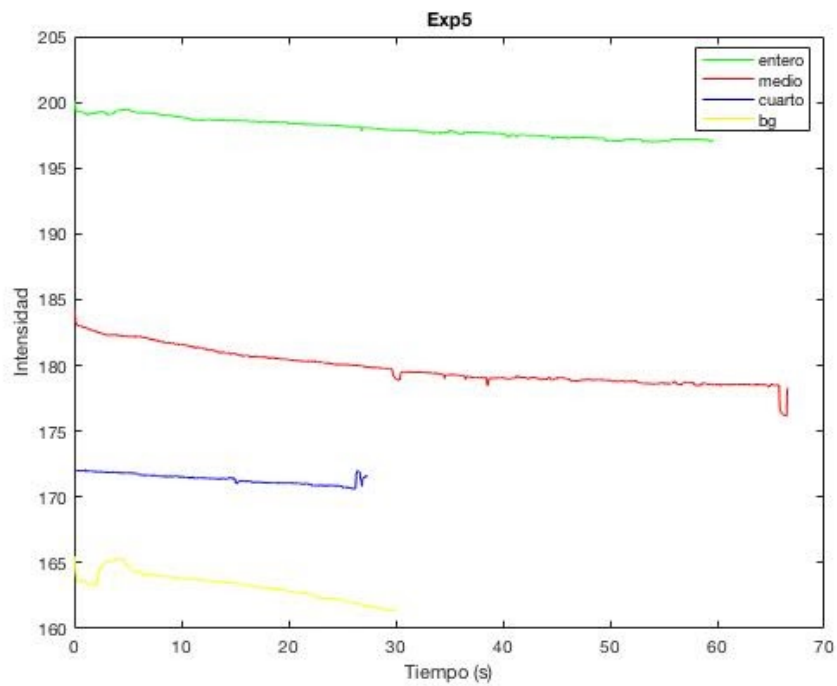


Figura 73. Señales grabadas con el LED de 415 nm durante el experimento 5.

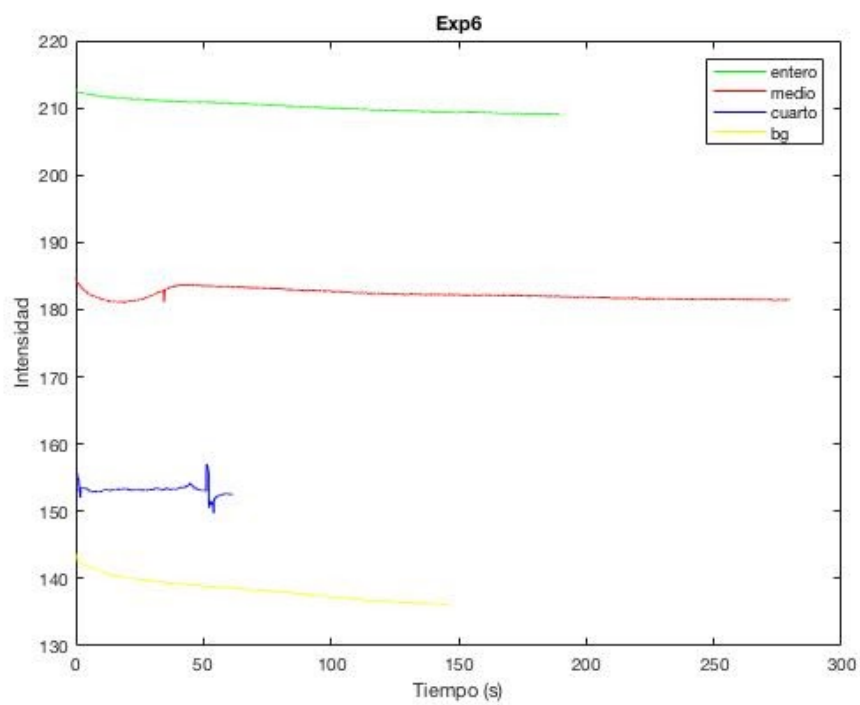


Figura 74. Señales grabadas con el LED de 415 nm durante el experimento 6.

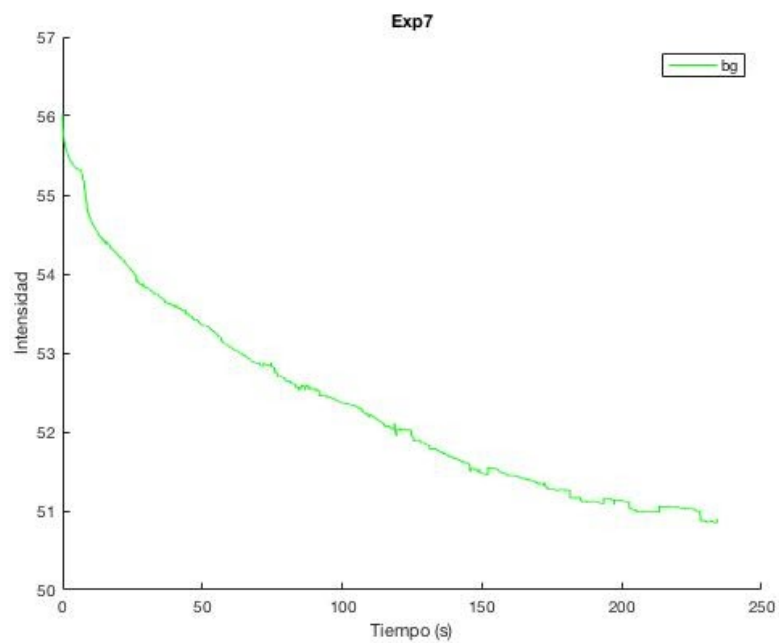


Figura 75. Señal grabada con el LED de 415 nm durante el experimento 7.

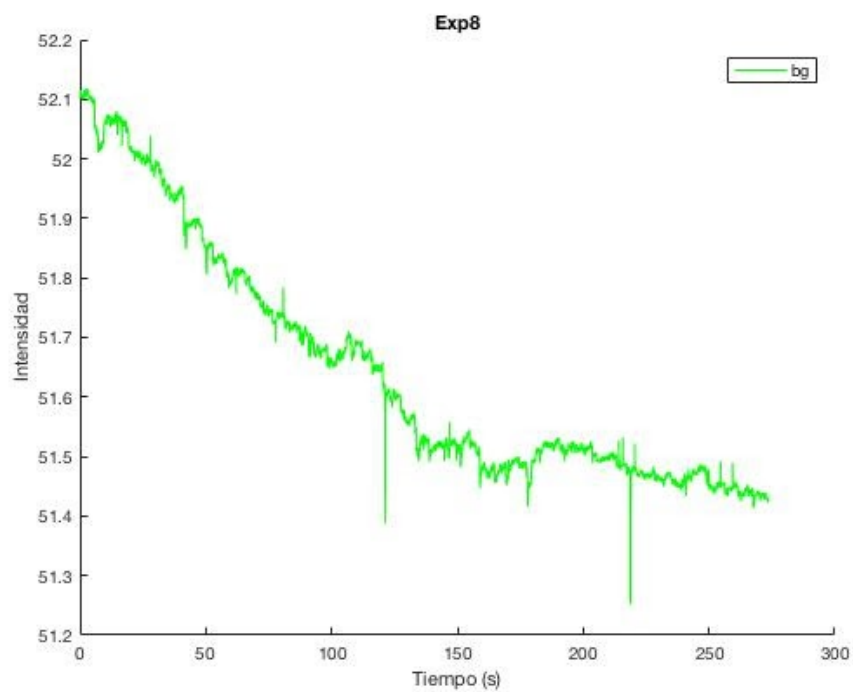


Figura 76. Señal grabada con el LED de 415 nm durante el experimento 8.

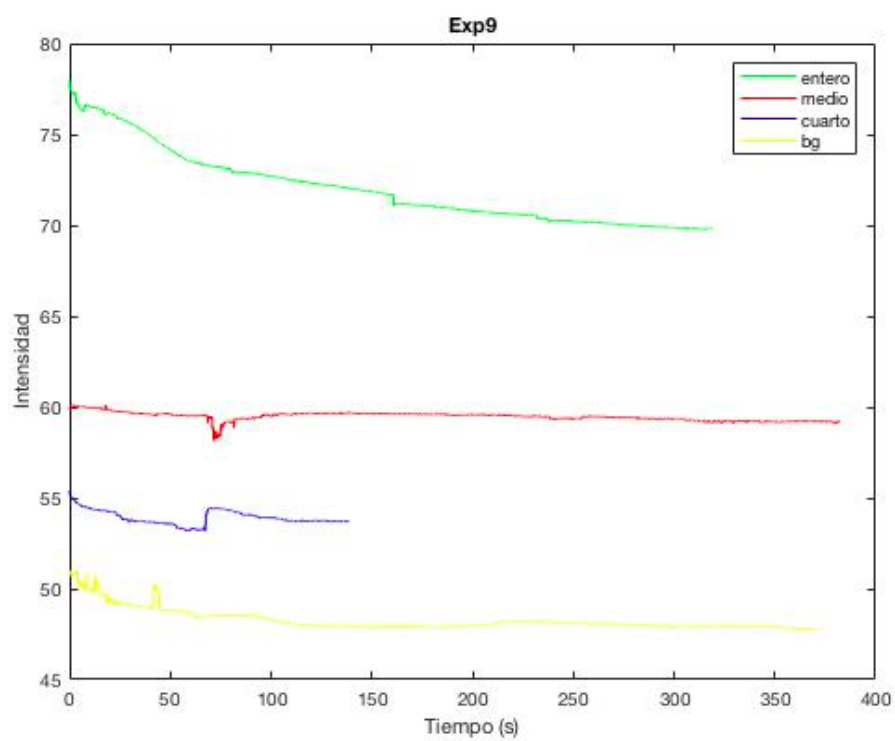


Figura 77. Señales grabadas con el LED de 415 nm durante el experimento 9.

También se hicieron dos experimentos más con el LED de 415 nm para determinar que el equipo se encuentra en buen funcionamiento.

En el primero se mantuvo un tiempo de exposición constante de 4 ms, una frecuencia de adquisición de 40 FPS, una ganancia de 8 dB y se fue incrementando de forma gradual el *duty-cycle* de estimulación LED (que varió de 10% a 49%). Lo esperable era que la intensidad detectada de autofluorescencia de la fibra se mantuviera constante y así fue.

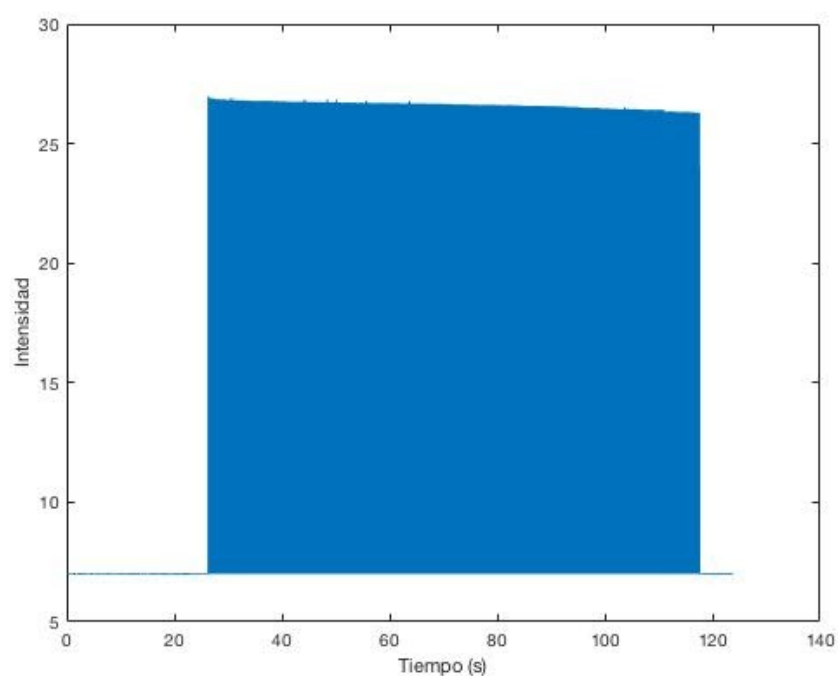


Figura 78. Señal de autofluorescencia sin demultiplexar. Se puede observar el decaimiento exponencial ya mencionado.

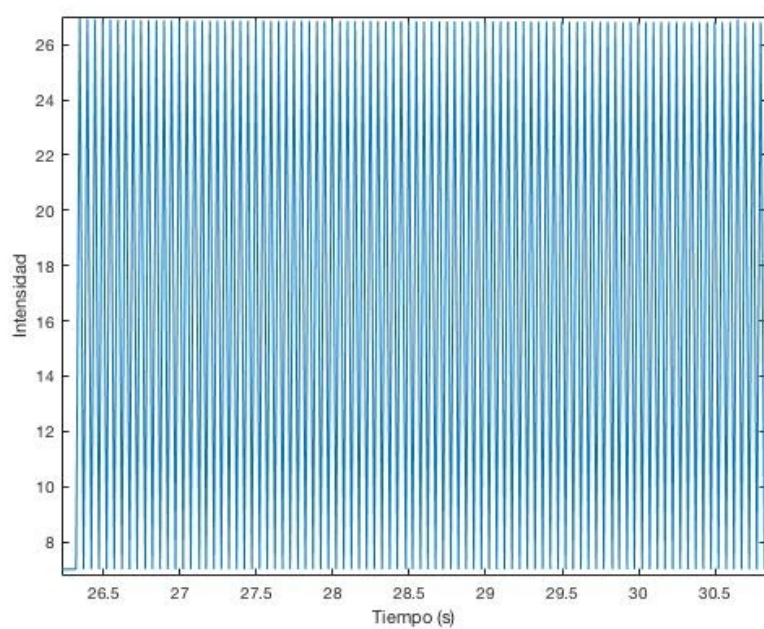


Figura 79. Señal de autofluorescencia sin demultiplexar donde se puede ver cómo se pasa de un valor máximo a uno mínimo donde el LED se encuentra apagado.

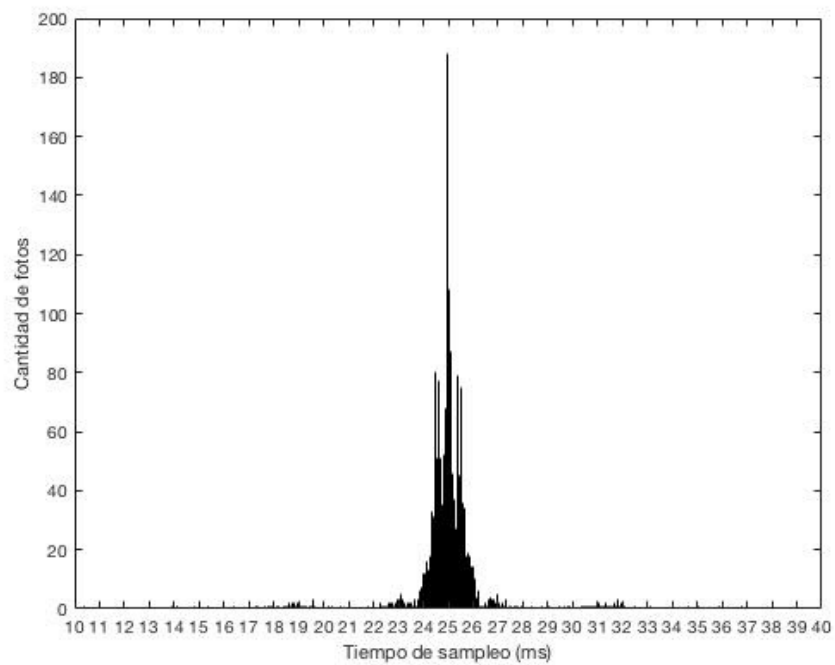


Figura 80. Histograma de los intervalos temporales entre muestras.

En el segundo experimento se configuró el equipo para que la cámara opere de 40 a 100 FPS y 9 ms de exposición durante toda la prueba. A medida que se fueron gradualmente incrementando los FPS, se ajustó el *duty-cycle* de forma acorde para que el mismo coincida siempre con los 9 ms de exposición deseados. El esquema del experimento fue el siguiente:

Ts*2 (ms)	FPS	DC (%)	Exposición (ms)	Trigger Delay	Gain (dB)
50,00	40	18%	9	-	8
40,00	50	22,00%	8,8	5285	8
33,33	60	27%	9	3915	8
28,57	70	31,00%	8,857142857	3320	8
25,00	80	36%	9	2875	8
22,22	90	40,00%	8,888888889	4170	8
20,00	100	45%	9	-	8

Tabla 7. Parámetros utilizados durante el experimento. El trigger delay fue configurado manualmente a excepción de cuando se adquiere a 40 o 100 FPS. En estos dos casos el delay del trigger de la cámara es automático y por eso no se especifican.

Lo que se esperaba con esta prueba es que sin importar los FPS y la frecuencia de excitación LED, los valores de autofluorescencia detectados no cambien. Y sucedió eso de forma aproximada como se puede ver en el siguiente gráfico.

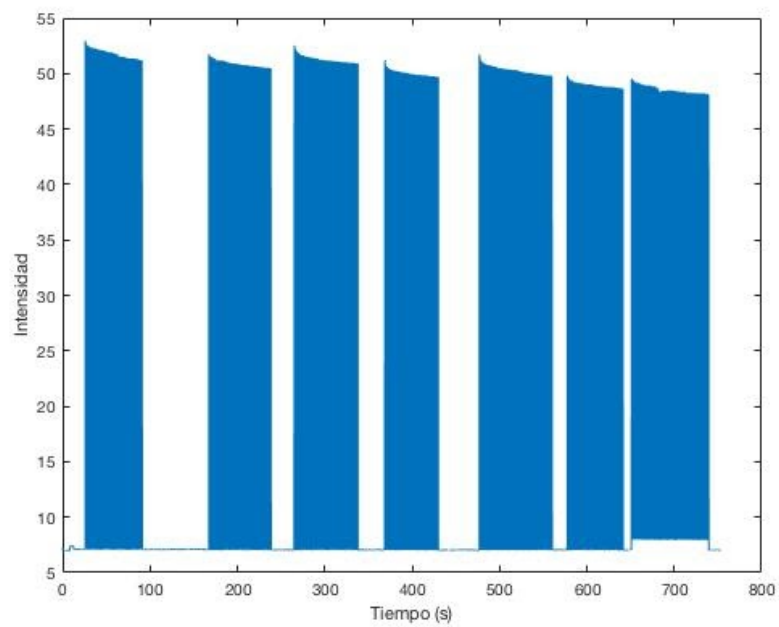


Figura 81. Señal de autofluorescencia sin demultiplexar para las diferentes frecuencias de adquisición y estimulación LED.

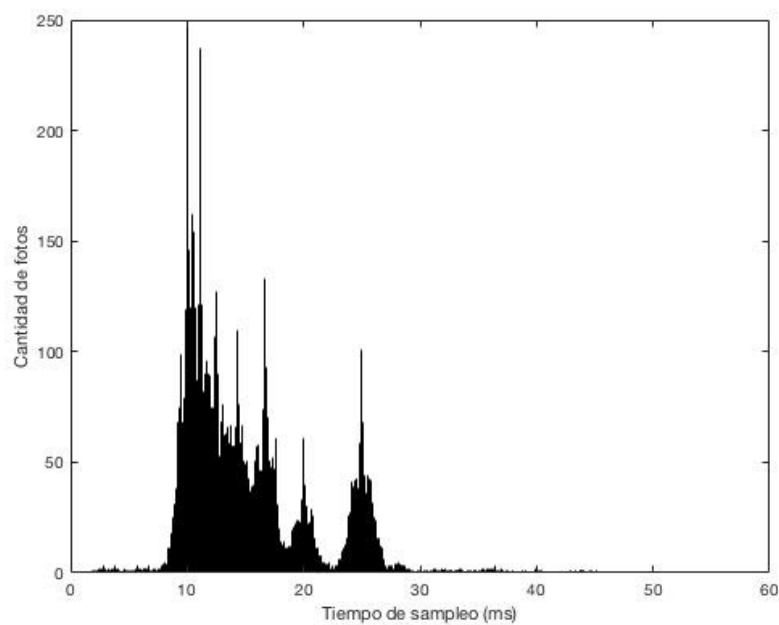


Figura 82. Histograma de los intervalos temporales entre muestras. Se puede ver que se usaron frecuencias de adquisición que van desde los 40 FPS hasta los 100 FPS.

5. Análisis de los datos

5.1. Secuencia de procesamiento

Luego de grabar, se hace un control en Python para ver si los datos fueron adquiridos en el intervalo de sampleo deseado. En el caso de que la cámara haya adquirido a 40 cuadros por segundo, deberían haber aproximadamente 25 milisegundos por muestra. Cualquier dato que haya sido adquirido a más de 50 milisegundos respecto del anterior se lo elimina porque significa que la cámara saltó un cuadro. Este umbral varía acorde a los FPS configurados para la cámara.

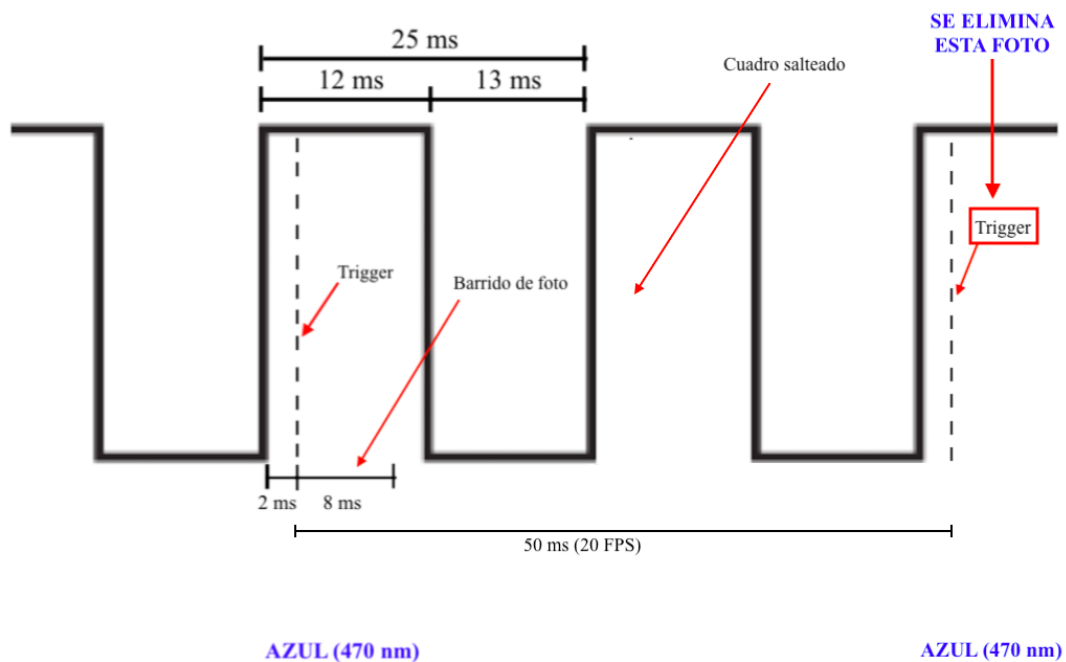


Figura 83. Esquema donde la cámara omite una foto, perdiendo una captura que corresponde a un ciclo ON del LED violeta.

Posteriormente, los datos van a ser organizados en dos grupos: 410 / 415 nm y 470 nm. Separándolos acorde a su posición par (azul) o impar (violeta) en el vector de valores.

Lo que se debería ver luego es una señal con transientes de calcio claramente definidos y otra señal que se comporta como su línea de base. El resultado final que

se busca es detectar el movimiento relativo entre la señal de fluorescencia de 410 / 415 nm y la de 470 nm.

Tomando en cuenta todo lo mencionado, se determinó que la secuencia de procesamiento de datos biológicos debe tener la siguiente estructura:

1. Revisar que los intervalos entre muestras del vector, que contiene la fluorescencia correspondiente a ambos haces de luz, sea consistente con los cuadros por segundo especificados. Se buscan los elementos que hayan sido adquiridos por fuera de los $\frac{1000}{FPS * 0.5}$ milisegundos respecto del dato anterior y se los elimina. Esta parte se lleva a cabo con un script en Matlab / Python.
2. Calcular la *SNR* de la señal de fluorescencia correspondiente a la estimulación GCaMP6 de 410 nm y 470 nm.
3. Extraer los valores de fluorescencia registrados correspondientes al haz de 470 nm y 410 nm, lo que se conoce como el demultiplexado de la señal. Tomando en cuenta que primero se dio comienzo a la grabación y luego a los LEDs, es importante en el csv dejar 2 valores anteriores al encendido de los LEDs para que el demultiplexado ocurra de forma correcta. Si se dio comienzo a la grabación primero y luego a los LEDs, el vector de datos siempre va a presentar la misma secuencia: los datos impares corresponden a la estimulación 410 nm y los pares a la de 470 nm.
4. Suavizar cada señal usando un algoritmo de media móvil. Eliminando el ruido de alta frecuencia. Mejorando la *SNR*.
5. Realizar una corrección de línea de base para cada señal usando un algoritmo denominado *Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares (AirPLS)* [40]. Este algoritmo sirve para contrarrestar el decaimiento exponencial de la fluorescencia detectada. El cual se encuentra aún más pronunciado debido al efecto del *photobleaching* mencionado anteriormente. En este paso se estima el ruido de base de cada señal.
6. Estandarizar las señales utilizando sus respectivos valores medios y desviaciones estándar. Dando lugar a 2 señales denominadas *zInt410* y *zInt470*.
7. Ajustar a las señales estandarizadas de 410 (*Int410*) y 470 (*Int470*) nm una función de regresión lineal: $y = a * x + b$

Utilizar los parámetros de la regresión lineal **a** y **b** para encontrar nuevos valores de *zInt410* ajustados a *zInt470*. Como indica la siguiente expresión:

$$fitzInt410 = a * zInt410 + b$$

8. Calcular la expresión dF/F normalizada: $z dF / F = zInt470 - fitzInt410$

A continuación se va a explicar más acerca del algoritmo denominado *AirPLS* y sus fundamentos teóricos.

Como se sabe, el ruido afecta negativamente las señales y deteriora los resultados analíticos. Por eso es necesario estimarlo en cada una de las señales de fluorescencia para poder realizar subsiguientes estudios. Para lograr esto se utilizó un algoritmo llamado *Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares (AirPLS)*, desarrollado por Zhimin Zhang [40]. Técnica que cambia de forma iterativa los pesos de la suma de los errores cuadrados mínimos entre la señal original y la línea de base candidata en cada iteración. Se destaca por su velocidad y puede ser utilizada para todo tipo de señales (cromatografía, resonancia magnética nuclear, espectroscopia Raman, etc) [40]. A continuación se describe brevemente cómo es que los investigadores Cobas y Zhang pasaron del algoritmo de Cuadrados Mínimos Penalizados al *AirPLS* [40].

5.1.1. Cuadrados Mínimos Penalizados:

Este método es una técnica que penaliza la rugosidad del ajuste entre la señal original y su línea de base estimada. En las siguientes fórmulas **x** va a representar el vector de datos y **z** el vector de ajuste. El largo de ambos vectores está representado por la variable **m**. La fidelidad entre **z** y **x** puede ser expresada como la suma de cuadrados de los errores entre ambos:

$$F = \sum_{i=1}^m (x_i - z_i)^2 = \sqrt{(x_1 - z_1)^2 + (x_2 - z_2)^2 \dots + (x_m - z_m)^2} \quad (23)$$

La rugosidad del ajuste del vector **z** puede ser escrita de la siguiente forma:

$$R = \sum_{i=2}^m (z_i - z_{i-1})^2 = \sum_{i=1}^{m-1} (\Delta z_i)^2 \quad (24)$$

El algoritmo *AirPLS* ofrece un parámetro tanto en Matlab como en Python que permite elegir el orden de las diferencias para cuantificar la rugosidad del ajuste de la línea de base respecto de la señal original.

El balance entre la fidelidad y la rugosidad de la señal \mathbf{z} respecto a \mathbf{x} puede ser expresado de la siguiente forma:

$$Q = F + \lambda R = \|\mathbf{x} - \mathbf{z}\|^2 + \lambda \|D\mathbf{z}\|^2 \quad (25)$$

Donde el parámetro λ tiene que ser ajustado por el usuario. A más grande λ , más suave es el ajuste del vector \mathbf{z} respecto a \mathbf{x} . \mathbf{D} representa la derivada de la matriz identidad de manera tal que $D\mathbf{z} = \Delta\mathbf{z}$.

Luego a partir de la expresión $\frac{\partial Q}{\partial \mathbf{z}} = 0$, se obtiene un sistema de ecuaciones lineales:

$$2(\mathbf{z} - \mathbf{x}) + 2\lambda \|D\|^2 \mathbf{z} = 0$$

$$\mathbf{z} + \lambda \|D\|^2 \mathbf{z} = \mathbf{x}$$

$$(I + \lambda D'D)\mathbf{z} = \mathbf{x} \quad (26)$$

De la ecuación 26 se despeja \mathbf{z} , obteniendo la línea de base de \mathbf{x} . Para poder optimizar \mathbf{z} , Cobas y Zhang modificaron la expresión (23). Lo que resultó en la siguiente fórmula:

$$F = \sum_{i=1}^m w_i (x_i - z_i)^2 = (x - z)' W (x - z) \quad (27)$$

Donde los pesos ubicados dentro de una matriz \mathbf{W} valen 0 cuando el índice de la sumatoria estuviera en una posición que correspondiera a un pico de \mathbf{x} . \mathbf{W} es una matriz diagonal con w_i en su diagonal. De forma tal que la expresión (26) cambia a la siguiente forma:

$$(W + \lambda D'D)z = Wx \quad (28)$$

Resolviendo la ecuación anterior, se obtiene el vector \mathbf{z} :

$$z = (W + \lambda D'D)^{-1} Wx \quad (29)$$

El problema del método de corrección de la línea de base de Cobas y Zhang es que requiere de detectar los picos que se encuentran en la señal \mathbf{x} [40]. El algoritmo *AirPLS* fue desarrollado para justamente evitar tener que buscar los picos de la señal \mathbf{x} y reducir los tiempos de procesamiento.

5.1.2. Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares (*AirPLS*):

Cada paso del algoritmo *AirPLS* requiere de resolver la siguiente expresión de forma iterativa:

$$Q^t = \sum_{i=1}^m w_i^t |x_i - z_i^t|^2 + \lambda \sum_{j=2}^m |z_i^t - z_{j-1}^t|^2 \quad (30)$$

El vector \mathbf{w} se lo obtiene empleando un método donde en el primer paso:

$$w^0 = 1$$

Luego se va obteniendo el \mathbf{w} de cada paso iterativo empleando la siguiente expresión matemática:

$$w_i^t = \begin{cases} 0 & x_i \geq z_i^{t-1} \\ e^{\frac{t(x_i - z_i^{t-1})}{|\mathbf{d}^t|}} & x_i < z_i^{t-1} \end{cases}$$

Donde el vector \mathbf{d}^t consiste en las diferencias entre \mathbf{x} y \mathbf{z}^{t-1} en cada iteración. El valor de ajuste z^{t-1} en la iteración $t - 1$ representa un candidato a línea de base. Si el valor de x_i es mayor a z^{t-1} , entonces al punto x_i se lo puede considerar como parte de un pico. Por lo tanto el peso w_i^t pasa a valer a 0 para ignorarlo en la próxima iteración de ajuste. El despeje iterativo de \mathbf{z} se lo expresa en la siguiente ecuación:

$$\mathbf{z}^t = (\mathbf{W}^t + \lambda \mathbf{D}^{t'} \mathbf{D}^t)^{-1} \mathbf{W}^t \mathbf{x} \quad (31)$$

El proceso iterativo va a finalizar cuando se alcance el límite máximo de iteraciones (configurado por el operador) o cuando se cumpla la siguiente condición:

$$|d_t| < 0.001 \cdot |x| \quad (32)$$

A continuación se presenta la estructura del algoritmo:

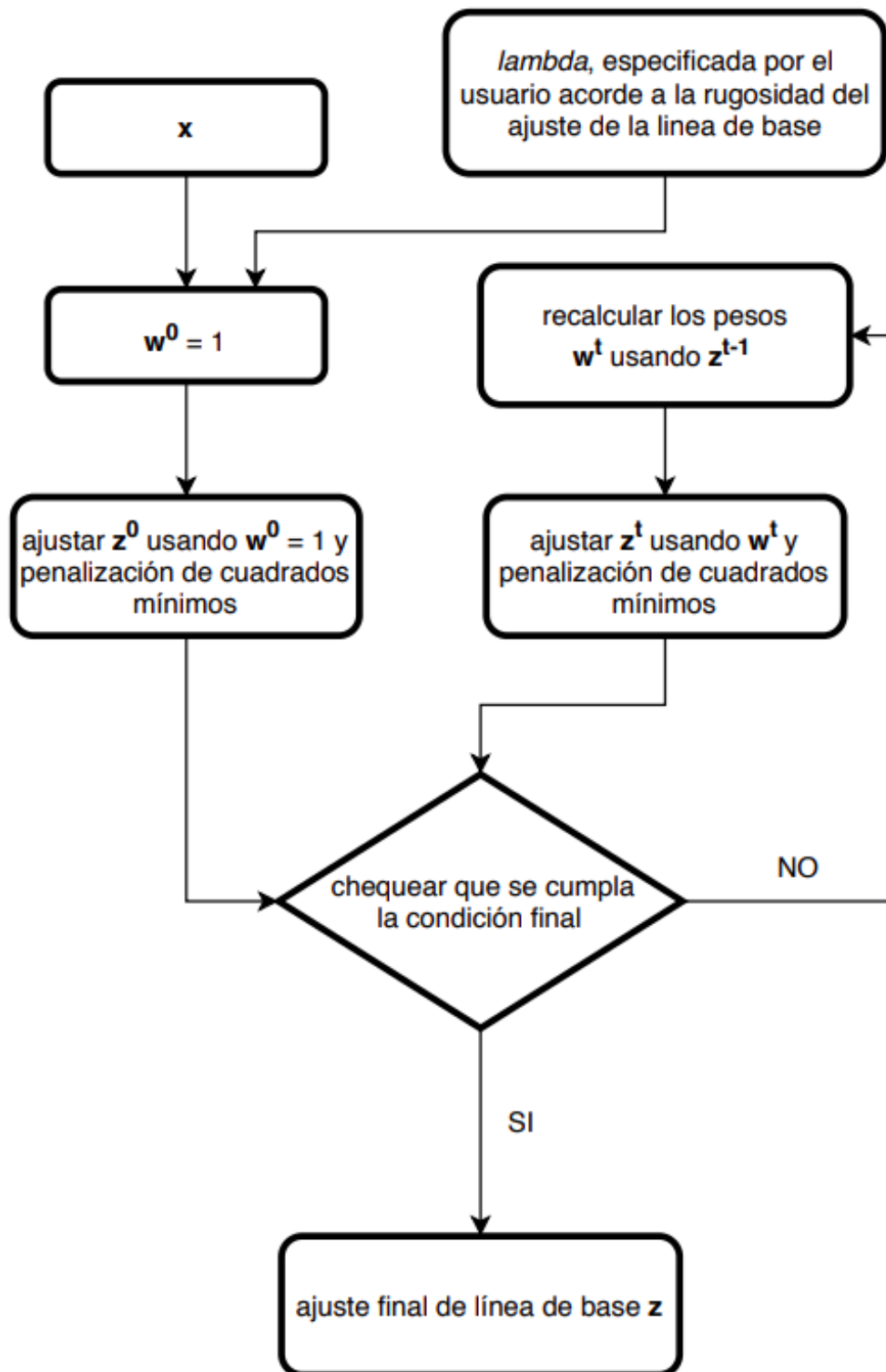


Figura 84. Diagrama de flujo del algoritmo AirPLS.

Se consiguieron datos de un experimento de *Fiber Photometry* a modo de ejemplificar cómo el algoritmo procesaría los valores de fluorescencia [23]. En los siguientes gráficos, el color violeta indica que se trata de una señal de fluorescencia producto de la estimulación del LED violeta (410 nm) y el color azul respecto a la del LED azul (470 nm). En este caso la cámara fue configurada para formar imágenes de 16 bits. Las cuales van a estar conformadas por píxeles cuyos valores de intensidad van de 0 a 65535.

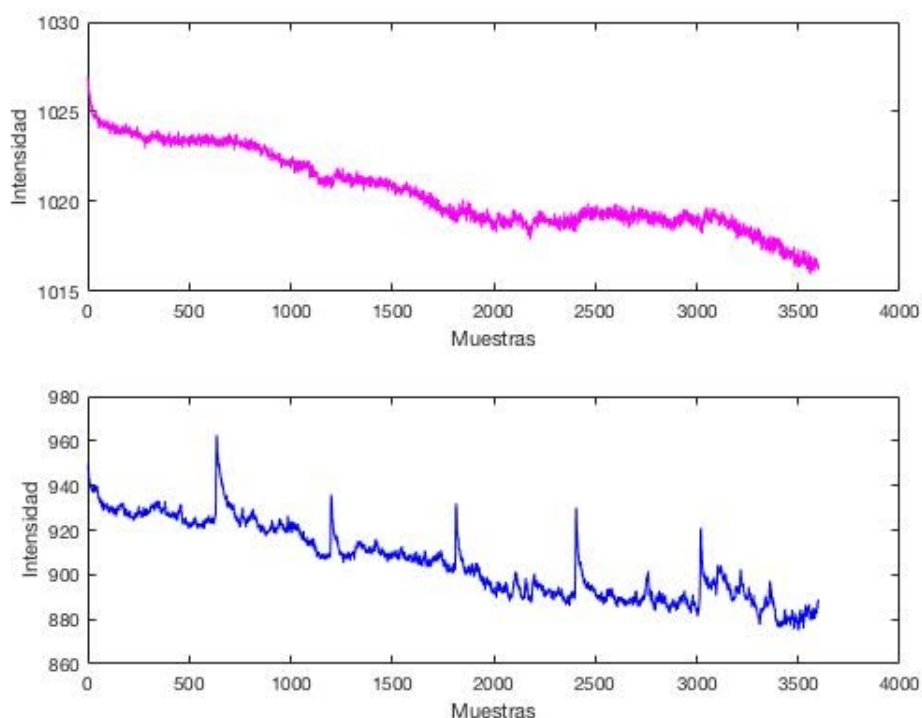


Figura 85. Pasos de procesamiento 1 a 3. Señales demultiplexadas.

La razón por la cual la fluorescencia emitida por la señal de excitación violeta (410 nm) es más intensa que la azul (470 nm) es porque hay una mayor concentración de GCaMP no ligada al calcio intracelular que ligada al mismo [23]. Por lo tanto se va a detectar una señal de mayor magnitud con la de 410 nm. A continuación se verá como el *pipeline* de procesamiento de datos opera sobre los datos.

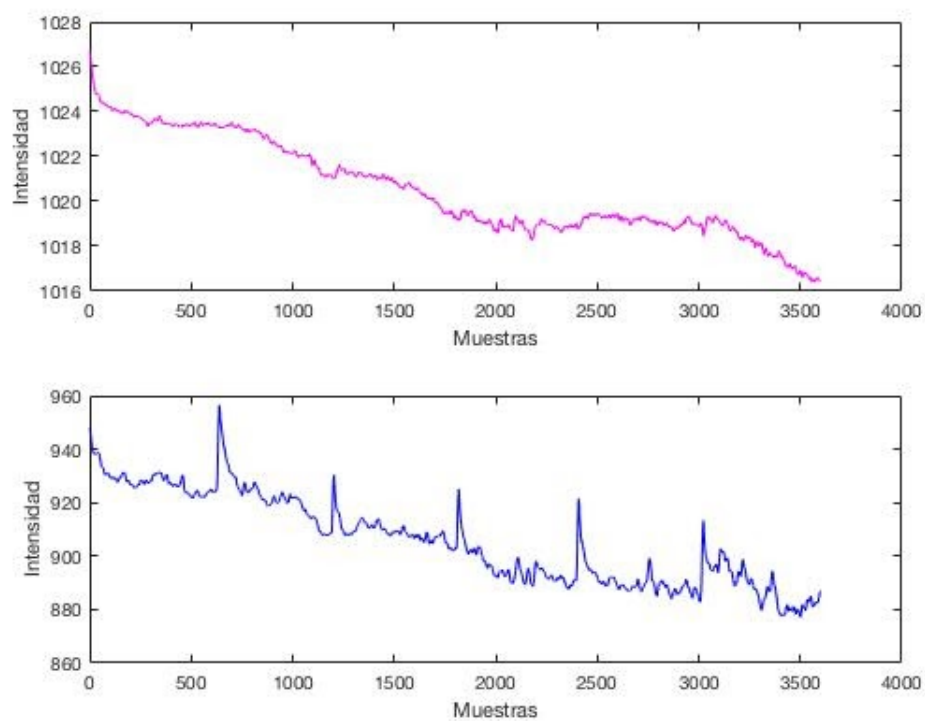


Figura 86. Paso 4. Señal suavizada por medio de un algoritmo de media móvil.

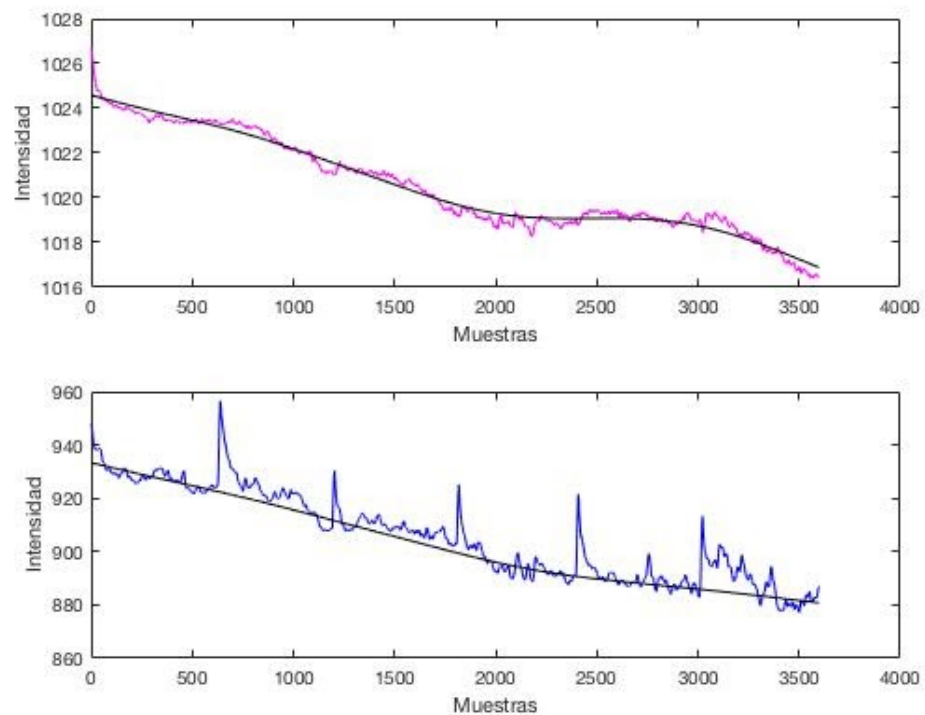


Figura 87. Paso 5. Se detecta la línea de base de cada señal usando el algoritmo denominado AirPLS.

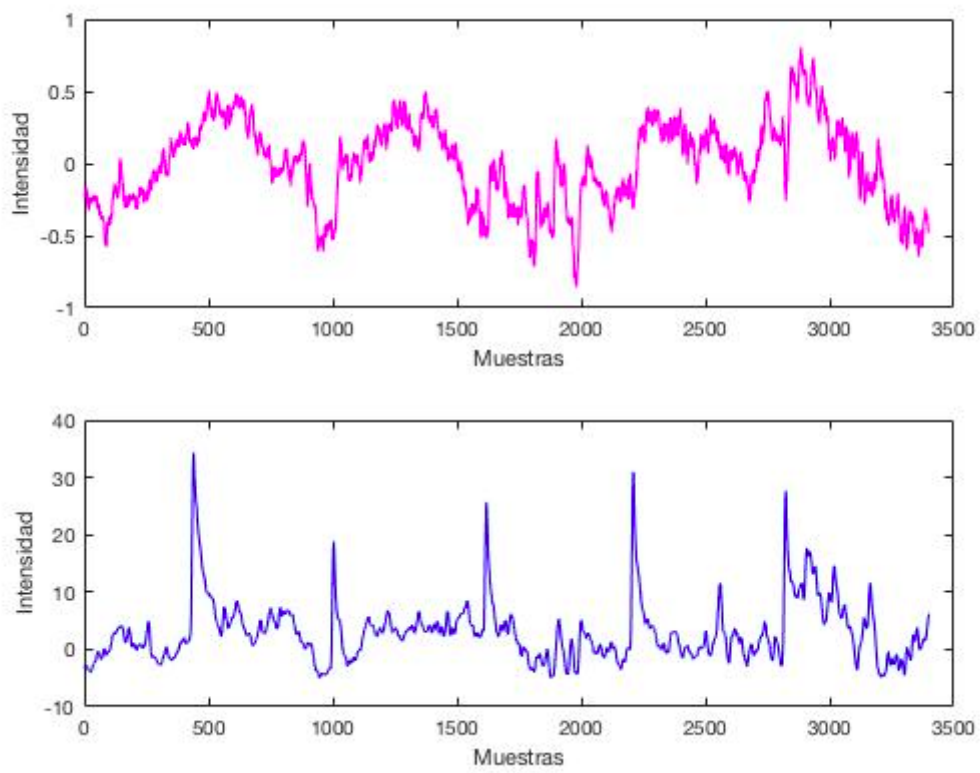


Figura 88. Paso 5. El algoritmo AirPLS luego devuelve la señal de referencia (violeta) y la señal principal (azul) corregidas sin sus respectivas líneas de base.

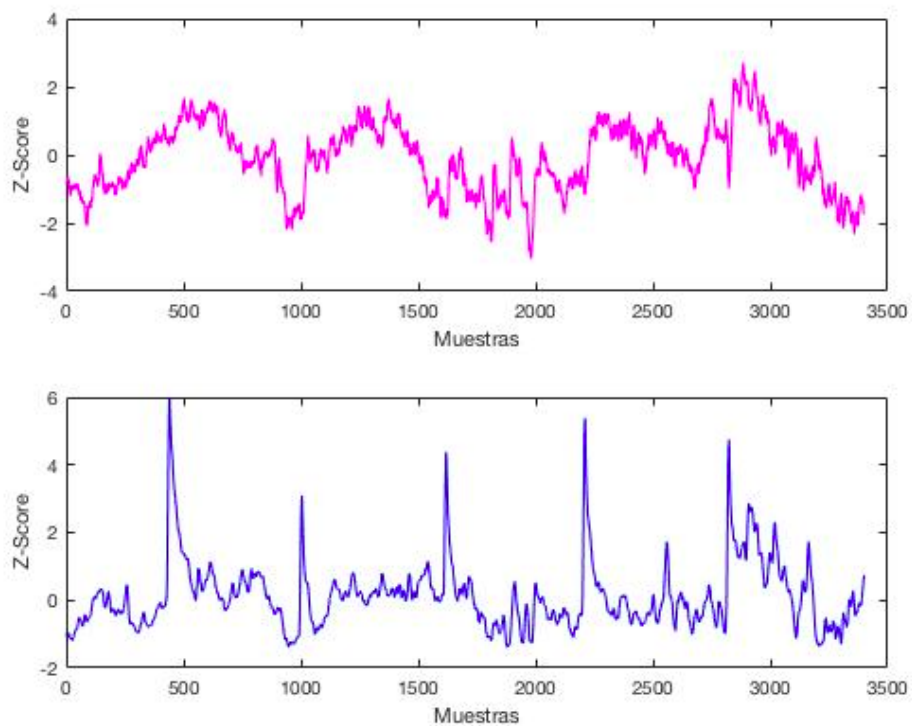


Figura 89. Paso 6. Señales estandarizadas.

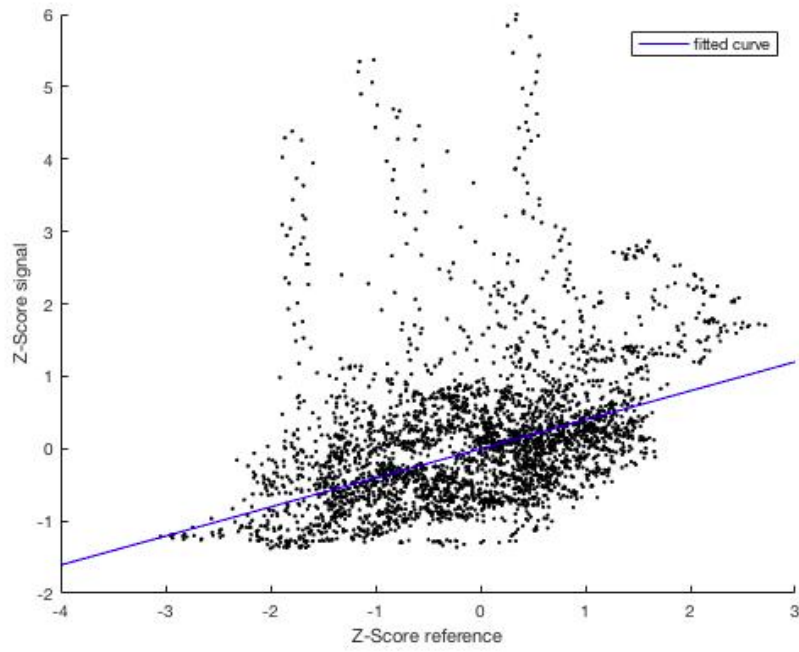


Figura 90 (a). Paso 7. Ajuste de las señales normalizadas.

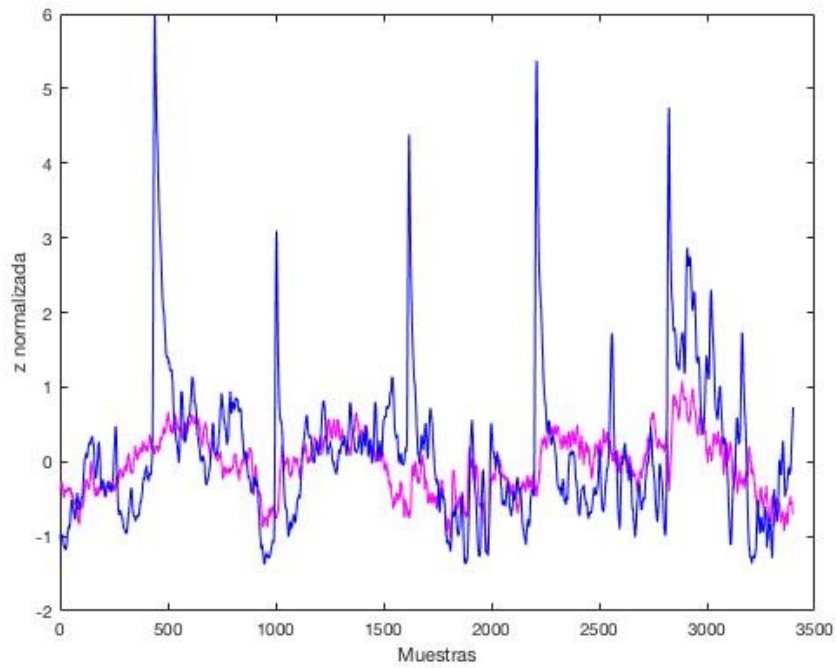


Figura 91 (b). Paso 7. Alineamiento de la señal de referencia normalizada con la principal también normalizada.

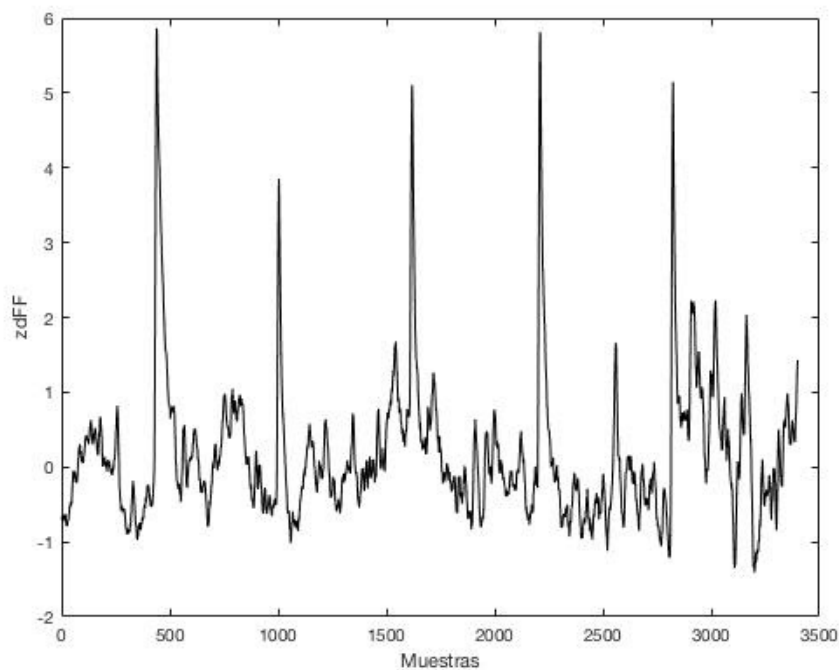


Figura 92. Paso 8. Se realizó la sustracción entre las dos señales de fluorescencia normalizadas.

Por último, a modo de ejemplo, se va a mostrar cómo trabaja el algoritmo *AirPLS* para detectar el cambio relativo y filtrar el decaimiento exponencial en dos de las señales detectadas (experimentos 6 y 9).

Esta situación dista ampliamente respecto a un experimento de *Fiber Photometry* tradicional debido a que se usó un LED de 410 nm para una solución de *green beads*, donde las señales fueron demultiplexadas entre sí y no hay dinámica de calcio intracelular presente. Por lo tanto se espera que no haya un patrón claro de movimiento relativo entre ambas señales con un significado biológico determinado.

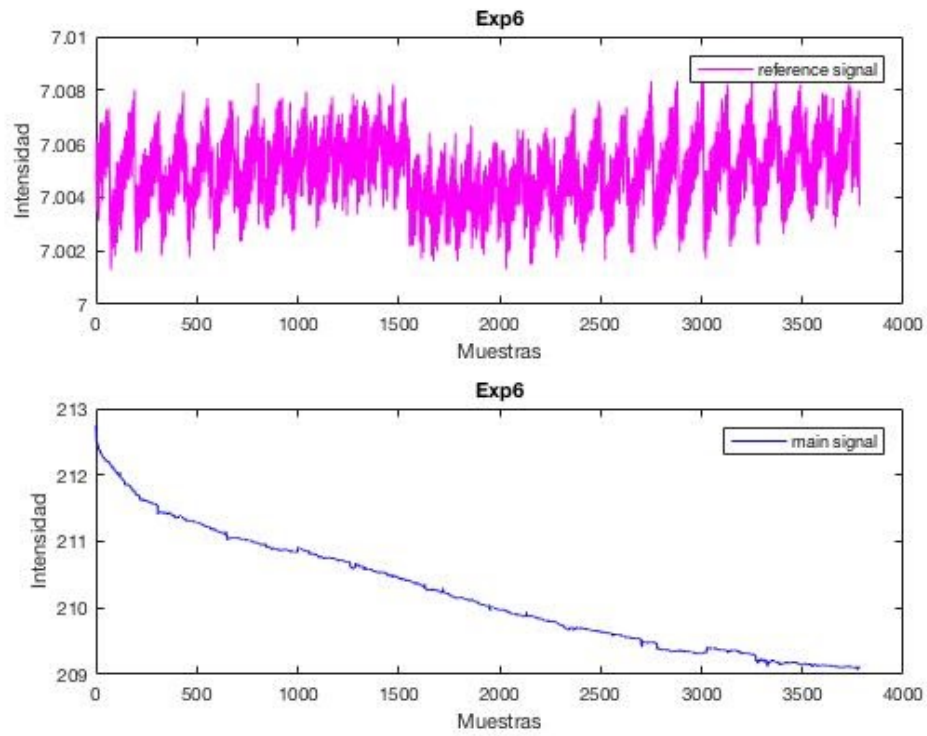


Figura 93. Pasos de procesamiento 1 a 3. Señales demultiplexadas.

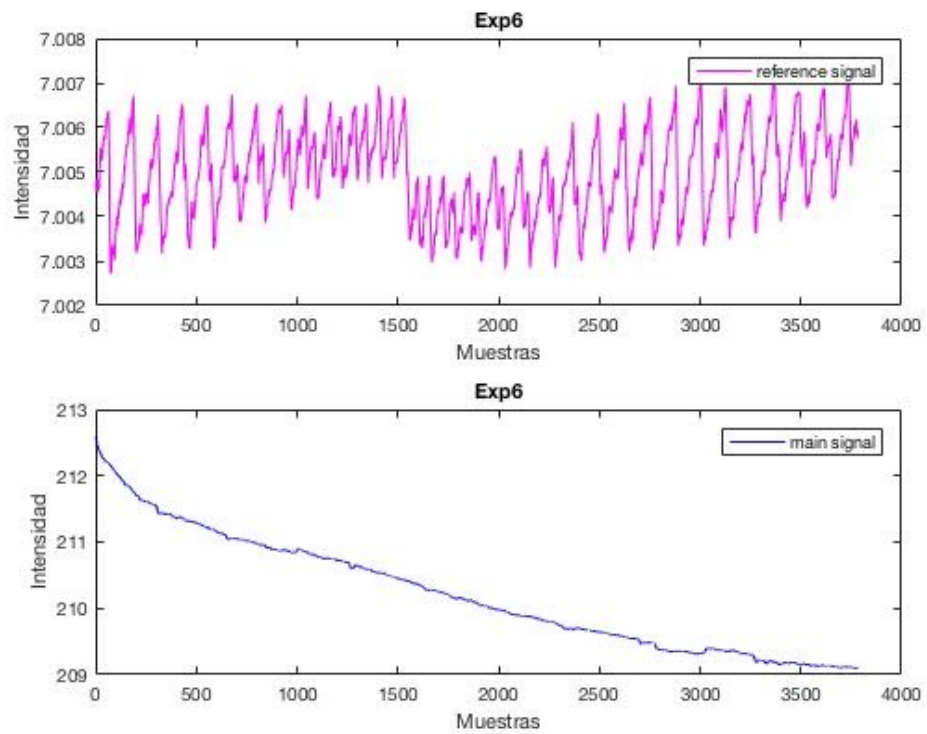


Figura 94. Paso 4. Señal suavizada por medio de un algoritmo de media móvil.

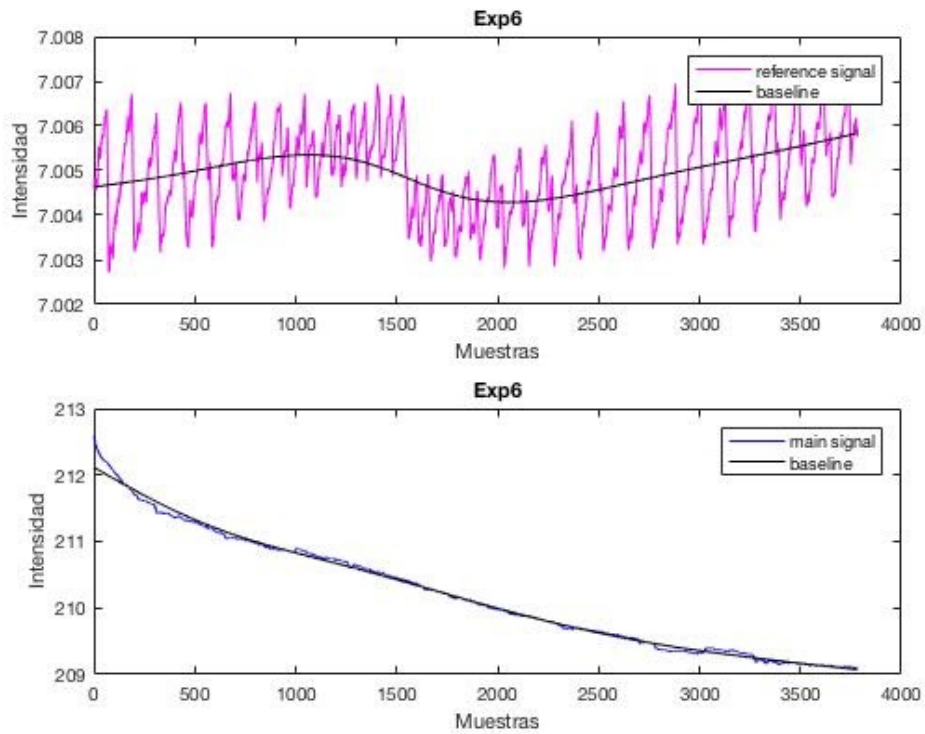


Figura 95. Paso 5. Se detecta la línea de base de cada señal usando el algoritmo denominado AirPLS.

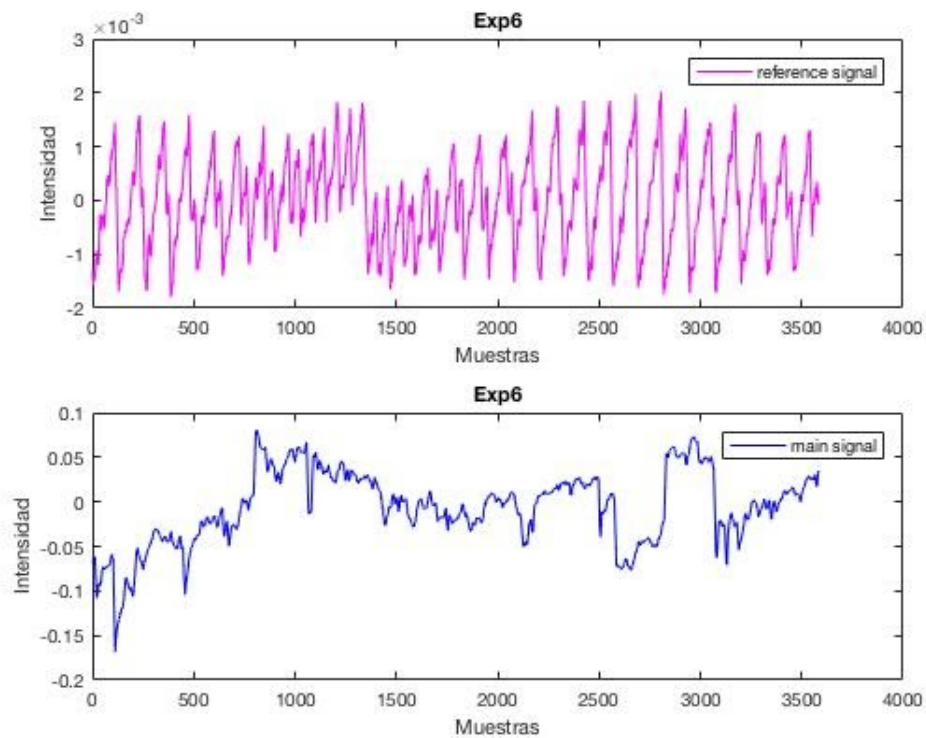


Figura 96. Paso 5. El algoritmo AirPLS luego devuelve la señal de referencia (violeta) y la señal principal (azul) corregidas sin sus respectivas líneas de base.

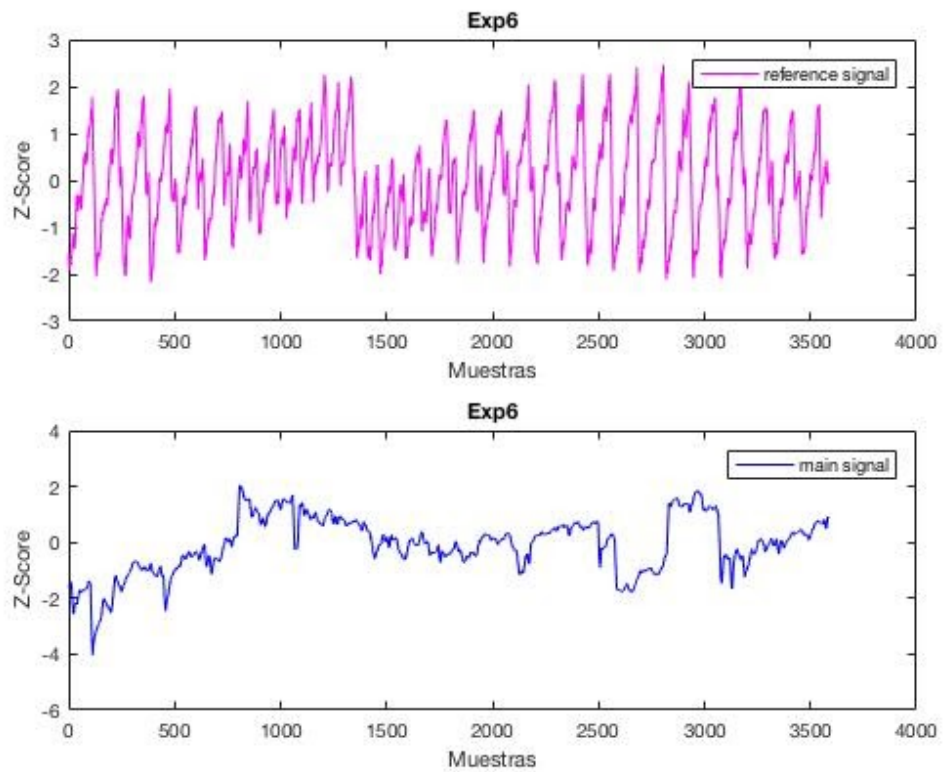


Figura 97. Paso 6. Señales estandarizadas.

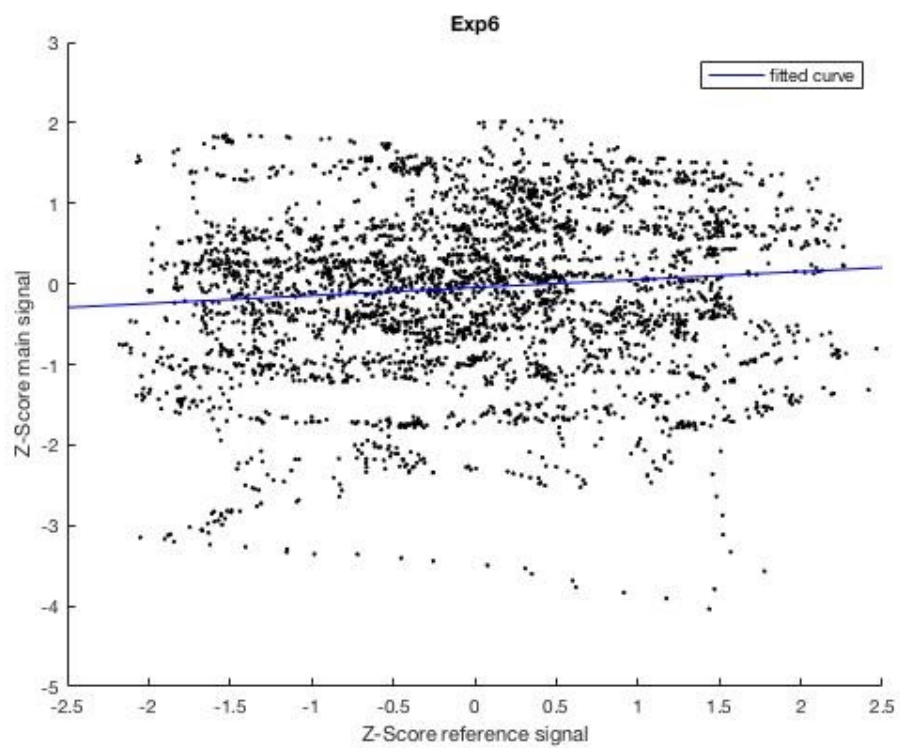


Figura 98. Paso 7. Ajuste de las señales normalizadas.

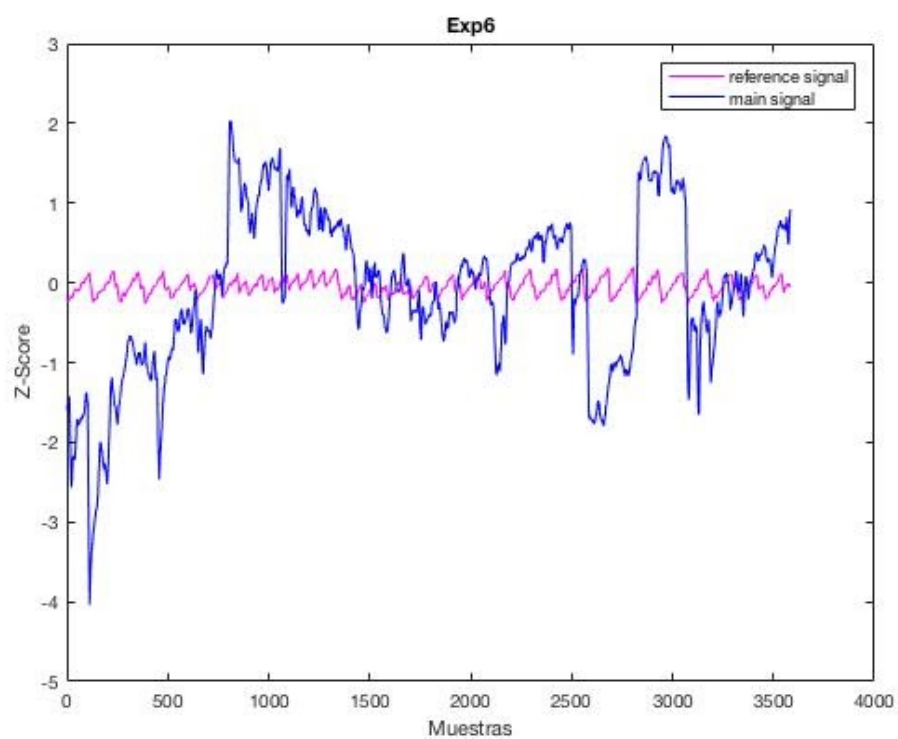


Figura 99. Paso 7. Alineamiento de la señal de referencia normalizada con la principal también normalizada.

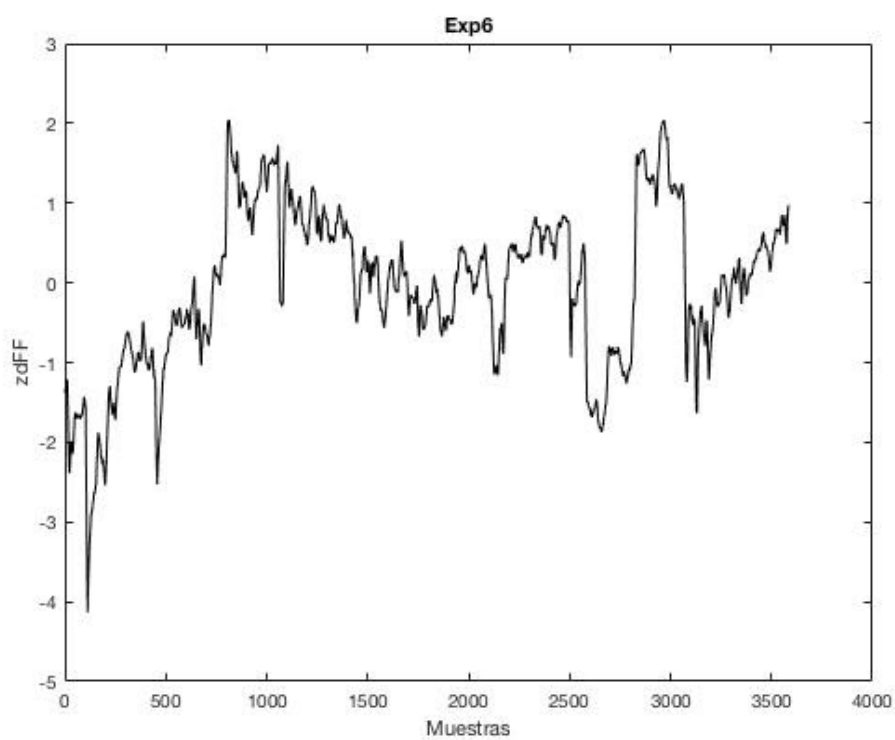


Figura 100. Paso 8. Se realizó la sustracción entre las dos señales de fluorescencia normalizadas.

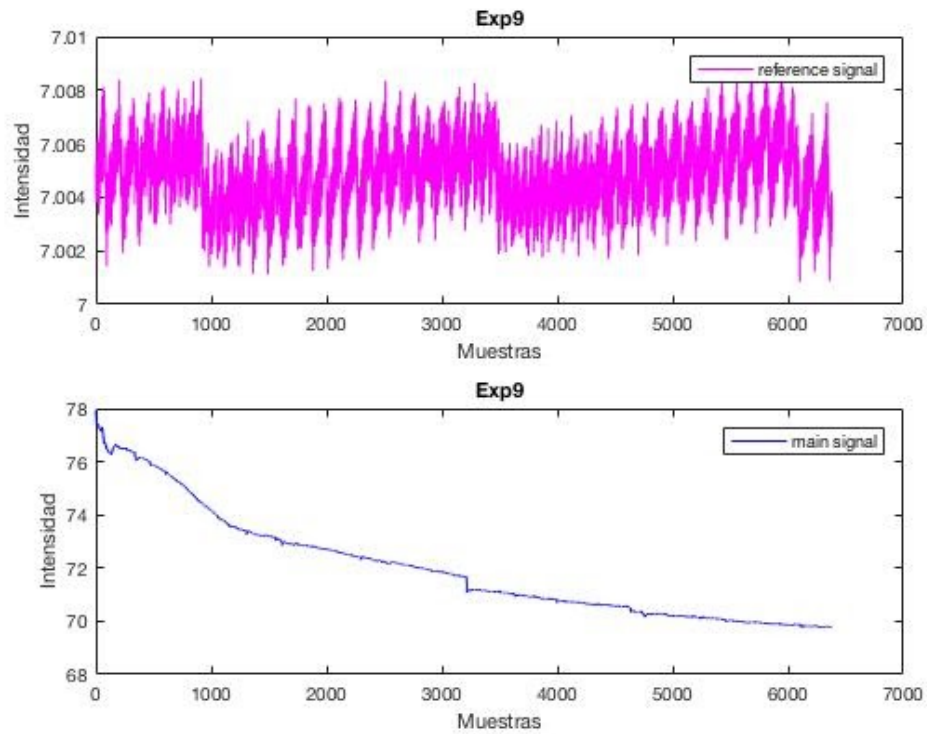


Figura 101. Pasos de procesamiento 1 a 3. Señales demultiplexadas.

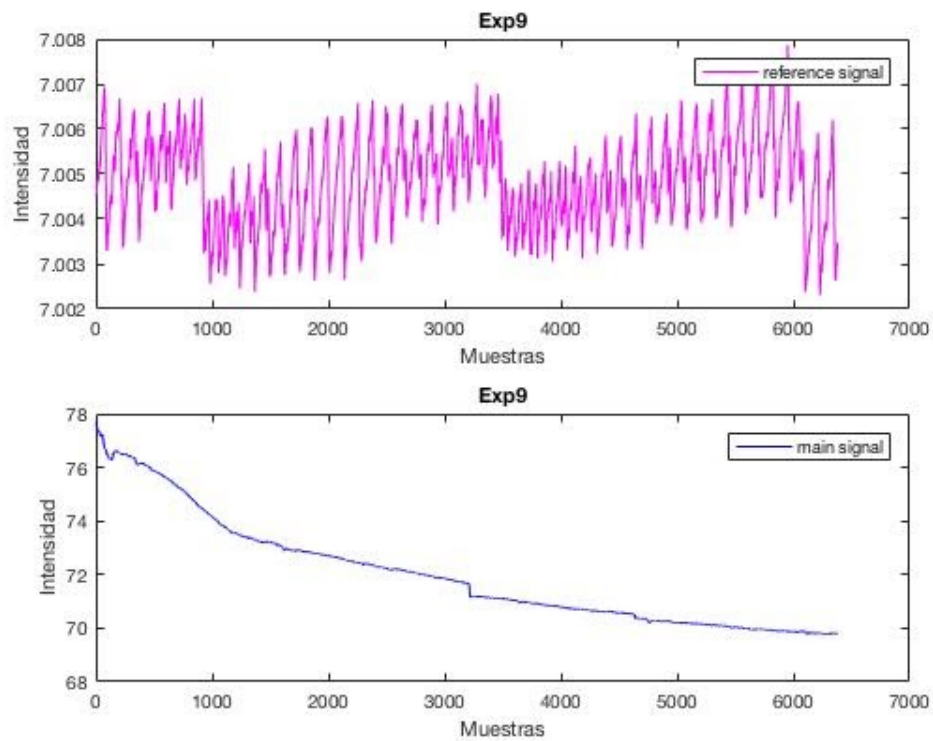


Figura 102. Paso 4. Señal suavizada por medio de un algoritmo de media móvil.

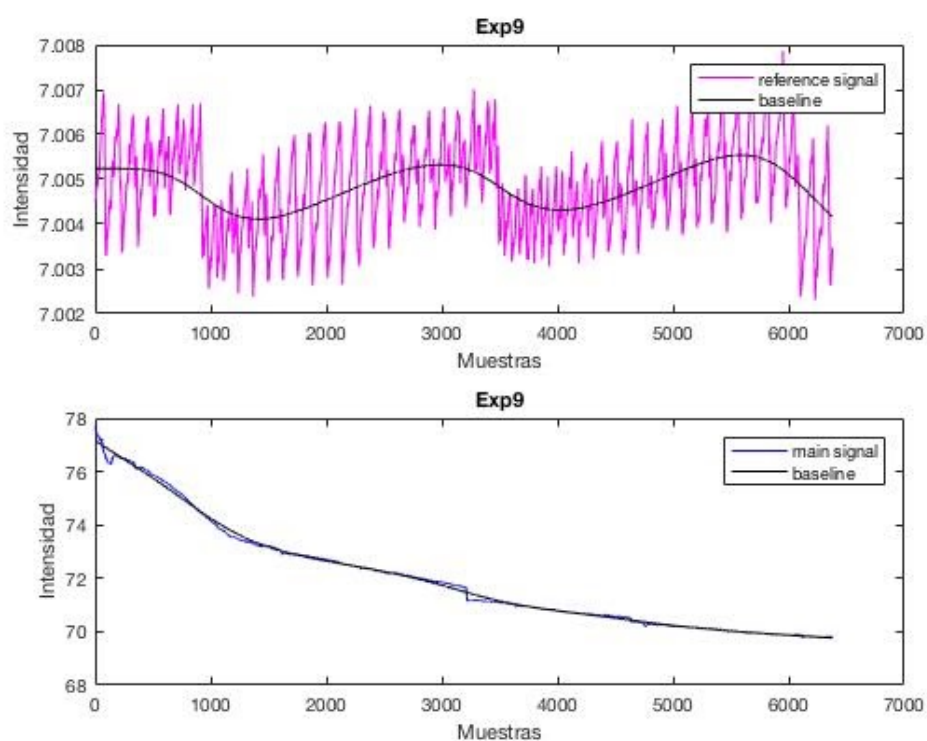


Figura 103. Paso 5. Se detecta la línea de base de cada señal usando el algoritmo denominado AirPLS.

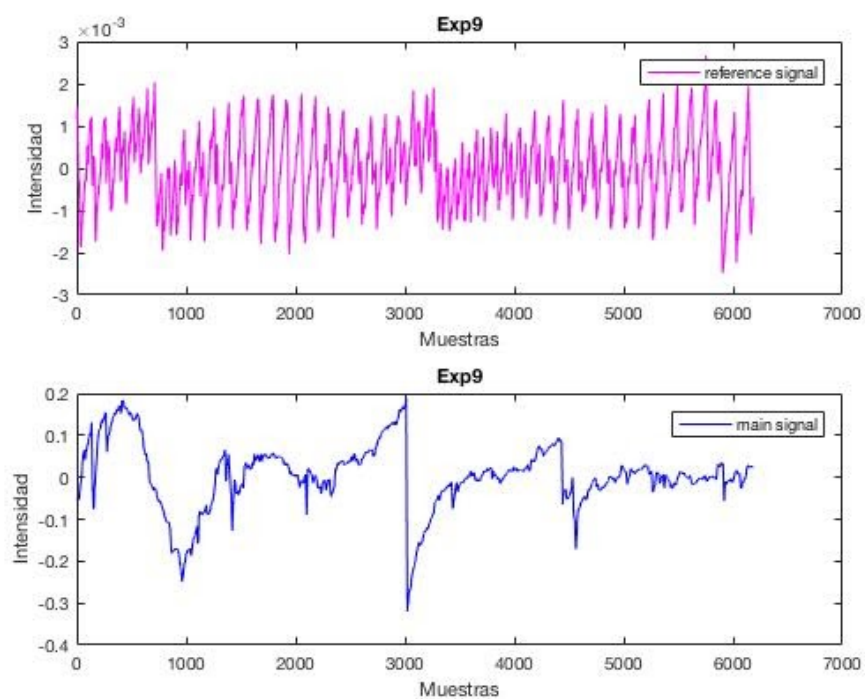


Figura 104. Paso 5. El algoritmo AirPLS luego devuelve la señal de referencia (violeta) y la señal principal (azul) corregidas sin sus respectivas líneas de base.

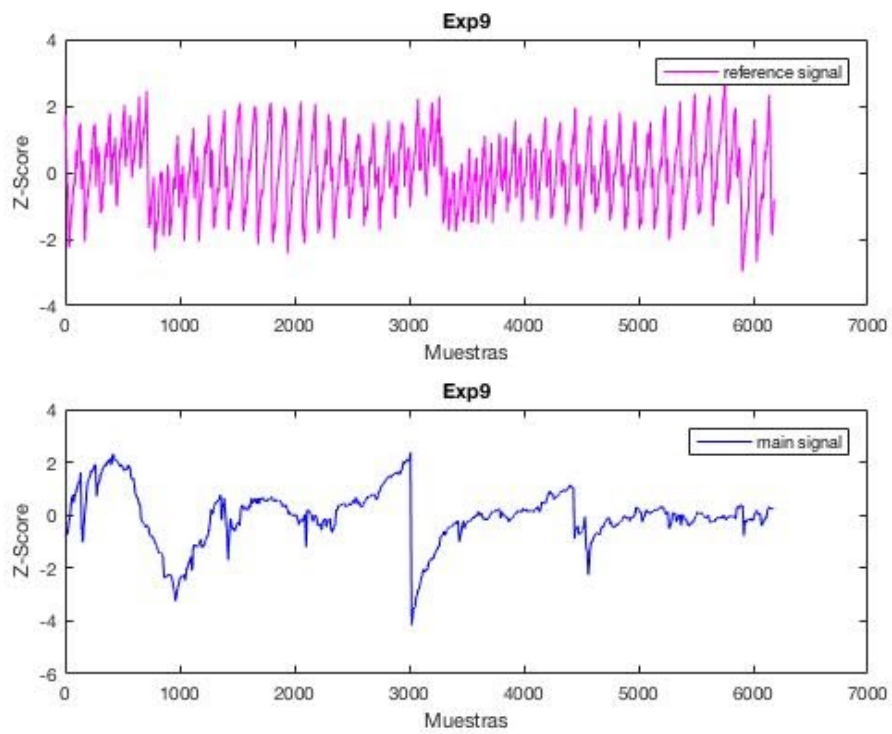


Figura 105. Paso 6. Señales estandarizadas.

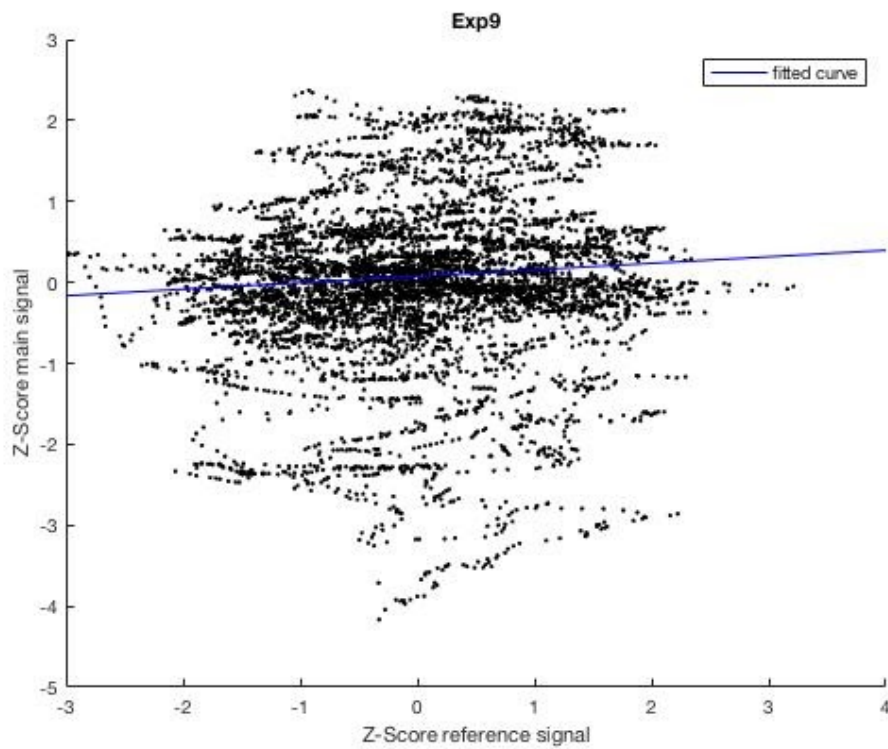


Figura 106. Paso 7. Ajuste de las señales normalizadas.

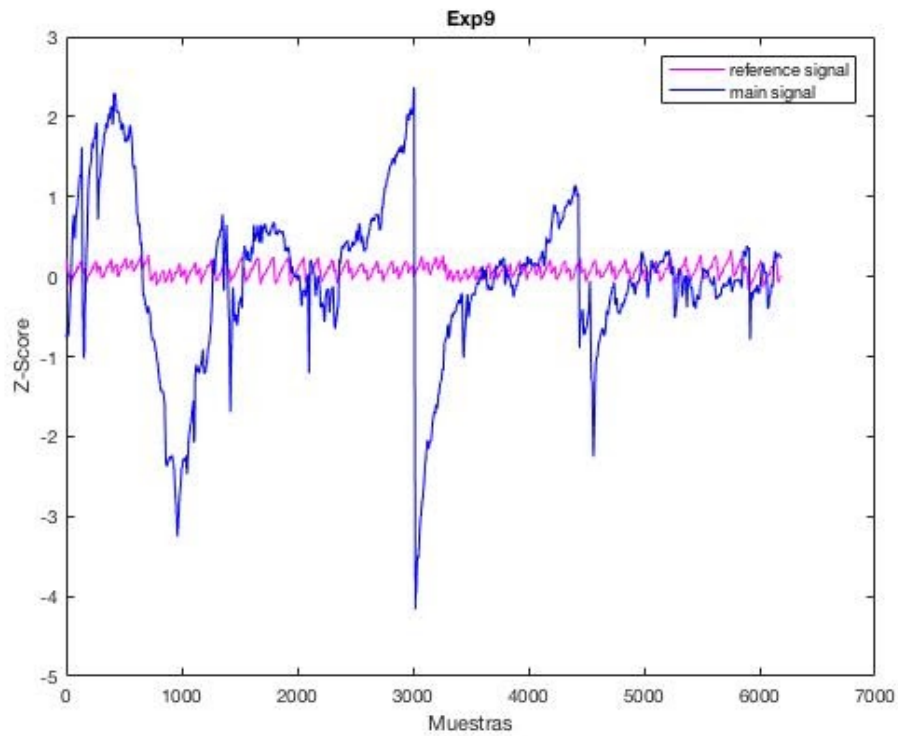


Figura 107. Paso 7. Alineamiento de la señal de referencia normalizada con la principal también normalizada.

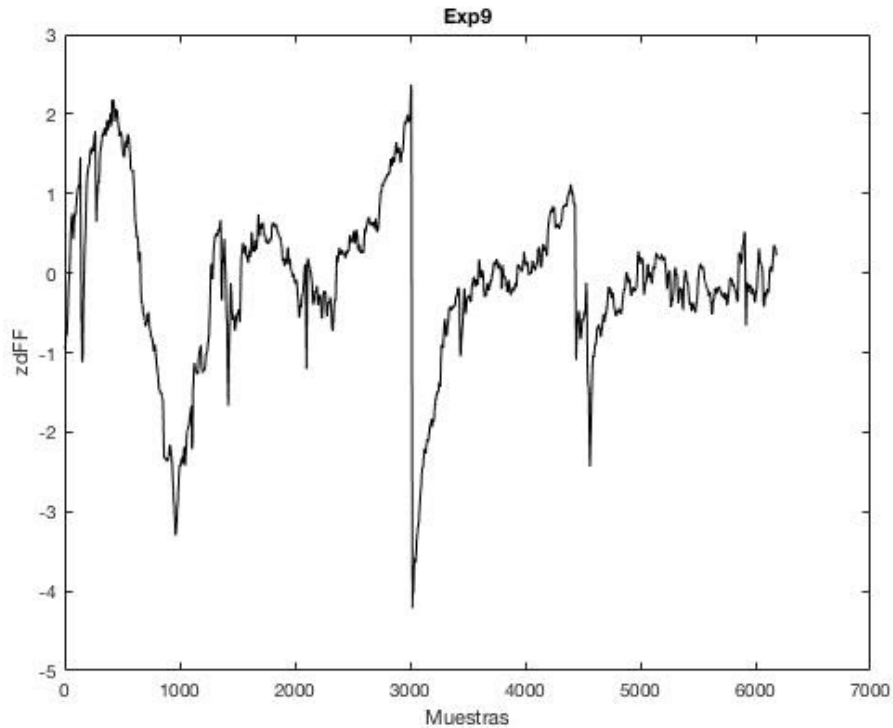


Figura 108. Paso 8. Se realizó la sustracción entre las dos señales de fluorescencia normalizadas.

6. Futuros desarrollos y conclusiones

Un punto importante que falta resolver es averiguar cuál es la relación señal/ruido del sistema en un experimento con un animal.

Una posible mejora al sistema es agregar un potenciómetro digital para poder regular la tensión de control entrante a los *drivers*. Pudiendo así calibrar la intensidad de los LEDs. Esto brindaría una capa adicional de control frente al posible *photobleaching* de las neuronas y permitiría disminuir la potencia lumínica de los LEDs para reducir la autofluorescencia de la fibra. Mejorando la relación señal/ruido. A continuación se muestra un esquema de cómo sería el circuito:

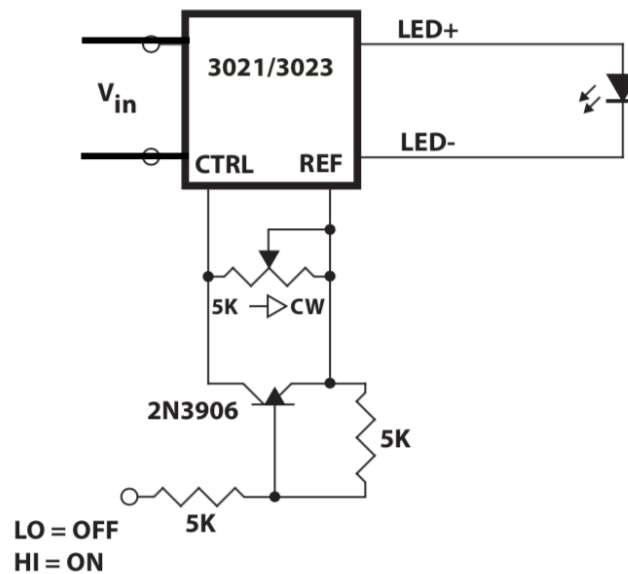


Figura 109. Circuito lógico-inversor + potenciómetro + driver: Control ON/OFF y de intensidad para un LED.

El resultado de este trabajo es un sistema altamente modificable a las necesidades del usuario. Donde el mismo, con criterio propio e instrucciones detalladas en el informe, podrá ir calibrando los distintos parámetros del equipo y deducir cuál es la configuración más óptima para su experimento.

7. Anexo

7.1. Lista de materiales del sistema

Código	Modelo	Descripción	U/	Precio x unidad (\$USD)	Total (\$USD)
MM	KC1-S	Kinematic, SM1-Threaded, 30 mm-Cage-Compatible Mount with Slip Plate for Ø1" Optic	2	158,10	316,20
CC	C6W	30 mm Cage Cube, Ø6 mm Through Holes	2	61,20	122,40
AC	C4W-CC	30 mm Cage Cube Connector for C4W and C6W Series Cubes	1	49,40	49,40
CC	B1C/M	Blank Cover Plate, Metric	2	18,00	36,00
CC	B3C/M	Fixed Cage Cube Platform for C4W/C6W, Metric	2	23,90	47,80
CC	B5CT1	Optic Mount with SM1-Threaded Bore for 30 mm Cage Cube, Mounts Optics up to 3.4 mm Thick	2	32,50	65,00

V	ER2-P4	Cage Assembly Rod, 2" (50.8 mm) Long, Ø6 mm, 4 Pack	3	22,57	67,71
	SM1L05	SM1 Lens Tube, 0.50" Thread Depth, One Retaining Ring Included	1	12,59	12,59
	SM1RR-P10	SM1 Retaining Ring for Ø1" Lens Tubes and Mounts, 10 Pack	1	40,50	40,50
F2	FD1B	Ø1" Additive Dichroic Color Filter, Blue	1	24,36	24,36
F1	FD1M	Ø1" Subtractive Dichroic Color Filter, Magenta	1	24,36	24,36
F3	MF525-39	GFP Emission Filter CWL = 525 nm, BW = 39 nm	1	233,00	233,00
LC	F240FC-532	532 nm, f=7.86 mm, NA=0.51 FC/PC Fiber Collimation Pkg	3	145,00	435,00
LC	AD12F	SM1-Threaded Adapter for Ø12 mm Cylindrical Components	1	28,80	28,80

uC	Atmega2560		1	20,30	20,30
	SM1L30	SM1L30 - SM1 Lens Tube, 3.00" Thread Depth, One Retaining Ring Included	1	27.84	27.84
	SM1T2	SM1T2 - SM1 (1.035"-40) Coupler, External Threads, 0.5" Long	1	21.54	21.54
	SM1A9	SM1A9 - Adapter with External C-Mount Threads and Internal SM1 Threads	1	19.96	19.96

	3021	3021/3023 BuckPuck™ Wide Range LED Power Module 500 mA	1	9.49	9.49
	3021	3021/3023 BuckPuck™ Wide Range LED Power Module 700 mA	1	9.49	9.49
	Hirose	ACC-01-3009: 6 pins, 1M GPIO cable, HIROSE HR10 Circular Connector	1	25.00	25.00
	USB	Cable USB 3.0 A a Micro B - para Discos Externos	1	13.40	13.40
	FLIR	BFLY-U3-23S6M -C: 2.3 MP, 41 FPS, Sony IMX249, Mono	1	519.00	519.00
	LUXEON Z	415 nm Ultraviolet on a Saber Z1 10mm Square Base - 725 mW - 500 mA	1	21.32	21.32

	LUXEON Z	470 nm Blue Rebel LED on a SkinkPad-II 25mm Round Baser - 74 lm - mA	1	15.05	15.05
	FT020	FT020 - Orange Reinforced Ø2 mm Furcation Tubing	2	1.42	2.82
	BFH48-400	BFH48-400 - 0.48 NA, Ø400 µm Core Multimode Fiber, High OH	1	3.78	3.78
	M128L01	Ø400 µm Core, 0.50 NA, FC/PC to Ø2.5 mm Ferrule Patch Cable, 1 m Long	2	108.11	216.22
	LPD25-15B	25 mm Square x 15 mm High Alpha Heat Sink - 15,6 °C/W	1	4.97	4.97
	LPD19-15B	19 mm Square x 15 mm High Alpha Heat Sink - 19,2 °C/W	1	4.78	4.78

		Fuente MEGALITE 60/50 Hz 12V	1		
	LG3	Laser Safety Glasses, Light Orange Lenses, 48% Visible Light Transmission, Universal Style	1	165,00	165,00
	BP100	Pre-Cut; Thermal Adhesive Tape for 5 mm Square LED Assemblies - (12 Piece Sheet)	2	3,49	6,98
					2609.26

7.2. Especificaciones técnicas de los LEDs

Respecto al LED azul, las especificaciones técnicas son las siguientes:

COLOR	DOMINANT ^(1, 2) or PEAK WAVELENGTH ⁽²⁾ (nm)		LUMINOUS FLUX ^(1, 3) (lm) or RADIOMETRIC POWER ⁽³⁾ (mW)		TEST CURRENT (mA)	PART NUMBER
	MINIMUM	MAXIMUM	MINIMUM	TYPICAL		
Blue	460	485	40	41	350	LXML-PB01-0040
	460	485	30	35	350	LXML-PB01-0030
	460	485	23	28	350	LXML-PB01-0023
	460	485	18	22	350	LXML-PB01-0018
	460	485	50	74	700	LXML-PB02

Figura 110. Desempeño del LED azul a 700 mA y 25 grados centígrados.

COLOR	PART NUMBER	TYPICAL SPECTRAL HALF-WIDTH ⁽¹⁾ (nm)	TYPICAL TEMPERATURE COEFFICIENT OF DOMINANT or PEAK WAVELENGTH (nm/°C)	TYPICAL TOTAL INCLUDED ANGLE ⁽²⁾	TYPICAL VIEWING ANGLE ⁽³⁾
Blue	LXML-PB01 ⁽⁵⁾	20	0.05	145°	125°
	LXML-PB02 ⁽⁵⁾	20	0.05	145°	125°

Figura 111. Características ópticas del LED azul a 700 mA y 25 grados centígrados.

COLOR	PART NUMBER	FORWARD VOLTAGE ⁽¹⁾ (V _f)			TYPICAL TEMPERATURE COEFFICIENT OF FORWARD VOLTAGE ⁽²⁾ (mV/°C)	TYPICAL THERMAL RESISTANCE—JUNCTION TO SOLDER PAD (°C/W)
		MINIMUM	TYPICAL	MAXIMUM		
Blue	LXML-PB01	2.55	2.95	3.51	-2.0 to -4.0	10.00
	LXML-PB02	2.50	2.95	3.50	-2.0 to -4.0	6.00

Figura 112. Características eléctricas y térmicas del LED azul a 700 mA y 25 grados centígrados.

PARAMETER	GREEN/CYAN/ BLUE/ROYAL BLUE	ES BLUE/ ES ROYAL BLUE	FAR RED/ DEEP RED/RED/ RED-ORANGE/AMBER	PC AMBER
DC Forward Current ^(1, 2)	1000mA	1000	700mA	700mA
Peak Pulsed Forward Current ^(1, 3)	1000mA	1200	700mA	700mA
LED Junction Temperature ⁽¹⁾ (DC & Pulse)	150°C	150°C	135°C	130°C
ESD Sensitivity (ANSI/ESDA/JEDEC JS-001-2012)	Class 3A	Class 3A	Class 3A	Class 3A
Operating Case Temperature ⁽¹⁾	-40°C to 135°C	-40°C to 135°C	-40°C to 120°C	-40°C to 110°C
LED Storage Temperature	-40°C to 135°C	-40°C to 135°C	-40°C to 135°C	-40°C to 135°C
Soldering Temperature	JEDEC 020c 260°C	JEDEC 020c 260°C	JEDEC 020c 260°C	JEDEC 020c 260°C
Allowable Reflow Cycles	3	3	3	3
Autoclave Conditions	-121°C at 2 ATM 100% Relative Humidity for 96 Hours Maximum			
Reverse Voltage (V _{reverse})	LUXEON LEDs are not designed to be driven in reverse bias			

Figura 113. Parámetros máximos para el LED azul. Como se puede apreciar, la corriente máxima que este LED puede soportar supera la corriente máxima que su driver correspondiente puede entregar.

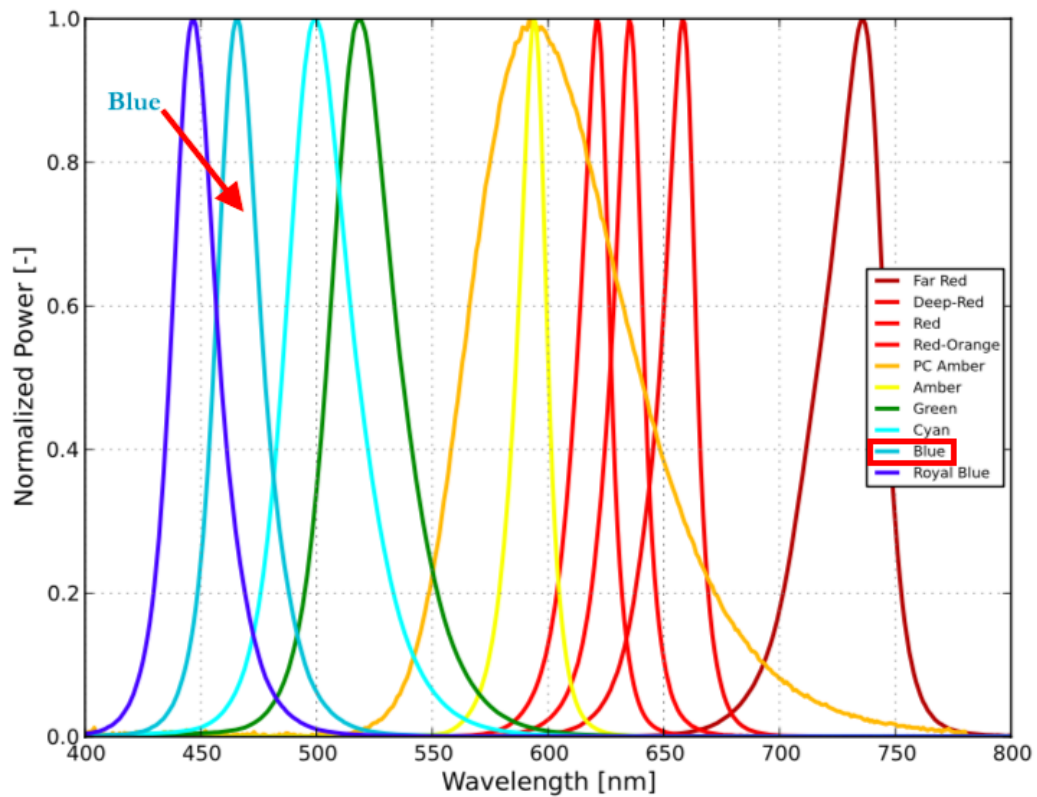


Figura 114. Potencia normalizada vs longitud de onda para el LED azul de 470 nm a 25 grados centígrados.

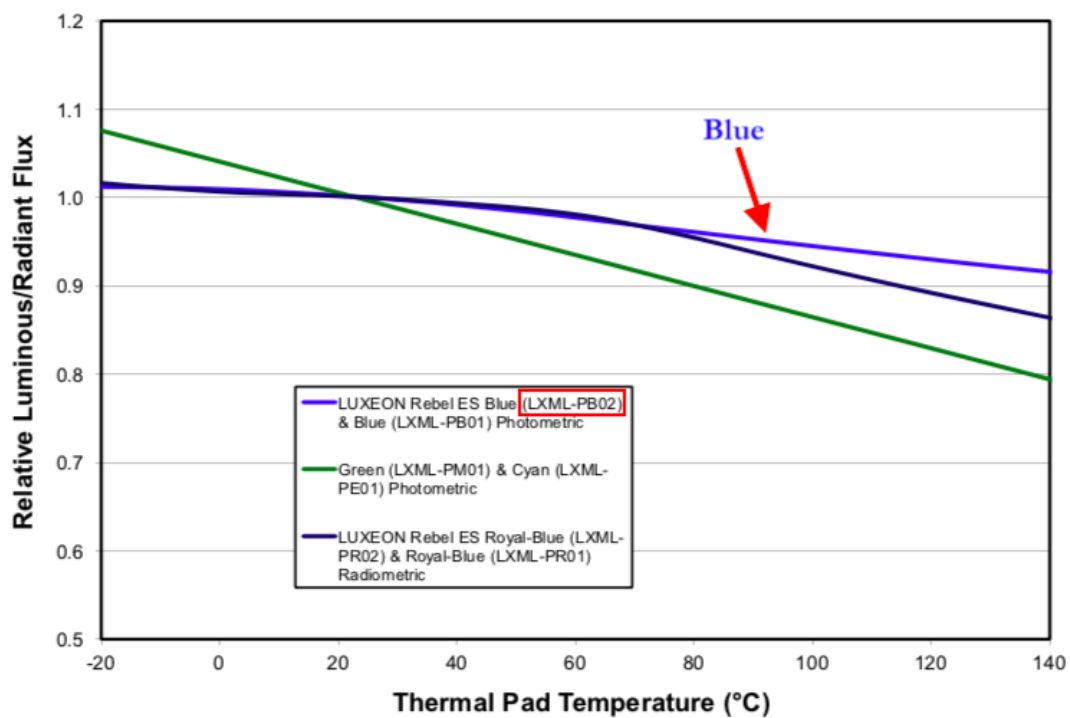


Figura 115. Salida de la luz normalizada vs temperatura de la base del LED azul.

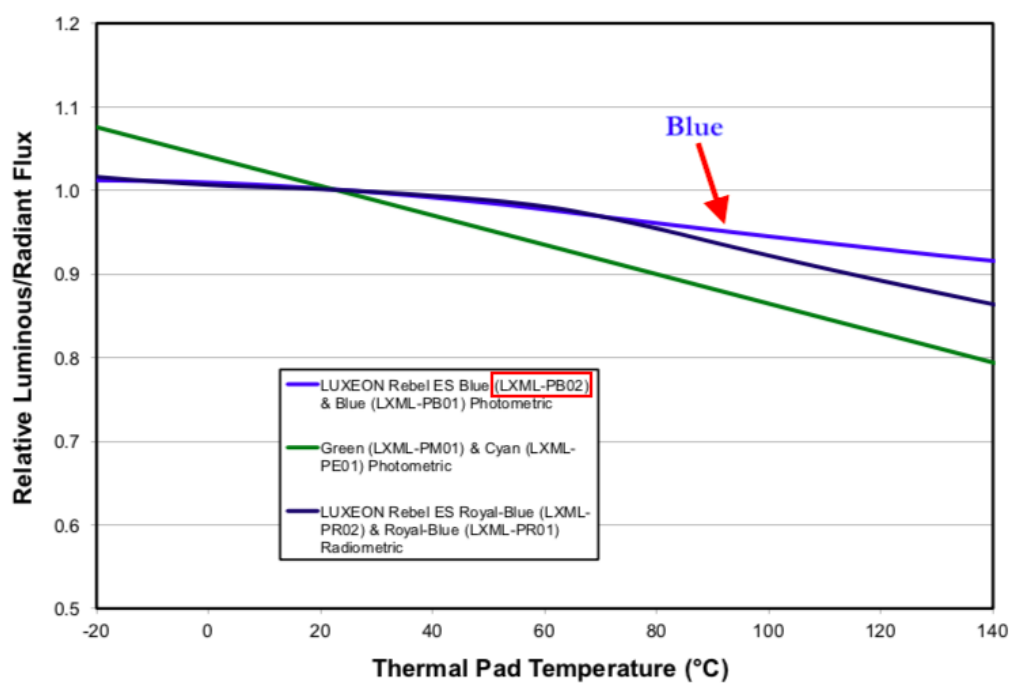


Figura 116. Flujo radiante relativo vs temperatura para el LED azul.

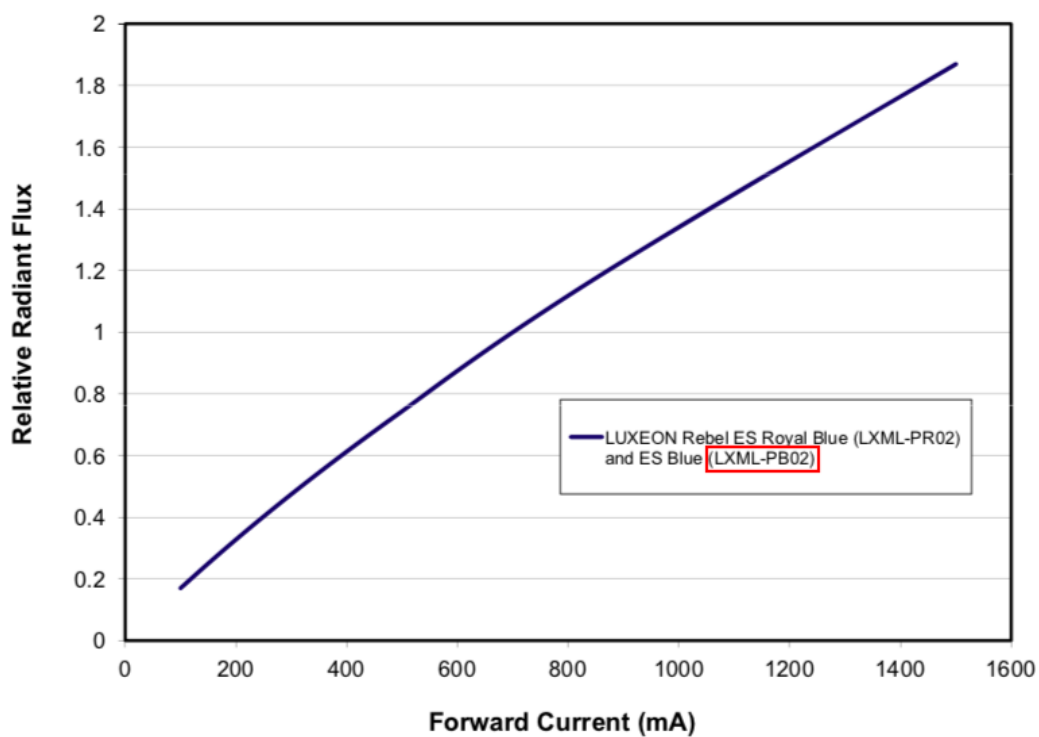


Figura 117. Flujo radiante relativo vs corriente directa para el LED azul.

Y las especificaciones técnicas del LED violeta son las que se presentan a continuación:

PEAK WAVELENGTH ^[1]	TYPICAL RADIOMETRIC POWER ^[2] (mW)		PART NUMBER
	500mA	1000mA	
415 ±5nm	575	1093	LHUV-0415-A055
	625	1188	LHUV-0415-A060
	675	1283	LHUV-0415-A065
	725	1378	LHUV-0415-A070

Figura 118. Desempeño del LED violeta a 25 grados centígrados.

PART NUMBER	TYPICAL SPECTRAL HALF-WIDTH (nm)	TYPICAL TEMPERATURE COEFFICIENT OF PEAK WAVELENGTH (nm/°C)	TYPICAL TOTAL INCLUDED ANGLE ^[1]	TYPICAL VIEWING ANGLE ^[2]
LHUV-0415-Axxx	13.7	0.05	170°	140°

Figura 119. Características ópticas del LED violeta a 500 mA y 25 grados centígrados.

PART NUMBER	FORWARD VOLTAGE ^[1] (V)		TYPICAL TEMPERATURE COEFFICIENT OF FORWARD VOLTAGE ^[2] (mV/°C)	TYPICAL THERMAL RESISTANCE—JUNCTION TO SOLDER PAD (°C/W)
	MINIMUM	MAXIMUM		
LHUV-0415-Axxx	2.9	3.4	-1.6	2.5

Figura 120. Características eléctricas y térmicas del LED violeta a 500 mA y 25 grados centígrados.

PARAMETER	MAXIMUM PERFORMANCE
DC Forward Current ^[1,2]	1000mA for LUXEON UV U1 2000mA for LUXEON UV U2
Peak Pulsed Forward Current ^[1,3]	1300mA for LUXEON UV U1 2600mA for LUXEON UV U2
LED Junction Temperature ^[1] (DC & Pulse)	120°C
ESD Sensitivity (ANSI/ESDA/JEDEC JS-001-2012)	Class 3B
Operating Case Temperature ^[1]	-40°C to 120°C
LED Storage Temperature	-40°C to 135°C
Soldering Temperature	260 ±3°C
Allowable Reflow Cycles	3
Reverse Voltage (V _{reverse})	LUXEON UV U Line LEDs are not designed to be driven in reverse bias

Figura 121. Parámetros máximos para el LED violeta. Como se puede ver la corriente máxima que este LED puede soportar supera la corriente máxima que su driver correspondiente puede entregar.

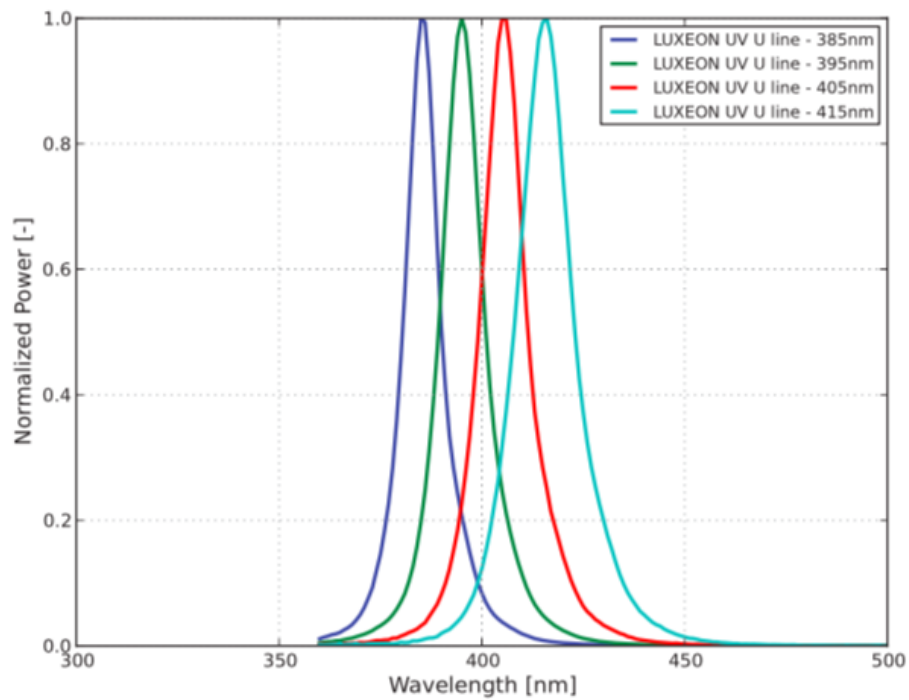


Figura 122. Potencia normalizada vs longitud de onda para el LED violeta de 415 nm a 25 grados centígrados.

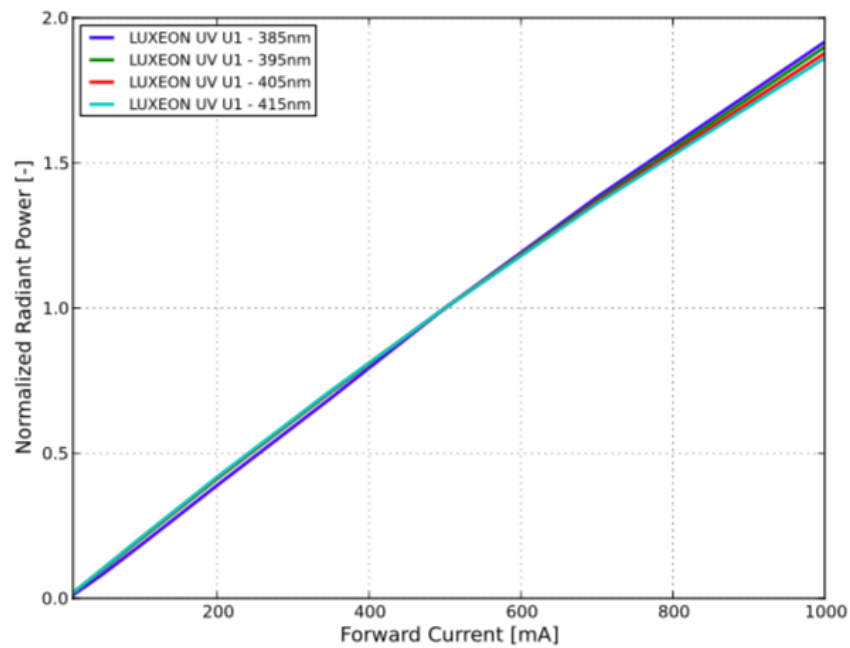


Figura 123. Potencia radiante normalizada vs corriente directa para el LED violeta de 415 nm.

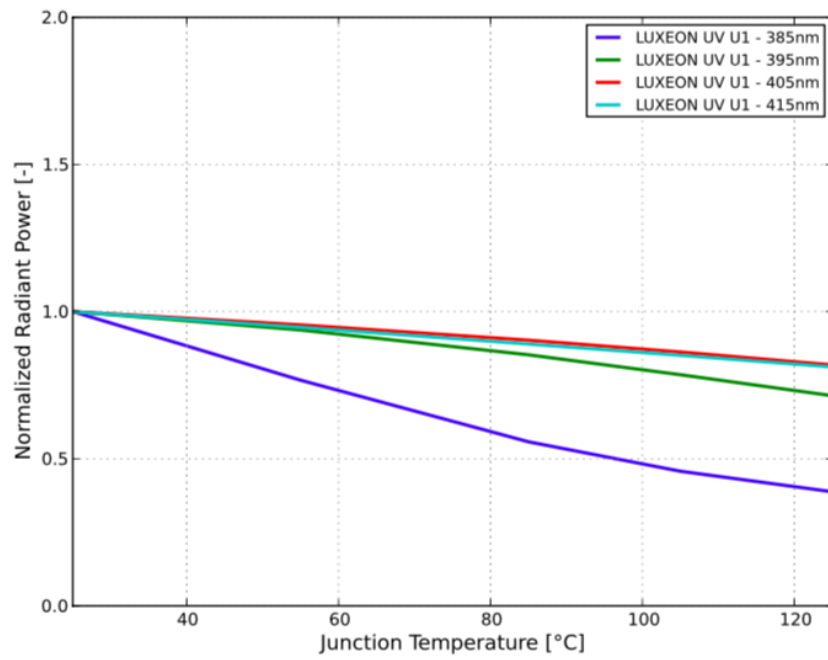


Figura 124. Potencia radiante normalizada vs temperatura de la unión para el LED violeta de 415 nm.

8. Bibliografía

1. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. 2005. Millisecond-timescale genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8:1263–8. doi:10.1038/nn1525
2. Lim, D. H., LeDue, J., Mohajerani, M. H., Vanni, M. P., and Murphy, T. H. 2013. Optogenetic approaches for functional mouse brain mapping. *Front. Neurosci.* 7:54. doi:10.3389/fnins.2013.00054
3. Deisseroth, K. 2015. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat. Neurosci.* 18(9):1213–25. doi:10.1038/nn.4091
4. Física para ciencias e ingeniería con Física Moderna; Volumen 2; Séptima Edición; Serway-Jewett. Página 634.
5. Chen, T., Wardill, T., Sun, Y. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300 (2013).
6. Burgoyne, R. D. (2007). Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca^{2+} signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 182–193.
7. Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators. S. Andrew Hires, Lin Tian and Loren L. Looger. Howard Hughes Medical Institute, Janelia Farm Research Campus, 19700 Helix Dr, Ashburn, VA 20147, USA.
8. Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd. ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA.
9. Jaffe, D. B., Johnston, D., Lasser-Ross, N., Lisman, J. E., Miyakawa, H., and Ross, W. N. (1992). The spread of Na^{+} spikes determines the pattern of dendritic Ca^{2+} entry into hippocampal neurons. *Nature* 357, 244–246.
10. Denk, W., Yuste, R., Svoboda, K., and Tank, D. W. (1996). Imaging calcium dynamics in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 372–378.
11. Yasuda, R., Nimchinsky, E. A., Scheuss, V., Pologruto, T. A., Oertner, T. G., Sabatini, B. L., et al. (2004). Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments. *Sci. STKE* 2004, 15.
12. Yuste, R. and Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682–684.

13. Rink, T. J., Tsien, R. Y., and Warner, A. E. (1980). Free calcium in *Xenopus* embryos measured with ion-selective microelectrodes. *Nature* 283, 658–660.
14. Johnson, F. H. and Shimomura, O. (1972). Preparation and use of aequorin for rapid microde- termination of Ca^{2+} in biological systems. *Nat. New. Biol.* 237, 287–288.
15. Tsien, R. Y. and Rink, T. J. (1983). Measurement of cytoplasmic free Ca^{2+} . In: Barker, J., McKel- vey, J. F. (eds.) *Current Methods of Cellular Neurobiology*, 3rd. ed., Wiley, New York.
16. Tsien, R. Y. (1999). Monitoring cell calcium. In: Carafoli, E., Klee, C. B. (eds.) *Calcium as a cellular regulator*, Oxford University Press, USA, pp. 28–54.
17. Kerr, J. N. and Denk, W. (2008). Imaging in vivo: watching the brain in action. *Nat. Rev. Neuro- sci.* 9, 195–205.
18. Di Virgilio, F., Steinberg, T. H., Swanson, J. A., and Silverstein, S. C. (1988). Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. A blocker of organic anion transport reveals that these processes occur via a membrane transport system for organic anions. *J. Immunol.* 140, 915–920.
19. Tour, O., Adams, S. R., Kerr, R. A., Meijer, R. M., Sejnowski, T. J., Tsien, R. W. et al. (2007). Calcium Green FAsH as a genetically targeted small-molecule calcium indicator. *Nat. Chem. Biol.* 3, 423–431.
20. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. et al. (1997). Fluores- cent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882–887.
21. Hasan, M. T., Friedrich, R. W., Euler, T., Larkum, M. E., Giese, G., Both, M. et al. (2004). Functional fluorescent Ca^{2+} indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PLoS Biol.* 2, e163.
22. <https://www.fpbases.org/protein/gcamp6f/>
23. Martianova E, Aronson S, Proulx CD. Multi-Fiber Photometry to Record Neural Activity in Freely-Moving Animals. *J Vis Exp.* 2019;(152):10.3791/60278. Published 2019 Oct 20. doi:10.3791/60278.
24. Akam, T., Walton, M.E. pyPhotometry: Open source Python based hardware and software for fiber photometry data acquisition. *Sci Rep* 9, 3521 (2019).
25. Leveraging calcium imaging to illuminate circuit dysfunction in addiction (2018). Cody A. Siciliano, Kay M.Tye. The Picower Institute for Learning and Memory,

- Department of Brain and Cognitive Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, United States. The Salk Institute for Biological Sciences, 10010 N Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, United States.
26. Deciphering the molecular mechanism responsible for GCaMP6m's Ca²⁺-dependent change in fluorescence. Lauren M. Barnett, Thomas E. Hughes, Mikhail Drobizhev. Published: February 9, 2017.
 27. Tian, L., Hires, S., Mao, T. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* 6, 875–881 (2009). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1398>
 28. “Guided Wave Optical Components and Devices. Basics, Technology, and Applications”. 2006, Pages 41-70.
 29. Lerner, T. N. et al. Intact-brain analyses reveal distinct information carried by SNc dopamine subcircuits. *Cell* 162, 635–647 (2015).
 30. Ronayne, K. (2016). Optoelectronic Systems and Applications for In Vivo Fiber Photometry (Unpublished master's thesis). University of Calgary, Calgary, AB.
 31. Kim, C., Yang, S., Pichamoorthy, N. et al. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat Methods* 13, 325–328 (2016).
 32. Wright, Patrick W et al. “Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice.” *PloS one* vol. 12,10 e0185759. 19 Oct. 2017, doi:10.1371/journal.pone.0185759.
 33. Fast Calcium Imaging with Optical Sectioning via HiLo Microscopy. Marcel A. Lauterbach, Emiliano Ronzitti, Jenna R. Sternberg, Claire Wyart, Valentina Emiliani.
 34. High-Accuracy Detection of Neuronal Ensemble Activity in Two-Photon Functional Microscopy Using Smart Line Scanning. Marco Brondi, Monica Moroni, Dania Vecchia, Manuel Molano-Mazón, Stefano Panzeri, Tommaso Fellin.
 35. Owen, S.F., Liu, M.H. & Kreitzer, A.C. Thermal constraints on in vivo optogenetic manipulations. *Nat Neurosci* 22, 1061–1065 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0422-3>.
 36. <https://www.flir.es/support-center/iis/machine-vision/knowledge-base/what-external-iidc-trigger-modes-are-supported-by-my-camera/>

37. <https://www.flir.com/support-center/iis/machine-vision/knowledge-base/why-is-the-frame-rate-displayed-in-the-demo-program-different-from-the-requested-frame-rate/>
38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6288536/>
39. <https://www.tdt.com/files/manuals/TDTFiberPhotometryUserGuide.pdf>
40. Zhang ZM, Chen S, Liang YZ. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst*. 2010;135(5):1138-1146. doi:10.1039/b922045c