

Sistema de cartografiado óptico en corazones grandes perfundidos con sangre: registro simultáneo de potenciales transmembrana y transitorios de calcio, mediante un único fotodetector CCD

Carolina Curiel Llamazares¹, Felipe Alonso Atienza², Jorge G. Quintanilla¹.

¹ Unidad de Arritmias, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España. ² Departamento de Teoría de la Señal y Comunicaciones. Universidad Rey Juan Carlos. Fuenlabrada, Madrid. España.

Resumen— El cartografiado óptico (CO) es una herramienta muy útil para el registro de la actividad eléctrica del corazón con alta resolución espaciotemporal. Los sistemas clásicos permiten el registro separado de potenciales transmembrana (V_m) o transitorios de calcio (Ca_iT) con un único fotodetector (p.e. cámara CCD), o el registro simultáneo de ambos parámetros a costa de utilizar dos fotodetectores y un complejo sistema óptico auxiliar. El presente proyecto aborda el diseño y la implementación de un sistema de CO, que como novedad, permite la adquisición simultánea de V_m y Ca_iT en corazones grandes utilizando un único fotodetector y aprovechando los cortos tiempos de conmutación de la tecnología de iluminación LED. Dicho sistema ha sido diseñado para la utilización de tintes que emiten en el infrarrojo cercano, permitiendo trabajar con corazones perfundidos con sangre en vez de Tyrode, lo que minimiza el edema. Además, se ha implementado una aplicación en MATLAB® que permite el control de dicho sistema con una interfaz gráfica que posibilita la adquisición de películas multiplexadas, la demultiplexación de los V_m y Ca_iT , la realización de filtrados espaciotemporales, la visualización de las películas y de los V_m y Ca_iT registrados en cada píxel y la exportación/importación de las películas en varios formatos. Por otra parte, se ha cuantificado la calidad de las películas de V_m y Ca_iT obtenidas con diferentes perfusiones y tasas de adquisición. Por último, se discuten los potenciales cambios realizables en el sistema para mejorar la calidad de los registros obtenidos.

Palabras clave— Cartografiado óptico cardíaco; Potencial de acción; Transitorio de calcio.

I. INTRODUCCIÓN

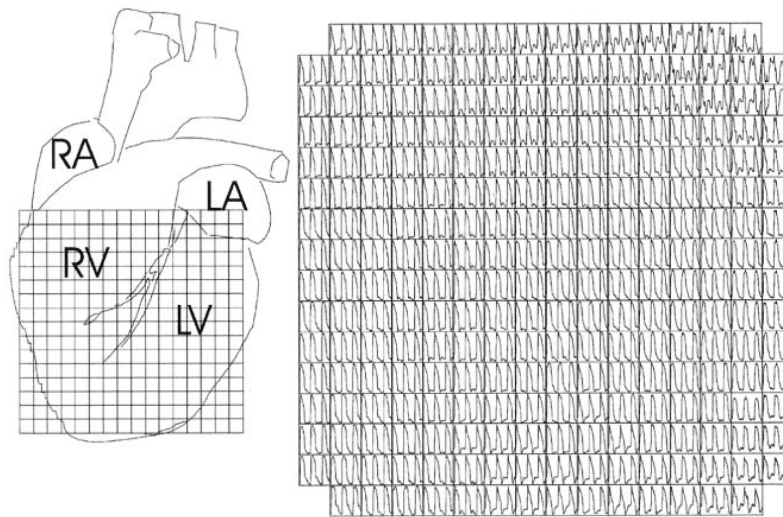
EL Cartografiado Óptico (CO) es una técnica de investigación experimental que se utiliza en electrofisiología cardíaca para analizar, a través de una serie de señales/parámetros de interés, el comportamiento eléctrico del corazón tanto en situaciones normales como patológicas

[1]. El CO consiste en el registro, mediante una cámara de alta sensibilidad y alta tasa de adquisición de imágenes (típicamente cámaras CCD o CMOS especializadas), de la fluorescencia emitida por tintes fotosensibles adheridos a la membrana de las células del corazón. Para cada píxel de la imagen (dimensión espacial) se obtiene una señal (dimensión temporal) de fluorescencia (Figura 1A) que está relacionada con algún parámetro electrofisiológico de interés, siendo los más típicos los potenciales de acción transmembrana (V_m) y los transitorios de calcio intracelular (Ca_iT). Con las señales anteriores pueden calcularse otros parámetros informativos a partir de mapas de activación, de velocidades locales de conducción y de repolarización [2], entre otros (Figura 1B).

El alcance de los sistemas de CO con una única cámara ha estado limitado a la captación de registros uniparamétricos (V_m o Ca_iT). Por otro lado, desde hace unos 10 años se han utilizado sistemas de CO que permiten el registro simultáneo de 2 parámetros electrofisiológicos simultáneos (típicamente V_m y Ca_iT) [3]. Sin embargo, su complejidad técnica y los altos costes asociados (dos cámaras muy caras, sistemas ópticos auxiliares complejos con espejos dicróicos, alineamiento y sincronización de alta precisión a priori entre las cámaras, etc.), han impedido la generalización de su uso como una herramienta de investigación estándar hasta el momento [4].

Recientemente las limitaciones de los sistemas de CO con una sola cámara se han visto solventadas gracias a los avances obtenidos en las tecnologías de iluminación y de adquisición [4], así como en los tintes fotosensibles [5]. Las tasas de adquisición (imágenes por segundo) de las nuevas cámaras CCD y CMOS permiten obtener registros multiparamétricos con una alta resolución espacio-temporal utilizando un único detector. Para excitar los diferentes tintes fotosensibles utilizados (uno por cada parámetro a medir) a altas velocidades, es necesario utilizar fuentes de luz capaces de

A



B

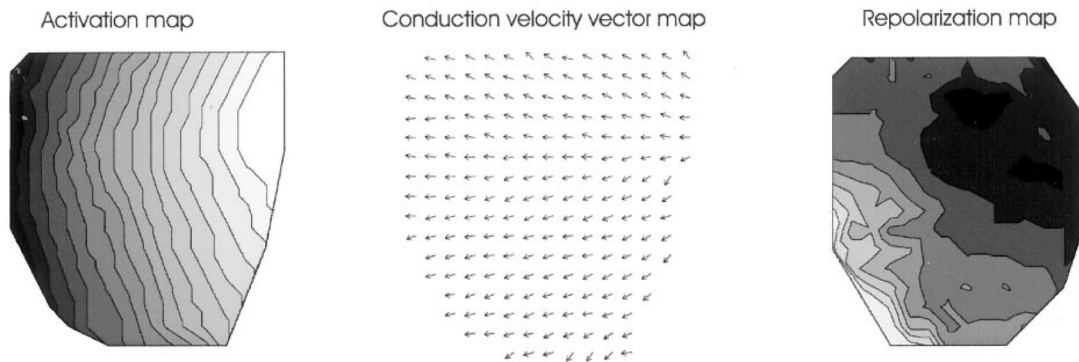


Figura.1 A: Mapas de potenciales de acción: diagrama esquemático del epicardio anterior en corazón de cobaya y el campo de visión de la imagen. B: Mapas de activación, de vectores de velocidad de conducción y repolarización. Figura obtenida de “*Optical imaging of the heart*” [2].

conmutar rápidamente (~ 1 ms) entre diferentes longitudes de onda, siendo los sistemas de iluminación LEDs los más apropiados para este fin [4]. Esto ha permitido, muy recientemente, obtener CO de múltiples parámetros electrofisiológicos simultáneos (por ejemplo V_m y Ca_iT) con una única cámara [4]. Gracias a ello, ahora es posible realizar un estudio más exhaustivo de los mecanismos subyacentes en la generación del ritmo tanto en condiciones normales como fisiopatológicas, sin necesidad de usar dos cámaras.

Basándonos en un sistema de CO propuesto recientemente para corazón de roedor [4], en el presente proyecto se ha diseñado e implementado un sistema de CO cardíaco que permite el registro simultáneo de los V_m y Ca_iT en corazones grandes (cerdo, perro, oveja e incluso humano), utilizando una única cámara CCD y cuatro fuentes de iluminación LED (a dos longitudes de onda diferentes), además de los filtros ópticos y tintes fotosensibles apropiados. Si se desea, dicho sistema permite además la utilización de sangre en lugar de solución de perfusión transparente (Tyrode), ya que utiliza longitudes de onda en el infrarrojo cercano que son menos absorbidas por la hemoglobina que las de los sistemas clásicos de CO. La

utilización de sangre posibilita modelos más realistas, con la ventaja adicional de limitar de manera muy importante la edematización del corazón bajo estudio, permitiendo experimentos de mayor duración con el corazón en condiciones óptimas.

A continuación se realiza un repaso al **estado del arte de los sistemas de CO** para facilitar la comprensión de las secciones posteriores del presente trabajo fin de máster.

A. Esquema básico y funcionamiento [6].

A la hora de realizar CO cardíaco existen diferentes esquemas de montaje. Sin embargo, todos tienen en común una serie de componentes principales.

En primer lugar, todos los sistemas deben mantener vivo al corazón sometido a estudio. Para ello, el corazón debe ser conectado rápidamente a un sistema de perfusión Langendorff, tras haber sido extraído *in vivo*. Este sistema permite la circulación de una solución nutritiva (Tyrode o incluso la propia sangre del animal) enriquecida con oxígeno hacia las células cardíacas a través de las arterias coronarias. Una vez que el corazón está conectado al sistema de perfusión, éste se

introduce en un recipiente transparente habitualmente lleno de la misma solución con la que está perfundido, a unos 37°C y se desfibrila. Después de esto, el corazón comienza a latir de manera similar a como lo haría *in vivo*.

A la preparación se le añade un tinte fotosensible, el cual es excitado con una luz a una determinada longitud de onda y emite fotones a otra longitud de onda diferente. Para la excitación de las moléculas de tinte es necesario utilizar una o varias fuentes de luz. Si las fuentes emiten mucho calor, es conveniente acoplarles filtros de calor para que no aumente la temperatura de la preparación cardiaca. Además, es indispensable acoplar a estas fuentes un filtro óptico que sólo deje pasar el rango de longitudes de onda de excitación apropiado para las moléculas del tinte fotosensible (filtro de excitación).

La luz emitida por el tinte que hay en las células cardiacas, atraviesa un filtro óptico acoplado a la cámara (filtro de emisión) que sólo deja pasar el rango de longitudes de onda emitidas por el tinte, hacia una lente situada sobre el fotodetector y que está enfocada a la zona de interés del corazón. Por último, dicho fotodetector transforma la señal óptica a una señal eléctrica que es enviada hacia un ordenador, donde posteriormente será procesada.

En la **Figura 2** se representa el montaje típico para CO cardiaco. Dicho montaje utiliza dos fuentes emisoras de luz, cada una de ellas con un filtro de calor, y un filtro óptico de excitación, que sólo deja pasar la luz de un determinado rango de longitudes de onda para excitar el tinte sensible al voltaje, el cual está adherido a las células cardiacas. La fluorescencia emitida por el corazón es filtrada en el margen de longitudes de onda apropiadas mediante un filtro óptico de emisión, y llega a un detector que, en este ejemplo, consiste en una cámara CCD con alta tasa de adquisición de imágenes.

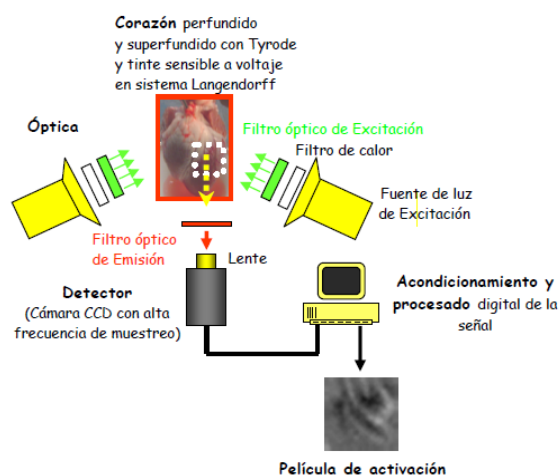


Figura 2. Montaje típico de cartografiado óptico cardiaco. Consta de dos fuentes de luz, con sus respectivos filtros de calor y filtros ópticos de excitación. La luz emitida por el corazón pasa a través de un filtro óptico de emisión, el cual sólo deja pasar determinado rango de longitudes de onda, y esta luz es entregada a una lente que enfoca la luz captada sobre el fotodetector (sensor CCD o CMOS típicamente).

B. Tintes potenciométricos y tintes sensibles al calcio.

Existen una gran variedad de tintes fotosensibles, cuyas moléculas están compuestas por un cromóforo que se adhiere a la membrana de las células y desprende fotones cuando se produce un cambio en la célula (por ejemplo, un cambio en el potencial de membrana o en la concentración de calcio intracelular) mientras que es excitada con una determinada luz.

Puesto que en el presente proyecto se desean registrar simultáneamente los V_m y los Ca_iT , a continuación se exponen los tipos de tintes potenciométricos y tintes sensibles al calcio intracelular más utilizados en los sistemas clásicos de CO.

1) Tintes potenciométricos.

Los tintes potenciométricos son sensibles a los cambios de potencial transmembrana (V_m) en las células cardiacas. Típicamente los más utilizados han sido el di-4-ANEPPS y el di-8-ANEPPS. Estos tintes son sensibles a variaciones temporales de voltaje en el orden de microsegundos, produciéndose un cambio uniforme del ~10% de la fluorescencia por cada 100 mV. Su mecanismo de funcionamiento se explica en la **Figura 3**. El tinte di-4-ANEPPS tiene el inconveniente de que se internaliza rápidamente en las células, ocasionando una disminución de la señal registrada con el paso del tiempo. En cambio, el tinte di-8-ANEPPS se mantiene más tiempo en la capa externa, reduciéndose así la fototoxicidad [7;8].

2) Tintes sensibles al calcio.

Los ciclos de calcio, en concreto el Ca^{2+} intracelular, son de gran importancia para el acoplamiento de estimulo-contracción. Cuando el potencial de acción llega a los -40 mV se abren los canales de calcio, de tal forma que el Ca^{2+} entra en la célula, provocando una liberación masiva de calcio desde el retículo sarcoplasmático que inicia el mecanismo de contracción celular. En condiciones patológicas, como la insuficiencia cardiaca, existe una desregularización de los transitorios de calcio, contribuyendo a una disfunción de la contractilidad y arritmogénesis [9].

A la hora de elegir un tinte no sólo hay que tener en cuenta las propiedades espectrales del mismo, sino también su afinidad con el Ca^{2+} . Los tintes con una afinidad alta son los más utilizados, ya que existe una gran variedad de propiedades espectrales, pero tienen el inconveniente de que pueden prolongar artificialmente los transitorios de calcio y confundir la interpretación [10]. En cambio, los tintes de baja afinidad permiten una medición más precisa de la dinámica del calcio pero tienen otros inconvenientes ya que las relaciones señal a ruido obtenidas son algo peores [11]. El Fura-2 y el Indo-1 fueron los primeros tintes de alta afinidad utilizados ampliamente para el estudio del calcio. Ambos requieren de una luz de excitación en el rango ultravioleta (340-380 nm). El mayor inconveniente de estos tintes es la penetración limitada al tejido de la luz ultravioleta [12].

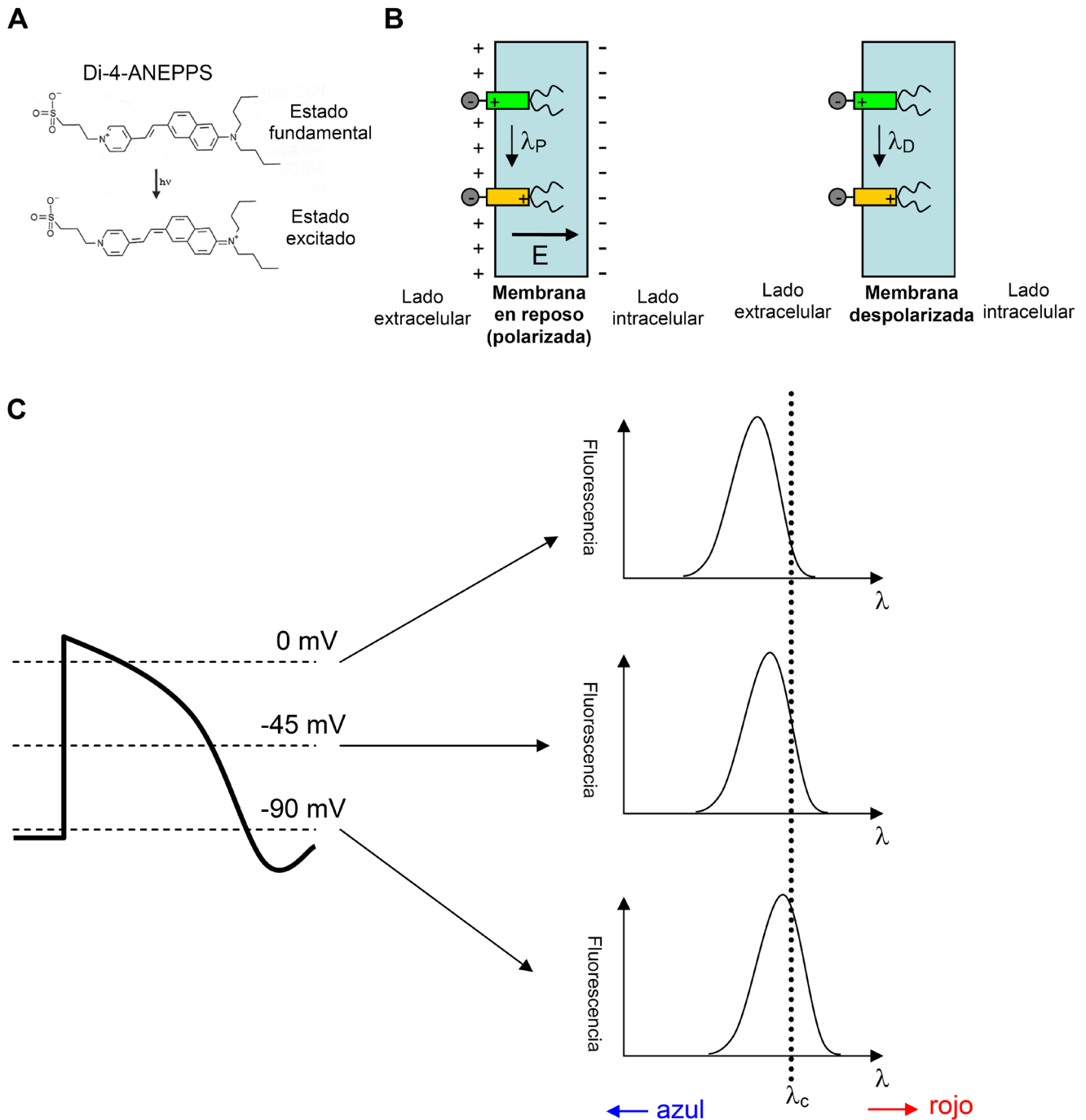


Figura 3. Mecanismo electrocrómico de respuesta al potencial de membrana. **A:** El cromóforo de la molécula, sufre un desplazamiento de carga debido a una reorganización de su estructura por el paso del estado fundamental al estado excitado. Es importante destacar que la molécula contiene un grupo polar en un extremo, y cadenas apolares hidrocarbonadas en el otro. Esto permite que la molécula se alinee con la estructura de la membrana de tal forma que el cromóforo quede paralelo al campo eléctrico intramembrana. **B:** Orientación que toma la molécula al ligarse a la membrana celular donde el cromóforo está representado por el rectángulo de color (verde en estado fundamental, naranja en estado excitado). El extremo polar es el círculo gris (que tiene carga negativa), y al otro extremo se representan las cadenas hidrocarbonadas. El campo producido en el interior de la membrana polarizada, disminuye la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado, por lo que se produce un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo). **C:** El espectro de emisión de la molécula sensible a voltaje cambia con el potencial de membrana. Cuando la célula se despolariza desde su potencial de reposo (-90 mV) hacia potenciales menos negativos (-45 y 0 mV respectivamente en la figura), el espectro de emisión se desplaza progresivamente hacia longitudes de onda menores (hacia el azul). El filtro de emisión situado delante del detector, excluirá la luz emitida por el tinte por debajo de una cierta longitud de onda λ_c , que aparece representada como una línea vertical punteada. Por ello, la cantidad de luz que alcanza el fotodetector está relacionada con el área de espectro que queda a la derecha de λ_c la cual está directamente relacionada con la tensión transmembrana [6].

Dentro del grupo de tintes de afinidad alta también se encuentran el Fluo-3 (ex. 506 nm / em. 526 nm), Fluo-4 (ex. 494 nm / em. 516 nm) y Rhod-2 (ex. 557 nm / em. 581 nm), los cuales tienen la ventaja de que la luz de excitación necesaria es de longitudes de onda visibles, siendo la atenuación de la luz de excitación/emisión menor [12].

Recientemente se ha desarrollado el tinte de baja afinidad Fura-4F (ex. 340-380 / em. 510 nm), del cual se ha demostrado que genera una señal continua estable en un periodo de 5 a 10 minutos, sin provocar fototoxicidad o *photobleaching* [13].

C. Fuentes de luz.

La fuente de luz para la excitación de los tintes usados en CO es uno de los elementos del sistema más importantes para obtener una relación señal a ruido lo suficientemente alta. Los métodos de iluminación que han sido más utilizados hasta el momento son las lámparas tungsten-halogen de filamentos y las lámparas de arco de mercurio/xenón, combinadas con filtros de excitación/emisión y dispositivos de control de iluminación.

De entre los dos, las lámparas de tungsten-halogen de filamentos son las fuentes de luz que proporcionan la luz más estable, aunque ofrecen una intensidad de iluminación por unidad de área muy baja y son muy caras. Mientras que las lámparas de arco de mercurio/xenón son inestables, debido a las fluctuaciones del plasma y la dispersión del calor [14].

Actualmente, además de la excitación láser, están en auge las fuentes LEDs, ya que tienen un menor coste, son estables y de fácil uso. Además, permiten una conmutación rápida de longitudes de onda, propiedad muy importante a la hora de registrar múltiples parámetros en CO, como es nuestro caso [4].

D. Tipos de detectores.

Los fotodetectores son también un elemento clave en un sistema de CO. Actualmente existe un número limitado de fotodetectores que ofrecen una sensibilidad y una resolución espacio-temporal adecuadas para el mapeo cardíaco. Las tecnologías más utilizadas son los arrays de fotodiodos (PDA), tubos fotomultiplicadores (PMT), cámaras CCD (Charge-Coupled Device) y cámaras CMOS (Complementary MetalOxide Semiconductor).

Los PDAs contienen cientos de fotodiodos que son sensores individuales que transforman la luz en corriente eléctrica, de tal forma que ésta es proporcional a la intensidad de luz recibida. Los PMT pueden llegar a conseguir factores de multiplicación de 10^3 a 10^9 mediante la emisión secundaria, por lo que pueden responder a niveles muy bajos de iluminación con un nivel de ruido aceptable. En cambio, su eficiencia cuántica está entre el 20 % y 30 %, siendo generalmente mayor para longitudes de onda entorno al azul y

menor entorno al rojo. Los PDA y PMT ofrecen una resolución temporal alta, pero baja resolución espacial [10].

Actualmente las tecnologías más utilizadas en el CO del corazón son las cámaras CCD y CMOS, ya que proporcionan una mayor resolución espacio-temporal que las tecnologías anteriormente mencionadas, debido al gran número de píxeles de los que disponen y a las altas tasas de adquisición de datos de las que son capaces [10]. Tanto los sensores CCD como los CMOS están fabricados con materiales semiconductores de metal-óxido (MOS) y estructurados en forma de matriz. Acumulan una carga eléctrica en cada celda de la matriz (o píxel) en proporción a la intensidad de luz que incide sobre ella [15].

La principal diferencia de funcionamiento entre estas dos tecnologías es que cuando el tiempo de exposición ha terminado, los sensores CCD (Figura 4) transfieren cada carga del píxel, mediante desplazamientos sucesivos y de forma secuencial, hacia una estructura de salida común, que transforma la carga a voltaje y lo entrega a la circuitería de la cámara donde la señal se digitaliza [15].

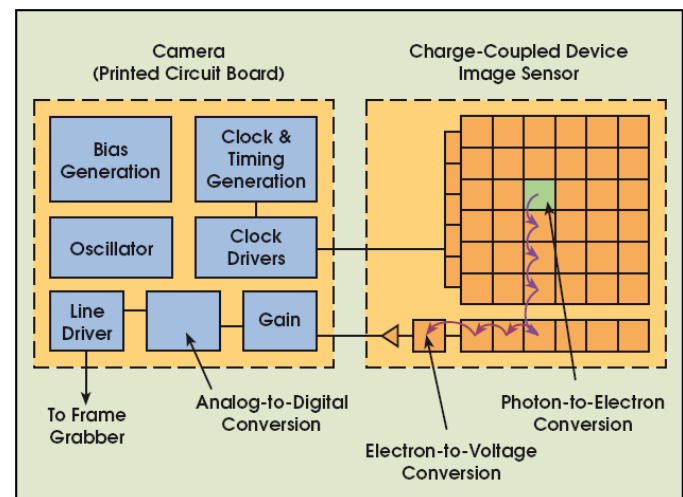


Figura 4. Esquema de funcionamiento de un sensor CCD. La mayoría de las funciones se llevan a cabo en la placa de circuito impreso de la cámara. Si la aplicación requiere algún cambio, se puede rediseñar la electrónica sin cambiar el sensor.

En cambio, en los sensores CMOS (Figura 5), los fotones que recibe cada celda son convertidos en carga eléctrica y en voltaje en la misma celda receptora, por lo que las celdas son independientes unas de otras [15].

Estas diferencias en las técnicas de lectura de datos tiene implicaciones significativas en la arquitectura del sensor y, por tanto, en sus capacidades y limitaciones [15].

Las principales ventajas de las cámaras CCD es que tienen un mayor rango dinámico (razón entre el nivel de saturación de los píxeles y el umbral por debajo del cual no captan señal), menor ruido y proporcionan una respuesta uniforme, es decir, un píxel sometido al mismo nivel de excitación de luz que sus

vecinos no presenta cambios apreciables. En cambio, las cámaras CMOS permiten utilizar mayores velocidades de adquisición, registrar sólo una región de interés, no presentan efecto “Blooming” (fenómeno por el cual un píxel que ha alcanzado la saturación empieza a ‘contagiar’ a sus vecinos) y tienen una alta eficiencia cuántica, es decir, con poca luz se puede conseguir un nivel de señal aceptable [15].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Procedimiento quirúrgico y preparación del corazón perfundido aislado.

Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo con las directivas Nacionales (RD1201/2005) y Europeas (86/609/EEC) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. La aprobación fue otorgada por el Comité de Bienestar Animal del Hospital Clínico San Carlos. Se utilizaron cerdos de 20-30 kg de peso. Se utilizó ketamina (20 mg/kg i.m.) como premedicación y se indujo anestesia general mediante propofol (6 mg/kg i.v.) y besilato de atracurio (0.2 mg/kg i.v.). Para el mantenimiento de la misma se utilizó besilato de atracurio (1.25 mg/kg/h i.v.), fentanilo (0.005 mg/kg/h i.v.) e isoflurano (2%). Se utilizó ventilación mecánica durante todo el procedimiento. La adecuación de la anestesia se controló mediante monitorización del ECG, del CO₂ expirado, de la saturación de oxígeno en sangre (pulsioxímetro) y de la temperatura rectal.[16;17]

Una vez anestesiados los animales, los corazones fueron expuestos mediante una esternotomía medial y posteriormente explantados. Fueron introducidos inmediatamente en un recipiente con una solución de Tyrode frío (NaCl 130 mM, NaHCO₃ 24 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 5.6 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1.8 mM y albúmina 0.04 g/l) y se conectaron a un sistema de perfusión Langendorff mediante una cánula aórtica. Se perfundió solución de Tyrode o sangre oxigenada, a una temperatura de 37°C y con una presión de

perfusión media de 45-60 mmHg, a través de las arterias coronarias. Para mantener el Tyrode oxigenado (95% de O₂, 5% de CO₂) y caliente (37°C) se utilizó un oxigenador extracorpóreo de neonatos (Lilliput 1 D901, Dideco, Sorin Group, Italia) calentado por un circuito cerrado de agua circulante, como se ha descrito en trabajos anteriores [16;17].

B. Procedimiento de carga de tintes y desacoplador electromecánico.

Para la elaboración de la solución de carga de los tintes, previamente se preparó una solución stock de Pluronic F-127 (1 g de Pluronic F-127 disuelto en 5 ml de DMSO). A continuación, se inyectó la preparación de tinte potenciométrico (1 ml de la solución stock de Pluronic + 300 µl de di-4-ANBDQPQ (JPW-6003) disuelto en etanol (24.4 mg/ml + 30 ml de Tyrode) durante ~30 segundos dentro de la cánula aórtica. Finalmente, se inyectó lentamente (5-10 minutos) la solución de carga del tinte sensible al calcio (2 mg de Rhod-2 disueltos en 2 ml de DMSO + 2 ml de solución stock de Pluronic y 30 ml Tyrode).

El artefacto de movimiento debido a la contracción del corazón se eliminó utilizando blebbistatin. El blebbistatin es un inhibidor de miosina II y otras isoformas de la miosina, capaz de minimizar el artefacto de movimiento con mínimas repercusiones en la actividad eléctrica del corazón [18]. Para la elaboración de la solución de blebbistatin se disolvieron 2 mg de blebbistatin en 1 ml de DMSO y se almacenó a 4 °C en la nevera hasta su utilización. Según el volumen de la solución de perfusión utilizado se utilizaron las dosis necesarias para conseguir la molaridad deseada (en nuestros experimentos 10 µM). Para su utilización, se calentó y 5/6 se disolvieron en la solución de perfusión. El 1/6 restante se inyectó por la cánula aórtica durante ~20 minutos. La incorporación del blebbistatin a la preparación se hizo a oscuras, ya que la luz UV y parte del espectro visible (450-490 nm) inactivan el blebbistatin [19].

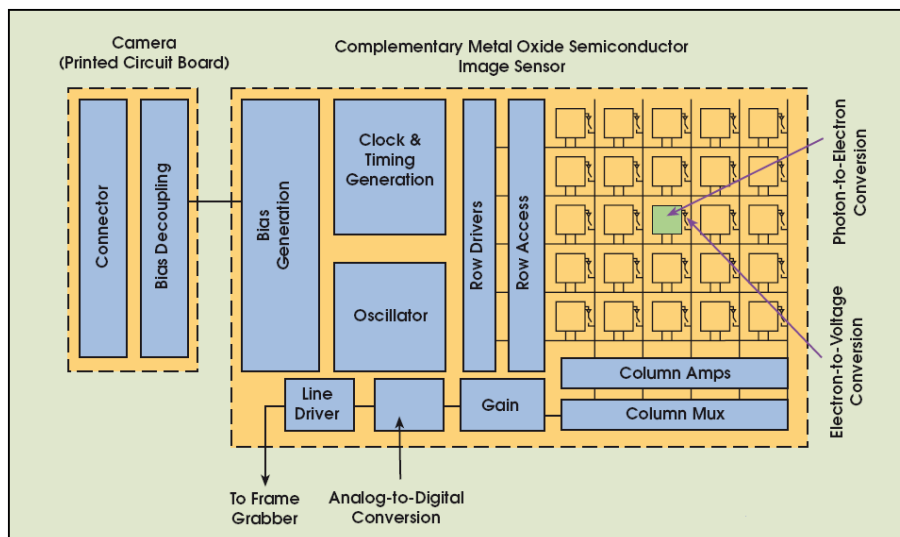


Figura 5. Esquema de funcionamiento de un sensor CMOS. La conversión carga-voltaje tiene lugar en cada píxel, y la mayoría de las funciones están integradas dentro del sensor.

C. Sistema de iluminación.

La preparación de corazón aislado se iluminó mediante 4 cabezas emisoras LED (LedEngin, Inc., Santa Clara, CA), 2 de ellas emitiendo “rojo profundo” (espectro centrado en 660 nm) para la excitación del tinte sensible a V_m y los otros 2 emitiendo luz verde (espectro centrado en 525 nm) para la excitación del tinte sensible a Ca_iT . Cada emisor LED suministra una potencia máxima de 10 W con una huella ultra pequeña (7x7x4,3 mm) (Figura 6A), proporcionando un flujo lumínico de ~425 lm con corrientes de 700 mA. Cada una de las cabezas emisoras está compuesta por 4 LEDs (Figura 6B). Se pueden consultar las especificaciones completas en la hoja de características suministrada por el fabricante.

Las cuatro cabezas emisoras LED se conectaron a dos fuentes (Cairn OptoLED, Faversham, Kent, UK, Figura 7). Cada fuente es capaz de controlar dos cabezas LED de forma independiente, utilizando un rango amplio de corrientes entre 0 y 5 amperios. Esta corriente puede ser establecida mediante un mando en el panel frontal o mediante un voltaje de control externo (de 0 a 10 V) por una entrada auxiliar. Cada canal dispone de un medidor de corriente (en A) o potencia (en W) que muestra los valores en el panel frontal.

Estas fuentes permiten la activación de cada LED mediante entradas digitales TTL (0V o +5V nominal) con conexión BNC, lo que es idóneo para realizar la conmutación de los LEDs mediante una señal externa, en nuestro caso proveniente de la cámara CCD. Se pueden utilizar dos entradas independientes para conmutar los LEDs por separado o utilizar una única señal de control para conmutar los LEDs según el nivel lógico de la señal. La última opción fue la utilizada en nuestro sistema. Los tiempos de subida y bajada son menores a 100 nanosegundos, lo que garantiza una

iluminación adecuada durante los cortos periodos de adquisición de la cámara CCD (1-3.3 ms para tasas de adquisición entre 300 y 1000 fps).

Una propiedad destacable de estas fuentes es que están provistas de un sistema de retroalimentación óptico, ya que, a pesar de que la salida de los LEDs tiende a ser más estable que otras fuentes, ésta también depende de la temperatura (Figura 8) que a su vez va variando dependiente del tiempo que lleve iluminando el sistema. En condiciones normales, la corriente que pasa a través del LED se ajusta utilizando un bucle de retroalimentación que la compara con un voltaje de control (proporcionado internamente o externamente por una entrada específica de la fuente). Cuando el sistema de retroalimentación óptico está activo, el voltaje de control ajusta la salida óptica del LED en vez de la corriente que pasa a través de él. El único inconveniente que presenta este sistema es que el tiempo de respuesta óptico para el ajuste es algo mayor, ~10 μs , pero lo suficientemente rápido para nuestra aplicación.



Figura 7. Fuente de alimentación OptoLed junto dos emisores LED. Se observan dos paneles frontales independientes para el ajuste de la corriente suministrada a cada LED. Dispone de un interruptor para seleccionar entre iluminación continua o pulsada, y otro para seleccionar conmutación manual o controlada por una señal externa. También dispone de una pequeña luz verde para indicar que los LEDs están encendidos, y una luz roja para indicar que el sistema de realimentación no es capaz de evitar la saturación de los LED y es necesario disminuir la potencia suministrada manualmente.

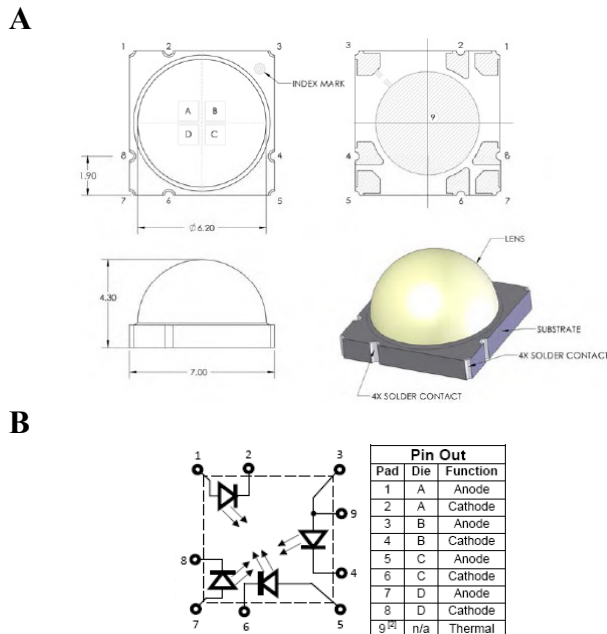


Figura 6. A: Esquema dimensional (mm) de los emisores LED. B: Esquema eléctrico de un emisor LED, donde se observa la distribución de los 4 LEDs con sus respectivas conexiones de ánodos y cátodos.

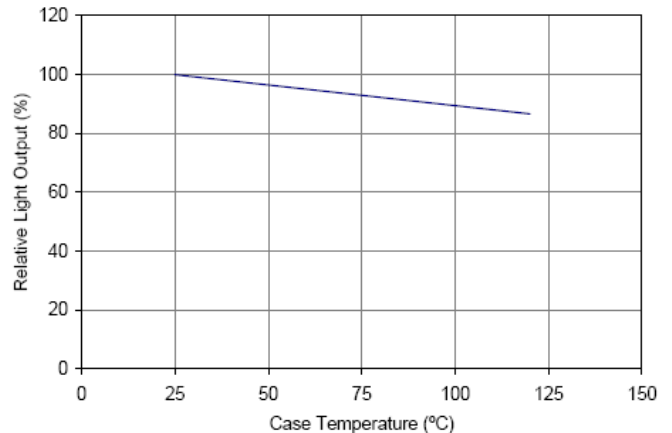


Figura 8. Salida de luz relativa (%) vs. Temperatura (°C) para las cabezas emisoras verdes, según las especificaciones técnicas del fabricante. Nótese como a medida que aumenta la temperatura disminuye la salida de luz relativa.

D. Elementos ópticos. Filtros de excitación y emisión.

La excitación de los tintes tiene que ser lo más eficiente posible, por lo que es fundamental seleccionar la zona del espectro donde la densidad de potencia de los LEDs sea máxima (Figura 9A) pero eliminando la luz en las longitudes de onda en las que emiten los tintes, ya que estos emiten intensidades muy bajas, incapaces de competir con la luz residual de iluminación a las mismas longitudes de onda a las que ellos emiten. Por ello, para el correcto funcionamiento del sistema es clave el uso de filtros ópticos, tanto de excitación (acoplados a las cabezas LED), como de emisión (acoplado a la lente de la cámara CCD). A cada emisor LED se le acopló un filtro óptico paso banda de excitación (Chroma Technology Corp., Brattleboro, Vermont, USA). El filtro de excitación de V_m está centrado en 650 nm con un ancho de banda de 40 nm. El filtro de excitación de Ca_iT está centrado en 520 nm con un ancho de banda de 40 nm (Figura 9B).

Se acopló una lente (Fuji Photo Optical Co., LTD, Saitama, Japón) sobre la cámara CCD para enfocar hacia el sensor la fluorescencia emitida por el corazón. Dicha lente tiene una apertura relativa máxima de 1:1.2, distancia focal de 6 mm, rango de iris de F1.2~F16. La lente dispone de anillos y tornillos de bloqueo para el iris y el enfoque, por lo que los ajustes no varían con el tiempo en el caso de experimentar vibraciones con la cámara.

A esta lente se le acopló un filtro óptico de emisión multibanda (Chroma Technology Corp., Brattleboro, Vermont, USA) para dejar pasar únicamente la fluorescencia emitida por los tintes. Las dos bandas de paso del filtro son 585 ± 20 nm (Ca_iT) y >700 nm (V_m) (Figura 9B).

E. Fotodetector CCD y sincronismo con los LEDs.

Las películas de fluorescencia fueron adquiridas con una cámara CCD digital de 12 bits, modelo DALSA CA-D1-0128T (Teledyne DALSA, Waterloo, ON, Canadá), que tiene una resolución de 128x128 píxeles cuadrados con un tamaño de 16 μ m de lado cada píxel. Las grabaciones se realizaron en modo binning 2x2, que combina 4 píxeles para conseguir incrementar la sensibilidad (más brillo por píxel) a cambio de reducir la resolución a 64x64 píxeles. Esta característica es esencial dados los bajos niveles de fluorescencia relativa ($\Delta F/F$) emitidos por los tintes. La cámara se conectó a una tarjeta de adquisición de datos PCI Road Runner (BitFlow, Inc., Woburn, USA), cuyo motor de acceso directo a memoria (DMA) transfiere los datos directamente a la memoria del sistema y cuyo puerto digital permite aceptar datos de hasta 32 bits, aunque sólo 12 fueron necesarios en este caso pues son los que proporciona nuestra cámara CCD.

Finalmente, uno de los componentes clave en nuestro sistema fue la construcción de un conmutador que permitió la activación de los LEDs rojos (excitación de tinte de V_m) sólo en los frames impares y la activación de los LEDs verdes (excitación del tinte de Ca_iT) sólo en los frames pares. El conmutador se implementó con un microcontrolador (Microchip 12F510). Dicho microcontrolador tiene como entradas la señal proveniente de la cámara que indica la obtención de un *valid frame*, la señal de *trigger* de la cámara y una alimentación de +5Vdc, conectadas mediante un cable plano. La salida consiste en dos señales TTL (a través de transistores 2N7000) invertidas una respecto a la otra, cuyos flancos de subida se utilizan para actuar como señal externa de conmutación de los LEDs. Dichas salidas están unidas a unos conectores BNC para poder conectarlas mediante cables BNC a las fuentes de los LEDs (Figura 10).

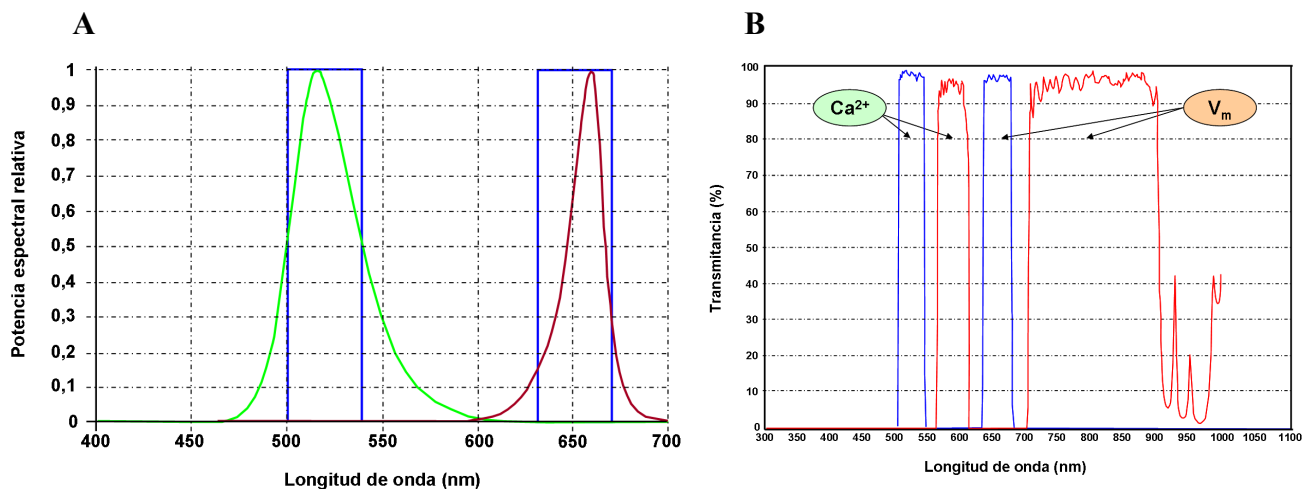


Figura 9. A: Potencia espectral relativa vs. Longitud de onda (nm) ($T_c = 25$ °C) de los emisores LED verdes y los emisores LED rojos junto a sus respectivos filtros ópticos de excitación ideales (azul). B: Espectro de transmisión (Transmitancia vs. Longitud de onda) de los filtros ópticos de excitación (azul) y del filtro óptico de emisión multibanda (rojo).

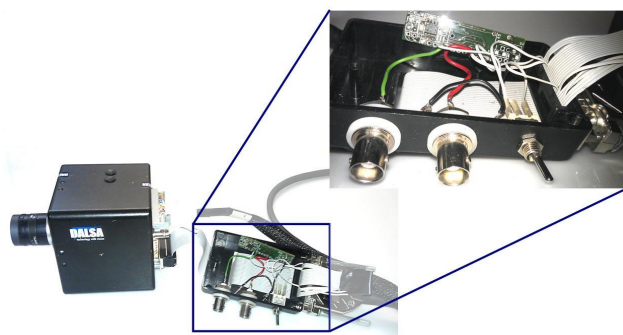


Figura 10. Cámara DALSA conectada al conmutador de LED diseñado a medida. El interruptor permite elegir si se desea que los LEDs conmuten con la señal de *trigger* de la cámara, o con la señal de *valid frame*.

Así, en el presente proyecto se ha diseñado y desarrollado un sistema de CO cardíaco basado en iluminación LED a dos longitudes de onda diferentes (dos emisores LED por cada longitud de onda), utilizando un único fotodetector (cámara CCD). En la [Figura 11](#) se muestra un esquema representativo de dicho sistema.

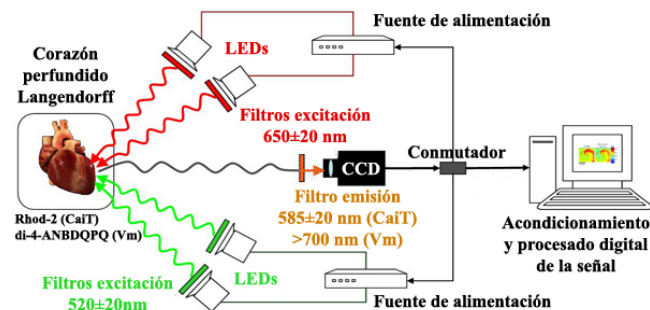


Figura 11. Esquema representativo de nuestro sistema de cartografiado óptico cardíaco. Consta de 4 emisores LED (2 verdes y 2 rojos profundos) de 10 W cada uno. A cada par de emisores LED se les suministra la corriente mediante una fuente de alimentación específicamente diseñada para ello con capacidad de realimentación para ajuste automático de los niveles de corriente. El dispositivo de adquisición de imágenes utilizado es una cámara CCD de 12 bits que se sincroniza frame a frame con los LEDs mediante un conmutador a medida. Para la excitación del Rhod-2 se acoplan a los LEDs unos filtros de excitación en el rango 520±20 nm y para la excitación del Di-4-ANBDQPQ en el rango 650±20 nm. Para el registro de la fluorescencia emitida por el corazón se acopla a la lente de la cámara un filtro multibanda (585±20 nm y >700 nm).

F. Desarrollo del software.

La implementación del software se realizó con MATLAB® 2011b (versión 7.13). Se eligió dicho entorno de programación por su amplio soporte matemático, la incorporación de rutinas ya desarrolladas, la integración con dispositivos hardware, la facilidad de uso y la capacidad de funcionar en varios sistemas operativos (MS-Windows, Linux y Mac OS X). Para conseguir adquirir imágenes y videos de la cámara y de la tarjeta de adquisición fue necesario instalar el paquete de herramientas Image Acquisition Toolbox y el adaptador de MATLAB® para la cámara DALSA, permitiendo detectar el hardware automáticamente y configurar sus propiedades.

G. Análisis del nivel de fluorescencia de los tintes.

En el presente estudio se analizó la calidad de las señales registradas con las diferentes combinaciones de parámetros posibles (solución de perfusión, dosis de tinte y tasa de adquisición de imágenes). Como medida de calidad de las películas se calculó la fluorescencia relativa [5], $\Delta F/F$, en 16 píxeles uniformemente distribuidos en la imagen a modo de retícula 4x4 como se muestra en la [Figura 12](#). Como se observa, se evitaron las zonas de los bordes por no tener habitualmente niveles de iluminación óptimos.

En cada uno de los 16 píxeles de cada película, la fluorescencia relativa se obtuvo como:

$$\Delta F/F(i, j) = \frac{F_{\max}(i, j) - F_{\min}(i, j)}{F_{\text{media}}(i, j)}$$

obteniendo posteriormente su valor medio y su desviación estándar, supuestas distribuciones gaussianas de los datos.

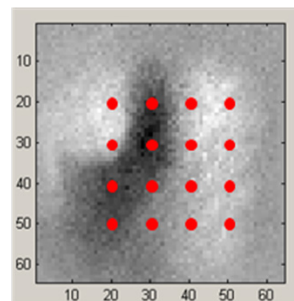


Figura 12. Distribución de los píxeles analizados (puntos rojos) en las películas de cartografiado óptico.

H. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos realizados se han llevado a cabo mediante el software IBM® SPSS® Statistics 19. La verificación de la hipótesis de normalidad en las muestras se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En las películas de V_m se comprobó si existían diferencias significativas de la fluorescencia relativa ($\Delta F/F$) entre películas registradas con diferentes tasas de muestreo (con el nivel de iluminación óptimo para cada una de ellas) utilizando perfusión de Tyrode (transparente) mediante un One-Way ANOVA. En las películas de Ca_T se comprobó el efecto de los diferentes factores (tasa de muestreo, dosis del tinte y solución de perfusión: Tyrode/sangre) en $\Delta F/F$, mediante un Three-Way ANOVA. Los resultados son expuestos en la sección III.C y se recogen en la [Tabla I](#) y [Figura 19](#), presentándose los datos como media ± desviación típica. Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

III. RESULTADOS

A. Estructura del software y GUI.

El software se divide en dos grandes bloques: 1) adquisición de datos y 2) acondicionamiento de los mismos. Dichos bloques permiten manejar el software con facilidad gracias a una interfaz gráfica de usuario.

El bloque de adquisición de datos está implementado en la función de Matlab *Optical Mapping()*. Al ser ejecutada aparece la pantalla principal que se muestra en la [Figura 13](#). La pantalla se divide en 4 paneles distintos, dependiendo de la funcionalidad.

El panel principal es el de “*Video*”, donde se visualizan las imágenes que captura la cámara. A la derecha tenemos el panel “*Image Adjustment*”, el cual permite ajustar la tasa de muestreo y hacer una previsualización de la imagen adquirida con el nivel de zoom adecuado, para poder elegir adecuadamente la zona a grabar, comprobar si la iluminación es adecuada y enfocar la lente. Una vez ajustados todos los parámetros de la imagen, se puede comenzar la adquisición del video. Para ello se utiliza el panel “*Acquisition*” en el cual hay que indicar el nombre del archivo (al cual se le añade un número de secuencia automáticamente), el formato del video (*.var o *.mat), el directorio donde se va a guardar y el tiempo de grabación (duración de la película). Por último, el panel “*View Video*” nos dará acceso al bloque de acondicionamiento de los datos adquiridos.

Al pulsar el botón *View Video* se ejecuta la función de Matlab *View_Video()*, donde está implementado el bloque de acondicionamiento de los datos adquiridos. Esta función genera una interfaz gráfica de usuario cuya ventana principal se muestra en la [Figura 14](#). Esta pantalla se divide en tres paneles, siendo el principal el de “*Video*” donde se visualiza la película de CO.

Para empezar el acondicionamiento de los datos, hay que dirigirse al panel de “*Control Video*”, desde el cual podemos importar una película que tenga un formato *.var o *.mat pulsando al botón Load File. Cuando la película esté cargada podemos reproducir y parar el video (PLAY, STOP), hacer que se vea más lento aplicándole un factor de ralentización (Slow factor) y ajustar el zoom (ZOOM IN/OUT). Además de todas estas opciones típicas de un reproductor, en el panel “*Functions*” se recogen una serie de funciones específicas para el acondicionamiento de películas de CO cardíaco. El primer botón *View Signals* permite seleccionar un píxel de la imagen y representar el nivel de fluorescencia recogido en dicho píxel frente al tiempo. Bajo dicho botón se encuentra el subpanel “*Frames to work*”, desde el cual podemos recortar la película de CO al intervalo de frames que nos interese procesar. El siguiente subpanel, “*Time-Space Filters*”, es de gran importancia para acondicionar las películas, ya que posibilita el filtrado temporal y/o espacial de las películas adquiridas. Es posible seleccionar el tamaño de ventana para filtrar especificándolo en las casillas de Kernel. Además es

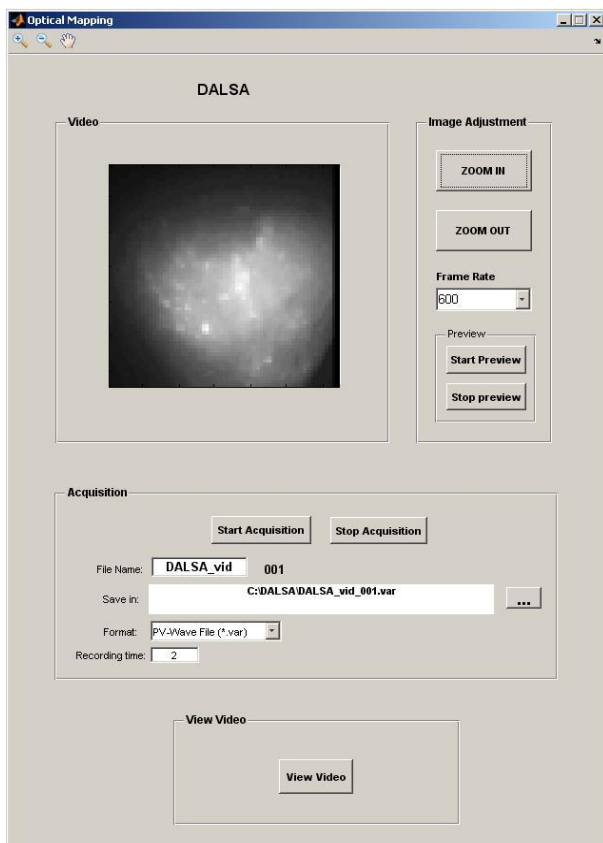


Figura 13. Interfaz gráfica para la adquisición de los registros ópticos.

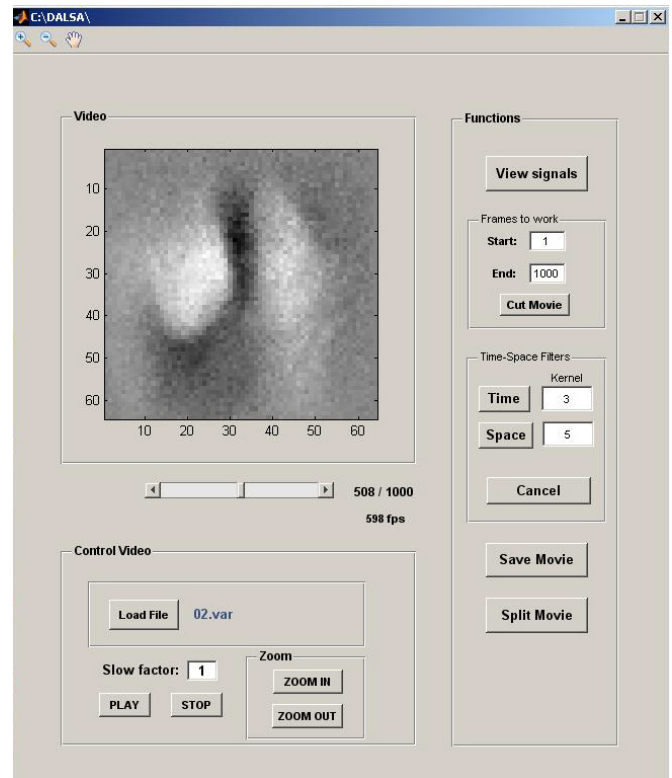


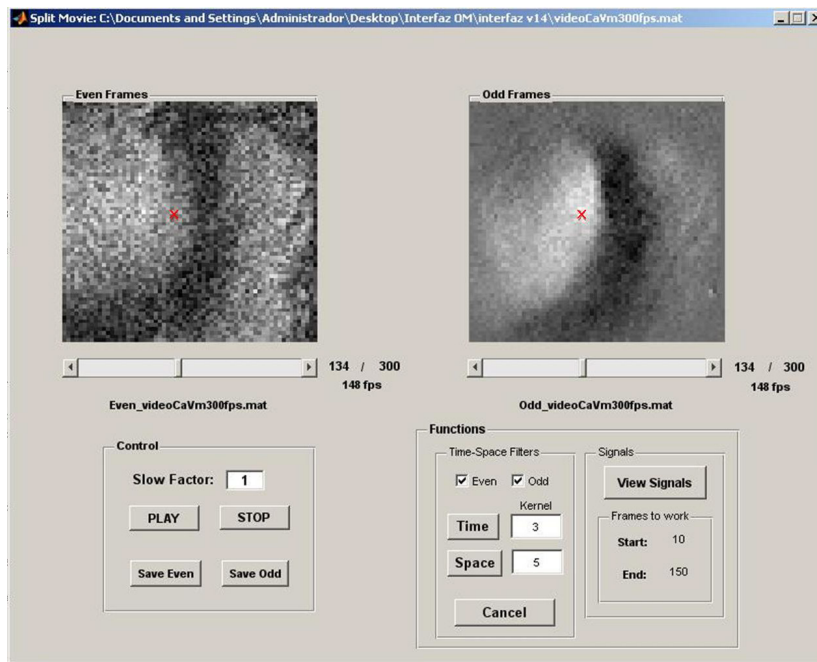
Figura 14. Interfaz gráfica para el acondicionamiento y visualización de los registros obtenidos.

posible eliminar los filtrados realizados pulsando el botón *Cancel*. Una vez aplicados los filtrados oportunos, podemos guardar la película de CO con el nombre de fichero que deseemos y en diferentes formatos (*.var, *.mat y *.avi) pulsando el botón *Save Movie*.

Finalmente, el botón *Split Movie* ejecuta la función *Split Movie()* donde está implementado un sub-bloque de acondicionamiento de los datos. Este sub-bloque sólo se utilizará si se han adquirido V_m y Ca_iT simultáneamente. Permite demultiplexar la película adquirida en dos películas independientes para analizar los dos parámetros registrados por separado (en nuestro caso los V_m y Ca_iT). La pantalla principal de este sub-bloque se muestra en la **Figura 15A**, en la que se pueden diferenciar cuatro paneles distintos. En los paneles “*Even frames*” y “*Odd Frames*” se muestran las películas con las imágenes pares y con las imágenes impares respectivamente, por lo que cada una de las películas demultiplexadas corresponderá a los niveles de fluorescencia recogidos de los V_m y de los Ca_iT .

Desde el panel “*Control*” es posible iniciar la reproducción de las dos películas simultáneamente (botón *PLAY*), parar la reproducción (botón *STOP*) y añadir un factor de enlentecimiento (*Slow Factor*). Además, se puede guardar cada película de forma independiente, eligiendo el nombre y el formato (*.var, *.mat y *.avi) que deseemos (botones *Save Even* y *Save Odd*). Desde el panel “*Functions*” se pueden realizar filtrados espaciales y/o temporales a cada película por separado (según la selección que hagamos en las casillas *Even* y *Odd*). Esta posibilidad de realizar filtrados independientes es realmente interesante ya que las películas de Ca_iT normalmente requieren aplicar filtros más agresivos que las películas de V_m debido a los extremadamente bajos niveles de fluorescencia que se obtienen en las primeras (**Figura 15B**). Pulsando el botón *Cancel* se eliminan todos los filtrados aplicados. Finalmente y como se muestra en la **Figura 15B**, si se pulsa el botón *View Signals* es posible visualizar la señal en cada píxel, mostrándose tres gráficas distintas: Ca_iT , V_m y las dos superpuestas, permitiendo evaluar variables interesantes como el tiempo entre máxima pendiente de subida de las mismas, que da una idea del retardo de la dinámica del calcio respecto a la de los potenciales de acción.

A



B

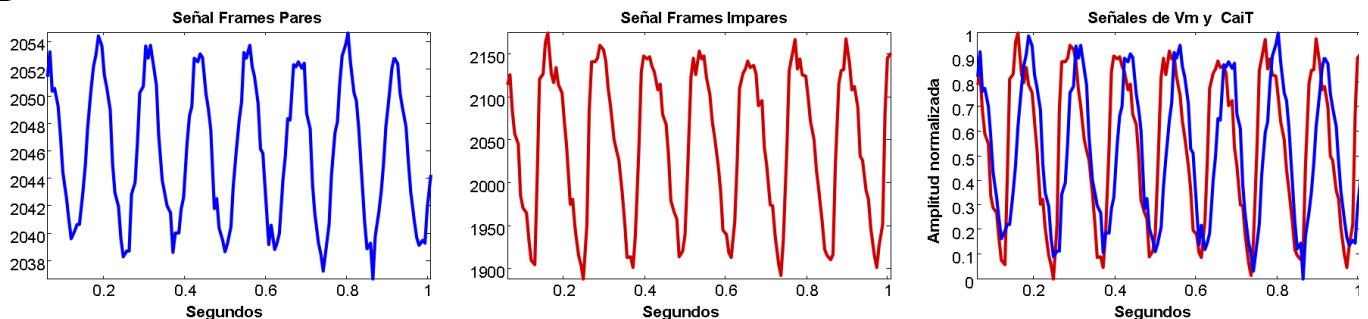


Figura 15. A: Interfaz gráfica del módulo de *Split Movie*. La ‘x’ roja indica el píxel de la película que ha sido seleccionado para la visualización de su nivel fluorescencia. **B:** Figuras que aparecen tras pulsar el botón *View Signals* de la interfaz gráfica de *Split Movie*. En la gráfica de la izquierda se representa la señal de los frames pares, en la del medio se representa la señal de los frames impares y en la de la derecha se representan las dos señales simultáneamente con la amplitud normalizada. La señal azul corresponde a los Ca_iT y la señal roja a los V_m .

B. Procesado digital de las películas.

El filtrado temporal y espacial se implementaron según describen Mironov et al [20]. El efecto de este tipo de filtrados en cuanto a mejora de la SNR y la distorsión que producen ya ha sido estudiado anteriormente [20], por lo que este trabajo no pretende llevar a cabo un análisis similar, sino solamente a nivel descriptivo.

1) Filtrado espacial.

Los coeficientes del filtrado espacial se implementaron utilizando una ventana triangular (Bartlett). El peso es máximo en el píxel central, y decrece linealmente hacia los bordes de la máscara de convolución, es decir:

$$w(i, j) = 1 - \sqrt{\frac{k^2 + l^2}{m^2}} \quad \text{para } k^2 + l^2 < m^2 \text{ y } 0 \text{ el resto}$$

Donde m es el tamaño de la máscara de convolución en píxeles y $-m/2 < k, l < m/2$.

La Figura 16 muestra el efecto de utilizar diferentes tamaños de kernel, pudiendo observarse como aumenta la distorsión a medida que la máscara de convolución va aumentando.

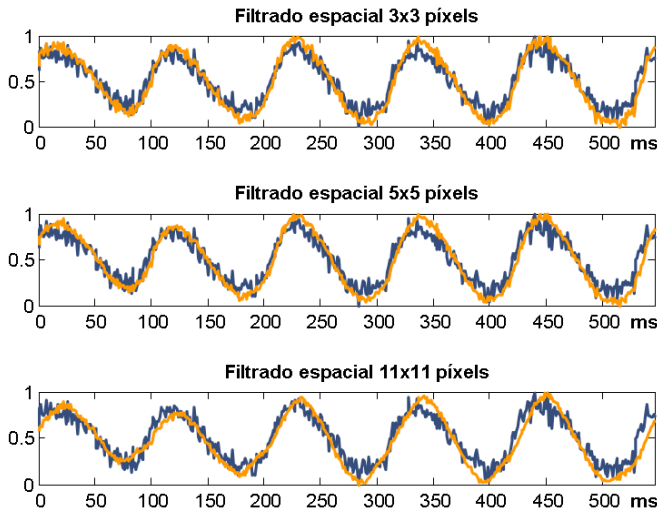


Figura 16. Señal de V_m registrada a 900 fps con perfusión de Tyrode. Las gráficas representan la fluorescencia normalizada frente el tiempo (ms). La señal original está representada en azul, las señales naranjas representan la señal filtrada espacialmente, aplicando diferentes tamaños de kernel espacial (3, 5 y 11 píxeles).

2) Filtrado temporal.

El filtrado temporal se implementó utilizando una ventana triangular similar a la del filtrado espacial pero con una única dimensión (tiempo). En la se muestran su efecto sobre la señal tras realizar un filtrado temporal con distintos tamaños de ventana (3, 5 y 11 frames). Como se puede observar, a tamaños de kernel más pequeños más se ajusta la morfología de la señal filtrada a la original. En cambio, al aumentar el

tamaño del kernel se reduce el ruido de alta frecuencia pero se distorsiona la señal, de manera similar a como pasaba con el filtrado espacial.

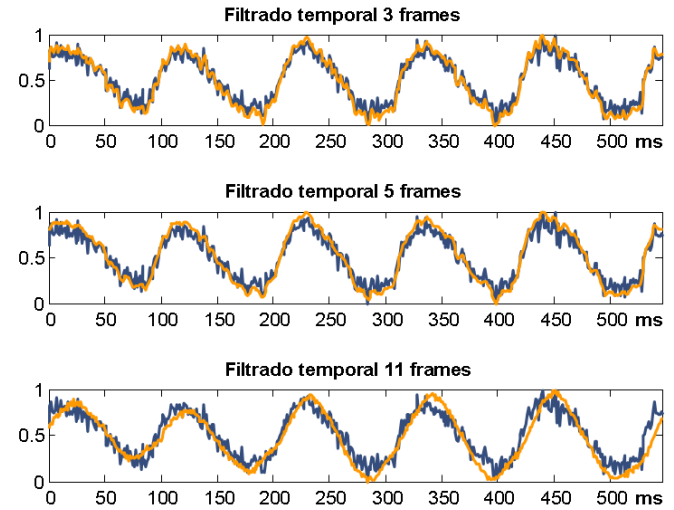


Figura 17. Señal de V_m registrada a 900 fps con perfusión de Tyrode. Las gráficas representan la fluorescencia normalizada frente al tiempo (ms). La señal original está representada en azul y las señales naranjas representan la señal filtrada temporalmente con diferentes tamaños de kernel (3, 5 y 11 frames).

Como se puede observar en la Figura 17 (gráfica superior), tras aplicar un filtrado combinado (espacial de 5x5 píxeles y temporal de 3 frames) obtenemos una señal de alta calidad, eliminando el ruido y preservando la fase 0 de los potenciales de acción. En la Figura 17 (gráfica inferior) se muestra la señal tras realizar un filtrado más agresivo, combinando un filtro espacial de 11x11 píxeles y un filtro temporal de 11 frames. La señal resultante tras aplicar dicho filtrado queda libre de ruido pero se aprecia cierta distorsión morfológica frente a la señal original lo que podría introducir una distorsión importante por ejemplo en la medición de tiempos de activación o duración del potencial de acción.

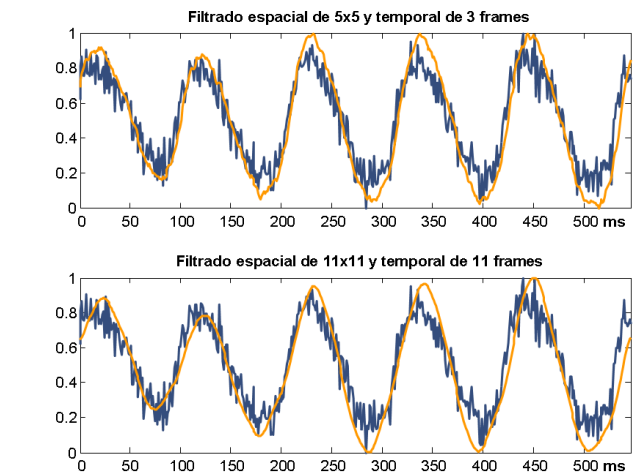


Figura 18. Señal de V_m registrada a 900 fps con perfusión de Tyrode. Las gráficas representan la fluorescencia normalizada frente al tiempo (ms). Las señales azules representan la señal original mientras que las naranjas representan las señales filtradas (Espacial 5x5 + Temporal 3 y Espacial 11x11 + Temporal 11).

C. Niveles de fluorescencia relativa obtenidos con el sistema.

La metodología utilizada se ha expuesto anteriormente (apartado G de la sección II). Las películas de V_m obtenidas a diferentes tasas de muestreo no presentaron diferencias significativas en los niveles de fluorescencia relativa (one-way ANOVA, $P = 0,811$) utilizando la misma dosis de tinte y con el mismo tipo de perfusión (Tyrode, transparente). De hecho, los niveles de $\Delta F/F$ obtenidos en las películas de V_m a diferentes tasas de adquisición fueron buenos y prácticamente iguales como se observa en la [Tabla I](#). Esto es debido a que al aumentar el número de imágenes por segundo adquiridas, se aumentó simultáneamente la potencia suministrada por los LEDs para compensar la disminución del tiempo de exposición. Incluso a la tasa de adquisición más alta permitida por la cámara (900 fps) los LEDs sólo necesitaron suministrar 6W de los 20W que eran capaces de proporcionar.

Esto indica que el nuevo tinte de potencial de membrana utilizado en este trabajo ofrece niveles de fluorescencia relativa óptimos incluso con bajos niveles de iluminación y a altas tasas de adquisición. Es obvio que si se hubiera mantenido la luz de excitación a un nivel constante, $\Delta F/F$ hubiera disminuido al aumentar la tasa de adquisición como consecuencia de la disminución de los tiempos de adquisición por frame.

Tabla I. Efecto de la tasa de adquisición de imágenes sobre la fluorescencia relativa ($\Delta F/F$) del tinte sensible a la señal V_m (di-4-ANBDQPO).

Tasa de adquisición (fps)	Potencia (W)	Fluorescencia Relativa (%)
300	< 5	$7,35 \pm 2,37$
600	< 5	$7,59 \pm 2,37$
900	6	$6,99 \pm 3,10$

Todas las películas fueron adquiridas con perfusión de Tyrode y la misma dosis de tinte. Los valores vienen dados como media \pm desviación típica (%). El efecto de la tasa de adquisición no fue significativo ($P = 0,811$)

En el caso de las mediciones de la fluorescencia relativa del tinte de Ca_iT , fue necesario suministrar la potencia máxima de los LEDs verdes de excitación (20 W), a pesar de lo cual los niveles obtenidos se quedaron lejos de ser óptimos. Se comprobó el efecto de los diferentes factores (tasa de adquisición de imágenes, dosis del tinte y solución de perfusión). Los valores de fluorescencia relativa obtenidos se muestran en la [Figura 19](#). El efecto de los 3 factores fue altamente significativo (3-way ANOVA). Así, el uso de perfusión con sangre en lugar de Tyrode y el aumento de la tasa de adquisición, disminuyeron significativamente $\Delta F/F$ (ambos $P < 0,0001$), mientras que el aumento de dosis de Rhod-2 de 2 mg a 4 mg, la aumentó significativamente ($P < 0,0001$).

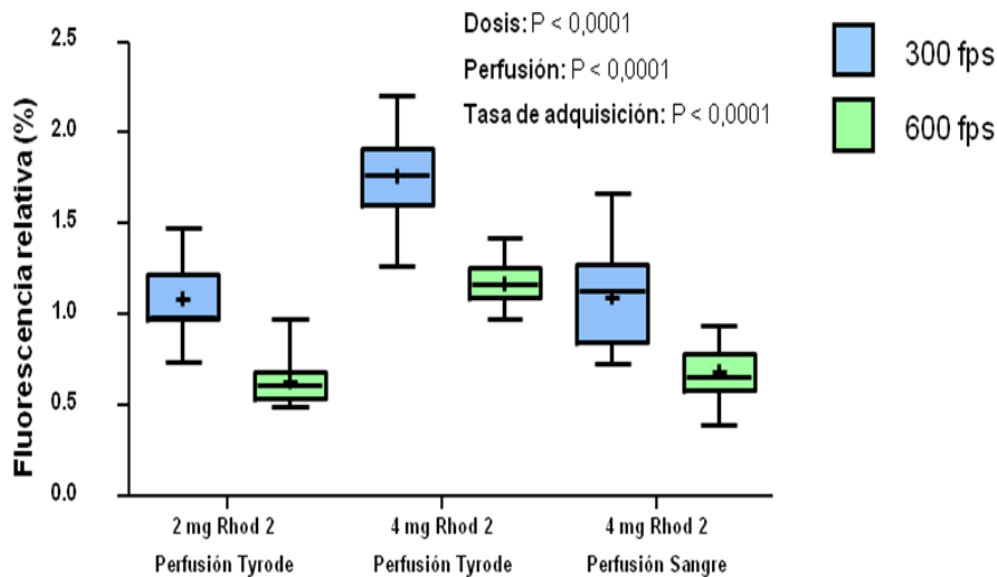


Figura 19. Efecto de la dosis (2 mg vs 4 mg), tasa de adquisición (300 fps vs 600 fps) y solución de perfusión (Tyrode vs sangre) sobre la fluorescencia relativa del tinte sensible a la señal Ca_iT (Rhod-2). Los tres parámetros mostraron tener una influencia altamente significativa ($P < 0,0001$)

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los sistemas clásicos de CO cardíaco permiten el registro individual de V_m o Ca_iT con un único fotodetector, o su registro simultáneo con dos fotodetectores y un complejo sistema óptico auxiliar. El presente trabajo demuestra la viabilidad de un sistema de CO en corazón grande, para el registro simultáneo de V_m y Ca_iT con una única cámara CCD, iluminación LED y un sistema de conmutación a medida.

El sistema puede ser utilizado con solución de perfusión Tyrode para obtener señales de alta calidad, pero con el inconveniente de la edematización de la pieza. Puesto que se utiliza para V_m un tinte que emite en el infrarrojo cercano (menos atenuado ópticamente por la hemoglobina), el sistema permite trabajar con perfusión de sangre en lugar de Tyrode, limitando significativamente la edematización. Sin embargo, los bajos niveles de señal de Ca_iT obtenidos con sangre suponen un claro inconveniente. A la espera del desarrollo de tintes sensibles al Ca^{2+} intracelular con longitudes de onda de excitación y emisión más desplazadas hacia el infrarrojo, la utilización de mayores potencias LED para excitar el Rhod-2 y el uso de una cámara con mayor sensibilidad mejorarían las prestaciones del sistema de manera importante.

A. Utilidad del sistema y del software implementado.

Hasta ahora, en el Hospital Clínico San Carlos se utilizaban dos aplicaciones separadas para la adquisición y el condicionamiento de las películas de CO cardíaco (Road Runner 400 y Scroll respectivamente, del Dr. Sergey Mironov). En el presente proyecto se ha implementado mediante MATLAB® una única aplicación conjunta que permite la adquisición y el análisis de las películas, además de la demultiplexación de las mismas en el caso del registro de dos parámetros (V_m y Ca_iT en nuestro sistema). Gracias al extendido uso de MATLAB® y a la posibilidad de incorporar nuevas funciones y bibliotecas, se pueden integrar más módulos independientes fácilmente en nuestra aplicación para análisis de los registros obtenidos. Por ejemplo, detección de puntos singulares y películas de fase, representación de mapas de frecuencia dominante e índice de regularidad para análisis de ritmos fibrilatorios, y obtención de mapas de isócronas y de velocidad de propagación del frente de onda, así como mapas de duración del potencial de acción y refractariedad para análisis de ritmos estimulados o espontáneos no fibrilatorios. Muchos de ellos ya han sido previamente desarrollados por nuestro grupo [16;21] y en un futuro próximo serán integrados con la herramienta aquí descrita para conseguir una funcionalidad total en cuanto a 1) adquisición, 2) acondicionamiento y 3) análisis de las señales registradas.

B. Elección de los tintes.

Existen una gran variedad de tintes fotosensibles, cuyas moléculas están compuestas por un cromóforo que se adhiere a

la membrana de las células y desprende fotones cuando se produce un cambio en la célula (por ejemplo, un cambio en el potencial de membrana o en la concentración de calcio intracelular) mientras que es excitada con una determinada luz.

Como se ha visto, típicamente el más utilizado para V_m ha sido el di-4-ANEPPS, que ha sido utilizado con éxito para CO tanto en células cardíacas como en tejidos con Tyrode (solución transparente), pero su utilidad se ha visto limitada para la perfusión con sangre debido a la dispersión de la luz y a la alta absorción de los cromóforos y de la hemoglobina con longitudes de onda de excitación onda verdes [5]. Se ha probado que la utilización de longitudes de onda largas (cercasas al infrarrojo) tanto para emisión como excitación, puede minimizar este problema, permitiendo la perfusión con sangre e incluso mejorando el registro de capas profundas del tejido. Entre estos tipos de tintes se encuentran los tintes sintetizados y caracterizados en el laboratorio del Dr. Salama [21], los llamados Pittsburgh I-VIII, y más recientemente los tintes di-4-ANBDQPQ y di-4-ANBDQBS. Además, son compatibles con otros tintes y se obtiene una mejor calidad de señal en comparación con el di-4-ANEPPS cuando se utilizan tanto con Tyrode como con sangre [10]. Tienen la ventaja añadida de que el decaimiento de la señal emitida debido a la internalización del tinte es de 5 a 7 veces más lento que en el caso del di-4-ANEPPS [5].

La utilización de este tinte es de gran importancia para nuestro sistema de CO de corazones de cerdo perfundidos con sangre debido a que las longitudes de onda de emisión y excitación se encuentran en el infrarrojo cercano, permitiendo así el registro simultáneo de los potenciales transmembrana (di-4-ANBDQPQ) y transitorios de calcio (Rhod-2). Esto es posible ya que los dos tintes emiten en rangos de longitudes de onda diferentes, por lo que acoplado un filtro óptico multibanda en la lente de la cámara CCD se pueden registrar las dos señales “simultáneamente” cuando excitamos con luz LED, alternando entre 532 nm (verde, para el Rhod-2) y 650 nm (rojo profundo, para el di-4-ANBDQPQ). Esta combinación de tinte es ideal, puesto que el di-4-ANBDQPQ tiene su punto isobéptico en el verde (longitud de onda de excitación a la cual un cambio producido en el potencial transmembrana no produce ni una disminución ni un aumento de la intensidad de emisión), y por lo tanto no se registra señal de voltaje cuando se ilumina con luz verde, que es la que se utiliza para excitar el Rhod-2 [22].

C. Acondicionamiento de la señal. Filtrado.

El ruido es uno de los grandes enemigos de los registros de CO debido a los bajos niveles de fluorescencia relativa obtenidos habitualmente. Es por ello, que se hace especialmente importante el filtrado de las señales registradas.

En cuanto al filtrado espacial, fundamentalmente elimina el ruido asíncrono producido por el dispositivo de adquisición. Según Mironov et al. [20], un tamaño de kernel espacial de 5 es suficiente para obtener una SNR óptima con una mínima distorsión. Así, en la [Figura 16](#) se puede observar como al

aumentar el tamaño del kernel mejora la SNR, pero aumenta la distorsión, añadiendo un ligero desfase en el dominio del tiempo debido a la ponderación de los tiempos de activación de una zona del tejido más amplia.

El filtrado temporal elimina, entre otros, el ruido sincrónico producido por el sistema de iluminación. Este ruido es uniforme en un frame, pero varía de frame a frame debido a las fluctuaciones del sistema de iluminación [20], aunque este ruido se ha minimizado con las nuevas tecnologías de iluminación LED y láser de alta estabilidad. Para filtrados temporales el tamaño del kernel no debería ser mayor de 6 frames para preservar las frecuencias menores de 130 Hz (dónde se encuentra el espectro de la señal útil). En la práctica, en nuestro laboratorio se suelen utilizar kernel de 3 frames o 5 si la señal es muy ruidosa. Otras aproximaciones como el filtrado de mediana pueden ser de utilidad en ciertas situaciones.

Así, el acondicionamiento de las señales registradas mediante una combinación de filtros espaciales y temporales es la opción adecuada a la hora de analizar las películas de CO cardíaco. Además puesto que las señales de calcio son más ruidosas que las de potencial de membrana debido a su menor fluorescencia relativa, nuestro sistema permite filtrar de manera individual ambas señales, pudiendo aplicar a cada una de ellas el filtrado que se estime más oportuno.

D. Niveles de fluorescencia obtenidos.

Como se observa en la [Figura 15B](#), en la [Tabla I](#) y [Figura 19](#), los niveles de fluorescencia relativa en las películas de Ca_iT son sustancialmente más bajos que en las películas de V_m . De hecho las películas de V_m se pudieron adquirir con sus LEDs de excitación (rojo profundo) muy lejos de proporcionar su potencia máxima (6W frente a los 20W máximos). Esto no fue así para las señales de Ca_iT para las que a pesar de iluminar con la potencia máxima disponible de los LEDs verdes (20W), no mostraron niveles de fluorescencia relativa que pudieran considerarse como buenos. Este hecho indica que la utilización de una cámara con mayor sensibilidad y eficiencia cuántica que la nuestra sería de interés para trabajar con las señales de Ca_iT con Tyrode y especialmente con sangre, donde los niveles de fluorescencia obtenidos son mínimos debido a la opacidad de la hemoglobina a las longitudes de onda utilizadas para excitación y emisión del Rhod-2. Además, con la utilización de una cámara con mejores prestaciones se haría posible el registro de las señales de baja amplitud, como por ejemplo las observadas en condiciones de estrés metabólico (por ejemplo fibrilación ventricular de larga duración con perfusión parada) o las observadas en la aurícula debido al bajo grosor de las paredes de la misma. Actualmente existen diversas compañías (iXon, Photometrics, SciMedia, etc.) que ofrecen cámaras CCD con resoluciones similares a la DALSA pero con tamaños de píxeles mayores, mayores sensibilidades y eficiencias cuánticas, y sobre todo mucho mejor comportamiento frente al ruido, ya que llevan incorporados sistemas de refrigeración que disminuyen la temperatura interna del dispositivo a $-100\text{ }^\circ\text{C}$.

E. Limitaciones.

Aunque existen aproximaciones para obtener sistemas de CO panorámicos incluso en corazones grandes [23], nuestro sistema no está preparado para ello debido a la alta complejidad que conllevaría un sistema de este tipo que además permitiera registrar múltiples parámetros simultáneos. Por otra parte, las señales de V_m y Ca_iT registradas con Tyrode no son realmente simultáneas, ya que se adquieren en frames alternos. Sin embargo, trabajando con tasas de adquisición adecuadas esto no es un problema importante, ya que la interpolación entre muestras consecutivas será lo suficientemente robusta para que no se pierda información electrofisiológica de importancia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Julián Pérez Villacastín y a todos los integrantes de la Unidad de Arritmias del Hospital Clínico San Carlos su apoyo y cariño constantes. Al Dr. Javier Moreno por depositar su confianza en mí para la ejecución de este proyecto y contribuir a mi formación en el ámbito de la electrofisiología. A mi tutor y compañero Jorge G. Quintanilla, por su persistente guía tanto en el trabajo de la unidad como en la realización de este proyecto, motivando mi afán de superación cada día. Al Dr. Felipe Alonso Atienza y al Dr. José Luis Rojo por su continuo interés y ayuda en el proyecto, así como por concederme la oportunidad de la realización del mismo en el Hospital Clínico San Carlos. A toda mi familia y amigos por su comprensión, cariño y apoyo.

REFERENCIAS

- [1] J. Jalife, "And the beat goes on ... the beat goes on: organization and quasi-periodicity in ventricular fibrillation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, no. 3, pp. 375-377, Aug.2013.
- [2] I. R. Efimov, V. P. Nikolski, and G. Salama, "Optical imaging of the heart," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 1, pp. 21-33, July2004.
- [3] M. Warren, J. F. Huizar, A. G. Shvedko, and A. V. Zaitsev, "Spatiotemporal relationship between intracellular Ca^{2+} dynamics and wave fragmentation during ventricular fibrillation in isolated blood-perfused pig hearts," *Circ. Res.*, vol. 101, no. 9, pp. e90-101, Oct.2007.
- [4] P. Lee, C. Bollensdorff, T. A. Quinn, J. P. Wuskell, L. M. Loew, and P. Kohl, "Single-sensor system for spatially resolved, continuous, and multiparametric optical mapping of cardiac tissue," *Heart Rhythm.*, vol. 8, no. 9, pp. 1482-1491, Sept.2011.
- [5] A. Matiukas, B. G. Mitrea, M. Qin, A. M. Pertsov, A. G. Shvedko, M. D. Warren, A. V. Zaitsev, J. P. Wuskell, M. D. Wei, J. Watras, and L. M. Loew,

- "Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium," *Heart Rhythm.*, vol. 4, no. 11, pp. 1441-1451, Nov.2007.
- [6] Jorge G. Quintanilla, "Desarrollo de herramientas de análisis de potenciales cardiacos para investigación básica y clínica en arritmias. Modelado multiescala del corazón y sus aplicaciones en la práctica clínica." 2009.
- [7] P. Schaffer, H. Ahammer, W. Muller, B. Koidl, and H. Windisch, "Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes," *Pflugers Arch.*, vol. 426, no. 6, pp. 548-551, Apr.1994.
- [8] S. Rohr and B. M. Salzberg, "Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale," *Biophys. J.*, vol. 67, no. 3, pp. 1301-1315, Sept.1994.
- [9] S. M. Pogwizd, K. Schlotthauer, L. Li, W. Yuan, and D. M. Bers, "Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness," *Circ. Res.*, vol. 88, no. 11, pp. 1159-1167, June2001.
- [10] T. J. Herron, P. Lee, and J. Jalife, "Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells & tissues," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 4, pp. 609-623, Feb.2012.
- [11] V. G. Fast, "Simultaneous optical imaging of membrane potential and intracellular calcium," *J. Electrocardiol.*, vol. 38, no. 4 Suppl, pp. 107-112, Oct.2005.
- [12] P. J. Del Nido, P. Glynn, P. Buenaventura, G. Salama, and A. P. Koretsky, "Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2," *Am. J. Physiol*, vol. 274, no. 2 Pt 2, p. H728-H741, Feb.1998.
- [13] D. L. Wokosin, C. M. Loughrey, and G. L. Smith, "Characterization of a range of fura dyes with two-photon excitation," *Biophys. J.*, vol. 86, no. 3, pp. 1726-1738, Mar.2004.
- [14] D. F. Albeanu, E. Soucy, T. F. Sato, M. Meister, and V. N. Murthy, "LED arrays as cost effective and efficient light sources for widefield microscopy," *PLoS. One.*, vol. 3, no. 5, p. e2146, 2008.
- [15] Dave Litwiller, "CCD vs. CMOS: Facts and Fiction," 2001.
- [16] J. Moreno, J. G. Quintanilla, A. Lopez-Farre, T. Archondo, R. Cervigon, P. Aragoncillo, E. Usandizaga, J. Silva, C. Rodriguez-Bobada, J. L. Rojo, N. Perez-Castellano, S. Mironov, L. Mont, P. T. Perez de, C. Macaya, and J. Perez-Villacastin, "Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart," *Europace.*, vol. 12, no. 11, pp. 1637-1644, Nov.2010.
- [17] J. G. Quintanilla, J. Moreno, T. Archondo, A. Chin, N. Perez-Castellano, E. Usandizaga, M. J. Garcia-Torrent, R. Molina-Morua, P. Gonzalez, C. Rodriguez-Bobada, C. Macaya, and J. Perez-Villacastin, "K_{ATP} channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, no. 3, pp. 576-585, Aug.2013.
- [18] L. M. Swift, H. Asfour, N. G. Posnack, A. Arutunyan, M. W. Kay, and N. Sarvazyan, "Properties of blebbistatin for cardiac optical mapping and other imaging applications," *Pflugers Arch.*, vol. 464, no. 5, pp. 503-512, Nov.2012.
- [19] D. Lang, M. Sulkin, Q. Lou, and I. R. Efimov, "Optical mapping of action potentials and calcium transients in the mouse heart," *J. Vis. Exp.*, no. 55 2011.
- [20] S. F. Mironov, F. J. Vetter, and A. M. Pertsov, "Fluorescence imaging of cardiac propagation: spectral properties and filtering of optical action potentials," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, vol. 291, no. 1, p. H327-H335, July2006.
- [21] G. Salama, B. R. Choi, G. Azour, M. Lavasani, V. Tumbeev, B. M. Salzberg, M. J. Patrick, L. A. Ernst, and A. S. Waggoner, "Properties of new, long-wavelength, voltage-sensitive dyes in the heart," *J. Membr. Biol.*, vol. 208, no. 2, pp. 125-140, Nov.2005.
- [22] P. Lee, P. Yan, P. Ewart, P. Kohl, L. M. Loew, and C. Bollensdorff, "Simultaneous measurement and modulation of multiple physiological parameters in the isolated heart using optical techniques," *Pflugers Arch.*, vol. 464, no. 4, pp. 403-414, Oct.2012.
- [23] M. W. Kay, P. M. Amison, and J. M. Rogers, "Three-dimensional surface reconstruction and panoramic optical mapping of large hearts," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 7, pp. 1219-1229, July2004.