

DINÁMICA NO LINEAL EN PATRONES DE SPECKLE DURANTE LA TRANSMISIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

NONLINEAR DYNAMICS IN SPECKLE PATTERNS DURING THE TRANSMISSION OF ACTION POTENTIAL

J. J. LLOVERA-GONZÁLEZ^{a†}, A. B. MORENO-YERAS^a, J. B. CRUZ-ARENCIBIA^a, R. L. SERRA-TOLEDO^a, D. SOGA^b Y M. MURAMATSU^b

a) Departamento de Física, Facultad de Ingeniería Eléctrica, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría (Cujae), Cuba; llovera@electrica.cujae.edu.cu †

b) Grupo de Óptica y Sistemas Amorfos, Departamento de Física General, Instituto de Física, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

† autor para correspondencia

Palabras claves: Patrones de speckle (42.30.Ms), procesos estocásticos (02.50.Ey), potencial de acción en axón gigante (87.19.lb), dinámica no lineal (05.45.-a).

Uno de los más trascendentales descubrimientos de la fisiología realizado en la última década de los años 50 del siglo pasado lo fue el mecanismo electroquímico por el cual se genera y transmite el potencial de acción a través de las células del sistema nervioso de los seres vivos [1]. Posteriores investigaciones sugieren que tales procesos biológicos en los que intervienen reacciones químicas y transferencias de iones por difusión activa [2] responden a procesos autocatalíticos estocásticos regidos por una dinámica compleja de carácter no lineal [3].

Diversas técnicas de mediciones ópticas han sido reportadas hasta hoy, algunas basadas en la birrefringencia de la membrana que envuelve a los axones de las células nerviosas [4], [5], [6], [7].

Recientemente los autores han empleado patrones de speckle dinámicos para obtener imágenes de un axón gigante de calamar sometido a impulsos eléctricos de frecuencias variables. Estas imágenes, procesadas digitalmente, revelan algunas características de este fenómeno que no son apreciables por otras técnicas ópticas convencionales [8].

Los resultados obtenidos evidencian el carácter no lineal de este proceso obteniéndose patrones de intensidad temporalmente variable similares a los correspondientes al modelo de Lotka y Volterra para las poblaciones de víctimas y depredadores (ver Ref. [3]).

Sistema experimental: Un láser de He-Ne clase III b ($\lambda = 632$ nm y 15 mW de potencia máxima) se apuntó hacia una lente expansora. El haz expandido y colimado se orientó a un espejo inclinado 45° con la horizontal que lo desvió verticalmente pasando por un polarizador para incidir en una placa difusora de vidrio rugoso produciendo un patrón de speckle. La

muestra, un axón gigante de calamar (*Ioligo saopauliensis*), se montó dentro de una cápsula Petri sumergido en una solución salina de cloruro sódico (300 mM) ubicada sobre la platina de un microscopio óptico (OPTICOM, XSZ-107T) con amplificación 64 X. Para registrar el potencial de acción fueron colocados microelectrodos inertes uno en el interior del axón y el otro en contacto con la disolución. Un generador de señales de pulso cuadrado de frecuencia y amplitud regulables fue conectado al axón y con un osciloscopio se registró la señal excitadora y la señal de respuesta (potencial de acción). Las imágenes se capturaron con una cámara CCD con resolución 1027 x 850 pixel y rapidez de captura de 30 cuadros/s acoplada al microscopio antecedida de otro polarizador y conectada a una computadora.

Los componentes fueron montados en una mesa antivibratoria para estabilizar el patrón. (Ver figuras 1 y 2).

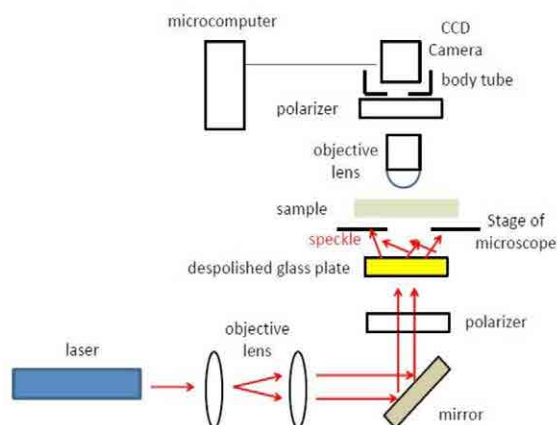


Figura 1: Esquema del sistema experimental para obtener el patrón de speckle.

Se grabaron videos de 500 fotogramas obteniéndose imágenes del patrón de speckle por transmisión a través de la membrana del borde del axón activada durante el proceso de excitación siendo observado con luz polarizada con los polarizadores tanto paralelos como cruzados apreciándose en este caso el carácter birrefringente de dicha membrana lo que se aprecia al comparar las figuras 3 y 4 respectivamente.

Videos obtenidos excitando el axón a diferentes valores de frecuencias fueron analizados eligiéndose uno en el cual la frecuencia fue de 200 kHz.



Figura 2: Montaje del sistema experimental.

Los videos fueron procesados digitalmente para estudiar las fluctuaciones de la intensidad promedio del patrón en el exterior y el interior del axón y en el seno de la membrana neurotransmisora.

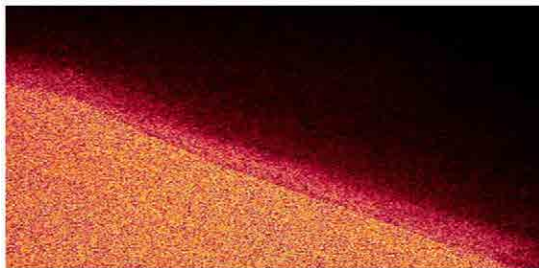


Figura 3: Patrón de speckle del borde de la membrana del axón (polarizadores paralelos).



Figura 4: Patrón de speckle del borde de la membrana del axón (polarizadores cruzados).

Utilizando el programa “Tracker”, versión 4.52 [9] se

obtuvieron registros temporales de variación de la intensidad del patrón en pequeñas regiones (radio 20 pixel) ubicadas perpendicularmente al plano de la membrana en la región sobre la membrana (ver figura 5).

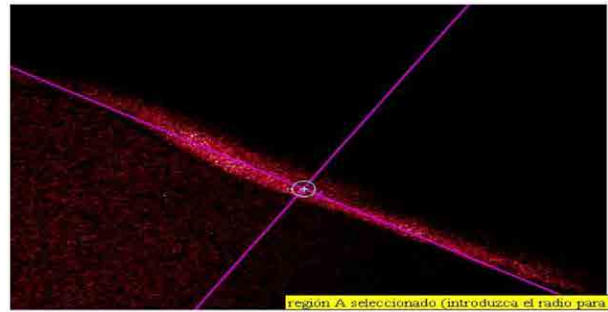


Figura 5: Imagen procesada con Tracker sobre el patrón de speckle de la membrana del axón (polarizadores cruzados).

El patrón de fluctuaciones temporales de la intensidad obtenido acusa variaciones estocásticas similares a las que se generan en los sistemas dinámicos autocatalíticos (ver figura 6).



Figura 6: Patrón de fluctuaciones temporales de la intensidad en el patrón por transmisión.

Comparando las fluctuaciones obtenidas en un punto interior a la membrana con las obtenidas en otro punto inmediato en la región de la solución salina se aprecia cierta correlación de las señales así como un desplazamiento relativo de los máximos y mínimos entre patrones lo cual puede estar relacionado con la difusión activa de iones sodio (Na^+) que penetran a través de la membrana y potasio (K^+) que salen hacia la solución y que son los responsables de la transmisión del potencial de acción (ver Ref [1]) de modo que las concentraciones respectivas cambian con un retraso en el tiempo en una y otra región. Ver figuras 7 a la 9.

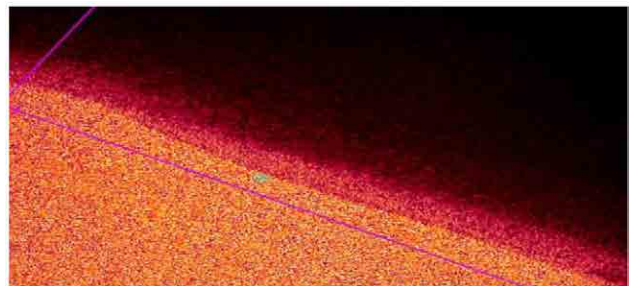


Figura 7: Imagen procesada con Tracker en la solución salina

(polarizadores paralelos).

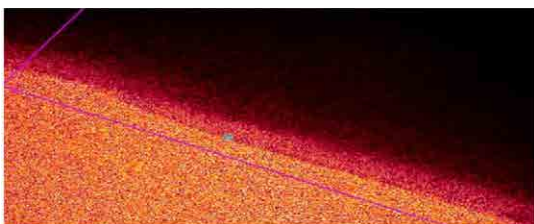


Figura 8: Imagen procesada con Tracke en la membrana neurotransmisora.

Con el objetivo de lograr mayor información de los patrones se aplicaron a los videos otros procesamientos para eliminar la señal del fondo y mejorar el contraste eliminando las componentes verde y azul de la matriz de cada cuadro dado que la luz empleada fue de un laser rojo de modo que las otras componentes solo aportan ruido a la señal.



Figura 9: Fluctuaciones temporales de la intensidad en el patrón por transmisión a través de la solución salina (a) y a través de la membrana neurotransmisora (b).

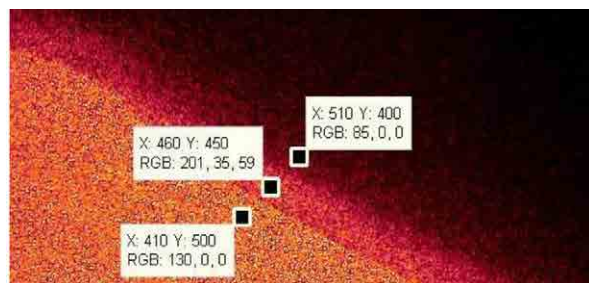


Figura 10: Puntos analizados en el eje transversal a la interfase.

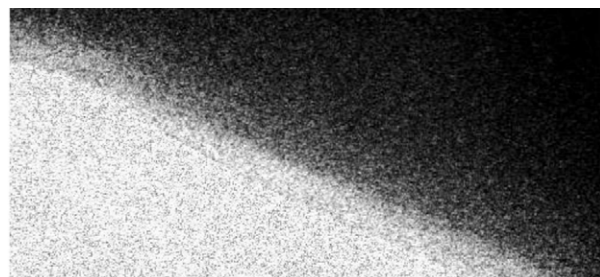


Figura 11: Imagen procesada del plano rojo.

El procesamiento aplicado en este caso utilizando recursos

de MatLab permitió descomponer cada video en todos sus cuadros, procesar cada cuadro y volver a recomponer el video para obtener los patrones de fluctuación temporal de la intensidad deseados. Los resultados de este proceso se muestran a continuación (figuras 10 y 11).

RESULTADOS OBTENIDOS AL ELIMINAR LA SEÑAL DE FONDO

Se apreció saturación de la cámara en región de la imagen y actividad de vibración en la frontera en algunos momentos.

La figura 12 muestra el plano del speckle del fondo que se restó de cada cuadro y la figura 13 muestra los puntos analizados en el video ya reconformado.

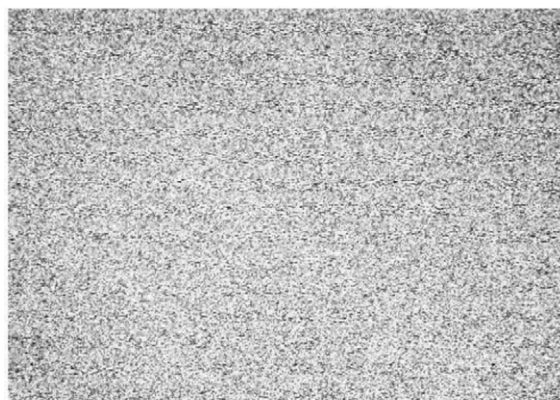


Figura 12: Plano del fondo rojo.

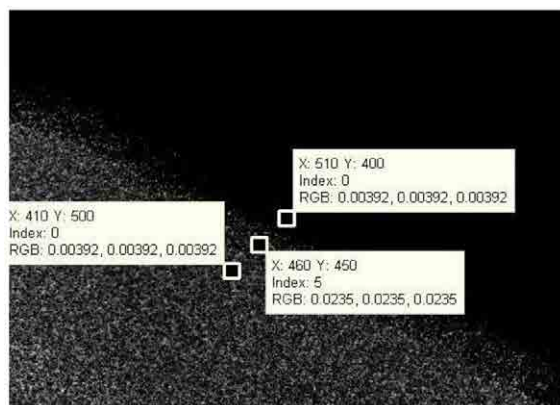


Figura 13: Puntos analizados en el plano rojo sin fondo.

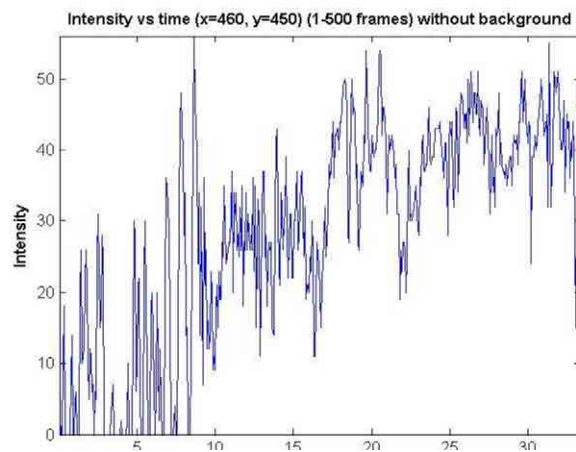


Figura 14: Patrón de fluctuaciones para el punto (460,450) sin fondo.

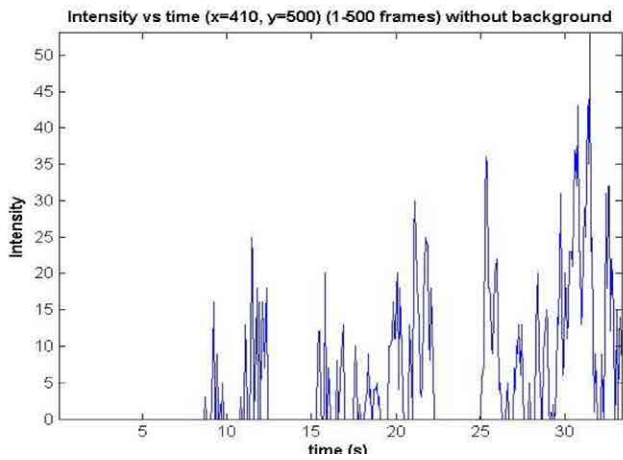


Figura 15: Patrón de fluctuaciones para el punto (410,500) sin fondo.

Para el punto (510, 400) el patrón resultó ser nulo todo el tiempo como era de esperar.

Se revela además el retardo de tiempo de las fluctuaciones en la solución salina respecto a la membrana del axón.

CONCLUSIONES

La técnica del speckle dinámico aplicada al estudio de imágenes microscópicas de la transmisión del potencial de acción en el axón gigante de calamar permite obtener valiosa información sobre la dinámica no lineal de este proceso y evidencia el carácter de proceso autorregulado inherente al mismo.

- [1] Hodgkin, A. and A. Huxley, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," *J. Physiol.* 117, pp. 500-544 (1952).
- [2] Guyton, A. C. and Hall, J. E. "Tratado de Fisiología Médica" Ed. Mc. Graw Hill Interamericana, Pensilvania USA (1996).
- [3] Volkenstein, M. V. "Biofísica" Ed. MIR Moscú, (1985).
- [4] Watanabe, A. Terakawa, S. "Alteration of birefringence signals from squid giant axon by intracellular perfusion with protease solution" *Biochimica et Biophysica Acta*, 436 (1976) p.p.833-842.
- [5] Landowne, D. "Optical studies of sodium channels" *Biophys. J.* © Biophysical Society Vol. 45 January (1984) p.p. 57-59.
- [6] Dombeck, D. A. Blanchard-Desce, M. Webb, W. W. "Optical recording of action potentials with second-harmonic generation microscopy" *The Journal of Neuroscience*, January 28, (2004) 24(4) pp 999-1003 (Brief communication).
- [7] Carter, K. M. George, J. S. Rector, D.M. "Simultaneous birefringence and scattered light measurements reveal anatomical features in isolated crustacean nerve" *Journal of Neuroscience Methods* 135 (2004) pp. 9-16.
- [8] Llovera-González, J. J. et. al. "Dynamical speckles patterns of action potential transmission effects in squid giant axon membrane. A tribute 50 years later to the memory of the Hodgkin and Huxley Nobel Prize" *Proc. of SPIE* Vol. 8785 8785DH-1 (diciembre de 2013).
- [9] Brown, D. (2009): Tracker 2.64. www.cabrillo.edu/~dbrown/tracker (descargado en marzo de 2012) versión libre.