

R. 16.737

TD/439



**“MONITORIZACIÓN DE LA EXOCITOSIS, MEDIANTE
TÉCNICAS FLUORESCENTES EN CÉLULAS CEBADAS”**

Vicente Valero Cumplido

A handwritten signature in black ink, enclosed within a circular scribble. The signature appears to read "Vicente Valero Cumplido".

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la
Universidad de Sevilla

Sevilla, 1998

92116

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda sujeta a la Ley de Enjuicio
al día 92 número 16 del año
8 correspondiente.

Sevilla, 23 OCT. 1998

El Jefe del Negociado de Teoría,

Alvarado

TD

411



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA MÉDICA Y BIOFÍSICA

Avda. Sánchez Pizjúan, 4. 41009 Sevilla. ESPAÑA
Tlfn.: 95 4 55 17 68 y 95 4 55 17 70. FAX: 95 4 55 17 69.

Don Guillermo Alvarez de Toledo Naranjo, Profesor Titular de
Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Don Vicente Valero Cumplido, ha realizado bajo su dirección
el trabajo titulado "Monitorización de la excitosis, mediante técnicas
fluorescentes, en células cebadas", que presenta para optar al grado de
Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.



DPTO. DE FISIOLÓGIA MÉDICA
Y BIOFÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA

Fdo.: Guillermo Alvarez de Toledo Naranjo

Sevilla, a 15 de Octubre de 1998

AGRADECIMIENTOS

Una vez terminada de escribir la tesis doctoral, uno echa la vista atrás y recuerda con cariño todas aquellas personas que la hicieron posible. A todas ellas deseo expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Guillermo Álvarez de Toledo, director de este trabajo, por permitirme formar parte de un grupo de investigación serio y competitivo. Ha sido durante estos años la referencia y el ejemplo. La referencia por su talento científico y por sus amplios conocimientos y capacidad para transmitirlos. El ejemplo por su honestidad, entrega, constancia y entusiasmo.

A Rafael Fernández Chacón, que me dio buenos consejos y palabras de aliento. En mis primeros pasos por el laboratorio fue una excelente guía sobre cómo debe trabajar, actuar y comportarse un buen doctorando.

A Lucía Tabares, por sus excelentes clases de fisiología, por su asesoramiento en cuestiones fluorimétricas, y por sus acertadas y cariñosas críticas.

A Juan Ribas, por su valiosa experiencia en cámaras digitales, sobre todo en la MCD-220, con la que se hicieron la mayoría de los experimentos descritos en este trabajo. Por la paciencia que demostró en las incontables ocasiones en que usurpé espacio en su laboratorio y parte de sus recursos informáticos. Por su simpatía y buen humor.

A Eva Alés por todas las veces que aguantó mis preocupaciones. Por su tolerancia, ayuda y amistad.

A Juan Manuel Poyato, con el que compartí, además de las inquietudes propias del trabajo de laboratorio, aventuras espeleológicas que supusieron otros retos distintos a los estrictamente intelectuales.

A todos los miembros del departamento, que siempre me ofrecieron su ayuda y colaboración. De forma particular a Juan Ureña, que me hizo partícipe de sus conocimientos sobre microscopía de fluorescencia e incubación de células con fura-2.

A Elisa, que supo siempre extraerme una sonrisa en los momentos tristes y entusiasmarme en los momentos difíciles. Por su apoyo y comprensión.

A mis padres, a los que tanto quiero, por hacerme como soy. A mis hermanas Rosa y Salomé, que siempre estuvieron pendientes de mí y de mi felicidad.

A mis padres

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

1. LA EXOCITOSIS: PRINCIPIOS GENERALES

- 1.1. La exocitosis: una necesidad biológica 1
- 1.2. Exocitosis constitutiva y exocitosis regulada 2
- 1.3. Independencia excitotica de los segmentos membranarios 3
- 1.4. Población y tráfico vesicular 3
- 1.5. Maquinaria proteica de la exocitosis 4

2. ESTUDIOS CLÁSICOS DE LA EXOCITOSIS 5

3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS ÚNICAS 6

- 3.1. Medida de la superficie de la membrana plasmática mediante la
determinación de la capacidad eléctrica de la misma 7
- 3.2. Cuantificación de la liberación de neurotransmisores con
técnicas de detección electroquímica 8
- 3.3. Amperometría en parche: una nueva técnica que combina
medida de capacidad y amperometría 12

4. TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS	
4.1. Colorantes vesiculares específicos	13
4.2. Colorantes marcadores de membrana	14
4.3. Indicadores para Ca^{2+}	16
4.4. Microscopía de reflexión interna total	18
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. PREPARACIÓN CELULAR	
1.1. Tipos de células	24
1.2. Método de extracción de células cebadas	
1.2.1. Obtención de células cebadas	25
1.2.2. Cultivo primario	26
1.2.3. Incubación de mastocitos con indicadores fluorescentes	26
2. SOLUCIONES	
2.1. Soluciones de extracción e incubación	27
2.2. Solución interna para inducir exocitosis en mastocitos	28
3. MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS. PRINCIPIOS GENERALES	28
3.1. Atributos de la microscopía de fluorescencia	29
3.2. Bases físicas de la fluorescencia	30
3.2.1. Reversibilidad del proceso de excitación	34
3.2.2. Relación entre la fluorescencia y la concentración del colorante	34
3.2.3. Naturaleza de las sondas fluorescentes	35
3.2.4. Parámetros de las sondas fluorescentes	41
3.2.5. Extinción fotónica de la fluorescencia	41
3.3. Elección del microscopio: conceptos básicos	42

3.3.1. Iluminación de Koehler	45
3.3.2. Fuentes luminosas y obturadores	47
3.3.3. Fuente de luz blanca	49
3.3.4. Láser	49
4. SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	50
4.1. Iluminación de epifluorescencia	51
4.2. Filtros	52
4.2.1. Filtros utilizados en la microscopía de fluorescencia	54
4.3. Objetivos	56
4.4. Cámara CCD digital	57
5. DETERMINACIÓN DE LA $[Ca]^{2+}$ POR MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS	
5.1. Introducción	62
5.2. Métodos basados en el cociente de intensidades de fluorescencia ...	62
5.2.1. Método del cociente de intensidades de fluorescencia	63
5.2.2. Determinación de la $[Ca]^{2+}$ mediante técnicas de imagen	65
6. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES	
6.1. Introducción	65
6.2. Sistema de digitalización de imágenes	69
6.3. Resolución de la imagen digital	70
6.4. Histograma de la imagen	71
6.4.1. Modificación del contraste a través del histograma	73
6.5. Filtro digital y convolución espacial	74
6.5.1. Ejemplos de máscaras de convolución	77
6.5.2. Filtros digitales mediante transformadas de Fourier	80
7. PROGRAMACIÓN DEL SISTEMA DE IMÁGENES	
7.1. Introducción	82
7.2. Programación de las DLL	84

7.3. Tipos de ficheros	85
7.3.1. Estructura del fichero en formato SSI	86
7.3.2. Estructura del fichero en formato BMP	87
8. DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES	
8.1. Introducción	87
8.2. Adquisición de imágenes	88
8.3. Procesamiento de las imágenes	89
8.4. Análisis de las imágenes	91
 RESULTADOS	
1. EXISTE UNA RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN CÉLULAS CEBADAS CARGADAS CON QUINACRINA Y LA EXOCITOSIS INDUCIDA POR 48/80	93
1.1. Las células cebadas cargadas con quinacrina, cuando exocitan, presentan una pérdida de intensidad de fluorescencia en un breve periodo de tiempo	94
1.2. Cuantificando la intensidad de fluorescencia de las imágenes, adquiridas durante el transcurso temporal de la exocitosis, se evidencia que dicha intensidad decrece de forma exponencial	96
1.3. La pérdida de intensidad de fluorescencia guarda una relación inversamente proporcional a la capacidad eléctrica de la membrana	98
1.4. La pérdida de intensidad de fluorescencia no es uniforme	102
2. EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES ES UNA POTENTE HERRAMIENTA QUE PERMITE ESTUDIAR, EN EL ÁMBITO DE GRANO ÚNICO, EL TRANSCURSO TEMPORAL DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CEBADAS CARGADAS CON QUINACRINA	105

2.1. La pérdida de intensidad de fluorescencia se produce en saltos discretos que corresponden a fusiones individuales de granos secretores	109
2.2. Los histogramas de frecuencias que representan el número de pixeles frente a la intensidad de fluorescencia constituyen un procedimiento eficaz para detectar vesículas	111
3. EL CONCEPTO DE CENTRO DE GRAVEDAD Y SU DETERMINACIÓN EN UNA SECUENCIA DE IMÁGENES PERMITE EL SEGUIMIENTO LOCAL DE LA VESÍCULA DURANTE EL TRANCURSO TEMPORAL DE LA EXOCITOSIS	112
3.1. El centro de gravedad en una secuencia de imágenes sufre, en ocasiones, desplazamiento	112
4. EL COLORANTE FM1-43, PERMITE, AL IGUAL QUE LA QUINACRINA, ESTUDIAR EL CURSO TEMPORAL DE LA EXOCITOSIS	118
4.1. El FM1-43 es un colorante no fluorescente en solución acuosa que al unirse a la membrana provoca que ésta adquiera dicha propiedad	120
4.2. Cuando se añade al medio extracelular el compuesto 48/80 inactivo, el FM1-43 tiñe no solamente la membrana vesicular sino también la matriz de proteoglicano	125
4.3. La inducción lenta de la degranulación con el compuesto 48/80 permite visualizar su desarrollo paso a paso, facilitando la posibilidad de registrar simultáneamente cambios de capacidad de membrana y relacionarla con la intensidad de fluorescencia	127
4.4. Las matrices de proteoglicano, después de que el grano se ha fundido, presentan comportamientos diferentes: unas quedan atrapadas en el interior vesicular y otras difunden al medio extracelular	129

4.5. La focalización de la exocitosis se manifiesta por un incremento de la intensidad de fluorescencia en una determinada región celular	131
4.6. Mediante el análisis de imágenes, podemos estudiar el movimiento de las matrices y determinar si están ancladas, si presentan un predeterminado desplazamiento o si están sujetos a la aleatoriedad de la difusión en el medio extracelular	133
5. LA ADQUISICIÓN DE IMÁGENES CON UNA CÁMARA CCD DIGITAL PUEDE SER EMPLEADA COMO HERRAMIENTA DE REGISTRO PARA DETERMINAR CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE Ca ²⁺ CITOSÓLICO	135
 DISCUSIÓN	
1. ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS CON TÉCNICAS FLUORESCENTE EN MASTOCITOS	140
2. JUSTIFICACIÓN DEL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES. ASPECTOS RELACIONADOS CON EL MISMO	150
1.1. Etapas cubiertas en el desarrollo	150
1.2. Comparación con sistemas existentes en el mercado	153
1.3. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia	155
1.4. Adquisición de imágenes	157
1.5. Procesamiento de imágenes	158
1.6. Software	159
 CONCLUSIONES	 161

APÉNDICE	
APÉNDICE I:	
ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LAS CÁMARAS CCD UTILIZADAS EN LA ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	164
APÉNDICE II:	
CONFIGURACIÓN DE LA TARJETA MULTIFUNCIONAL AT-MIO-16	165
APÉNDICE III:	
ESTRUCTURA E INVOCACIÓN DE LAS DLL	167
APÉNDICE IV:	
ESTRUCTURA DE UN FICHERO BITMAP (BMP)	169
APÉNDICE V:	
SUBROUTINAS DE CONTROL DE LA CÁMARA	170
APÉNDICE VI:	
SUBROUTINAS EMPLEADAS EN EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES	178
APÉNDICE VII:	
SUBROUTINAS PROGRAMADAS EN VISUAL BASIC	194
 BIBLIOGRAFÍA	 198

INTRODUCCIÓN

1. LA EXOCITOSIS: PRINCIPIOS GENERALES

1.1. La exocitosis: una necesidad biológica

Todo organismo vivo ha de comunicarse con su entorno para sobrevivir. En el caso de las células eucariotas, esta comunicación tiene lugar a través de su membrana plasmática, empleando diferentes mecanismos que, por ejemplo, les permite captar macromoléculas por un proceso denominado *endocitosis* y liberar al exterior celular sustancias no permeables a través de la membrana plasmática mediante un proceso denominado *exocitosis* (Alberts y col., 1994; Lindau y Almers, 1995).

La liberación de productos de secreción específicos por parte de las células secretoras se inicia con la síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático rugoso, se transportan al aparato de Golgi y posteriormente se almacenan en

pequeños orgánulos rodeados de membrana denominados *vesículas* o *granos secretores* (Palade, 1975).

Cuando las vesículas de secreción inmaduras emergen de la red del *trans* Golgi, su cubierta de clatrina es eliminada y su contenido se condensa (Griffiths y Simons, 1986; Kelly, 1985). La condensación es debida a la acidificación del lumen de la vesícula, inducida por una bomba de H^+ impulsada por ATP de la membrana vesicular. En las células cebadas, los gránulos secretores contienen una molécula altamente cargada e hidrofílica constituida de proteoglicano de heparina (Rabenstein, 1987). En ellos están condensados la histamina, serotonina, ATP y Ca^{2+} (Nicaise y col., 1992). Debido a que las vesículas maduras son tan densas, la célula secretora libera grandes cantidades de material por exocitosis en cuanto es necesario (Davidson y col., 1992a).

1.2. Exocitosis constitutiva y exocitosis regulada

A partir de la red del *trans* Golgi, divergen dos rutas exocitóticas: la constitutiva y la regulada o estimulada (Burgess y Kelly, 1987). La exocitosis constitutiva está presente en todas las células eucarióticas, y ocurre de forma continuada sin necesidad de que aparezcan señales específicas que la induzcan. Tiene especial relevancia la inserción en la membrana celular de proteínas como los canales iónicos y los receptores de membrana (caso del receptor de la Transferrina o el receptor para la LDL; Goldstein y col., 1985).

Por otra parte, la exocitosis regulada o estimulada requiere la llegada de un preciso mensajero intracelular, el cual desencadena una cascada de reacciones que culmina con la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y la posterior liberación de las sustancias que contienen. Este segundo tipo de exocitosis se encuentra presente en células especializadas de naturaleza secretora, como las células cebadas, que exocitan, por ejemplo, en respuesta a ionóforos de Ca^{2+} , y a un secretagogo, el compuesto 48/80 (Breckenridge y Almers, 1987b; Poon y col., 1981).

1.3. Independencia exocitótica de los segmentos membranarios

La histamina es una pequeña molécula segregada por las células cebadas, mediante la ruta regulada, como respuesta a ligandos específicos que se unen a los receptores de su superficie. La histamina es la responsable de muchos síntomas tales como el prurito o los estornudos que acompañan a las reacciones alérgicas.

Si se incuban células cebadas en un medio que contenga un estimulante soluble, se observa que la exocitosis se produce por toda la superficie celular. Sin embargo, ésta no es una respuesta generalizada de toda la célula, ya que si el ligando estimulador está artificialmente fijado a una superficie sólida de modo que sólo puede interactuar con una región localizada de la superficie de la célula cebada, la exocitosis queda restringida a la región en que la célula entra en contacto con el ligando. Por lo tanto, distintos segmentos de la membrana plasmática pueden actuar de forma independiente. Como resultado de ello, la célula cebada, a diferencia de una célula nerviosa, no responde como un todo cuando está estimulada; la activación de los receptores, las señales intracelulares resultantes y la exocitosis posterior están localizadas en la región particular de la célula que ha sido excitada (Lawson y col., 1978).

1.4. Población y tráfico vesicular

Cuando las vesículas han completado el proceso de síntesis y están cargadas, se acumulan constituyendo el *contingente de vesículas en reserva*. Estas vesículas no experimentan la exocitosis inmediatamente, sino que aparecen inmovilizadas unidas al citoesqueleto celular hasta que llega la señal que indica que han de aproximarse a la membrana plasmática. Por otra parte, junto a la membrana plasmática, se encuentra otro grupo de vesículas, el *contingente de vesículas listas para fundirse* (Neher y Zucker, 1993a).

Desde el contingente de vesículas en reserva los granos secretores tienen que emigrar al lugar de secreción, donde deben esperar hasta que la célula reciba la señal que desencadene la liberación. En algunas células (las nerviosas proporcionan el ejemplo más extremo), el lugar de secreción está lejos del

complejo de Golgi. Las proteínas, como los neurotransmisores peptídicos que deben ser liberados al final del axón, son sintetizadas y empaquetadas en vesículas del cuerpo celular, donde se sitúan los ribosomas, el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. Entonces deben viajar a lo largo del axón hasta alcanzar el terminal axónico, recorriendo distancias de hasta un metro. Las vesículas utilizan proteínas motoras unidas a su superficie para propulsarse a lo largo de los microtúbulos axonales, la orientación de los cuales guía este tráfico a lo largo del axón en la dirección apropiada (Burgoyne y Morgan, 1993).

1.5. Maquinaria proteica de la exocitosis

Las sinapsinas son proteínas mediadoras del tráfico intracelular de membrana (Greengard y col., 1993). La sinapsina I se une por un extremo a la membrana de la vesícula y por el otro a la actina que forma parte del citoesqueleto de la célula. De esta forma la vesícula queda inmovilizada. Las sinapsinas son proteínas que se fosforilan en presencia de calcio. Cuando esto ocurre, la sinapsina I se despega de la actina y de la membrana vesicular, quedando libre la vesícula para aproximarse a la membrana. Ante un estímulo repetido la entrada de calcio activa la fosforilación de la sinapsina I, se incrementa el número de vesículas que llegan hasta la membrana y aumenta la liberación del neurotransmisor. En células cromafines, se ha propuesto recientemente que el Ca^{2+} promueve directamente el movimiento de vesículas desde el contingente de reserva al contingente submembranario (Heinemann y col., 1993; Rüdén y Neher, 1993). Se ha demostrado que las elevaciones mantenidas en rangos moderados de la concentración de calcio facilitan este trasiego. El ión Ca^{2+} es, por tanto, no sólo un mediador directo de la exocitosis de las vesículas (Douglas, 1968; Katz y Miledi, 1965c), sino que actúa como modulador y tiene un papel muy importante en fenómenos de adaptación celular como la facilitación sináptica. Por ello, es de gran importancia funcional conocer cómo y en qué puntos de la vía de secreción actúa.

Durante los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los mecanismos proteicos responsables del tráfico vesicular, tales como las reacciones producidas durante la fusión inmediatamente antes de la liberación.

El ciclo de la vesícula sináptica (exocitosis, liberación, endocitosis y regeneración) es el más estrictamente regulado y el que ocurre con mayor rapidez. Con nuevos modelos moleculares (Jahn y Südhof, 1994; Südhof, 1995), el conocimiento de los mecanismos involucrados en la función neuronal es cada día mayor.

Técnicas como la purificación, el clonado y el análisis funcional exhaustivo de las proteínas responsable del tráfico de membrana, han conducido al aislamiento del llamado *complejo de fusión*, formado por un grupo de proteínas encargadas del acercamiento último y fusión de la vesícula de secreción sobre la membrana (Söllner y col., 1993a). Este complejo distingue fundamentalmente dos tipos de proteínas: proteínas solubles citosólicas y proteínas unidas a membranas. Se han identificado como proteínas solubles el NSF (Factor sensible a la N-etil-maleimida), que liga ATP y resulta imprescindible en gran número de reacciones intracelulares de fusión, y las SNAPs, que se unen al NSF formando el complejo NSF-SNAP.

Las proteínas unidas a la membrana plasmática hasta ahora identificadas son la Sintaxina y la SNAP-25 (proteína derivada de los sinaptosomas número 25 o t-SNARE), y las proteínas unidas a la membrana de la vesícula secretora son las Sinaptobrevinas, también conocidas como VAMP o v-SNARE (Söllner y col., 1993b).

2. ESTUDIOS CLÁSICOS DE LA EXOCITOSIS

Tradicionalmente, la exocitosis se ha estudiado con técnicas morfológicas y bioquímicas que han permitido establecerla como un proceso celular básico en el que la liberación al exterior de macromoléculas se produce a través de la fusión de las vesículas que las contienen con la membrana plasmática.

Las técnicas morfológicas se han basado en experimentos autorradiográficos seguidos de estudios seriados de microscopía electrónica,

mientras que las segundas realizan una medida del material segregado (Palade, 1975). Con las técnicas de microscopía electrónica es extremadamente difícil reconstruir el tamaño exacto de los gránulos secretores, dado que en las secciones ultrafinas, el corte se produce de manera no selectiva, por lo que las técnicas morfométricas pueden únicamente medir vesículas de volumen casi esférico y de grandes dimensiones. En el caso concreto de agregados multigranulares, la estructura vesicular se perdería por efecto del plano de sección (Alvarez de Toledo y Fernández, 1990).

Las técnicas bioquímicas miden exocitosis en función del material segregado por poblaciones de células. Estos experimentos se han encaminado principalmente a dilucidar el papel de los mensajeros intracelulares en el control de la exocitosis (Cockroft y Gomperts, 1979; Del Castillo y Katz, 1954; Douglas y Rubin, 1961). El principal inconveniente de ésta metodología experimental lo constituye el hecho de que los datos obtenidos se refieren, en todos los casos, a valores promedio de la población celular estudiada (Armstrong-James y Fox, 1981).

La técnica de medición de la superficie de la membrana plasmática por la determinación de la capacidad eléctrica de la misma (Fernández y col., 1984; Neher y Marty, 1982), permite estudiar la exocitosis desde puntos de vista distintos a los ofrecidos por técnicas morfológicas y/o bioquímicas. La principal ventaja que presenta esta técnica es que permite medir la exocitosis en células individuales, medir la fusión de vesículas de secreción, seguir el curso temporal de la secreción en una única célula y estudiar la acción de segundos mensajeros sobre la exocitosis.

3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS ÚNICAS

Para investigar el mecanismo celular que controla la exocitosis, es importante la observación en una única célula, porque dentro de una población de células, los fenómenos transitorios tienden a permanecer ocultos debido a la

variabilidad y asincronía de las células individuales, dificultando el estudio momentáneo de los eventos que conducen a la liberación exocitótica.

Cuando en una población celular se libera sólo una parte del producto secretor disponible, puede deberse bien a una secreción completa de alguna de las células, bien a una respuesta secretora parcial de todas ellas. La única forma de diferenciar estas dos respuestas es el estudio de células individuales.

3.1. Medida de la superficie de la membrana plasmática mediante la determinación de la capacidad eléctrica de la misma

Para el desarrollo de esta técnica fueron fundamentales las aportaciones de Philipson (Philippon, 1921), que equiparó la estructura molecular de la membrana plasmática a un circuito eléctrico equivalente del tipo resistencia-condensador en paralelo. La bicapa lipídica constituye en sí un condensador eléctrico en el que las placas conductoras son los dos medios iónicos, intra y extracelular, y el dieléctrico es la bicapa misma. Esto define el componente capacitativo de la membrana, mientras que el componente resistivo viene dado por la presencia de canales iónicos insertos en el espesor de la bicapa lipídica, a través de los cuales permean selectivamente los iones.

En el proceso de fusión, la membrana vesicular se une a la membrana plasmática. Esto se traduce en un incremento de la superficie celular que puede monitorizarse eléctricamente como un incremento en la capacidad de la superficie de membrana (Gillespie, 1979; Jaffe y col., 1978). Cuando la instrumentación es suficientemente sensible (Neher y Marty, 1982), el incremento de capacidad ocurre en una secuencia de pasos, cada uno de los cuales representa la fusión de un grano secretor con la membrana celular (Almers y Neher, 1987; Fernández y col., 1984).

Existen diversas configuraciones de registro que emplean la técnica de "patch-clamp" descrita inicialmente por Neher y Sakman (Neher y col., 1978), que permiten registros electrofisiológicos en células de reducido tamaño. Esta

técnica consiste en aislar un área o parche de membrana celular mediante la unión de la punta de una micropipeta de vidrio sobre la cara externa de la membrana plasmática. Cuando se obtiene este sello entre la pipeta y la membrana plasmática, se alcanza la denominada configuración en “cell-attached”, en la que se conserva la integridad de la membrana, permitiendo registrar corriente a través de la superficie que permanece en contacto con la solución de la micropipeta.

En esta situación, la aplicación de una presión negativa a la pipeta provoca la rotura del parche de membrana, delimitado por la punta de vidrio, poniendo de esta forma en comunicación el medio intracelular con la solución de la micropipeta, hasta lograr la diálisis del contenido celular. Ésta es la llamada configuración en “whole-cell” o de célula completa, que permite el cálculo de la capacidad total de la célula y su variación a lo largo del tiempo. Ofrece la posibilidad de controlar el medio intracelular a través de la micropipeta, lo que permite introducir segundos mensajeros o indicadores colorantes en el citosol. También permite controlar el potencial de membrana y registrar corrientes transmembranarias.

Esta técnica ha permitido establecer, en células cebadas, que las vesículas secretoras se funden reversiblemente con la membrana plasmática (Alvarez de Toledo y Fernández-Chacón, 1993; Fernández y col., 1984) mediante la formación transitoria del poro de fusión, el canal acuoso que conecta el interior de la vesícula con el medio externo (Almers y Tse, 1990a; Alvarez de Toledo y Fernández, 1988; Breckenridge y Almers, 1987a).

3.2. Cuantificación de la liberación de neurotransmisor con técnicas de detección electroquímica

La monitorización de la capacidad eléctrica nos permite estudiar el proceso de fusión de las vesículas durante la exocitosis, pero no podemos conocer la dinámica de las moléculas secretadas. Desde los años 70 se vienen utilizando técnicas de detección electroquímica para estudiar la liberación de neurotransmisor, en el cerebro completo de animales vivos (Adams, 1969). La aplicación, en células aisladas, de estas técnicas (Tatham y col., 1991), que

aprovechan la propiedad oxidativa de determinadas sustancias y su detección electroquímica con microfibras de carbón (Stamford y col., 1993), permite un mayor conocimiento de la biología celular de la secreción.

Las técnicas de detección electroquímica cuantifican la corriente eléctrica generada al oxidarse ciertas moléculas cuando se les aplica un determinado potencial, característico de cada una, denominado *potencial de oxidación*.

Para aplicar dicho potencial se utiliza un electrodo de vidrio con una microfibra de carbono en su interior, a través del cual fluirán los electrones liberados en la oxidación. El número de electrones, y por tanto la corriente generada, será proporcional al número de moléculas oxidadas.

Cada sustancia tiene una curva corriente-voltaje característica, que se denomina *voltamograma*. En el voltamograma aparecen los picos de oxidación y reducción específicos de cada sustancia. En la dopamina, por ejemplo, para cada molécula oxidada se movilizan dos electrones.

La voltametría y la amperometría son técnicas electroquímicas de gran trascendencia en el estudio de la exocitosis. La voltametría consiste en la aplicación de ciclos de rampas de voltaje, en cada uno de los cuales se lleva a cabo la oxidación y posterior reducción de la sustancia. Permite, por una parte, monitorizar la liberación simultánea de diferentes productos de secreción e identificarlos. Por otra, determinar las variaciones de la concentración del producto, para lo cual es necesario calibrar el electrodo utilizado.

En la amperometría, el voltaje que se aplica es un voltaje constante y suficiente para oxidar la sustancia que se desea medir. Tiene mayor resolución temporal que la voltametría y mide directamente la corriente que se produce por la oxidación. No es necesario calibrar el electrodo. El número de moléculas se calcula a través de la carga eléctrica que soporta la corriente registrada, conocida la carga que aporta cada molécula en su reacción específica de oxidación.

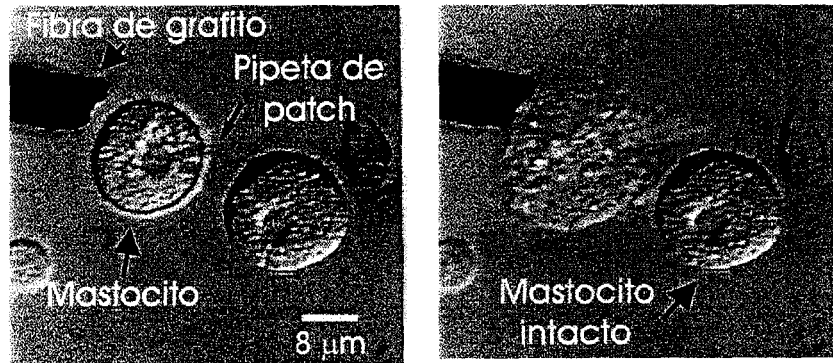
La liberación de granos únicos se observa como una forma de onda típica con espigas correspondientes a la corriente amperométrica. A menudo tales espigas vienen precedidas por un pequeño pedestal llamado "foot", que representa una lenta liberación de material secretor al espacio extracelular, a través de un estrecho poro de fusión en los primeros milisegundos de su formación (Chow y

col., 1992) y durante las fusiones transitorias de vesículas (Alvarez de Toledo y Fernández-Chacón, 1993). Estudiando la cantidad de serotonina liberada de grandes vesículas en mastocitos y midiendo simultáneamente la conductancia del poro de fusión se ha podido establecer la proporcionalidad directa existente entre ambos eventos, así como la aleatoriedad en la apertura de los “flicker” (fusión transitoria que precede a la dilatación del poro de fusión) durante el “foot” en el poro de fusión (Alvarez de Toledo y Fernández-Chacón, 1993).

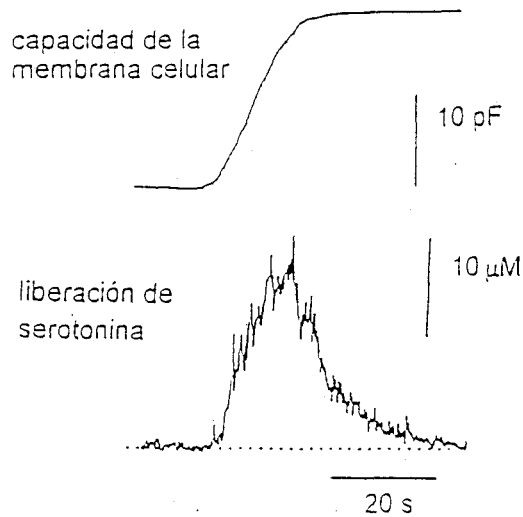
La amperometría presenta una elevada resolución temporal y una gran sensibilidad en la detección (Alvarez de Toledo y Fernández-Chacón, 1993; Chen y col., 1994; Chow y col., 1992; Kennedy y col., 1993; Leszczyszyn y col., 1991; Parras y Kennedy, 1995; Wightman y col., 1991), por lo que permite medir muy bajas concentraciones de sustancias liberadas (Cahill y col., 1996; Cahill y Wightman, 1995; Crespi, 1991; Schroeder y col., 1992).

Combinando las técnicas de “patch-clamp” y amperometría, se determinó que a la fusión de una vesícula de liberación, detectada por el incremento de la capacidad eléctrica de membrana, le seguía una espiga de oxidación amperométrica, confirmando de manera directa (al menos en mastocitos y cromafines) la hipótesis de la secreción granular (Alvarez de Toledo y Fernández-Chacón, 1993; Fernández-Chacon y col., 1997; Oberhauser y col., 1996; Robinson y col., 1995).

A



B



C

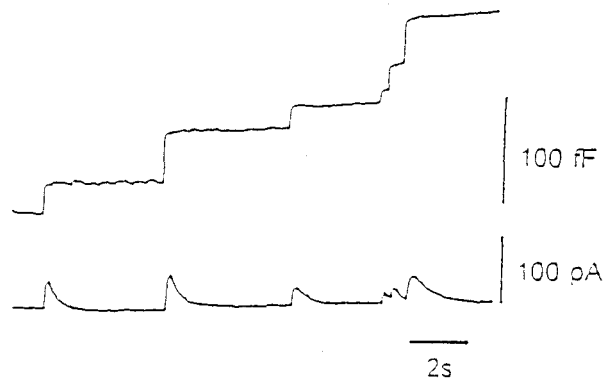


Fig. 1. Monitorización de la exocitosis con técnicas electrofisiológicas. A) Célula cebada sometida a diálisis intracelular a través de una pipeta de "patch-clamp". Las dos imágenes muestran las diferencias morfológicas antes y después de la degranulación. B) El aumento de superficie de membrana se registra mediante la determinación de la capacidad eléctrica. De forma simultánea se detecta electroquímicamente la liberación de serotonina. C) Registro similar al ilustrado en B, pero al que se le ha dado mayor ganancia. Se observa que los aumentos de capacidad se corresponden con aumentos discretos de la superficie celular. A cada incremento (salto) le corresponde la fusión de una única vesícula de secreción. En la parte inferior se muestra cómo cada evento de fusión lleva aparejado una liberación de serotonina desde el interior de cada vesícula.

3.3. Amperometría en parche: una nueva técnica que combina medida de capacidad y amperometría

Una nueva técnica, la amperometría en parche (Albillos y col., 1997; Alés, 1998), permite registrar en un parche de membrana, y de forma simultánea, el proceso de fusión de vesículas sinápticas con la membrana y la subsiguiente liberación de los productos de secreción en granos individuales. La aportación principal de esta técnica es la posibilidad de resolver fusiones de vesículas de muy pequeño tamaño en las que por primera vez se pueden estudiar la dinámica de expansión del poro de fusión y la liberación no cuántica durante la apertura del mismo.

Esta técnica, mediante la que, paralelamente, se determina la capacidad eléctrica de la membrana y la corriente generada por la liberación de las moléculas liberadas por las vesículas, combina la configuración en “cell-attached” (con la que se pueden resolver fusiones de vesículas sinápticas mayores de 60 nm de radio) y la amperometría (que determina la cantidad de productos secretados al interior de la pipeta de “patch-clamp”). Para ello se requiere un “holder” especial para la pipeta de “patch-clamp”, que permite aproximar la fibra de carbono muy cerca de la punta de la pipeta, al objeto de que la distancia a la que se detectan los productos de secreción sea inferior a 5-10 μm (Albillos y col., 1997).

En los modelos celulares estudiados hasta la fecha (mastocitos, células tipo I del cuerpo carotídeo), el registro de capacidad se ha realizado en condiciones de diálisis del citosol que recrean nuevas condiciones citosólicas y eliminan parte de los componentes intracelulares responsables del control del proceso secretor, evitando de esta manera que el estímulo secretor sea lo suficientemente modulable para provocar fusiones reversibles de vesículas (“flicker”). Una de las ventajas de utilizar la amperometría en parche es que se realiza una determinación de la capacidad eléctrica de la membrana sin dializar el citosol. En esta situación el estudio de la exocitosis se realiza en condiciones más parecidas a las fisiológicas.

Esta técnica ha sido desarrollada por nuestro grupo en colaboración con el grupo del Dr. Manfred Lindau (Max-Planck Institute für Medizinische Forschung, Heidelberg, Alemania).

4. TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS

4.1. Colorantes vesiculares específicos

Las células cebadas poseen un gran contenido de aminas biogénicas como la histamina y serotonina (Bergendorff, 1975; Wasserman, 1979). Estas aminas, junto con gran cantidad del mucopolisacáridos aniónicos heparina y enzimas proteolíticas, se almacenan masivamente en los granos osmofílicos de las células cebadas (Jacques, 1975; Uvnäs, 1974a). Con tamaños comprendidos entre 300 y 800 nm, las vesículas esféricas de los mastocitos pueden distinguirse fácilmente a través de un microscopio óptico (Behrendt y col., 1976).

Aunque la histamina es sintetizada a partir de la histidina en el citosol de las células cebadas (Jacques, 1975), la microscopía de fluorescencia ha establecido que la histamina está localizada en altas concentraciones sólo en los granos secretores (Jansson, 1971).

Aprovechando la ventaja que supone estudiar este tipo celular por tener sus vesículas un gran tamaño, se determinó el pH de los granos mediante técnicas fluorescentes utilizando como indicador el 9-amino acridina (9-AA) (Casadio y Melandri, 1977; Daemer y col., 1972; Johnson y col., 1980). Este fluoróforo se acumula en el interior de organelos ácidos, difundiéndose a través de la membrana plasmática en su forma no cargada.

Para analizar el comportamiento de la secreción vesicular durante el “flicker” y valiéndose del carácter ácido de las vesículas (Johnson y col., 1980), se utilizó la quinacrina como marcador vesicular. Este indicador fluorescente actúa de forma similar al 9-AA, y durante el curso de la degranulación de las vesículas, la fluorescencia se pierde por difusión del colorante al medio extracelular. De esta forma, y combinando medidas de fluorescencia con medidas de capacidad, se ha evidenciado que el “flicker” representa un poro acuoso, poro de fusión, que conecta el lumen de la vesícula con el medio extracelular, y es tan estrecho que la quinacrina sólo puede escapar de forma inapreciable

(Breckenridge y Almers, 1987b), hasta que la dilatación del poro permita la liberación de todo el colorante.

En célula única, es usual correlacionar la liberación de productos secretores con la medida de otras variables que acompañan la activación como la medida de $[Ca^{2+}]$ intracelular mediante colorantes fluorescentes, tales como el indo-1 o el fura-2.

A principios de los 90 se utilizaron colorantes que permitían la detección de la liberación exocitótica en un volumen celular. Por ejemplo, en mastocitos extraídos del peritoneo de rata, la secreción de aminas vasoactivas tales como histamina y enzimas tales como la β -N-acetilglucosaminidasa, podían ser medidas por indicadores fluorescentes (Cockroft y Gomperts, 1979; Gomperts y col., 1983). Sin embargo, aunque estos fluoróforos eran sensibles y permitían cuantificar, no eran indicados para monitorizar la liberación en célula única, ni para combinarlos con técnicas electrofisiológicas.

En 1991 se monitorizó la exocitosis en célula única de mastocitos mediante "fast voltammetry" (Tatham y col., 1991). Se utilizaron rampas de voltaje con electrodos de fibra de carbón para estudiar la secreción. Además, se emplearon fluoróforos como la quinacrina, que se acumula en los granos secretores, para correlacionar la amplitud de la señal electroquímica observada durante la degranulación con la pérdida de fluorescencia debida a la liberación de la quinacrina del grano secretor. Ambos métodos fueron empleados simultáneamente para registrar la secreción en mastocitos como respuesta a sucesivas aplicaciones del compuesto 48/80.

4.2. Colorantes marcadores de membrana

Durante el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, se produce una reducción en el número de innervaciones axónicas. Este fenómeno, conocido como *eliminación sináptica*, ha sido estudiado fundamentalmente en uniones neuromusculares. Lichtman y col. describieron por primera vez en reptiles la

eliminación sináptica con una nueva técnica que implicaba la captación y liberación de colorantes fluorescentes (Lichtman y col., 1985).

Sin embargo, la sulforodamina y otros colorantes usados por estos científicos no servían en otras preparaciones diferentes a la de los reptiles. Un notable avance fue el desarrollo de nuevos colorantes que tiñen vesículas sinápticas y endosomas en una amplia variedad de preparaciones (Betz y Bewick, 1992c; Betz y col., 1992a), de los cuales cabe destacar el estiril FM1-43 (que emplea los filtros de la fluoresceína) y el FM4-64 (que emplea los filtros de la rodamina).

La utilidad del colorante fluorescente para el estudio de la cuantía del tráfico endosomal depende fundamentalmente de tres atributos: primero, debe unirse inmediata y reversiblemente con la membrana; segundo, no debe permear a través de la membrana; por último, debe ser fluorescente solamente cuando se une a la membrana.

Estas tres características determinan tres partes bien diferenciadas en la molécula: la cola hidrofóbica, que se une a la membrana (Loew y Simpson, 1981); la cabeza, dicatiónica, que previene la permeabilidad; y el cuerpo o núcleo, que contiene anillos aromáticos y dobles enlaces que determinan las propiedades espectrales del colorante.

Siguiendo estas pautas, Betz y col. sintetizaron el FM1-43, que se une a la cara externa de la membrana, expuesta al colorante. El fluoróforo puede ser internalizado por endocitosis y posteriormente liberado al exterior por exocitosis. Una importante característica es el espectacular incremento de fluorescencia (350 veces) que experimenta, con respecto al que está presente en solución acuosa, cuando se une a la membrana. Esto facilita la adquisición de imágenes de fluorescencia mientras el colorante sigue estando disuelto en el medio extracelular (Lagnado y col., 1996; Smith y Betz, 1996).

En algunos estudios, los estiril colorantes únicamente marcan estructuras de interés tales como terminales presinápticos (Bindokas y Miller, 1995; Liu y Tsien, 1995; Stevens y Tsujimoto, 1995), mientras que en otros casos han sido utilizados como herramienta principal para el estudio del reciclado de vesículas sinápticas, particularmente en terminales del nervio motor de la rana (Betz y

Bewick, 1992c; Betz y Henkel, 1994) y en sinapsis de neuronas cultivadas del hipocampo (Kraszewski y col., 1995; Ryan y col., 1993; Ryan y Smith, 1995).

Combinando la utilización de FM1-43 y fura-2 para monitorizar la concentración de calcio intracelular, se ha estudiado la farmacología de los mecanismos de transporte de calcio en células cultivadas del hipocampo (Cousin y col., 1995; Reuter, 1995) y en células endocrinas (Betz y Wu, 1995).

4.3. Indicadores para Ca^{2+}

Actualmente existe una extensa variedad de indicadores fluorescentes que observan una respuesta espectral cuando se unen a iones específicos (H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} y Ca^{2+}), lo que ha permitido estudiar los cambios producidos en sus respectivas concentraciones (Minta y Tsien, 1989; O'Neill y col., 1991; Tsien y Pozzan, 1989b; Tsien, 1989a; Tsien, 1989c). De todos ellos, el sensible al Ca^{2+} ha sido el más utilizado, debido a su importancia como mensajero intracelular y a la necesidad de medir variaciones de su concentración en el citosol ante cambios en el potencial de membrana o a la ocupación de un receptor (Marin y col., 1996).

La concentración de Ca^{2+} libre citosólico, por ejemplo, está implicado en la regulación de la contracción muscular, el metabolismo y la secreción celular (Berridge, 1987a; Berridge, 1987b; Williamson y Monck, 1989). Por este motivo, es importante desarrollar técnicas capaces de medir dichas concentraciones.

Los colorantes fluorescentes, junto con técnicas como la microscopía de fluorescencia (Blinks y col., 1982), la citometría y la espectroscopia de fluorescencia, han permitido estudiar cambios producidos en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (García-Sancho y col., 1982). Estos indicadores fluorescentes proceden de quelantes de Ca^{2+} no fluorescentes como el EGTA Y BAPTA.

Hasta mediados de los años 80, el colorante más empleado en la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue el quin2 (Tsien y Rink, 1983), que en su estado éster permeaba a través de la membrana. Un incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ implicaba un aumento de la intensidad de fluorescencia.

Sin embargo, presentaba algunos inconvenientes como la corta longitud de onda requerida para la excitación, el bajo coeficiente de extinción, el escaso

desplazamiento entre la curva de excitación y emisión, la poca resolución en la determinación de la concentración y la elevada afinidad sobre otros cationes divalentes como el Mg^{2+} . Por estos motivos, surgió la necesidad de sintetizar nuevos colorantes (stil 1, stil 2, indo 1, fura-1, fura-2 y fura-3) que tuviesen unas características espectroscópicas más favorables para la experimentación (Gryniewicz y col., 1985). De ellos, el indo-1 fue el primer candidato para citometría, mientras que el fura-2, después de más de una década, sigue siendo, por sus preciadas características, utilizado en diferentes tipos celulares, a pesar de la necesidad de emplear dos longitudes de onda de excitación (colorante ratiométrico), y de la consiguiente calibración que ello conlleva.

La combinación de medidas con fura-2 y los avances en imagen digital y computacionales, hicieron posible detectar cambios espaciales y temporales de la concentración de Ca^{2+} en célula única (Cohan y col., 1987; Connor y col., 1987; Monck y col., 1990b; O'Sullivan y col., 1989; Rooney y col., 1990; Valdeolmillos y col., 1993; Wier y col., 1987).

En células cebadas, la exocitosis no está únicamente vinculada a la $[Ca^{2+}]_i$ como en las células excitables. Esto queda establecido aplicando la técnica combinada de medidas de la fluorescencia con fura-2 y de la capacidad de membrana (Neher, 1988; Neher y Almers, 1986b; Penner y Neher, 1988; Penner y col., 1987). Si realizamos tales experimentos con células cromafines o células- β pancreáticas e incrementamos la $[Ca^{2+}]_i$ (cargando las células con "buffers" de alto calcio o estimulando el influjo de dicho ión mediante la depolarización) se observa a continuación un incremento en la capacidad (Neher y Marty, 1982; Penner y Neher, 1988). Por el contrario, en los mastocitos, una elevada $[Ca^{2+}]_i$, por sí misma, no induce la secreción a menos que se eleve la $[Ca^{2+}]_i$ a altos valores no fisiológicos durante largos periodos (Neher, 1988; Penner y Neher, 1988). Pero si emparejamos esta acción con otro estímulo, el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en rangos fisiológicos inicia un drástico aumento de la secreción.

4.4. Microscopía de reflexión interna total

Un avance notable en la microscopía de fluorescencia lo constituye la aplicación de una onda evanescente (“evanescent wave”) como luz de excitación (Axelrod, 1981). Cuando un haz de láser incide sobre la superficie de un sólido transparente en contacto con un líquido, el haz de excitación penetra una distancia extremadamente corta en la interfase líquido sólido. Esta superficie electromagnética es denominada “evanescent wave”, y puede excitar selectivamente moléculas del líquido colindante a la interfase (Axelrod y col., 1983). En microscopía de “evanescent wave” o microscopía de reflexión interna total, la iluminación del espécimen se restringe a una fina capa sobre el substrato, del orden de varios centenares de nanómetros (Omann y Axelrod, 1996).

Recientemente se ha observado, gracias a esta técnica, que los granos secretores de células cromafines teñidas con Acridine Orange (Steyer y col., 1997) o colorantes acidotrópicos (Oheim y col., 1998), pueden ser resueltos individualmente y estudiar el movimiento en la vecindad de la membrana, su anclaje, así como la liberación del colorante por exocitosis.

Las neuronas conservan una población de vesículas sinápticas que permanecen ancladas en zonas activas a la espera de intervenir en el proceso de exocitosis (Broadie y col., 1995; Hunt y col., 1994). Por el contrario, las células endocrinas liberan un gran número de granos de núcleo denso que no tienen zonas activas y existe controversia sobre el tamaño (Gillis y col., 1996) e incluso la existencia (Trifaro y Vitale, 1993) de una población anclada. No se conoce cómo y con qué rapidez las vesículas secretoras son reemplazadas en posiciones secretoras tanto en neuronas como en células endocrinas, por lo que se exploran nuevas técnicas de microscopía que resuelvan dichas cuestiones.

Gracias al microscopio electrónico se han podido identificar (Steyer y col., 1997) una población de granos anclados en células cromafines que se reduce cuando la célula exocita.

La dinámica de los cambios morfológicos fue estudiada en células vivas mediante microscopía de fluorescencia (Terakawa y col., 1991) y fluoróforos como el acridine orange. Para ver granos únicos debajo del plasmalema, la

microscopía confocal tiene insuficiente resolución, causaba una rápida pérdida de fluorescencia (“bleaching”) y presentaba fototoxicidad.

Para tomar imágenes de finas capas del citosol, y evitar estos inconvenientes, Steyer y col. utilizaron un método no aplicado anteriormente en neurobiología y que requería menos intensidad de iluminación. La fluorescencia fue excitada selectivamente en una fina capa (300 nm) del citosol, adyacente a la superficie de vidrio, utilizando la “evanescent wave” con un rayo láser que sufría una reflexión total en la interfase célula vidrio (Stout y Axelrod, 1989).

Una imagen típica observa dispersos puntos fluorescentes. Debido a que los granos son con diferencia los organelos más abundantes cerca del plasmalema, la mayoría de los puntos fluorescentes deben representar granos próximos al plasmalema, en el lugar donde se adhiere al vidrio.

Cuando estimulaban con alto $[K^+]$, los puntos fluorescentes desaparecían debido a que la fusión de los granos con la membrana, hacían verter el fluoróforo al medio extracelular. Los granos que tocaban el plasmalema fueron perdiéndose selectivamente; del orden del 53 % de ellos, se perdieron durante dos minutos de estimulación. Sin embargo, no es de esperar una selectiva reducción de granos anclados pasados los dos minutos, si los granos anclados y citosólicos alcanzan el equilibrio pasado ese tiempo.

Por ejemplo, la rápida liberación del “pool” de vesículas secretoras en células cromafines (Moser y Neher, 1997a) y neuronas (Stevens y Tsujimoto, 1995), es repuesto con una constante de tiempo de 10 segundos. En células cromafines esto puede suceder sin el anclaje de nuevos granos.

Estudios no invasivos mediante técnicas fluorescentes en células neuronales han resuelto algunas cuestiones acerca de cómo funciona el terminal presináptico (Betz y Bewick, 1992c; Ryan y col., 1993; Wu y Betz, 1996). En estos estudios, las vesículas sinápticas fueron selectivamente teñidas con FM1-43 mientras se desarrollaban los procesos de endo y exocitosis. Este método es efectivo porque las membranas de vesícula sináptica, una vez en contacto con el

medio externo, son recicladas en cuestión de minutos, para formar nuevas vesículas sinápticas.

Junto a las vesículas sinápticas, los terminales presinápticos contienen granos secretores de núcleo denso que secreta hormonas y péptidos neurotransmisores. En células endocrinas, tales granos forman los organelos secretores dominantes. En células frescas, los granos de núcleo denso no pueden ser fácilmente teñidos con esteril colorantes, porque sus membranas y proteínas son empaquetadas conjuntamente en la biogénesis del grano, y no queda claro que después de la endo y exocitosis los componentes de la membrana sean específicamente reunidos con nuevos péptidos para formar nuevos granos secretores.

Para resolver este problema, se recurrió a la proteína “green fluorescent” (GFP) (Chalfie y col., 1994; Cubitt y col., 1995). La GFP es una potente herramienta que permite visualizar eventos celulares y compartimentos en vivo (Cole y col., 1996; Gerisch y col., 1995; Kaether y Gerdes, 1995; Rizzuto y col., 1995; Wacker y col., 1997).

Thorsten Lang y col (Lang y col., 1997) expresaron en células PC12 la proteína “green fluorescent” (GPF) (Chalfie y col., 1994; Cormack y col., 1996; Cubitt y col., 1995) fusionándola con la cromogranina B humana o con el neuropéptido Y, lo cual producía puntos fluorescentes. Estos puntos, colocados con granos secretores endógenos, son marcadores de la dopamina β -hidroxilasa.

La estimulación de células PC12 con elevada $[K^+]$, o permeabilizadas con Ca^{2+} , provocó una pérdida de intensidad de fluorescencia dependiente de Ca^{2+} en las neuritas. Las imágenes de granos individuales fluorescente, fueron adquiridas mediante la técnica microscopía de fluorescencia “evanescent wave”. Se observó la migración de los granos secretores, que se detenían en sitios de anclaje a la membrana y de repente su fluorescencia desaparecía como consecuencia de la exocitosis. La GFP unida a los péptidos secretados, es un marcador fluorescente

para granos de núcleo denso y puede ser utilizado para resolver mediante microscopía, granos individuales.

OBJETIVOS

La fusión de las vesículas con la membrana celular, es un evento universal en células eucarióticas, pero no son del todo conocidos los mecanismos que acontecen, desde que se produce el estímulo para la secreción, hasta que tiene lugar la exocitosis.

Gran parte del conocimiento adquirido en los últimos años, ha llegado de forma paralela a la innovación de nuevas técnicas que han contribuido a responder a múltiples cuestiones sobre el mecanismo secretor. Cabe destacar las técnicas electrofisiológicas y moleculares, si bien, la síntesis de colorantes específicos y su registro de fluorescencia, también han aportado datos importantes.

Por este motivo, y como objetivo general del presente trabajo, ha sido el desarrollo de un sistema de imágenes, que añade una técnica más al laboratorio, que nos permita conocer más aspectos relacionados con los mecanismos que participan en la fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática.

Los objetivos específicos, que de forma secuencial se cubrieron durante el desarrollo del proyecto, fueron:

1. Montar un sistema de fluorimetría de bajo coste, que permita estudiar, con una elevada resolución, dónde y en qué momento se produce la fusión de la vesícula con la membrana plasmática.

2. Programar una aplicación que adquiera imágenes a partir de una CCD, las procese y las analice de forma rápida y versátil.

3. Estudiar los diferentes colorantes existentes en el mercado, conocer sus características espectroscópicas y su aplicabilidad a distintos tipos celulares.

4. Validar la metodología anterior en células cebadas, que han sido estudiadas de forma extensiva para el estudio de la exocitosis, teniendo en cuenta que los mecanismos importantes por los que se rige el proceso secretor en mastocitos debe ser también relevante en otros modelos de células excitables tales como cromafines o neuronas.

5. Con este sistema, analizar la focalización de la exocitosis en células cebadas. Determinar que existen zonas membranas especializadas en el proceso secretor, y que cuando se induce dicho proceso en una región, la exocitosis no se produce como un “todo o nada” sino que por el contrario afecta únicamente a esa región.

6. Determinar y cuantificar, si lo hay, el movimiento de la vesícula antes de su fusión con la membrana. En función de tal cuantificación, determinar los posibles estados del grano (movimiento del grano desde citosol a la membrana, de la membrana a los lugares secretores o si está anclado y por tanto no sufre desplazamiento).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PREPARACIÓN CELULAR

1.1. Tipos de células

Para estudiar el proceso de exocitosis, así como el papel que desempeña el calcio en dicho proceso, estudiamos principalmente las células cebadas, también llamadas *mastocitos*. Se originan a partir de las células madre hematopoyéticas y juegan un importante papel en los procesos inflamatorios gracias a la liberación de mediadores que dirigen la acción de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. También pueden actuar como mediadores en reacciones alérgicas dependientes de Inmunoglobulinas E. Son fácilmente identificables al microscopio óptico por su aspecto granuloso y su núcleo diferenciado.

La elección de dicho tipo celular se fundamentó en la gran cantidad y adecuado tamaño de sus vesículas secretoras, $0.7 \pm 0.23 \mu\text{m}$ (media \pm desviación estándar) (Helander y Bloom, 1974). Por otra parte, la inexistencia de canales de

calcio permitiría un mayor control de los posibles cambios que se produjesen en la concentración de dicho ion en el citosol.

Fueron extraídas de ratas macho adultas (tres meses). Poseían un peso de 200-300 g y pertenecían a la cepa Wistar.

El tamaño de las vesículas permite una aceptable resolución espacial en la adquisición de imágenes, lo que queda especialmente patente cuando se tiñen con colorantes específicos que se unen a la membrana o con acidifílicos que se cargan en el interior vesicular.

1.2. Método de extracción de células cebadas

1.2.1. Obtención de células cebadas

Transcurrido el periodo de incubación de la solución de extracción, se anestesia la rata con cloroformo, se decapita con la guillotina y se desangra el animal para evitar que, durante el protocolo de extracción, aparezcan eritrocitos.

Ya desangrado, le inyectamos en la cavidad peritoneal, a través de la piel, la solución de extracción (15 ml). Procedemos a un suave masaje peritoneal durante un par de minutos para favorecer el desprendimiento de las células cebadas de la serosa peritoneal. Posteriormente, y con unas tijeras, se realiza un corte longitudinal en la piel abdominal para acceder a la cavidad peritoneal y, con una pipeta Pasteur, se aspira el líquido peritoneal. Para que la extracción haya sido exitosa, el líquido extraído será limpio y transparente.

Centrifugamos el líquido peritoneal (centrifugadora Sorvall RT6000B, Dupont, EE.UU.) en un tubo de ensayo durante 2 minutos a 800 r.p.m.

Transcurrido este tiempo, aparecerá un pellet blanquecino en el fondo del tubo. Se retira el sobrenadante, que es sustituido por solución de extracción fresca (12 ml), y se resuspenden las células. La cantidad de solución fresca añadida guarda una relación inversa a la concentración de células. En nuestro caso, el interés radicaba en una población con células suficientemente aisladas unas de otras, para que, al observar la fluorescencia de una célula, no existiesen interferencias o ruido debido a la fluorescencia de células vecinas.

1.2.2. Cultivo primario

En una camarita fabricada en metacrilato, y utilizando como fondo un cubreobjetos, se sembraron las células, depositando en cada una de ellas un volumen de 70 μl de la suspensión celular. Se mantuvieron durante una hora a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 y un 95% de aire. Este periodo de incubación permite que las células se adhieran al sustrato y no se muevan en el transcurso del experimento.

Si observamos la preparación al microscopio (Axiovert 35 Zeiss, Alemania), podemos distinguir, junto a las células cebadas, otros tipos celulares tales como los linfocitos o macrófagos. Sin embargo, los mastocitos, de apariencia circular, son fácilmente diferenciables del resto debido al aspecto rugoso de su superficie, consecuencia de la abundancia de vesículas secretoras, y por su destacado núcleo redondeado.

1.2.3. Incubación de mastocitos con indicadores fluorescentes

a) Fura-2 AM (acetoximetil). Una vez que las células, tras el periodo de incubación, están adheridas al sustrato, se añaden en las camaritas 20 μl de fura-2 AM (2.5 μM) y se mantiene el cultivo en la incubadora de 15 a 30 minutos. Durante este tiempo, el fluoróforo, presente en estado éster, atraviesa de forma pasiva la membrana celular.

En algunos casos, y para favorecer la entrada del fluoróforo al interior celular, se utilizó plurónico diluido en DMSO. La concentración final de fura-2 en este caso, fue de 4 μM , aunque en ocasiones se redujo dicha concentración a 2 μM . Transcurrido el periodo de incubación, se debe someter la preparación a un lavado con solución externa para eliminar restos del fluoróforo, que evitará una indeseable fluorescencia debida al colorante presente en el medio extracelular.

b) Quinacrina (6-Cloro-9[(-dietilamino)-1-metil-butil] amino-2-metoxi acridina; Mecrapina, de Sigma). Se realiza de forma similar al indicado con fura-2. Únicamente varía el tiempo de incubación que es de tan sólo 10 minutos, tiempo suficiente para que la quinacrina penetre al interior celular y tiña las

vesículas y en general todos los compartimentos ácidos. La cantidad de fluoróforo empleado debe ser mínima (5 μ l a 2 mM) para evitar daño celular.

c) FM1-43 AM (N-(3-trietilaminopropil)-4-(4-(dibutilamino) piridinium dibromidío, Molecular Probes). Diluimos inicialmente el colorante hasta 1mM en solución externa, y posteriormente, antes de los experimentos, se diluye de nuevo a 10 μ M. La tinción se realiza aproximando la punta de una micropipeta, llena con el colorante, a la superficie de la membrana celular. Una presión neumática positiva sobre la solución de la pipeta controla la cantidad de fluoróforo administrado al medio extracelular.

2. SOLUCIONES

Para todas las soluciones, el agua empleada la tratamos previamente con la técnica de ósmosis inversa (Milli-Ro 6 Plus, Millipore) y la desionizamos en resina de intercambio iónico (Milli-Q Plus, Millipore), con una resistividad de 18.2 M Ω /cm. Los reactivos químicos utilizados eran de Sigma. En el proceso de elaboración de las soluciones, se monitorizó el pH de las mismas con un Phmetro (MicropH 2002 Crison) calibrado previamente con disoluciones tampón pH 4 y pH 7.02. La osmolalidad de las soluciones fue medida con un osmómetro de presión de vapor (Wescor, Utah, EE.UU.).

2.1. Soluciones de extracción e incubación

En nuestro caso, para las células cebadas, las soluciones de extracción e incubación son las mismas. Para su preparación, añadimos a la solución externa estándar 45 mM de CO₃NaH, 2mM de tampón fosfato y 6 mM de glucosa. Se prepara fresca y se utiliza después de permanecer en un incubador (Forma Scientific 3862, EE.UU.) durante 1 hora a 37 °C, en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Bajo estas condiciones, la presión parcial del dióxido de carbono es de 38 mm de Hg y el pH final esperado, 7.69, de la solución carbonatada, es ligeramente básico. El pH se ajustó con NaOH a 7.25 y la omolalidad osciló entre 335-350 mmol/Kg.

En la tabla I, se muestra, de forma esquemática, la composición de la solución descrita anteriormente.

CINa	HEPES	KOH	Cl ₂ Mg	Cl ₂ Ca	CO ₃ HNa	PO ₄ HNa ₂	Glucosa
140	10	3	2	1	45	0.4	6

Tabla I. Composición de la solución de extracción (en mM).

2.2. Solución interna para inducir exocitosis en mastocitos

La composición de la solución interna estándar para dializar las células cebadas durante los experimentos de célula completa, queda reflejada en la tabla II. La degranulación de las células fue inducida por GTP γ -S (sal tetracloruro de 3-tiotrifosfato de guanosina), un nucleótido de guanina no hidrolizable que activa de forma irreversible la proteína G.

Glutamato Potásico	Cl ₂ C a	HEPES	KOH	Mg-ATP	EGTA-K ₂	GTP γ -S
125	7	10	3	0.2	0.07	0.005-0.1

Tabla II. Composición de la solución interna con la que se induce exocitosis (en mM).

3. MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS. PRINCIPIOS GENERALES

En este apartado se revisarán diferentes conceptos relacionados con la fluorimetría, y aunque algunos de ellos fueron ya descritos en tesis anteriores (Toledo-Aral, 1992; Marín-Caballeros, 1995) no queríamos dejar de señalarlos, con el fin de no perder la continuidad en la elaboración de la metodología seguida durante el proyecto de tesis.

3.1. Atributos de la microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una importante herramienta biofísica para el estudio de célula única y preparaciones *in vitro*. Algunas moléculas fluorescentes pueden incorporarse a células en las que se quieren conocer cambios fisiológicos del citosol, tales como pH, $[Ca^{2+}]$ o potencial de membrana.

Antes de pasar a describir con detalle la metodología y técnicas aplicadas en nuestros experimentos, definiremos algunos conceptos, relacionados con la fluorescencia y con la microscopía, que irán apareciendo a lo largo de este trabajo:

1. Especificidad. Es una propiedad selectiva por la cual las moléculas fluorescentes absorben y emiten luz únicamente a unas determinadas longitudes de onda.

2. Sensibilidad. Define el número de moléculas fluorescentes que pueden ser detectadas. Con microscopía de fluorescencia, pueden ser detectadas, aproximadamente, cincuenta moléculas en un micrómetro cúbico.

3. Espectroscopía. Estudia la dispersión de un conjunto de radiaciones y las clasifica en función de sus frecuencias.

Las moléculas fluorescentes pueden ser diseñadas para ser extremadamente sensibles al entorno físico-químico. Existe una gran variedad de parámetros espectroscópicos que se pueden utilizar para medir propiedades químicas y moleculares como el pH, la concentración de calcio libre, el potencial de membrana, la hidrofobicidad, la distribución de carga, la microviscosidad, las distancias moleculares, los coeficientes de difusión y las orientaciones moleculares.

4. Resolución temporal. Este parámetro define el intervalo de tiempo necesario entre dos eventos para que ambos sean registrados. La medida de la fluorescencia está limitada por la resolución temporal de aquellos eventos que ocurran con una frecuencia igual o más grande que el inverso del tiempo transcurrido entre la absorción y la emisión de luz. De esta forma, es posible detectar y medir procesos biológicos que ocurren a una frecuencia del orden de 10^8 segundos⁻¹ o menores.

5. Resolución espacial. Determina la distancia mínima necesaria para que dos elementos observados puedan ser identificados, sin ser confundidos como un único elemento. La resolución de diferentes estructuras está limitada al poder de resolución de la luz en el microscopio, que es función tanto de la apertura numérica del objetivo como de la longitud de onda de emisión.

3.2. Bases físicas de la fluorescencia

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia en el que la luz es emitida por moléculas durante un corto periodo de tiempo, después de llevarse a cabo una absorción de luz. La absorción de un fotón provoca la excitación de un átomo de un estado energético inicial, a otro superior. Si el proceso es reversible, es decir, vuelve al estado inferior a través de una serie de saltos correspondientes a niveles energéticos intermedios, se emiten tantos fotones como niveles energéticos sean necesarios para volver al estado energético inicial.

Cuando el retraso entre la absorción y la emisión es aproximadamente de 10^{-8} segundos o menos, se produce lo que se denomina *fluorescencia*, mientras que si es mayor que esta cantidad lo conocemos como *fosforescencia*.

Cuando la luz interacciona con la materia, puede ser dispersada (luz difractada) o absorbida. La absorción de la luz ocurre en cantidades discretas llamadas *quanta*. La energía de un quantum está dada por:

$$E = \hbar \cdot \nu = \hbar \cdot c / \lambda \quad (1)$$

donde “ \hbar ” es la constante de Planck, “ c ” es la velocidad de la luz en el vacío, “ λ ” es la longitud de onda de la luz y “ ν ” es la frecuencia de vibración de la luz.

La potencia de la luz en vatios se define como la cantidad de energía producida por unidad de tiempo, es decir,

$$P = dW/dt = F \cdot dr/dt = F \cdot v \quad (2)$$

Las unidades en que se mide la potencia en el sistema MKS, CGS y en función de sus unidades fundamentales son respectivamente,

$$1 \text{ W} = 1 \text{ Julio/seg} = 10^7 \text{ ergios/seg} = 1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^2/\text{seg}^3$$

La potencia por unidad de sección transversal está definida como la intensidad (I) o irradiación, tal que:

$$I = W/\text{cm}^2 \quad (3)$$

Cuando un quantum de luz es absorbido por una molécula, un electrón pasa a una órbita de mayor energía, es decir, a un estado excitado. Cuando este electrón vuelve a su original nivel energético, se emite un quantum de luz. Un átomo puede absorber un fotón si y sólo si su energía $\hbar \cdot \nu$ corresponde a la diferencia de energía entre un nivel energético ocupado del átomo y un nivel excitado disponible.

En la fig. 1 se muestran dos niveles energéticos E_1 y E_2 . La diferencia entre dichos niveles sería la energía necesaria para provocar la transición al estado excitado.

El espectro de absorción de una molécula depende del número de posibles niveles energéticos que puede tener la molécula. En la fig. 2, se representan dos posibles estados energéticos del electrón, así como su posible transición de un estado de mínima energía, a un estado de excitación energética. Dentro de un mismo nivel energético (representado por S o por G), el electrón puede poseer diferentes subestados debido a su energía vibracional (líneas horizontales).

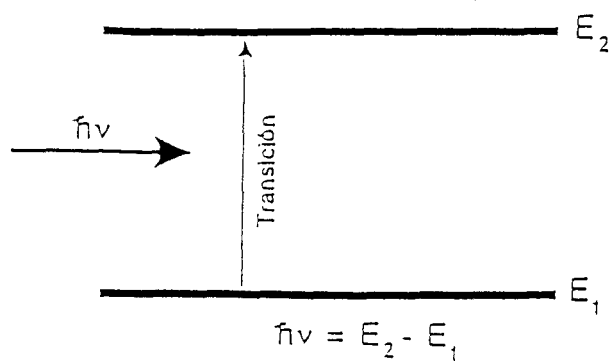


Fig. 1. La flecha horizontal indica la energía absorbida correspondiente a un fotón, y la vertical, la transición de un estado energético a otro superior.

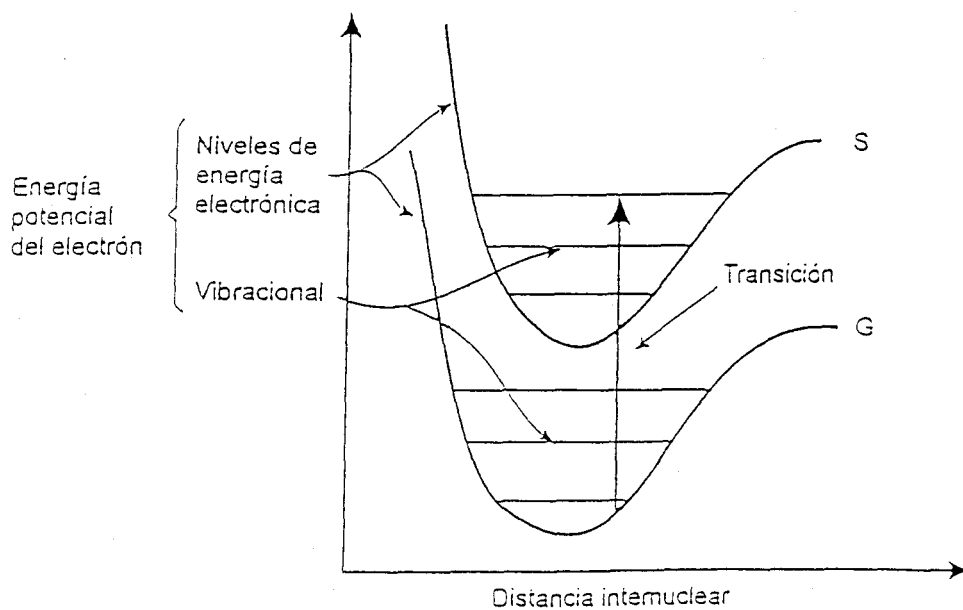


Fig. 2. Diagrama de la energía potencial del electrón, en estado basal, G, y excitado, S.

La absorción ocurre sólo en longitudes de onda de la luz cuyo quantum energético es equivalente a la diferencia de energía entre la tierra y el estado excitado. Para un átomo, hay pocos niveles energéticos posibles, y la absorción de luz ocurre sólo en longitudes de ondas discretas de equivalente energía luminosa.

La fluorescencia ha sido descrita como un proceso de relajación que comienza con la absorción de la luz y acaba con su emisión. La longitud de onda de la fluorescencia emitida es generalmente mayor que la longitud de onda de la luz absorbida (ley de Stokes) debido a que la energía absorbida es mayor que la emitida.

Como,

$$E_1 = \hbar \cdot \nu_1 = \hbar \cdot c / \lambda_1$$

$$E_2 = \hbar \cdot \nu_2 = \hbar \cdot c / \lambda_2$$

si,

$$E_1 > E_2$$

entonces,

$$\lambda_1 < \lambda_2$$

ya que la energía es inversamente proporcional a la longitud de onda.

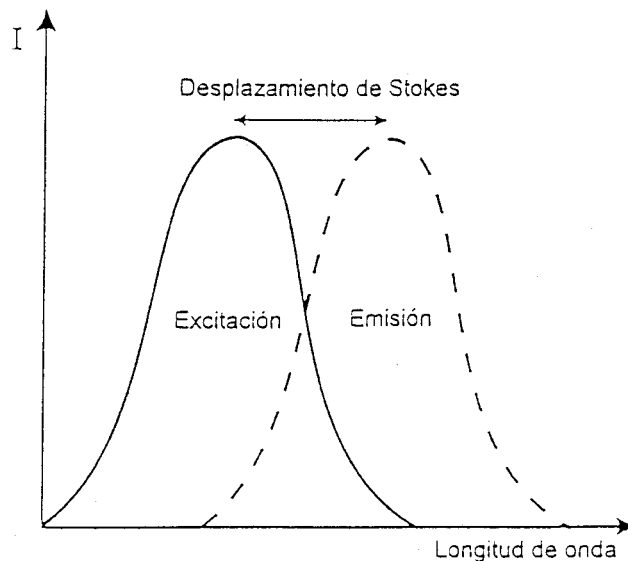


Fig. 3. Espectro de excitación y emisión de una molécula fluorescente. El desplazamiento observado obedece a la ley de Stokes, por la cual la energía absorbida es mayor que la emitida y por tanto la λ de excitación es menor que la de emisión.

3.2.1. Reversibilidad del proceso de excitación

La fluorescencia es una de las posibles vías de la reversibilidad del proceso de excitación, mediante el cual un electrón, en estado excitado, aporta una energía al volver a su estado original.

Definimos el periodo de vida de la fluorescencia como el tiempo medio que una molécula permanece en el estado excitado. El tiempo requerido en el proceso de absorción ($\sim 10^{-15}$ segundos) es instantáneo respecto al periodo de vida de la fluorescencia ($\sim 10^{-8}$ segundos). La fluorescencia, y como consecuencia, la emisión de luz, se retrasa alrededor de 10^{-6} segundos si el electrón excitado se traslada a un estado prohibido antes de volver al estado inicial.

La fosforescencia comienza con una transición al estado prohibido. En contraste con el retraso de la fluorescencia, la emisión ocurre mediante la transición del electrón excitado desde un nivel energético inferior, al estado original. La fosforescencia tiene un periodo de vida mucho más prolongado en el estado excitado (varios segundos) y el espectro de emisión se traslada al rojo en comparación con la fluorescencia.

Existen otras alternativas a esta reversibilidad, como la emisión no radiativa: la energía del electrón excitado puede ser disipada por interacción con otras moléculas.

3.2.2. Relación entre la fluorescencia y la concentración del colorante

La intensidad de fluorescencia de una solución es directamente proporcional a la concentración del indicador fluorescente. Sin embargo, en altas concentraciones, la intensidad de la fluorescencia puede decrecer. Hay tres razones principales que pueden explicar este fenómeno. La primera de ellas se debe al efecto del filtro interno, que ocurre cuando la luz de excitación no penetra a través de la muestra debido a la absorbancia de la misma. De esta forma, todos los fluoróforos no tienen la misma absorbancia. Esto puede ocurrir en muestras muy gruesas y/o muy concentradas.

La fluorescencia puede también decrementarse para altas concentraciones del fluoróforo debido a la formación de dímeros en el estado no excitado o de dímeros formados únicamente en el estado excitado (excímeros). Habitualmente, estos complejos causan un apagamiento de la fluorescencia (“quenching”). De manera adicional, puede ocurrir que se produzca un fenómeno de reabsorción del espectro de emisión, de manera que se solapa con el de excitación.

La presencia del efecto de la concentración puede ser valorada experimentalmente, incrementando y decrementando la concentración de la sonda fluorescente utilizada. Un síntoma inequívoco de que la concentración añade un artefacto es la medida del incremento de la fluorescencia cuando se decreta la concentración del fluoróforo.

3.2.3. Naturaleza de las sondas fluorescentes

La autofluorescencia es la fluorescencia que se produce de forma natural en moléculas de ciertas células. La mayoría de la autofluorescencia en células excitadas de mamíferos, producida cerca de las regiones ultravioleta y azul del espectro, es debida a las coenzimas NADH, riboflavina y flavina. Cambios en la autofluorescencia han sido utilizados para medir reacciones moleculares en el transporte electrónico mitocondrial (Kohen et al., 1981). Sin embargo, la fluorescencia ocurrida de forma natural se estudia menos en biología molecular que la fluorescencia debida a fluoróforos exógenos. De hecho, la autofluorescencia es una gran fuente de ruido en muchos experimentos.

Los fluoróforos o fluorocromos son colorantes fluorescentes que se añaden a las células. Son elegidos o sintetizados, según diferentes criterios, para aplicaciones particulares. Estos criterios incluyen espectros de absorción y emisión, coeficiente de extinción, rendimiento cuántico, efectos en el entorno y reactividad química.

Actualmente existe un gran número de fluoróforos diseñados para conocer el comportamiento de diferentes iones (ver Tsien, 1989 a y b; Valdeolmillos y Eisner, 1991). De todos ellos, los más empleados son los que permiten conocer la

variación o concentración del ion Ca^{2+} o del pH. Los utilizados en este trabajo son los siguientes:

a) *Fura-2*. Es uno de los más conocidos y utilizados para conocer la concentración de calcio. Se presenta en forma sal o éster. Fue desarrollado por el Dr. Roger Tsien y sus colegas (Grynkiewicz, Ponie y Tsien, 1985) y procede del BAPTA, 1,2-bis-(2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-ácido tetraacético, quelante selectivo al calcio, no fluorescente.

Cuando se utiliza en estado éster (acetoximetil, AM), sus moléculas atraviesan pasivamente la membrana celular debido a su naturaleza hidrofóbica, y una vez en el citosol, los grupos ésteres son enzimáticamente hidrolizados, generando la forma ácida libre cargada, la cual puede unir calcio de manera que la probabilidad de difundir libremente fuera de la célula se hace muy pequeña. En la fig. 4 se muestra su estructura química antes y después de ser hidrolizado por las esterasas intracelulares.

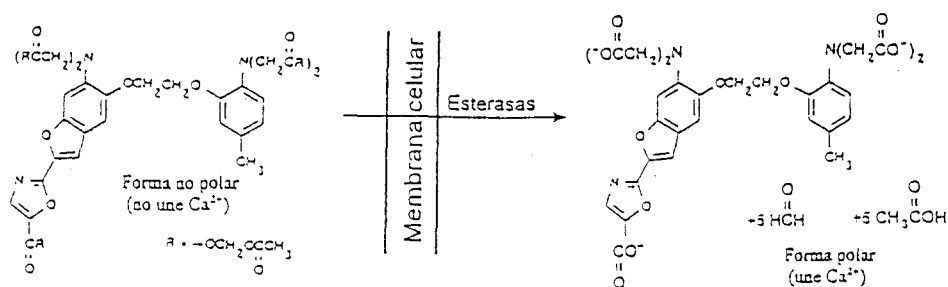


Fig. 4. Diagrama esquemático del proceso relacionado con la carga de fura-2 AM en la célula, en el que se observa su estructura química, antes y después de atravesar la membrana celular. Es importante destacar la formación de ácido acético y formaldehído, potencialmente tóxicos.

La constante de disociación, K_B , de la unión del Ca^{2+} al fura-2 suele estar en el rango de 135 a 224 nM (Grynkiewicz y col., 1985). La emisión del fura-2 es de color verde y sus picos de intensidad se sitúan en el rango de 505-520 nm. Si la longitud de onda de excitación es de 380-390 nm, la intensidad de la fluorescencia

es inversamente proporcional a la concentración, mientras que para 345-360 nm, la relación es directamente proporcional.

En la fig. 5 se muestra el espectro de emisión del fura-2. Una característica interesante mostrada en la gráfica es el punto isobéptico. Dicho punto representa un valor constante de la intensidad para diferentes concentraciones del ion.

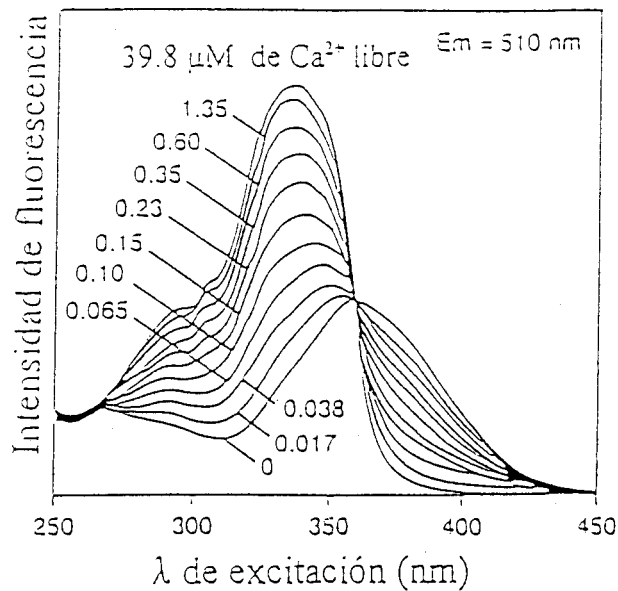


Fig. 5. Espectro de emisión del fura-2. Se representa gráficamente la variación de la intensidad luminosa en función de la longitud de onda de excitación y de la concentración de Ca^{2+} .

Entre las ventajas más destacable del fura-2 está la escasa fotólisis que presenta, de forma que la fluorescencia de la muestra perdura durante un tiempo prolongado, pudiendo llegar en algunas ocasiones a media hora.

En cuanto a las desventajas, podemos citar que en algunos tejidos la hidrólisis no es completa (Highsmith y col., 1986; Scanlon y col., 1987), que se puede producir una compartimentalización en organelos (Almers y Neher, 1985; Malgaroli y col., 1987; Steinberg y col., 1987) y, por último, que en algunos casos las moléculas de fura-2 son devueltas al medio extracelular mediante mecanismos de transporte iónico (DiVirgilio y col., 1988).

La compartimentalización ocurre cuando, al cargar la célula, la distribución del indicador fluorescente no es homogénea, sino que, por el

contrario, se acumula en organelos. Este fenómeno es más acusado a altas temperaturas.

b) *Fluo-3*. Como el anterior, se diseñó para ser utilizado en la medición del Ca^{2+} intracelular. Fue desarrollado por Tsien y colaboradores y precisa fuentes de excitación con espectros en el rango de la luz visible.

Su principal característica es presentar escasa fluorescencia en ausencia de Ca^{2+} , mientras que al unir dicho ion aumenta de 100 a 200 veces. Para concentraciones de Ca^{2+} libre en el citosol, bajo condiciones normales, y el colorante en saturación, el aumento de fluorescencia es del orden de 5 a 10 veces, lo cual hace que el uso del Fluo-3 esté especialmente indicado para medir la cinética de los transientes de Ca^{2+} . En la fig. 6 se muestra la dependencia respecto al Ca^{2+} del espectro de emisión.

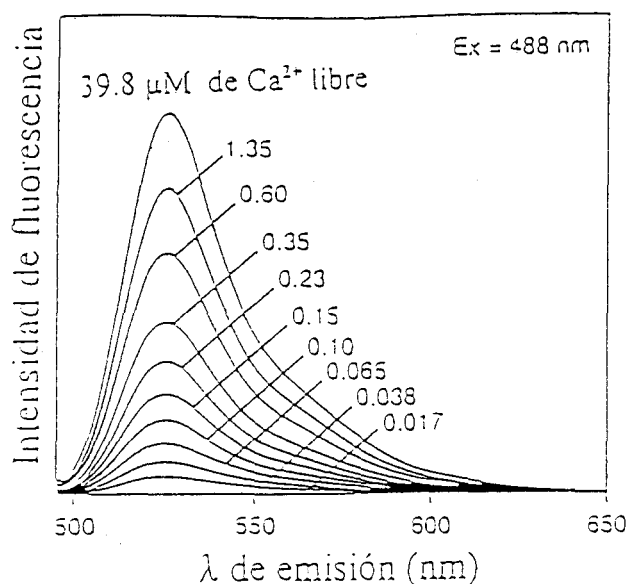


Fig. 6. Espectro de emisión del Fluo-3 en función de la concentración de Ca^{2+} . Es destacable el importante aumento de intensidad respecto a cambios de concentración.

c) *Quinacrina*. A diferencia de los anteriores fluoróforos, éste no es quelante de calcio. La propiedad que lo caracteriza, y que lo hizo especialmente útil en nuestros experimentos, es su localización selectiva en aquellos organelos que poseen carácter ácido, tales como los granos secretores que tienen un $\text{pH}=5.5$.

Por este motivo, las células cebadas, después de incubarlas con quinacrina, presentan una extraordinaria emisión de fluorescencia irradiada desde el interior de las vesículas.

El inconveniente observado fue el daño celular provocado por este fluoróforo cuando se sometía a una prolongada excitación (fototoxicidad), por lo cual es imprescindible el uso de obturadores que reduzcan la excitación únicamente al tiempo que perdura la exposición al detector.

c) *FM1-43*. Este fluoróforo es un marcador de membrana frecuentemente utilizado para estudiar los procesos de endocitosis y exocitosis. En neuronas tratadas con este fluoróforo, éste se internaliza cuando las vesículas sinápticas son recicladas en el proceso exocitótico.

Es un colorante no tóxico soluble en agua, en cuyo medio no presenta fluorescencia, pero que al unirse a la cara externa de la membrana celular adquiere dicha propiedad. Los primeros en utilizar este fluoróforo fueron Betz y colaboradores (Betz y col., 1992a), que observaron las vesículas en terminales nerviosos.

El esterilpiridinium FM1-43 ha sido empleado como marcador en investigaciones sobre el reciclado sinaptosomal en diferentes especies. También facilita el estudio de mutaciones ocurridas en el reciclado de vesículas sinápticas.

Recientemente, Charles F. Stevens y Venkatesh N. Murthy emplearon este colorante para cuantificar la intensidad de fluorescencia por vesícula durante los procesos de endocitosis (internalización de la membrana y, por tanto, del colorante) y exocitosis en neuronas del hipocampo.

El juego de lentes para la fluoresceína es óptimo para utilizarse con este colorante, ya que sus picos de absorción y emisión están próximos a los que presenta el FM 1-43. En la fig. 7 se representa en el mismo diagrama el espectro de absorción y emisión de este indicador.

Su estructura química posee un grupo lipofílica (cola) que se une a un grupo piridinium cargado catiónicamente (cabeza) mediante un doble enlace (núcleo). La cola lipofílica consta de dos cadenas hidrocarbonadas alifáticas. La cola del FM1-43 contiene de 1 a 18 átomos de carbono que hacen que el brillo de

la señal sea reversible mediante lavado. La cabeza del colorante es una importante determinación de su permeabilidad respecto a la membrana.

La λ de emisión del colorante es determinada en el núcleo (formado por dos anillos aromáticos y un puente de doble unión), y no le afectan ni la longitud ni la naturaleza de la cabeza y cola de la estructura química. Los colorantes con mayor número de enlaces dobles tienen mayor longitud de onda de excitación y emisión. La emisión del FM1-43 es amarillo-anaranjada.

Durante la aplicación del FM1-43 se ha observado que se bloquean reversiblemente los receptores de acetilcolina en músculo de rana (Bewick GS, Betz WJ 1994). Por otra parte, este colorante exhibe diferentes propiedades espectrales en diferentes tipos celulares.

Este fluoróforo presenta una gran fotoestabilidad (Grinvald A., Frostig RD, 1988), aunque presenta extinción fotónica para largos periodos de exposición (Betz WJ, Mao 1992; Liu G, Tsien RW, 1995). También para largas exposiciones se observa fototoxicidad.

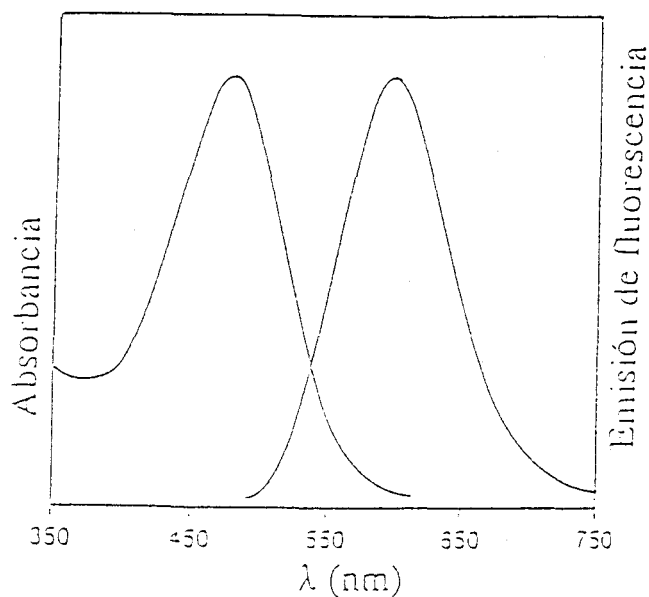


Fig. 7. Espectro de absorción y emisión del FM 1-43. Presenta los picos espectrales en 479 nm y 598 nm respectivamente.

3.2.4. Parámetros de las sondas fluorescentes

El coeficiente de extinción ϵ y el rendimiento cuántico ϕ , así como la vida media τ , son los tres parámetros básicos que definen la fluorescencia de un colorante. El coeficiente de extinción indica la probabilidad de absorción. Un gran coeficiente de extinción indica que existe una alta probabilidad de absorción. Como consecuencia, si existe una alta probabilidad de absorción para moléculas fluorescentes, entonces hay también una alta probabilidad de emisión, ya que la vida media es inversamente proporcional a la probabilidad de absorción.

El rendimiento cuántico mide la eficacia de la fluorescencia en relación con todas las posibles formas por las que un electrón en estado excitado vuelve a su estado original. El rendimiento puede ser expresado como el cociente entre el número de quanta emitidos y el número de quanta absorbidos.

La intensidad de fluorescencia es también función del rendimiento cuántico:

$$I_{\text{fluorescencia}} = I_0 \cdot \phi \cdot \epsilon \cdot C \cdot l \quad (4)$$

donde " I_0 " es la intensidad de luz incidente, " C " es la concentración de la sustancia y " l " es el espesor atravesado por la luz.

La vida media de fluorescencia τ es el tiempo medio que una molécula permanece en el estado excitado. La vida media intrínseca τ_0 es la máxima vida media posible. Esto ocurre cuando ϕ es máximo.

3.2.5. Extinción fotónica de la fluorescencia

La extinción fotónica, o fotoblanqueo, se define como la permanente destrucción de la fluorescencia por una conversión, inducida por la luz, del fluoróforo a otro compuesto no fluorescente. Este proceso requiere, además de luz, oxígeno molecular en la mayoría de los fluoróforos utilizados. La magnitud de estas consecuencias adversas es función del número de moléculas fluorescentes excitadas por la señal luminosa.

Se han utilizado dos técnicas para evitar este daño: eliminar el oxígeno y reducir la intensidad y duración de la iluminación. En la práctica, este último método suele ser el más viable, ya que quitar oxígeno no es una buena solución cuando se estudian células vivas, por lo que la única opción es regular la luz.

Al ser la extinción fotónica proporcional a la integral del flujo luminoso de excitación, se debe balancear la intensidad de iluminación y su duración para adquirir la imagen con el mínimo daño a la preparación. Ésta es la principal razón por la que se utilizan obturadores frente a la fuente luminosa. Gracias a este procedimiento, nos aseguramos de iluminar la muestra sólo durante el tiempo que dura la medida.

La excitación de baja irradiación durante periodos relativamente largos de tiempo es utilizada con intensificadores de imágenes, mientras que para cámaras CCD (Charge Coupled Device) se utilizan irradiaciones altas durante un breve periodo de tiempo.

La generación de compuestos tóxicos (incluyendo radicales libres durante la extinción fotónica) es un problema adicional. La solución a estos problemas conlleva elegir fluoróforos fotoestables, decrementar la iluminación disminuyendo el número y duración de los periodos y aumentar la sensibilidad del detector.

3.3. Elección del microscopio: conceptos básicos

El principio fundamental en el diseño de un microscopio de fluorescencia es maximizar la adquisición de luz fluorescente mientras se minimiza la luz de excitación. Además, se debe tener en cuenta que la intensidad de fluorescencia es normalmente de varios órdenes de magnitud más pequeña que la intensidad de iluminación. Las imágenes de fluorescencia deben ser registradas usando videocámaras que capten bajos niveles de luz o bien cámaras CCD digitales, que son convenientemente enfriadas a muy bajas temperaturas con la finalidad de evitar ruido eléctrico. El contraste de la imagen depende, críticamente, de la habilidad del microscopio para dejar pasar luz de fluorescencia al detector mientras bloquea temporalmente la excitación luminosa.

La sensibilidad y contraste de la microscopía de fluorescencia depende de la configuración óptica, de la iluminación, del camino óptico de la luz y de los componentes del microscopio.

La microscopía de fluorescencia es similar a la microscopía estándar. Su diferencia básica radica en el tipo de iluminación. Hay tres tipos básicos de iluminación en la microscopía de fluorescencia: iluminación mediante luz transmitida con apertura completa, transiluminación en campo oscuro e iluminación mediante luz incidente.

a) Iluminación mediante luz transmitida con apertura completa. La microscopía de fluorescencia puede llevarse a cabo a partir de un microscopio convencional, insertando filtros de excitación entre el iluminador y el condensador, así como filtros de emisión (también llamados *filtros de supresión*) entre el objetivo y el elemento de registro. Los filtros de excitación son de paso de banda con el propósito de dejar pasar la luz en el espectro de absorción del fluoróforo, mientras que bloquean la luz para longitudes de onda mayor que el espectro de fluorescencia.

En contraste, los filtros de emisión se eligen para dejar pasar la luz del espectro de emisión mientras bloquean la luz del espectro de excitación.

La ventaja de este tipo de iluminación radica en las sencillas modificaciones que se deben practicar en un microscopio convencional. Las desventajas son que incluye la posible presencia de efectos de filtrado en muestras gruesas y la dificultad de alinear el condensador y el objetivo.

b) Iluminación en campo oscuro. Hasta alrededor de 1970, el problema de eliminar la luz de excitación fue resuelto primariamente usando configuración de iluminación en campo oscuro. Un condensador de campo oscuro produce un cono anular de iluminación cuya apertura es mayor que la apertura del objetivo. El contraste de la imagen era superior que con objetivos de iluminación de apertura completa, usando los filtros de excitación y de emisión disponibles en esa década.

La mayor desventaja de este diseño es que la eficiencia de adquisición de la fluorescencia de emisión, a través del objetivo, se reduce considerablemente. Aquellos especímenes que tienen una débil fluorescencia son difíciles de detectar, y la adquisición de la luz emitida por la preparación depende de la apertura numérica del objetivo en el orden de la segunda potencia.

Para la luz de excitación en campo oscuro, la apertura del objetivo debe ser menor que la apertura de iluminación. Se deben utilizar objetivos con apertura de diafragma, la cual no suele ser mayor de $NA=0.7$. Por lo general, se considera $NA=1.4$ ya como una buena calidad de objetivo. La reducción en la intensidad de fluorescencia es en este caso $(0.7/1.4)^2=0.25$. Esta reducción es el mayor inconveniente para la detección y medida cuando hay una débil fluorescencia, aunque conlleva la prevención de la extinción fotónica.

c) Iluminación mediante luz incidente o epiiluminación. Los problemas de iluminación y contraste fueron óptimamente resueltos a finales de los 60, mediante la modificación de iluminadores verticales, añadiendo nuevos filtros de interferencia (Ploem, 1967).

Como se observa en la figura, la epiiluminación ocurre a través del objetivo. El objetivo es a la vez condensador y objetivo. El nuevo componente del sistema es un espejo llamado *dicróico*. Este espejo posee una capa que le infiere un gran poder de reflexión a 45° para las longitudes de onda transmitidas por el filtro de excitación mientras que tiene una alta transmitancia para las longitudes de onda del filtro de emisión. En la fig. 8 se muestran las dos circunstancias posibles en relación con la incidencia de la luz sobre el espejo dicróico. En el caso a), la luz de excitación es reflejada, ya que posee una λ menor que la característica de corte del dicróico, mientras que en b), la luz de emisión se transmite al tener una λ mayor.

En epiiluminación con apertura completa del objetivo, y en combinación con filtros de excitación y emisión, se obtiene un excelente contraste en preparaciones que tengan una débil fluorescencia. Al utilizar el objetivo como

condensador, es fácil la alineación. Además, la fluorescencia para gruesos especímenes es más brillante que en luz transmitida.

Una importante ventaja de la epiiluminación es que puede ser combinada con métodos convencionales de transiluminación tales como contraste de fase, polarización y contraste diferencial.

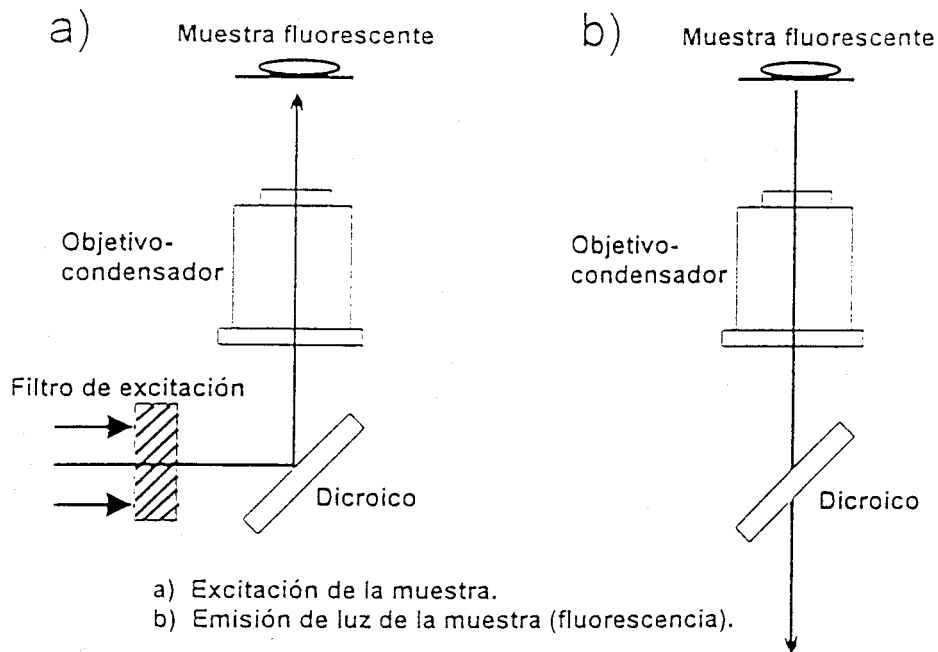


Fig. 8. Esquema de la epiiluminación. a) Luz de excitación. b) Luz de emisión. El objetivo hace de condensador. El dichroico posee distintas propiedades de reflexión y transmisión dependiendo de la λ de la luz incidente.

3.3.1. Iluminación de Koehler

El camino de la luz incidente es diseñada de acuerdo a los principios de Koehler. En la iluminación de Koehler, la imagen de la fuente de luz (L) es focalizada en el iris del diafragma (L') que es también conjugado a la entrada de la pupila (L''L''') del objetivo (Obj), mientras que la imagen del diafragma de campo

(FD) es focalizada en el plano del espécimen (SP). Cuando el diafragma de campo está focalizado en el plano del espécimen, la imagen de la fuente de luz está fuera de foco. Esta disposición produce luz uniforme del campo del espécimen a pesar de la desigual intensidad luminosa típica de la mayoría de las fuentes luminosas. El diafragma de campo controla el tamaño del área iluminada del espécimen sin afectar la intensidad del área iluminada. El diafragma del iris controla el tamaño de la fuente de luz proyectada en la pupila de la entrada del objetivo. Abriendo y cerrando el diafragma del iris, se incrementa y decrementa la intensidad de iluminación del espécimen sin afectar el tamaño del campo iluminado. Si el diafragma del iris no está incluido en el diseño de la iluminación, entonces la intensidad de iluminación del espécimen es ajustada insertando filtros de densidad neutra en el camino de iluminación en la adecuada posición donde la imagen de la superficie de los filtros estará fuera de foco en el plano del espécimen.

En la fig. 9 se esquematiza la iluminación de Koehler. En el diagrama, A, B y C son lentes, el filtro de excitación es EX, el espejo dicróico se representa por DM, y BF es el filtro de supresión. Los planos conjugados del espécimen son O, SP, O' y O'' mientras que para la lámpara se emplea la notación L, L', L'', L''' y L''''.

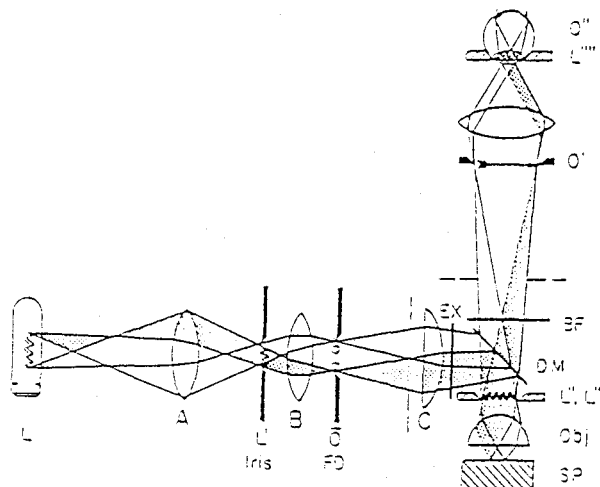


Fig. 9. En el diagrama se muestra un esquema de iluminación de epifluorescencia empleado en la microscopía de fluorescencia. El diafragma de campo (FD) está conjugado con el espécimen, mientras que la imagen del filamento de la lámpara o arco (L) lo está con la parte posterior del plano focal del objetivo (L'', L'''). A esta relación se le conoce como iluminación de Koehler.

3.3.2. Fuentes luminosas y obturadores

Los obturadores son críticos en la microscopía de fluorescencia. Una continuada iluminación del espécimen puede reducir su fluorescencia debido a la extinción fotónica, además de no ser muy saludable para las células.

Por otra parte, la fluorescencia no es deseable cuando se observa el espécimen mediante transiluminación. Habitualmente se sitúa un obturador mecánico con el fin de controlar el paso de luz. Estos obturadores (Uniblitz, Vincent Associates, Rochester, New York) permiten regular la iluminación mediante control remoto.

Existen diferentes tipos de lámparas de luz blanca así como láseres que frecuentemente son utilizados en microscopía de fluorescencia. Cuando tomamos la primera opción, debemos observar estas diferentes características:

- el espectro de radiación de la lámpara;
- el tamaño del filamento o arco comparado con área del plano focal del objetivo (condensador en epiiluminación);
- estabilidad de la fuente de luz a lo largo del tiempo y del espacio;
- uniformidad de la iluminación del campo;

Las lámparas pueden ser caracterizadas en términos radiométricos por la densidad de radiación espectral (B_l). Esta medida física es independiente de la sensibilidad visual humana, y es específica para cada lámpara. Una porción del área de la superficie luminosa de una lámpara emite luz con un ángulo sólido que posee un particular rango espectral:

$$B_l = f/(FwDl) \quad (5)$$

donde f es el flujo radiante en vatios, F es el área de la superficie luminosa en cm^2 , w es el ángulo sólido del cono de luz emitido en esterradianes, y Dl es el ancho de banda espectral seleccionado en nanómetros. B_l viene expresada en las siguientes unidades: $\text{Wcm}^{-2}\text{sr}^{-1}\text{nm}^{-1}$

Este valor representa el flujo radiante por unidad de área, unidad de ángulo sólido y unidad de ancho de la banda espectral. El valor absoluto dependerá de la

forma en que se ajuste el microscopio. El flujo radiante es determinado por el tamaño de la superficie luminosa seleccionada por el diafragma del iris de la epiiluminación. El ángulo sólido del cono de luz emitido es determinado por la apertura numérica (NA) de la lente del iluminador. El ancho de banda del espectro es determinado por los filtros y/o monocrómetro empleado.

La luz emitida por la lámpara se ajusta con un buen colector situado de forma que el filamento o arco esté cerca de su principal punto focal. En la iluminación de Koelher el colector hace de fuente de luz secundaria. Una imagen del filamento o arco debe ser proyectada sobre el plano focal del objetivo, que sirve de condensador, durante la excitación en epiiluminación. El filamento o arco llena la apertura del objetivo para maximizar la radiación y asegurar una iluminación uniforme del campo mediante la iluminación de Koelher. En ocasiones se coloca frente a la lámpara un cristal para maximizar la iluminación uniforme, especialmente con lámparas de arco que tienden a producir puntos de gran intensidad luminosa.

La iluminación del espécimen debe ser constante en el tiempo y en el espacio. La estabilidad de la fuente de luz también es crítica para asegurar la precisión de la medida. La inestabilidad a lo largo del tiempo refleja las fluctuaciones temporales de la radiación de la lámpara y es derivada primariamente de la variación en el suministro eléctrico de la lámpara. La inestabilidad de la lámpara en el espacio es detectada a menudo en lámparas de arco, y se caracteriza por fluctuaciones en la iluminación. Esta vibración ocurre cuando diferentes elementos de la superficie de la lámpara de arco presentan diferentes fluctuaciones de la migración del plasma a través de los electrodos. Estas variaciones espaciales pueden ser debidas a pequeñas alteraciones de la resistencia de los electrodos, fluctuaciones en la potencia suministrada y/o vibraciones mecánicas.

Las fuentes de luz basadas en un filamento son muy estables, especialmente cuando funcionan a una corriente constante. Por el contrario, las lámparas de arco son inherentemente más inestables. Gracias al funcionamiento de las lámparas de arco en DC, se ha podido aumentar su estabilidad

considerablemente. Se ha demostrado que en las lámparas de arco, a menor distancia entre electrodos, mayor estabilidad. De la misma forma, una lámpara de arco de xenón es más estable que una de mercurio. Añadir un pequeño porcentaje de xenón a una lámpara de arco de mercurio hace que ésta aumente su estabilidad (Oriel, Stratford, Connecticut). Las lámparas de arco tienen un proceso de envejecimiento en el cual el metal se deposita gradualmente en la superficie de la bombilla, lo cual se puede apreciar a simple vista.

Resumiendo, debemos seguir los siguientes pasos para optimizar el sistema:

1. Seleccionar la fuente de luz y el condensador adecuados, para que el plano focal del objetivo se rellene con la imagen del filamento u arco.
2. Tener precaución en que la radiación de la lámpara sea estable en el espacio y en el tiempo.
3. El microscopio deberá, finalmente, ser ajustado mediante la iluminación de Koeler.

3.3.3. Fuente de luz blanca

Basándonos en las características de las lámparas descritas anteriormente, se utilizan diferentes tipos de luz blanca en microscopía de fluorescencia. La elección depende del espectro de radiación de excitación sobre el rango de longitudes de onda requerido y la estabilidad requerida de la radiación. Las principales lámparas son de: tungsteno, halógeno-cuarzo, 50-100W de arco de mercurio y 75W de arco de xenón.

3.3.4. Láser

La utilización de láseres nos asegura estabilidad y una intensa luz monocromática. Hay dos picos de intensidad principales en un láser de ion argón, uno en 488nm y otro en 514nm. La emisión del láser puede tener una de las líneas o ambas sintonizando una determinada frecuencia resonante del láser. La línea de 488 es ideal para excitar la fluoresceína. La línea de 514 se utiliza para excitar la rodamina.

En general, se utilizan diferentes tipos de láser para distintos espectros de emisión. Los láseres de gran potencia y con una buena estabilidad de la fuente luminosa, son relativamente caros y difíciles de mantener.

Actualmente, el láser es una fuente de luz ideal para su aplicación en microscopía de fluorescencia y más particularmente en microscopía confocal.

4. SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

El sistema de adquisición de imágenes montado en nuestro laboratorio, está formado por un microscopio invertido dotado de iluminación de fluorescencia (Axiovert-35, Carl-Zeiss, Oberkochen, Alemania), una cámara CCD (MCD220, SpectraSource Instruments, California, USA), una tarjeta convertidora analógico-digital (AT-MIO-16, National Instrument, Texas, USA) y un PC con un microprocesador Pentium a 133 Mhz con 16 Mb de memoria RAM y 1.2 Gb de disco duro. Ver fig. 10.

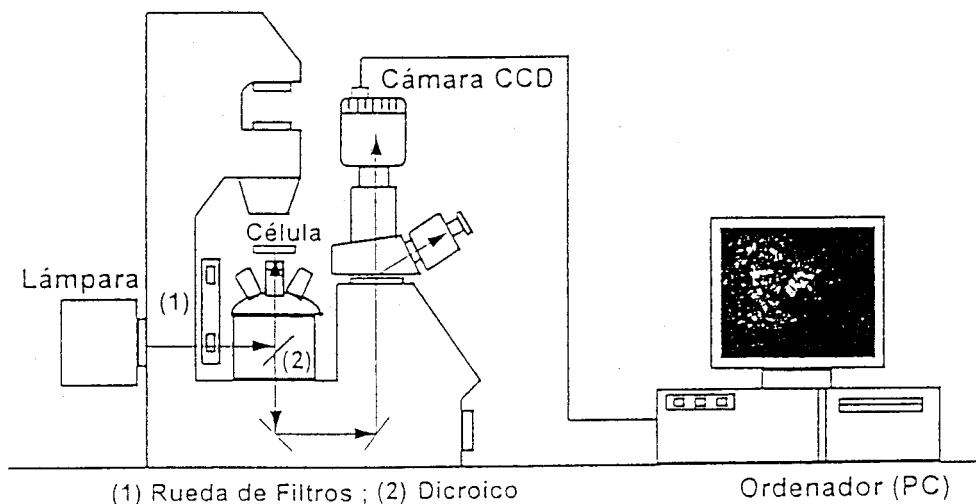


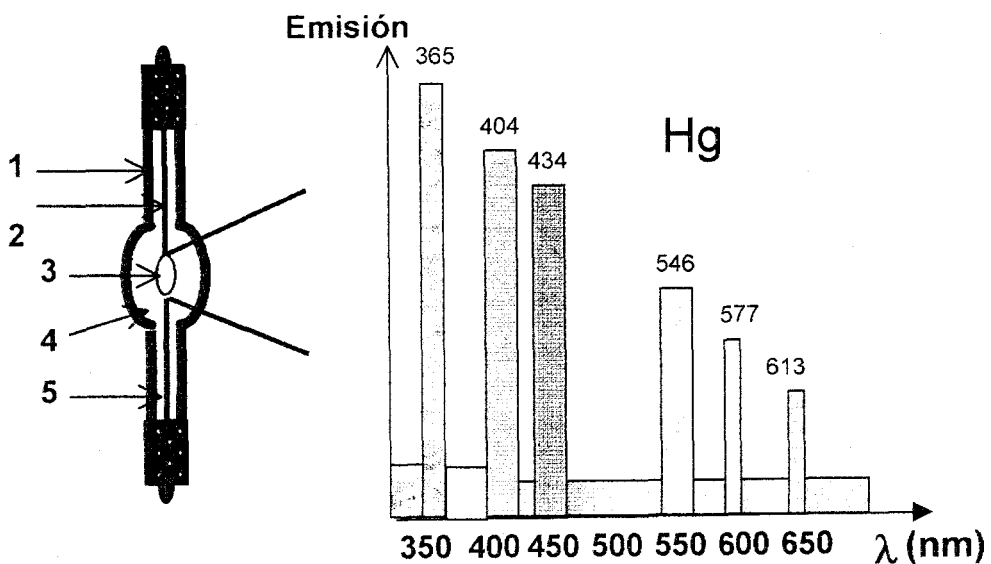
Fig. 10. Esquema del sistema de adquisición de imágenes, que incluye el microscopio dotado de luz de epifluorescencia, la cámara CCD y el sistema computerizado de adquisición de imágenes.

A continuación se describen los diferentes elementos que forman este sistema de adquisición, desarrollándolo con mayor profundidad.

4.1. Iluminación de epifluorescencia

Para los experimentos que se describen en este trabajo, se utilizaron fluoróforos como quinacrina, fura-2 y FM1-43. En los tres casos, y debido a sus características intrínsecas, las longitudes de onda de excitación necesarias son de 360, 390 y 460 nm. Por ello, y puesto que el espectro de radiaciones así lo requería, se utilizó una lámpara de mercurio resistente a altas presiones (Osram HBO 100, Berlín, Alemania).

El espectro de emisión que a continuación se describe alcanza desde los 340 a los 650 nm. Cada zona del espectro equivale a un color. Esto es lo que se conoce comúnmente como temperatura de color.



- 1.- Cristal de cuarzo de alta resistencia.
- 2.- Cátodo.
- 3.- Arco de luz.
- 4.- Cámara de combustión (contiene mercurio).
- 5.- Ánodo.

Fig. 11. Descripción de la lámpara y de su espectro de emisión. Los picos representan una acentuada intensidad de iluminación y se correlacionan con una determinada λ .

El rango de longitudes y su correspondencia con un color determinado es el siguiente:

1. - 340-400 nm Cerca del ultravioleta (UV)
2. - 400-430 nm Violeta
3. - 430-500 nm Azul
4. - 500-560 nm Verde
5. - 560-620 nm Amarillo a Naranja
6. - 620-700 nm Naranja a Rojo
7. - > 700 nm Cerca del infrarrojo (IR) – Invisible

Tal como se describe en la fig. 11, se colocan dos electrodos (cátodo y ánodo) en una lámpara de cristal de cuarzo resistente a altas presiones. La cámara de encendido contiene una pequeña cantidad de Hg.

Entre los electrodos se prende un arco de luz provocado por una sobretensión transitoria que se mantiene con una fuente de alimentación. El calor resultante vaporiza el Hg a gas y se crea una enorme sobrepresión en la lámpara. Ésta se calienta e irradia una luz extremadamente brillante con una alta proporción de luz ultravioleta (UV).

La energía luminosa irradiada se distribuye en determinadas longitudes de onda llamadas “líneas de mercurio”. La capacidad para cambiar a diferentes líneas de intensidad y estrecho rango espectral constituye una gran ventaja de este emisor, y es muy útil en fluorescencia.

La excitación se provoca con una sola “línea” y, debido al cambio en la longitud de onda de emisión descrita por la ley de Stokes, la fluorescencia se ve en una longitud de onda en la cual la luz del iluminador no causa prácticamente ninguna perturbación.

4.2. Filtros

Existen diferentes tipos de filtros: de densidad neutra, filtros de vidrio, filtros de vidrio coloreados, filtros de gelatina y filtros de interferencia.

Los filtros de densidad neutra atenúan uniformemente todos los colores del espectro. Se construyen, frecuentemente, depositando una fina capa de metal sobre una superficie plana de vidrio. Esta superficie se sella con otra lámina de vidrio.

Los filtros de vidrio coloreados transmiten la luz en regiones limitadas del espectro debido a la absorción de luz, dependiendo ésta de la composición metálica del vidrio.

Los filtros de gelatina constan de una capa de gelatina que contiene colorantes orgánicos. Esta capa suele estar protegida por dos superficies planas de vidrio.

Los filtros de interferencia están contruidos por multitud de capas de diferente índice de refracción selladas por dos superficies planas de vidrio. La característica de transmisión de este tipo de filtros se produce por la interferencia de la luz reflejada en las diferentes capas. Es importante destacar que la luz no transmitida por un filtro de interferencia es reflejada. Los filtros de interferencia diseñados para seleccionar parte de la región del espectro mediante reflexión se denominan espejos dicróicos. Los filtros de interferencia pueden ser diseñados para transmitir o reflejar luz en anchos de banda discretos, desde el UV a la región del infrarrojo en el espectro.

Los filtros se caracterizan por sus coeficientes de transmisión y reflexión. Los filtros paso de banda se identifican por sus picos en la longitud de onda de transmisión, el porcentaje de luz incidente en la longitud de onda transmitida y la media del ancho de banda de dicha longitud de onda. Los filtros de paso de banda de alta calidad tienen una característica de transmisión marcadamente cortante.

Los filtros que dejan pasar señales por encima o por debajo de una determinada longitud de onda, también tienen una característica similar al anterior entre el rango de la longitud de onda transmitida y la absorbida o reflejada. Los filtros coloreados y de gelatina, en cambio, no suelen tener esta acentuada longitud de onda de corte. Los mejores resultados, por tener acentuada esta característica, se obtienen con los filtros de interferencia.

La longitud de onda de los filtros de ancho de banda y de corte se eligen con el fin de maximizar la transmisión de energía sin pérdida de la fluorescencia al atravesar diferentes filtros.

4.2.1. Filtros utilizados en la microscopía de fluorescencia

Los filtros que se describen a continuación se colocan entre la fuente luminosa de excitación y el condensador (objetivo), así como entre la preparación y la cámara CCD digital.

a) *Filtro de excitación.* Estos filtros suelen ser de ancho de banda, y se denominan así por permitir el paso únicamente a la luz que tenga longitudes de onda definidas en un estrecho espectro. De esta forma, si un filtro se define como BP 340/10, nos asegura el paso de longitudes de onda de 340 ± 10 nm. El resto del espectro será absorbido o reflejado.

b) *Dicroico.* Es un filtro paso de banda (transmite por encima de una λ) y viene definido por una longitud de onda de corte. Esta propiedad origina un curioso comportamiento, de tal forma que, al incidir radiaciones con longitudes de onda superiores a la de corte, éstas son transmitidas, mientras que las que poseen longitudes de onda inferiores son reflejadas. Gracias a esta propiedad, y a la disposición en 45° que adopta el dicroico en el cajetín del microscopio, la luz de excitación es reflejada, mientras que la que llega de la luz de fluorescencia de la preparación (la luz de emisión) es transmitida, ya que esta última tiene una longitud de onda mayor que la de corte del filtro.

c) *De emisión.* Suele ser de paso de banda, aunque en ocasiones se utiliza de ancho de banda. En este último caso, nos aseguramos la eliminación de ruido, pues la posible luz emitida por elementos ajenos a la preparación es filtrada y sólo se transmite la luz de emisión de la fluorescencia.

En la fig. 12, se pueden contemplar las características particulares de los filtros empleados. Es importante conocer con exactitud los espectros de los filtros, para poder optimizar nuestro sistema con el diseño de un filtrado ideal que favorezca una máxima fluorescencia emitida, para una mínima excitación.

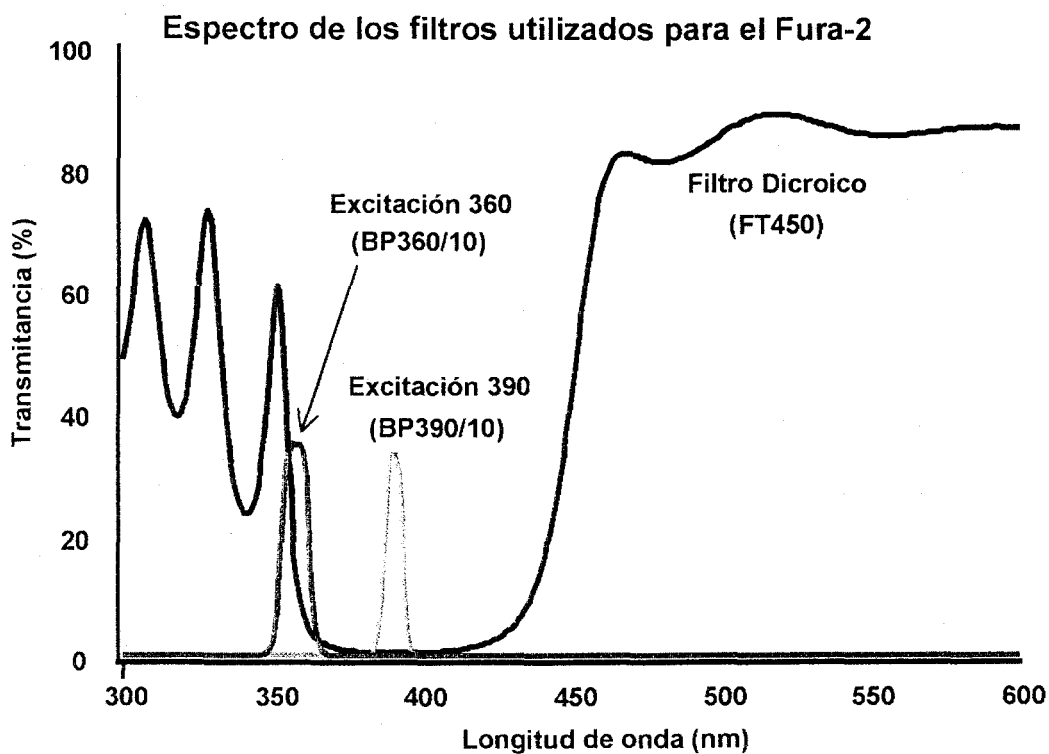
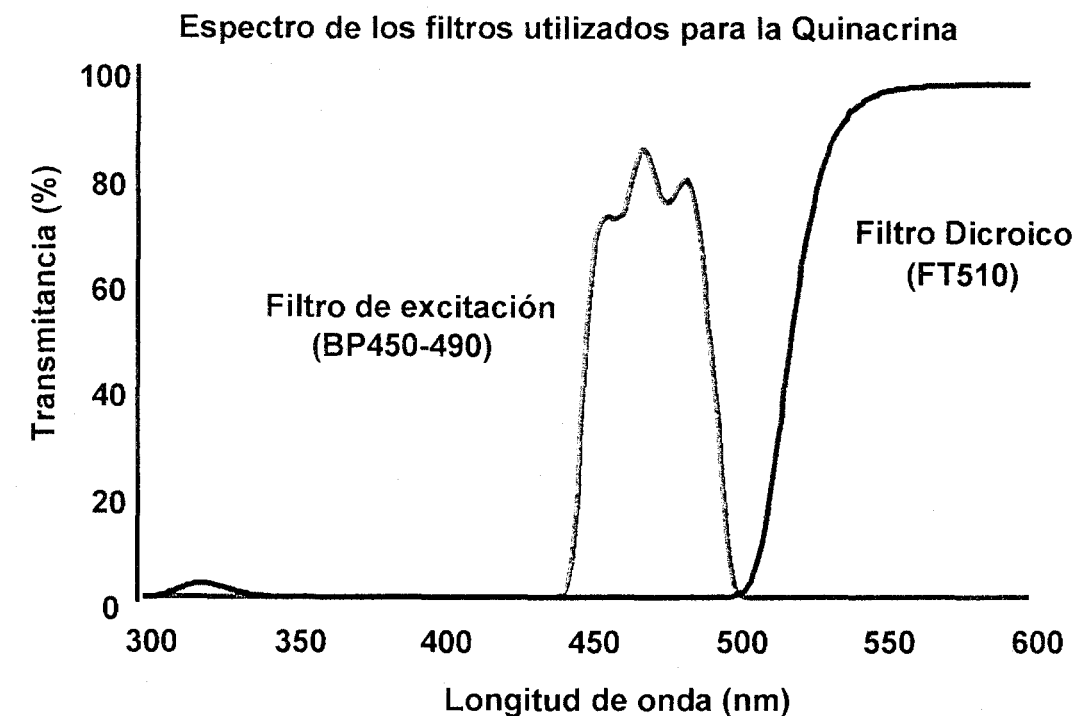


Fig. 12. Los espectros de los filtros fueron obtenidos con un espectrofotómetro (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, California, USA). Las características intrínsecas de las moléculas de los colorantes hacen que se deba utilizar una determinada longitud de onda de excitación y, como consecuencia, un determinado juego de filtros.

4.3. Objetivos

La intensidad de la imagen de fluorescencia varía según sea el objetivo empleado. Se puede determinar teóricamente el brillo relativo de la imagen, si ignoramos los efectos de la transmisión y reflexión de los elementos ópticos de los objetivos. La intensidad de luz que pasa a través de un objetivo varía con el cuadrado de su apertura numérica. La NA es la medida de la apertura a través de la cual la luz pasa por el objetivo. Está definida como:

$$NA = n \cdot \sin q \quad (6)$$

donde “n” es el índice de refracción entre la muestra y el objetivo, y “q” es la mitad del ángulo del cono de los rayos que entran al objetivo.

Además, el brillo de la imagen varía con el inverso del cuadrado del aumento del objetivo. En la fluorescencia con luz transmitida, el condensador habitualmente permanece fijo, mientras que es el objetivo el que cambia. Cuando se utiliza una gran magnificación del objetivo con un condensador fijo, la luz de iluminación del condensador es difuminada fuera del campo, y se observa mayor que la visualizada desde el objetivo. Por este motivo se pierde parte de la intensidad luminosa. Por lo tanto, podemos expresar el brillo de la luz de fluorescencia transmitida como:

$$\text{brillo de la imagen} \propto [(NA \text{ del objetivo})^2 \cdot (NA \text{ del condensador})] / (\text{magnificación})^2 \quad (7)$$

En epiiluminación, el objetivo también sirve como condensador. Al incrementar la magnificación del objetivo, se focaliza la misma intensidad de luz sobre un campo más pequeño. El resultado es que el brillo de la imagen es proporcional a:

$$\text{Brillo de la imagen} \propto (NA \text{ del objetivo})^4 / (\text{magnificación})^2 \quad (8)$$

Una regla práctica consiste en magnificar la NA del objetivo y minimizar la magnificación total cuando se realizan imágenes electrónicas. En niveles de

baja intensidad luminosa, cuando la luz es una limitación, es a menudo más importante incrementar el cociente entre señal y ruido a expensas de la magnificación. Ploem ha descrito el uso de la demagnificación de las lentes en combinación con una alta NA del objetivo para maximizar el brillo de la imagen. La necesidad de minimizar la irradiación de la luz de excitación para evitar la extinción de la fluorescencia hace que se deba considerar este hecho en la elección de los componentes.

4.4. Cámara CCD digital

a) *Propiedades del silicio.* Puesto que las CCD están fabricadas de silicio, el estudio de las propiedades de este elemento nos permitirá comprender mejor el funcionamiento de este dispositivo de adquisición de imágenes.

En la forma cristalina, cada átomo de silicio está unido covalentemente a su vecino. Se necesita una energía superior a la de enlace, que es aproximadamente de 1.1 eV, para romper la unión y crear un par electrón-hueco. Una radiación electromagnética incidente en forma de fotones, con una longitud de onda menor que 1 μm , puede romper la unión y generar pares electrón-hueco. Bajo una iluminación constante, se establece un equilibrio entre el flujo que entra y la recombinación de carga.

En la fig. 13 se ilustra cómo pueden romperse las uniones a causa de la incidencia de fotones, y se muestra que existe una estrecha relación entre el tipo de radiación incidente y la intensidad de absorción; una longitud de onda corta implica una menor penetración en el silicio. Éste será transparente en longitudes de onda próximas a 1100 nm, mientras que es prácticamente opaco a longitudes de onda menores de 400 nm.

Es importante conocer que partículas de alta energía, rayos-X y rayos cósmicos pueden romper miles de uniones, puesto que una exposición excesiva puede dañar el cristal.

Otra posibilidad es que las uniones se rompan por agitación térmica. En las cámaras CCD digitales esto supone ruido, por lo que normalmente se somete el cristal a un enfriamiento.

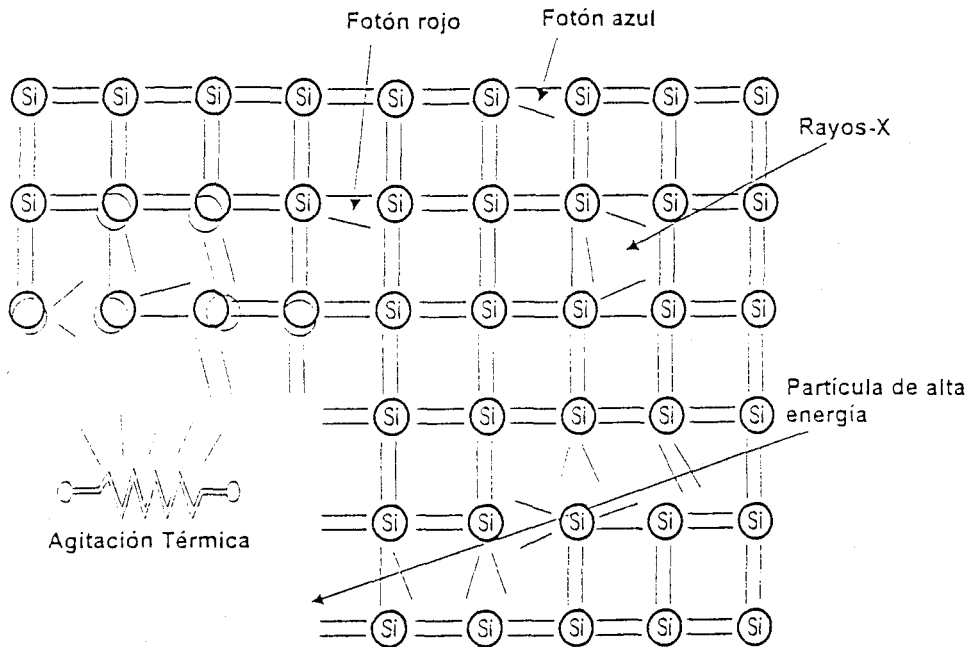


Fig. 13. Representación bidimensional de un cristal de silicio tridimensional en diferentes estados de excitación. Podemos observar que diferentes tipos de radiaciones incidentes provocan la ruptura de diferente número de uniones, según sea su penetración en el cristal.

b) *Pozo de Potencial*. Para medir la carga producida por los fotones incidentes, se construyen los fotodetectores. Tal como se esquematiza en la fig. 14, se crece una fina capa de dióxido de silicio sobre una sección de silicio. Se añade una puerta conductora (“gate”) sobre el óxido. Así, será posible aplicar un potencial eléctrico positivo a la puerta, lo que crea una región donde pueden ser almacenados los electrones libres generados por los fotones incidentes. Es importante destacar la imposibilidad de distinguir entre electrones generados por agitación térmica, por partículas de alta energía o por la interacción fotónica. Por este motivo, la carga producida por agitación térmica es indeseable.

El pozo de potencial se continúa llenando hasta un cierto límite. La capacidad del pozo de potencial suele sobrepasar el millón de electrones.

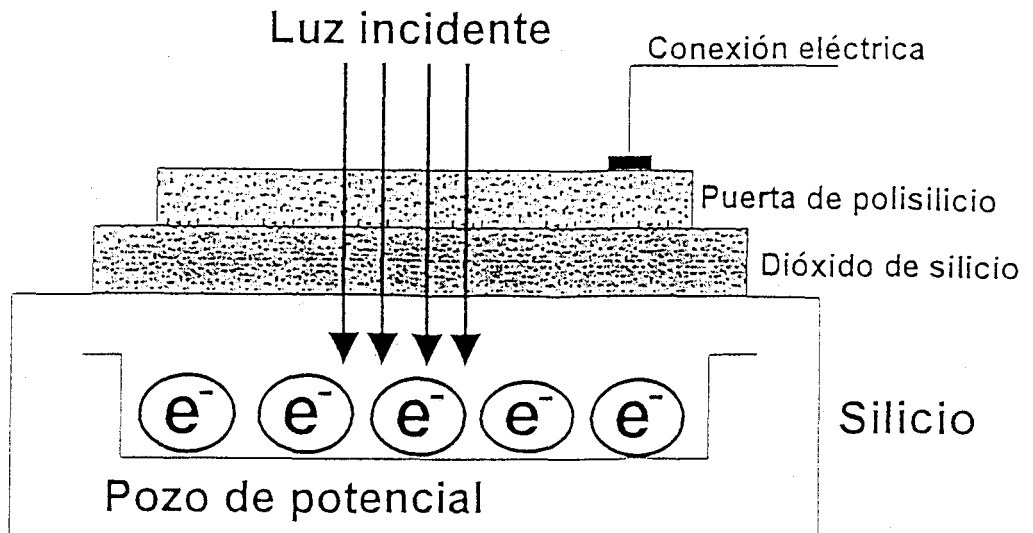


Fig. 14. Representación esquemática de un pozo de potencial donde son almacenados los electrones libres que han sido generados al romperse enlaces entre átomos de silicio.

C) *Principios básicos de funcionamiento de la CCD.* Típicamente las CCD se fabrican a partir de finas rodajas de cristal de silicio. Sus dimensiones suelen tener varios centímetros cuadrados de superficie y 500 μm de grosor. En dicha oblea se dispone una estructura formada por miles de pozos de potencial. Esta estructura puede disponerse con muchas fases, de forma que los pozos de potencial son capaces de propagarse a través del cristal de silicio. En la fig. 15 se ilustra el corazón de una cámara CCD digital. Aunque dentro de la carcasa de la cámara hay otros componentes, el representado en la figura es el que nos permite reconocer cuánta luz emite o refleja un espécimen.

Está compuesta de un agrupamiento de pozos de potencial dispuestos en columnas. La geometría de los canales establece las columnas y la imposibilidad de migración de carga entre columnas. La carga es almacenada a lo largo de las columnas en fotodetectores individuales gracias a patrones de potenciales aplicados en la "gate".

La CCD es cuadrada y está integrada por 192 x 165 pixeles. Cada píxel tiene un tamaño de $16\ \mu\text{m} \times 13.75\ \mu\text{m}$, lo que supone un área activa de $0.264\text{cm} \times 0.264\text{cm}$. Cada píxel es una unidad independiente que permite almacenar la carga del electrón inducida por radiación fotónica.

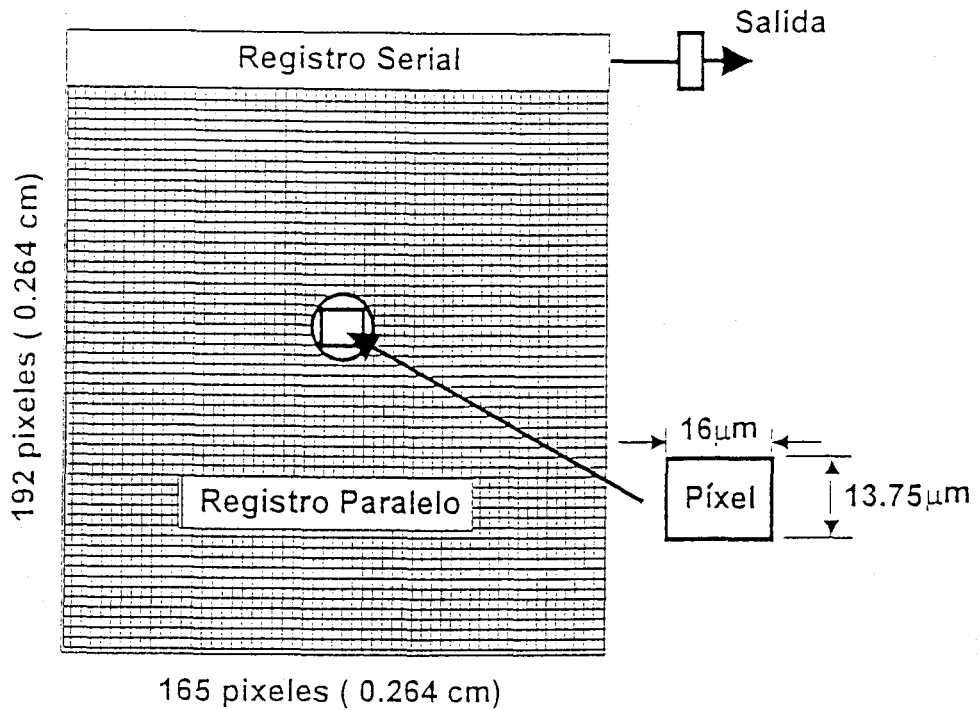


Fig. 15. Esquema de la CCD de la cámara utilizada en los experimentos. Se especifican algunos datos dados por el fabricante, tales como números de pixeles y dimensiones de los mismos. Sabiendo estos datos y la magnificación del objetivo, podemos conocer, por ejemplo, las dimensiones del espécimen observado por el microscopio.

Esta agrupación bidimensional de pozos de potencial es conocida como registro paralelo. Una imagen focalizada sobre el registro paralelo proporciona una distribución de carga proporcional a la integración del flujo total incidente de cada fotodetector. La independencia de almacenes de carga individuales se mantiene durante todo el proceso de forma que no se entremezclan las cargas de

diferentes pozos. Además, la transferencia de carga se puede producir cientos de veces sin pérdida alguna.

El principio de transferencia de carga es un concepto esencial para comprender el dispositivo de acoplo de carga. En realidad, la carga no se transmite por la superficie del silicio, sino que lo hace a través de canales enterrados bajo su superficie. Esto permite evitar interferencias y asegura la máxima eficiencia en el proceso de transferencia.

La calidad de la CCD depende de la eficacia en el transporte de la carga desde el fotodetector hasta la salida del amplificador. Este parámetro suele venir identificado en las características técnicas. Para nuestra cámara, la eficacia de transferencia es del 99.998%.

El funcionamiento de este mecanismo de lectura queda descrito en la fig. 16.

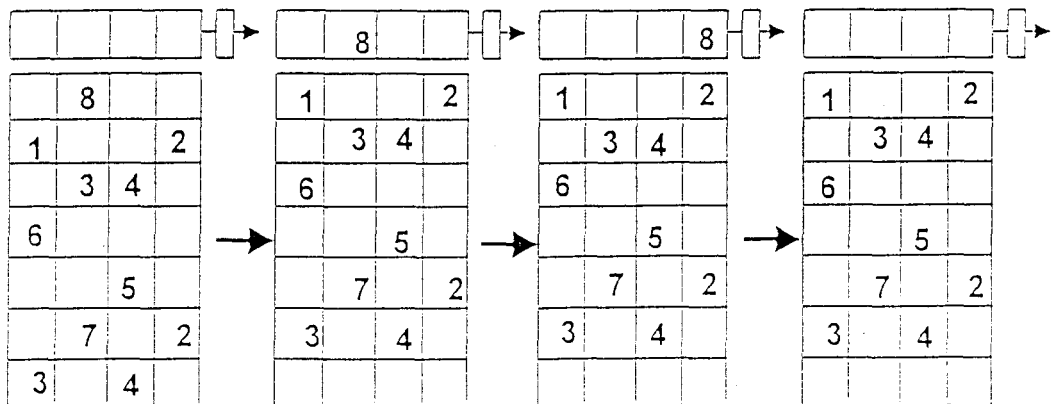


Fig. 16. Mecanismo de lectura en el registro serial.

En la parte superior de la fig. 16 se distingue el registro serial, que juega un papel fundamental en la lectura de la CCD. Un cambio en el potencial de la "gate" provoca que toda la carga almacenada en un registro paralelo cambie hacia el registro serial, fila a fila. Una vez en el registro serial, la carga se transfiere al

amplificador de salida. Éste produce una señal, susceptible de ser medida, proporcional a la carga.

Después de que el registro serial se vacía de carga, una segunda fila de cargas se transfiere desde el registro paralelo para finalmente llegar de nuevo a la salida del amplificador. Este mecanismo se repite hasta vaciar completamente las filas de carga, de manera que podemos de nuevo exponer la CCD y repetir el proceso.

5. DETERMINACIÓN DE LA $[Ca]^{2+}$ POR MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS

5.1. Introducción

En algunos casos, como por ejemplo los indicadores de calcio fura-2 e Indo-1, o indicadores del pH tales como el BCECF, SNARF Y SNAFL, el ion libre y el ion en su forma fluorescente tienen diferente espectro de excitación o emisión. Con este tipo de indicadores, el cociente de las señales ópticas se puede utilizar para calcular la concentración del ion. La medida del cociente de intensidades de fluorescencia elimina la distorsión debida a la extinción de la fluorescencia, así como las variaciones en la carga de la sonda y las posibles fluctuaciones provocadas por la falta de estabilidad de la fuente luminosa.

5.2. Métodos basados en el cociente de intensidades de fluorescencia

Estos métodos consisten básicamente en medir la intensidad de fluorescencia provocada por la excitación de la muestra a dos longitudes de onda diferentes. La gran ventaja de estos métodos radica en la cancelación de variaciones artificiales de la señal de fluorescencia.

Para aplicar el método de la razón de intensidades, es conveniente sustraer la fluorescencia de fondo ("background") antes de proceder al cálculo del cociente. El cociente de dos intensidades de fluorescencia con opuestas respuestas al ion sensible produce el mayor rango dinámico posible. En otros casos, el cociente se realiza entre intensidades sensibles al ion con otro que permanece invariable a la concentración de dicho ion (punto isobéptico).

En la fig. 17 podemos observar de qué forma una disminución de fluorescencia debida a diferentes factores tales como la extinción fotónica, es eliminada cuando se realiza el cociente de intensidades de fluorescencia correspondientes a diferentes longitudes de onda.

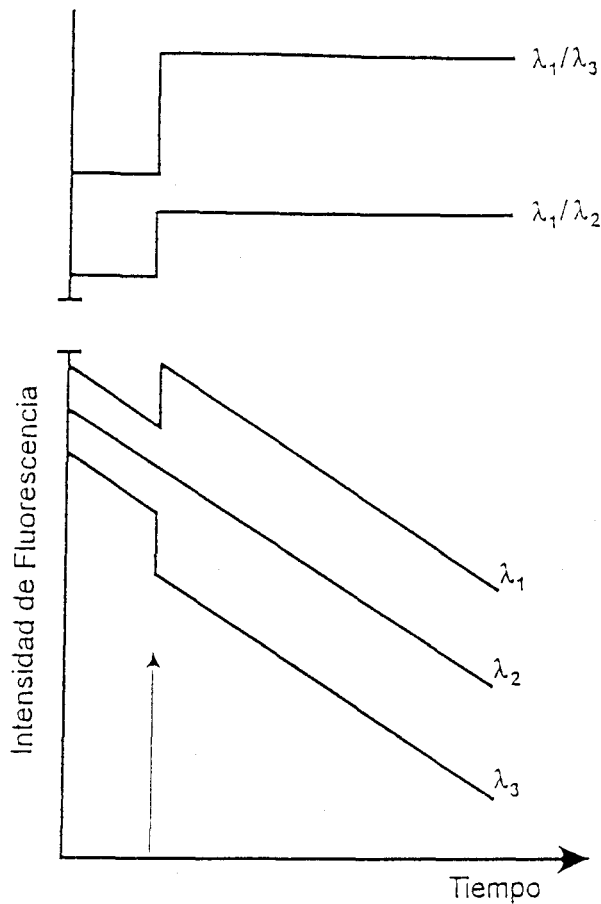


Fig. 17. Diagrama representativo de la importancia de la técnica del cociente de intensidades de fluorescencia. El ejemplo muestra un indicador iónico que exhibe un aumento de intensidad de fluorescencia a una λ_1 mientras que se decrementa para λ_3 . El punto isobéptico corresponde a λ_2 donde la intensidad de fluorescencia es independiente de la concentración del ion. La intensidad de fluorescencia del indicador se decrementa en el tiempo debido al fenómeno de extinción fotónica u otro proceso. Sin embargo, este fenómeno no se aprecia cuando sometemos el registro al método del cociente de intensidades.

5.2.1. Método del cociente de intensidades de fluorescencia

Con este método (Grynkiewicz y col., 1985) se calcula el cociente de intensidades de fluorescencia, $R = F_1 / F_2$ para dos longitudes de onda (F360 y

F390). La $[Ca^{2+}]$ depende de la constante de disociación K_d de fluoróforo y de β , es decir, del cociente de las intensidades de fluorescencia con la longitud de onda de 390 nm con 0 Ca^{2+} y con saturación de Ca^{2+} .

Considerando S_{f1} y S_{f2} coeficientes de proporcionalidad relativos a λ_1 y λ_2 cuando el colorante está libre; S_{b1} y S_{b2} cuando el colorante está ligado a Ca^{2+} ; S_f y S_b las concentraciones del indicador libre y ligado respectivamente, tenemos:

$$\begin{aligned} F_1 &= S_{f1}C_f + S_{b1}C_b \\ F_2 &= S_{f2}C_f + S_{b2}C_b \end{aligned} \quad (9)$$

Sin embargo, S_f y S_b están relacionados con $[Ca^{2+}]$ por la ecuación:

$$C_b = C_f \cdot [Ca^{2+}] / K_d \quad (10)$$

donde K_d es la constante de disociación efectiva. La razón de fluorescencia, R :

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{S_{f1}C_f + S_{b1}C_b}{S_{f2}C_f + S_{b2}C_b} = \frac{S_{f1} + S_{b1}[Ca^{2+}] / K_d}{S_{f2} + S_{b2}[Ca^{2+}] / K_d} = R \quad (11)$$

Despejando de esta última expresión obtenemos el valor de $[Ca^{2+}]$:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - (S_{f1}/S_{f2})}{(S_{b1}/S_{b2}) - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \quad (12)$$

teniendo en cuenta que S_{f1}/S_{f2} es el valor límite que R puede tomar para $[Ca^{2+}] = 0$ lo consideraremos como R_{min} , mientras que S_{b1}/S_{b2} puede ser escrito de forma análoga como R_{max} , ya que expresa el cociente máximo para una $[Ca^{2+}]$ saturada. Podemos escribir entoces:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \quad (13)$$

Si utilizamos valores de intensidad para una única longitud de onda, la ecuación quedaría como:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \quad (14)$$

5.2.2. Determinación de la $[Ca]^{2+}$ mediante técnicas de imagen

Para poder aplicar el método anteriormente expuesto, debemos registrar la intensidad de fluorescencia a dos λ distintas. Una forma de registrar dicha señal es utilizar un fotomultiplicador, que transforma la señal luminosa en eléctrica y la amplifica. Otro método consiste en captar imágenes de fluorescencia y promediar la intensidad luminosa de los píxeles correspondientes a una región determinada. En realidad, las bases físicas de estos dos métodos de registro son similares, ya que en ambos casos existe una transformación de la señal luminosa en señal eléctrica.

Sin embargo, hay dos diferencias importantes que hay que tener en cuenta para valorar estas dos técnicas de registro:

1. El fotomultiplicador permite tiempos extremadamente cortos en la adquisición de la señal, respecto al que necesita la CCD. Es decir, tiene una mayor resolución temporal.

2. La CCD, frente al fotomultiplicador, tiene la ventaja de conservar la información de forma espacial, es decir, podemos conocer la intensidad luminosa emitida en cada región de la imagen adquirida. Esto nos permitirá, en el análisis, escoger la región que nos interese de la imagen original, para calcular la razón en la misma.

6. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

6.1. Introducción

Determinadas diferencias, muy sutiles, de valores de intensidad son difícilmente perceptibles por el ojo humano. Por ello, se recurre a procesamientos

digitales que permiten una mejora sustancial y, por consiguiente una mayor resolución para nuestra visión. En la fig. 18 se muestra de qué manera, en una imagen con una escala gradual y continua de tonos de gris, no podemos distinguir entre valores próximos de intensidad. Por el contrario, si conseguimos transformar esta imagen en otra más contrastada, los valores de gris presentan saltos discretos que son fácilmente distinguibles por el ojo humano.

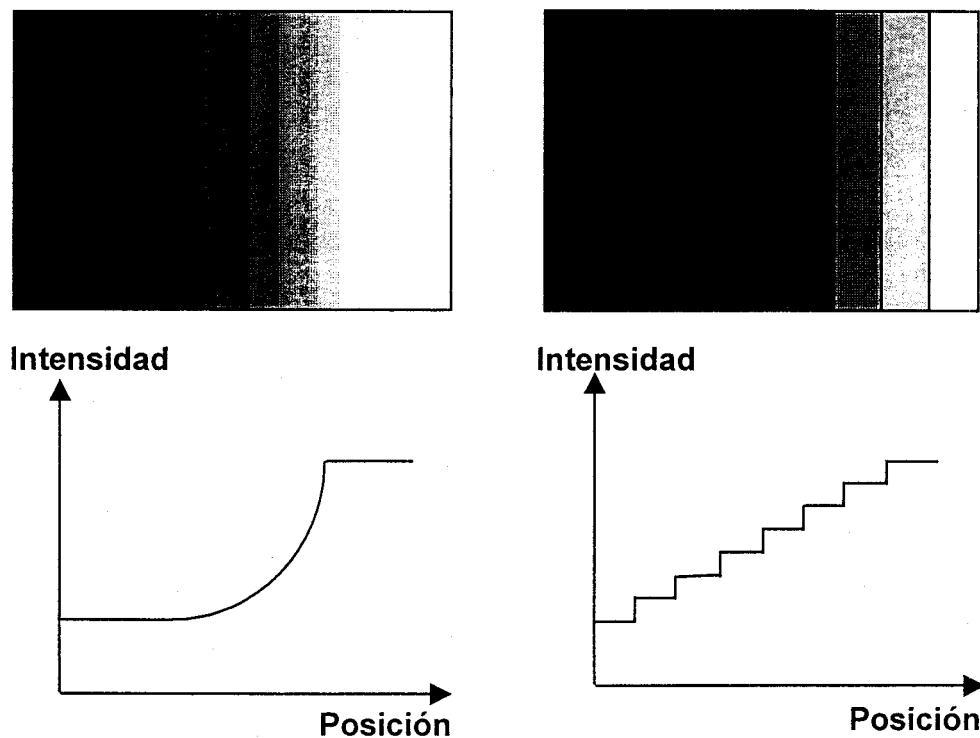


Fig. 18. En la parte superior se muestran las imágenes de la escala de gris antes y después de aplicar un cambio en el contraste. En la parte inferior se grafican los cambios de intensidad luminosa respecto a la posición. En el primer caso la gráfica es continua y el cambio de intensidad respecto a dos puntos próximos es mínimo. En cambio, en el segundo caso podemos ver un cambio brusco de intensidad entre dos posiciones vecinas. Esto es lo que se conoce como "aumento de contraste".

Por otra parte, la mera observación de una imagen no siempre nos da toda la información que de ella requerimos; es preciso un análisis, mediante diferentes algoritmos, para profundizar en los detalles que nos interesen.

Por ejemplo, la idea básica en el procesamiento de imágenes consiste en resaltar la diferencia de intensidad entre dos puntos próximos mediante tratamientos digitales que eliminen el ruido, aumenten el contraste de la imagen y/o transformen una escala de gris en otra de color. En la fig. 19 se muestra cómo puede afectar a un determinado píxel o conjunto de píxeles la información que lo rodea. El tratamiento de eliminación del fondo luminoso en una imagen digital provoca el efecto descrito.



Fig. 19. Los cuadros interiores en las cuatro figuras son idénticos. Sin embargo, los contornos que los rodea hacen que parezcan diferentes. Concretamente, el cuadrado interior de la última figura parece más luminoso que el primero.

Las propiedades ópticas de los microscopios convencionales dotados de iluminación de epifluorescencia no producen una imagen perfecta del espécimen. Por el contrario, la imagen observada es una versión filtrada paso de baja y es contaminada con información fuera de foco. Como resultado, la imagen tiene un reducido contraste y un incremento de la profundidad de campo. Este problema es especialmente importante en medidas de $[Ca^{2+}]$ localizado.

Una solución a este problema es adquirir imágenes con la técnica de microscopía confocal que sólo detecta información que esté a foco. Pero esto tiene varias desventajas en medidas de baja luz de fluorescencia en células vivas. Como alternativa se recurre al procesamiento digital y a un algoritmo de perfilado que elimine información fuera de foco.

En el procesamiento digital se recurre a manipular números que expresan la cantidad de iluminación que presentaba la imagen adquirida. Dicho de otra forma, la imagen que observamos en el microscopio ha sido traducida, en nuestro caso, a una matriz de 192 x 165, de forma que cada elemento es un número, tanto más alto cuanto mayor es la intensidad luminosa de la imagen. Esta matriz de números, por lo tanto, será la fuente del procesamiento digital. En la fig. 20 se representan los diferentes pasos requeridos en la obtención de una imagen digital.

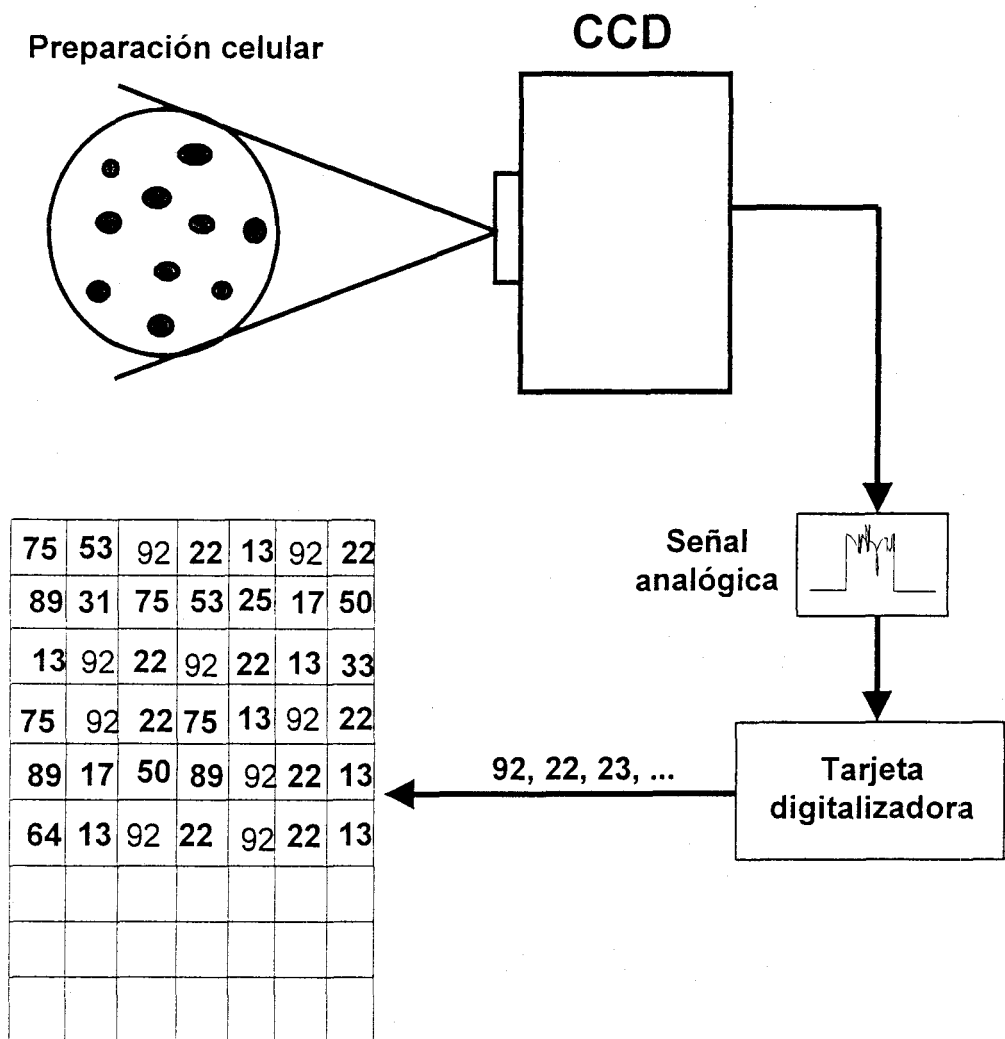


Fig. 20. Los fotones reflejados o emitidos por la preparación celular llegan a la CCD, donde son transformados en una señal eléctrica (analógica). Posteriormente, esta señal se transfiere a un convertidor que transforma dicha señal analógica en digital.

Existe un número ilimitado de manipulaciones que pueden realizarse con las imágenes digitales; tales manipulaciones pueden ser clasificadas en dos categorías:

1.- Análisis de imágenes. Nos referimos a todas aquellas rutinas de programación que producen información descriptiva de la imagen digital. Se suelen designar como características de la imagen (cálculo del diámetro de la célula, valor de la $[Ca^{2+}]$, ...).

2.- Mejora de la calidad de la imagen. En esta segunda categoría, las rutinas para manipulación de imágenes permiten que la observación de la imagen sea más clara, sin que en ningún momento aporte información descriptiva sobre la misma.

Ejemplos de este tipo de rutinas son la substracción de dos imágenes adquiridas en diferente lapso de tiempo para poder detectar el movimiento, o la sustitución de una escala de gris por otra de color (seudocolor) para exagerar el contraste.

6.2. Sistema de digitalización de imágenes

Un sistema de este tipo consiste en una serie de componentes que convierten una imagen óptica en una imagen digital. Dicho sistema genera valores numéricos discretos para cada localización de la imagen que miden su intensidad luminosa. Estos números son conocidos como valor o nivel de gris. En la mayoría de los casos, este valor se escribe en código binario, de forma que el máximo rango de valores de gris es una potencia de dos. Así, un sistema digitalizador de 8 bits produce $2^8 = 256$ valores diferentes de gris.

Normalmente, cuando se mide la intensidad de luz en diferentes localizaciones de la imagen, se trasladan dichos valores a una matriz ordenada de elementos o sistema de ejes cartesianos en donde es posible identificar cada elemento de la imagen original por sus coordenadas. Además, este valor binario que hemos adquirido guarda una relación lineal con la intensidad luminosa de dicha localización. De esta forma, mediante una función lineal de transferencia, y

a partir del valor de gris de un píxel individual, podemos determinar el brillo que había en el correspondiente punto de la imagen original.

6.3. Resolución de la imagen digital

Una imagen digital debe ser una fiel representación de la imagen óptica original. Ésta será tanto más exacta cuanto mayor sea la resolución de la imagen digital. Podemos contemplar, atendiendo a la resolución, dos categorías:

- *Resolución en el rango de valores de grises.* Viene determinada por el sistema digitalizador. De esta forma, un sistema de 8 bits ($2^8=256$) tendrá menos resolución que uno de 12 bits ($2^{12}=4096$).

En ocasiones, cuando la imagen presenta diferencias sutiles en el contraste, se precisarán 256 ó más valores de gris para una correcta representación de la misma. Otras veces, por el contrario, cuando se pretende representar únicamente el tamaño de un objeto para su clasificación, no será necesaria tanta resolución y se reducirá el número de diferentes valores de gris con el propósito de aumentar la velocidad y disminuir la memoria necesaria para su almacenamiento.

Si, por ejemplo, en una aplicación, una imagen de 8 bits puede expresarse en cuatro diferentes valores de gris (una imagen de 2 bits), entonces la memoria necesaria se reducirá en un factor de cuatro. Algunas imágenes pueden ser almacenadas utilizando un único bit de valor de gris. Se llaman imágenes binarias y contienen píxeles que pueden ser blancos o negros.

La resolución de valores de gris está limitada por el ruido debido a las propiedades intrínsecas de la CCD y a los componentes electrónicos que participan en la digitalización. La precisión del proceso de digitalización viene expresado por el número de bits necesarios para almacenar la desviación estándar de la componente del ruido.

A veces, el ruido puede reducirse mediante la acumulación y el cálculo de la media de varias imágenes digitales “idénticas” tomadas en diferentes instantes. Este tipo de manipulación sería eficiente si la imagen digital se pudiera modelar mediante la suma de la imagen verdadera y una función independiente del ruido, distribuida normalmente y aditiva. Acumulando N imágenes, el componente de la

imagen real vendrá incrementada por un factor N , mientras que el componente del ruido se incrementa sólo en un factor \sqrt{N} (Castleman, 1979).

Cuando el propósito del procesamiento digital es crear una imagen nítida, el número de diferentes valores de gris de la misma debe ser mayor que los que percibe el ojo humano. Nosotros podemos distinguir solamente 40-80 diferentes valores de gris en un monitor de vídeo (Castleman, 1979); por lo tanto, una imagen con 6 ó 7 bits de resolución (64 ó 128 valores de gris) sería suficiente para obtener una buena calidad de reproducción.

- *Resolución espacial.* Viene determinada por el espacio entre píxeles, y por la fidelidad de la tarjeta digitalizadora. El valor de cada píxel en la imagen digital representa la intensidad media de una localización de la imagen óptica sobre un espacio finito. Por esta razón, las características de la imagen que sean menores que el espacio entre píxeles no se representarán con exactitud en la imagen digital. Para preservar la resolución espacial, la tarjeta digitalizadora debe tener un espacio de al menos la mitad del tamaño de la característica más pequeña resoluble, o lo que es equivalente, dos veces la más alta frecuencia espacial (criterio de Nyquist).

6.4. Histograma de la imagen

El histograma de nivel de gris es una función discreta que especifica el número de píxeles que aparecen en la imagen para cada valor de gris. Mediante la observación del histograma de nivel de gris, podemos obtener importante información de la imagen óptica.

Por ejemplo, nos puede interesar el área ocupada por una célula que aparece como una mancha oscura sobre un fondo claro. La solución a este problema pasaría por contabilizar el número de píxeles que tienen un valor correspondiente a la zona oscura y multiplicarlo por el área de cada píxel. Mediante el histograma, representado en la fig. 21, de dicha imagen digital

podremos distinguir dos picos, uno correspondiente a los valores de gris de la célula y otro correspondiente al fondo.

Tomando como referencia el valor de T_1 podemos conocer el número de píxeles correspondientes a cada zona. Numéricamente, se describe como:

$$Area = \sum_{GV=0}^{T_1} H(GV) \quad (15)$$

donde GV es el valor de gris de cada píxel y $H(GV)$ es el nivel de gris en el histograma.

El valor de gris que separa diferentes regiones de un histograma, tales como T_1 en este caso, es llamado umbral de los valores de gris y es frecuentemente utilizado en manipulación de imágenes (Weszka, 1978). Una fórmula más general para encontrar áreas entre dos umbrales del histograma es:

$$Area(T_1, T_2) = \sum_{GV=T_1}^{T_2} H(GV) \quad (16)$$

donde T_1 y T_2 son el umbral más bajo y más alto, respectivamente, que definen la región de interés en el histograma.

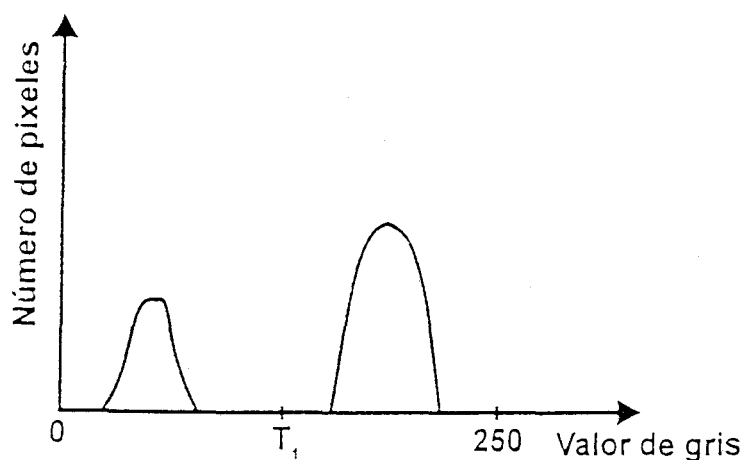


Fig. 21. En el histograma se representan el número de píxeles que poseen un determinado valor de gris. T_1 sería el valor de referencia que separa dos poblaciones de píxeles con características de intensidad luminosa muy diferentes.

6.4.1. Modificación del contraste a través del histograma

Una vez que la imagen está almacenada en forma digital puede ser manipulada de forma que se altere el contraste (se define contraste entre píxeles vecinos como la diferencia entre sus respectivos valores de gris) y el brillo de la imagen. Tales manipulaciones afectan tan sólo a los valores de gris de píxeles individuales y no altera para nada la información espacial.

De esta forma, dada una imagen digital I_1 , obtendremos otra I_2 , aplicando la función $f(I)$, llamada *función de transformación de intensidad* (ITF):

$$I_2(i,j) = f[I_1(i,j)] \quad (17)$$

donde $I_1(i,j)$ representa el píxel original definido posicionalmente mediante la fila "i" y la columna "j". Es importante destacar que el píxel de salida (el píxel procesado a partir del original, llamado de entrada) depende solamente del valor del nivel de gris del píxel de entrada y no de los píxeles circundantes. Por esta razón, la ITF puede expresarse mediante,

$$GV_2 = f(GV_1) \quad (18)$$

donde GV_2 es el valor de gris de salida de la imagen I_2 y GV_1 es el valor de gris de entrada de la imagen I_1 .

Una ITF muy utilizada es la función lineal,

$$GV_2 = m GV_1 + b \quad (19)$$

donde la pendiente "m" indicará el grado del contraste y "b" el brillo de la imagen. En la figura siguiente se observa la relación entre el histograma de entrada y el de salida mediante la aplicación de la ITF. Cada valor de gris en H_1 es transformado, mediante dicha función, en un valor de gris en H_2 .

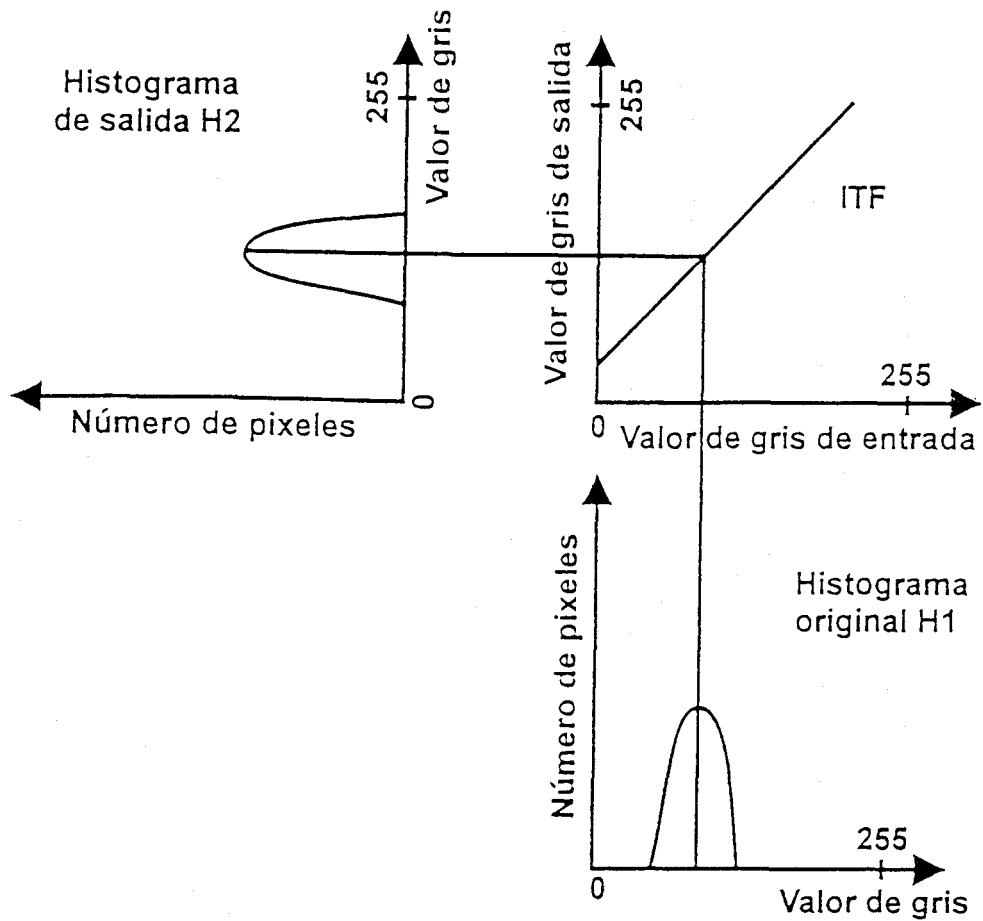


Fig. 22. Cada valor de gris en H_1 es transformado, mediante la función ITF, en un valor de gris en H_2 .

6.5. FILTRO DIGITAL Y CONVOLUCIÓN ESPACIAL

Anteriormente hemos descrito manipulaciones digitales que se producían punto a punto; cada valor de gris del píxel de salida venía determinado únicamente por el correspondiente píxel de entrada. Estas operaciones alteraban propiedades como el brillo o el contraste, permaneciendo inalterada la información espacial.

El término "filtrado digital", por el contrario, describe manipulaciones que afectan a la información espacial, tales como suprimir el ruido añadido o resaltar detalles parciales de la imagen.

Un ejemplo de rutina de filtrado digital es la convolución espacial. Una operación de convolución sobre una imagen digital implica multiplicar punto a punto cada valor de los píxeles de la imagen de entrada por los píxeles de una segunda imagen, conocida como máscara de convolución o *kernel*. Normalmente el kernel contiene un número impar de filas y columnas y suele ser una matriz cuadrada.

La operación de convolución se realiza de forma individual sobre cada píxel de la imagen de entrada y consta de tres operaciones aplicadas secuencialmente:

1. La máscara de convolución es superpuesta sobre la imagen original, de manera que el píxel central del kernel coincida con la localización del píxel al que se aplica la convolución (en adelante nos referiremos a él como píxel diana).
2. El valor de cada píxel de la imagen original se multiplica por el correspondiente valor del kernel.
3. El valor de gris del píxel diana se sustituye por la suma de los productos determinados en el caso anterior.

Algunos algoritmos requieren cierta cantidad de imágenes bidimensionales tomadas en diferentes planos focales, aunque el algoritmo de enfoque de vecinos próximos sólo requiere una imagen por encima y otra por debajo del plano de la imagen.

Existe una modificación de este algoritmo que consiste en construir un simple filtro inverso, el cual extrae información fuera de foco con resultados similares al obtenido con el algoritmo de vecinos próximos, pero sin la necesidad de utilizar secciones adyacentes de la imagen.

La fig. 23 esquematiza los tres pasos descritos anteriormente, y describe un ejemplo de máscara de convolución y de qué forma actúa sobre el píxel diana.

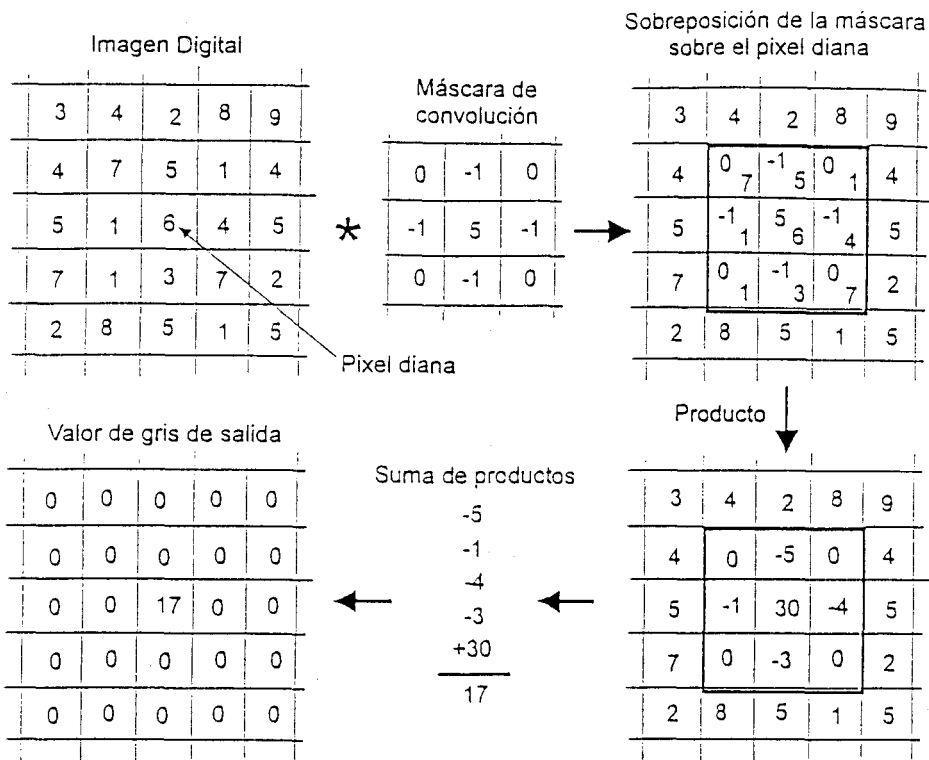


Fig. 23. La operación de convolución se realiza de forma individual sobre cada pixel. En la imagen final de salida sólo se especifica el pixel descrito en la convolución. Los señalados con "0" deben considerarse también como resultado de la convolución.

Para realizar la convolución sobre una imagen completa, la secuencia de operaciones descritas se debe repetir para cada píxel de la imagen original. Podríamos considerar que la propiedad de convolución tiene elemento neutro, y sería la aplicación del filtro digital mediante un kernel que tuviese valor 1 en el píxel central y valor 0 en los circundantes, con lo cual obtendríamos una imagen idéntica a la original.

La operación de convolución se describe matemáticamente, en su forma discreta como:

$$B_{(i,j)} = \sum_m \sum_n I_{(i-m,j-n)} M_{(m,n)} \quad (20)$$

donde $B_{(i,j)}$ es el píxel en la fila “i” y la columna “j” en la imagen de salida, $I_{(i,j)}$ es el correspondiente píxel en la imagen de entrada y $M_{(m,n)}$ es el píxel en la fila “m” y columna “n” del kernel. Esta operación se representa a menudo en la forma

$$B = I * M \quad (21)$$

donde el símbolo * representa la operación de convolución.

6.5.1. Ejemplos de máscaras de convolución

Dependiendo del tipo de análisis y de la información que queramos obtener, podremos aplicar a nuestra imagen original diferentes tipos de filtrado y, por tanto, diferentes máscaras de convolución:

a) *Filtro suavizador*. Si a la convolución de la imagen le aplicamos la máscara descrita en la fig. 24, correspondiente a dicho filtro, el valor de gris de cada píxel se sustituye por la intensidad promedio de sus ocho vecinos más próximos. Si el valor de gris de alguno de estos nueve píxeles es, de manera inusual, más bajo o más alto que de los vecinos como consecuencia del ruido añadido, el valor medio tenderá a reducir el efecto de dicho ruido debido a que es distribuido entre los píxeles circundantes.

1/9	1/9	1/9	ó	1	1	1	x 1/9
1/9	1/9	1/9		1	1	1	
1/9	1/9	1/9		1	1	1	

Fig. 24. Kernel aplicado en la convolución destinada a suavizar el contraste de la imagen.

La convolución con una máscara de este tipo se interpreta como una operación que suprime la contribución de alta frecuencia espacial. El término frecuencia espacial es análogo a la frecuencia temporal, y describe la rapidez con que una determinada señal cambia, con respecto a la posición en la imagen. Una función senoidal tiene una baja frecuencia espacial si presenta sólo unos pocos ciclos a través del ancho de una imagen, mientras que tiene una alta frecuencia si observa muchos ciclos a su través. La más alta frecuencia espacial que se puede representar en una imagen digital tiene un periodo de longitud igual al ancho de dos píxeles.

El ruido randómico de una imagen suele poseer una frecuencia espacial alta, por lo que podrá eliminarse mediante un filtro suavizador, haciendo que la imagen se desdibuje. Este efecto será tanto más acusado cuanto mayor sea el número de filas y columnas del kernel.

b) *Filtros Laplacianos o perfiladores*. Se diseñan normalmente para aumentar la nitidez de la imagen y detectar bordes. Los kernel con los que aplicamos la convolución se describen en la fig. 25.

0	-1	0	-1	-1	-1	1	-2	1
-1	4	-1	-1	8	-1	-2	4	-2
0	-1	0	-1	-1	-1	1	-2	1

Fig. 25. Ejemplos de máscaras destinadas a perfilar contornos en la imagen.

En este caso, el efecto que provoca es el de acentuar la alta frecuencia espacial a la vez que suprime las bajas frecuencias.

Es interesante destacar que un filtro perfilador puede separarse en dos máscaras, tal como se demuestra en el esquema de la fig. 26.

$$\begin{array}{c}
 \text{Filtro sharpening} \\
 \begin{array}{|c|c|c|}
 \hline
 -1 & -1 & -1 \\
 \hline
 -1 & 8 & -1 \\
 \hline
 -1 & -1 & -1 \\
 \hline
 \end{array}
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \text{Separación en dos máscaras} \\
 \begin{array}{|c|c|c|}
 \hline
 0 & 0 & 0 \\
 \hline
 0 & 9 & 0 \\
 \hline
 0 & 0 & 0 \\
 \hline
 \end{array}
 -
 \begin{array}{|c|c|c|}
 \hline
 1 & 1 & 1 \\
 \hline
 1 & 1 & 1 \\
 \hline
 1 & 1 & 1 \\
 \hline
 \end{array}
 =
 \end{array}$$

$$=
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|c|c|}
 \hline
 0 & 0 & 0 \\
 \hline
 0 & 1 & 0 \\
 \hline
 0 & 0 & 0 \\
 \hline
 \end{array}
 -
 \begin{array}{|c|c|c|}
 \hline
 1 & 1 & 1 \\
 \hline
 1 & 1 & 1 \\
 \hline
 1 & 1 & 1 \\
 \hline
 \end{array}
 \times 1/9
 \end{array}$$

Máscara identidad
Máscara smooting

Fig. 26. Un filtro perfilador puede descomponerse en dos máscaras aplicadas de forma sucesivas.

La primera de las dos máscaras descritas en la fig. 26 corresponde al elemento neutro que, tras la convolución, produce una imagen idéntica y la segunda es la que se utiliza para suavizar una imagen. Por lo tanto, el efecto de un filtro Laplaciano es similar al efecto de sustraer, de la imagen original, una imagen desdibujada. En la fig. 27 se representa en el sistema de ejes cartesiano la intensidad de cada píxel frente a su situación espacial.

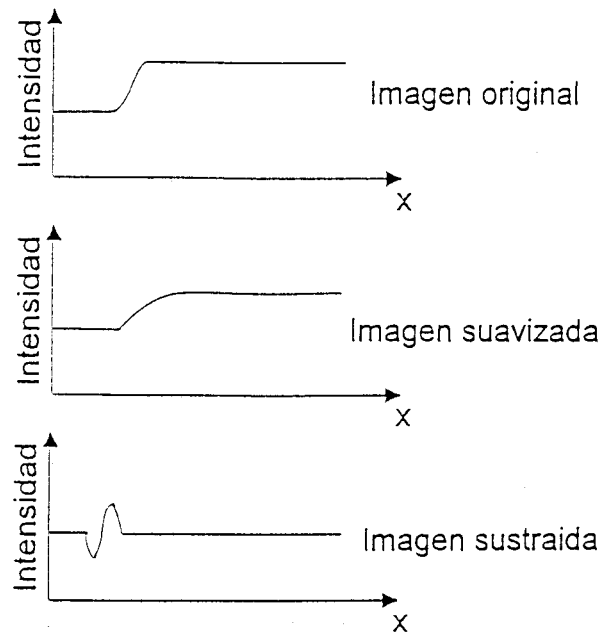


Fig. 27. En este esquema puede observarse el efecto que provoca la sustracción de la imagen suavizada a la original.

6.5.2. Filtros digitales mediante transformadas de Fourier

Las técnicas más poderosas para procesamiento digital son aquellas que recurren al análisis mediante transformadas de Fourier. Se basan en un teorema que establece que una función armónica puede ser representada por una serie de funciones seno y coseno que difieren en la frecuencia, amplitud y fase. La transformada de Fourier es una función cuya frecuencia y amplitud están relacionadas con las componentes del armónico de la función original de donde deriva. Por ejemplo, si tenemos una función de la forma $f(x)=\cos(2\pi \cdot f \cdot x)$, la transformada de Fourier es de la forma representada en la fig. 28.

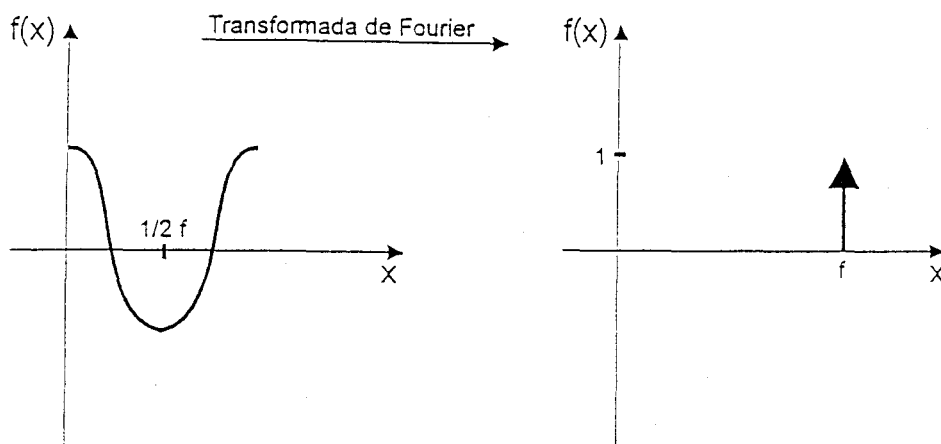


Fig. 28. Transformada de Fourier de una función trigonométrica.

Mediante la transformada de Fourier, convertimos una función que varía con el espacio, en otra que varía con la frecuencia.

Gracias a esta técnica, y con el diseño de filtros de Fourier adecuados, se consigue eliminar altas y bajas frecuencias espaciales. El método es especialmente poderoso cuando se pretende filtrar ruido armónico.

Otra característica importante de la aplicación de la transformada de Fourier es la semejanza que ofrece en su resultado con la convolución descrita en el apartado anterior. La operación de convolución sobre un píxel implicaba las operaciones del producto y la suma, así como máscara de convolución. Esta operación es similar al filtro de Fourier, donde cada valor del filtro de Fourier es multiplicado por su correspondiente píxel en la transformada de Fourier de la imagen.

Las dos operaciones están relacionadas porque la operación de convolución es idéntica a la operación de filtro de Fourier cuando dicho filtro es la transformada de Fourier de la máscara de convolución. Por lo tanto, se podrá utilizar cualquiera de estas dos técnicas con idéntico resultado. La única diferencia

radica en trabajar en el “espacio de la imagen” o hacerlo en el “espacio de Fourier”.

La decisión de aplicar una u otra operación depende de algunas consideraciones:

- La transformada de Fourier conlleva un considerable tiempo de computerización y de memoria, por lo que resulta más lento que el uso de la convolución mediante una máscara pequeña.
- Sin embargo, cuando la máscara es grande, la transformada de Fourier es más rápida que la operación de convolución.

7. PROGRAMACIÓN DEL SISTEMA DE IMAGEN

7.1. Introducción

En el sistema de adquisición de imágenes, la programación del software utilizado ha tenido una gran relevancia. El programa que se describirá a continuación ha sido diseñado e implementado íntegramente en el laboratorio, lo cual ha permitido un mayor control de los experimentos, al ser desarrollado en función de las exigencias de los mismos.

Cuando nos planteamos un lenguaje de programación, nos decidimos por Visual Basic. La elección se basó en la facilidad y rapidez para desarrollar una aplicación, así como, en un segundo término, la apariencia profesional que muestra en pantalla. Sin embargo, tanto en la adquisición como en el procesamiento de las imágenes, presentaba el inconveniente de la lentitud con que realizaba estas tareas. Debido a esto, recurrimos a ciertas librerías de Windows Api (Application Programming Interface) que mejoraban esta carencia. En este punto es donde se justifica plenamente la elección de Visual Basic, por ofrecer la posibilidad de incorporar DLL (Dynamic Link Libraries), siendo ésta una de sus mejores virtudes y que lo hace extraordinariamente potente.

Pero en el mercado no existían todas las librerías que necesitábamos, con lo cual sólo nos quedaba el recurso de crear nuestras propias librerías en lenguaje “C”. De esta forma, todas las funciones que gobiernan la cámara, tales como abrir

y cerrar el obturador, integrar y limpiar los valores de la CCD o regular el tiempo de exposición, se construyeron sobre una única DLL. También se programaron otras DLL para realizar diferentes tratamientos y análisis de las imágenes que en Visual Basic habrían requerido mucho tiempo de procesado. Todas ellas fueron programadas en "C" e invocadas desde Visual Basic.

En síntesis, abordamos las tareas de programación del siguiente modo:

1. En Visual Basic se crearon las formas, es decir, las pantallas que daban acceso a las utilidades del programa mediante los comandos. También se programó en este lenguaje la gestión de ficheros, la presentación en pantalla de las imágenes y la selección de las variables que se emplean en la adquisición.
2. En "C" se programaron las DLL que incluyen todas las funciones de gobierno de la CCD. Otras DLL escritas en este lenguaje generan BitMaps, calculan valores de intensidad luminosa, convierten formatos, procesan imágenes y determinan su centro de gravedad. En última instancia, estos programas fueron invocados desde Visual Basic siguiendo el protocolo habitual que se utiliza con las funciones de Windows Api.

En la fig. 29 se esquematizan los diferentes recursos de programación empleados y las diferentes utilidades de la aplicación utilizada en nuestros experimentos.

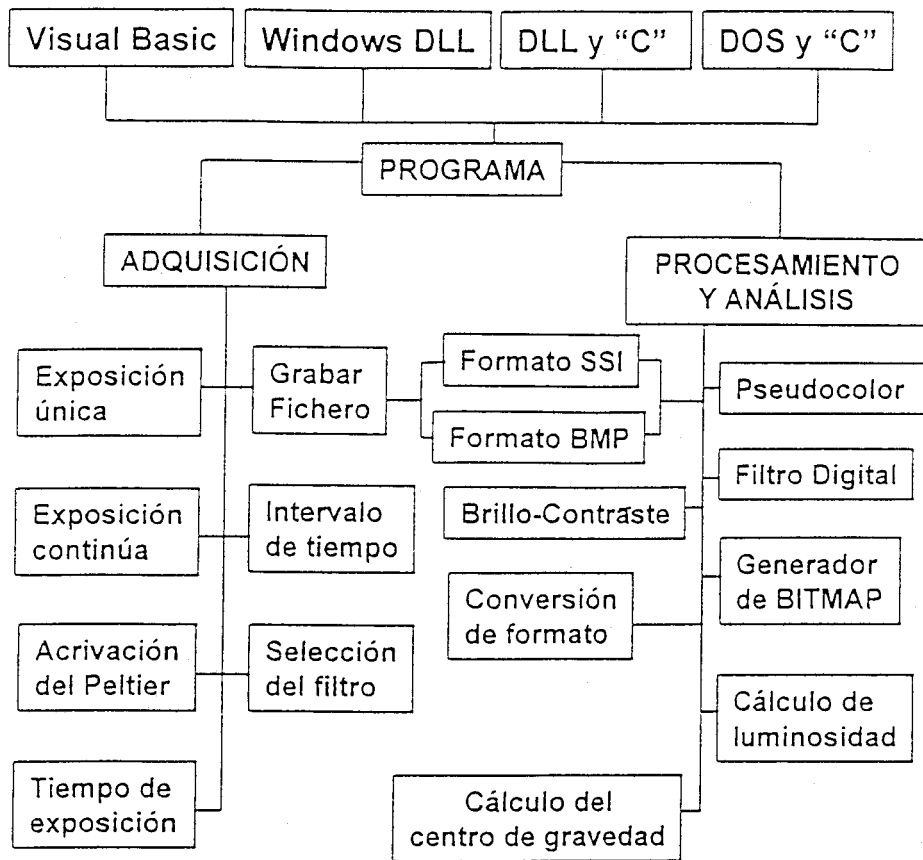


Fig. 29. Representación de los lenguajes de programación utilizados en nuestra aplicación y descripción de algunas de sus principales funciones.

7.2. Programación de las DLL

Las DLL juegan un importante papel en la filosofía del entorno Windows. Su principal característica es la de ser llamadas en el periodo de ejecución de cualquier aplicación. Dicho de otro modo, una DLL es una librería de funciones a las que un programa puede acceder de forma dinámica en el transcurso de su ejecución. Las direcciones de memoria que necesita el programa para acceder a la librería de funciones se fija cuando se crea el fichero ejecutable y permanece inalterado durante su ejecución. Ejemplos de DLL en Visual Basic son todos los controles que se utilizan en el diseño de la aplicación.

Existen varias razones por las que es recomendable el uso de las DLL:

1. Posibilita el acceso a funciones "Run-Time" de "C". Estas funciones no serían reconocidas por Visual Basic de no ser DLL.
2. Las DLL permiten compartir una sola copia de una función ejecutable. Es decir, si hubiese diez programas ejecutándose en un entorno multiproceso, y cada uno de ellos utilizara una misma función, no se necesitarían diez copias de esa función, sino que una es compartida por los diez programas.
3. Da acceso a funciones de Windows API (Application Programming Interface). Estas funciones son de gran utilidad, ya que, debido a la amplia librería disponible, facilitan la programación de Visual Basic. Normalmente se requieren rutinas de llamada para permitir su incorporación a este lenguaje de programación.
4. Mayor velocidad debido a la proximidad del lenguaje "C" al código máquina.
5. Los códigos y datos de las DLL solo se cargarán si son necesarios. Como consecuencia, se requerirá menos cantidad de memoria y menos tiempo cuando se inicialice el programa.
6. Si la función ejecutable, la DLL, es mejorada, puede ser sustituida por la versión antigua sin tener que modificarse ni reprogramar las aplicaciones que la utilizan.

7.3. Tipos de ficheros

En la mayoría de los programas, existe la necesidad de leer y/o grabar datos de un fichero. Como el tipo de información puede ser muy diferente, también lo es el tipo de fichero al que se desea acceder. De esta forma, tanto en Visual Basic como en "C" se distinguen tres tipos: de acceso aleatorio, secuencial y binario.

1. Acceso *aleatorio*. Es el más utilizado cuando el programa gestiona una base de datos en la que cada registro está compuesto de diferentes campos. Por ejemplo, una agenda digital contemplaría la posibilidad de leer y escribir los datos de una persona, de forma que un registro

estaría compuesto por los campos nombre, apellidos, teléfono, etc... Cada registro ocuparía el mismo número de bytes independientemente de si se completan o no (puede que los datos no ocupen la misma extensión, por ejemplo el nombre de dos registros diferentes). La principal ventaja de este tipo es acceder a un registro cualquiera y, por lo tanto, a todos los campos del mismo.

2. *Acceso secuencial.* Mientras que en el fichero de acceso aleatorio se accede registro a registro, en el secuencial se hace línea a línea. Así, tanto cuando se lee, como cuando se escribe en un editor, leemos o escribimos línea a línea, en el fichero, dicho texto. Es la manera más adecuada de gestionar ficheros de texto.
3. *Acceso binario.* En este tipo, el acceso es byte a byte. En nuestro caso, y debido a la propia estructura física del hardware, es el más conveniente a la hora de registrar y leer las imágenes. Posibilita localizar bytes específicos que nos permiten una mayor versatilidad en el procesamiento de los mismos.

Los tipos de fichero utilizados para grabar y de esta forma conservar, procesar y analizar las imágenes, son los formatos “SSI” y “BMP”.

7.3.1. Estructura del fichero en formato SSI

Éste es el formato natural de la tarjeta digitalizadora de la cámara. El sensor que utiliza la cámara está compuesto por 31680 pixeles (192 x 165) y la señal adquirida por cada uno de ellos es convertida a un valor de resolución de 12 bits, es decir precisa 2 bytes para almacenar el valor de cada píxel.

Los datos de la imagen son transferidos línea a línea (cada una formada por 192 pixeles) hasta completar las 165 líneas que componen la CCD. Así el número total de bytes transferido es de 63360 bytes.

Es importante tener en cuenta que la disposición de los bytes no mantiene el orden secuencial, sino que el primer byte es el menos significativo y el segundo,

el más significativo. Si queremos conocer el valor decimal correspondiente que se archiva en este formato, deberemos multiplicar el valor decimal del segundo byte (el más significativo) por 256 y sumarle el valor decimal del primero.

7.3.2. Estructura del fichero en formato BMP

Si bien es cierto que el formato SSI era el que mayor resolución tenía (puesto que se aprovechaba la máxima resolución de 12 Bits de la cámara) y, por lo tanto, era el considerado para los análisis de la imagen, sin embargo, en algunos casos, presentaba ciertas dificultades y se optó por la conversión a otro formato más universal, concretamente al BMP.

La conversión a este formato se fundamentó en la comodidad que presentaba para ser exportado a otras aplicaciones, como editores gráficos o de texto, de uso general (Word Perfect, Corel Draw, Power Point...).

En esta estructura se contemplan dos bloques bien diferenciados: uno es el cabecero ("header") en donde se definen todos los aspectos relacionados con la presentación de la imagen (tamaño, tipo de fichero, resolución, número de colores empleados, paleta utilizada...); el otro es la información propiamente dicha de la imagen ("Info"), donde se graban los valores correspondientes a la intensidad luminosa de cada píxel.

8. DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS

8.1. Introducción

Antes de comenzar a programar nos preguntábamos como sería nuestra aplicación y qué esperábamos obtener de ella. En primer lugar, queríamos un programa que pudiera adquirir imágenes y así poder tener el máximo control sobre dicha adquisición. El programa debía ser específico para la cámara que empleáramos y para los experimentos que diseñásemos.

Por esta razón, al describir la aplicación, la subdividiremos en tres apartados. Uno de ellos se basará en la adquisición y los otros, en el procesamiento y análisis.

8.2. Adquisición de imágenes

Partiendo del menú principal y seleccionando el modo de adquisición, nos situamos en una pantalla independiente en donde todos los controles están relacionados con las propiedades inherentes a la adquisición y con otras que se ven involucradas en la misma.

Lo primero que debemos hacer antes de proceder a la exposición de la CCD es activar el dispositivo que enfría el sensor. Este dispositivo provocará un enfriamiento del cristal de silicio evitando de esta forma ruido eléctrico.

El segundo paso es la selección del modo de exposición, que puede ser único o continuo. En ambos casos se deberá señalar el tiempo de exposición adecuado. Si se trata de exposición continua, escogeremos el intervalo de tiempo que transcurrirá entre exposiciones. Si se considera 0 ms, el tiempo real entre adquisiciones lo marcará el tiempo necesario para la integración por parte de la tarjeta digitalizadora. Se contempla también la posibilidad de que las imágenes adquiridas se muestren en seudocolor y no en blanco y negro.

Otros comandos útiles son los que gobiernan otros periféricos, como el obturador que intercalamos entre la fuente de excitación y el espécimen, y la rueda de filtros que selecciona la longitud de onda de excitación.

El primero fue especialmente importante para preservar las preparaciones cargadas con quinacrina de una innecesaria iluminación de excitación, mientras que el segundo nos permitía, gracias a una señal de voltaje aplicada a un motor que hacía girar la rueda de filtros, poder adquirir imágenes de fluorescencia a dos longitudes de onda diferentes.

Por último, es posible, en esta misma pantalla de adquisición, decidir el directorio donde se ubicarán las imágenes adquiridas y el nombre del fichero.

En la fig. 30 se ilustra la pantalla a la que se hace referencia y pueden verse los comandos a los que accede el usuario y que ya han sido descritos en este apartado.

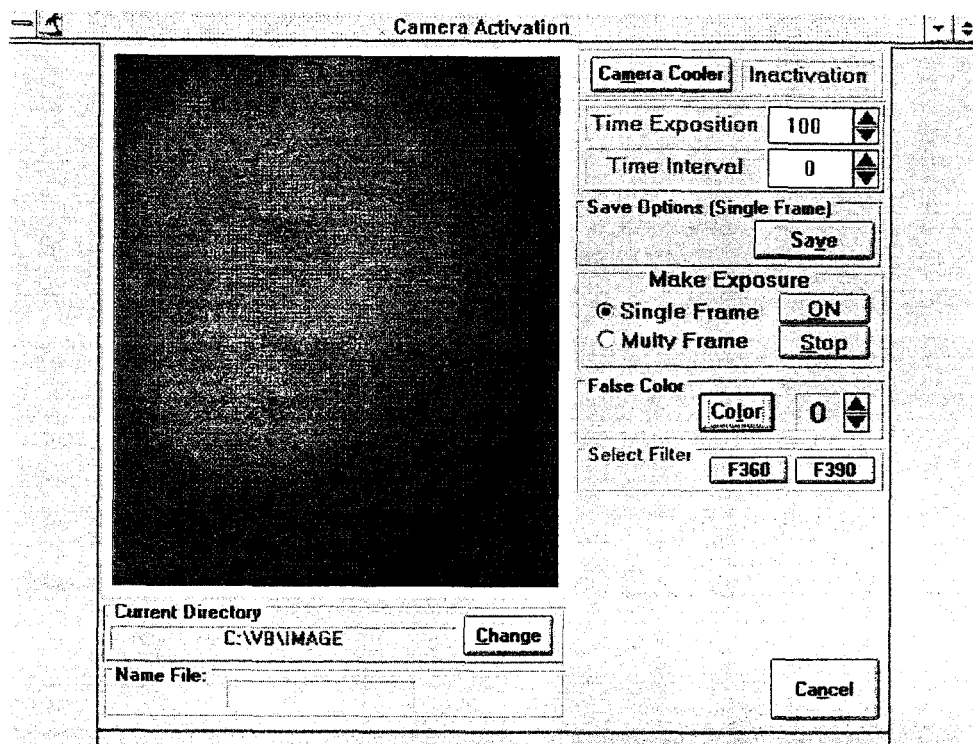


Fig. 30. La imagen adquirida se presenta siempre en pantalla, bien sea la adquisición única o continua. El obturador que se antepone entre la lámpara y la preparación puede regularse de forma automática y sincronizada con el obturador de la cámara o manual, para que permanezca abierto durante todo el proceso de adquisición. Respecto al filtro empleado, sólo contemplamos la posibilidad de seleccionar el filtro antes de la adquisición.

8.3. Procesamiento de las imágenes

Una vez hechos los experimentos y obtenidas las imágenes, se recurre al procesamiento y análisis de las mismas. El programa nos permite modificar el contraste y brillo de la imagen. También, dependiendo del tipo de análisis y de la información que queramos obtener, podremos aplicar diferentes máscaras de convolución.

En el primer caso, una pantalla de dialogo permite controlar el grado de contraste y/o brillo de la imagen procesada. El algoritmo utilizado en este proceso consistió en relacionar el histograma de entrada y el de salida mediante la

aplicación de una ITF (ver el apartado 6.4.1- Modificación del contraste a través del histograma).

Respecto a la máscara con la que se realiza la convolución, el programa contempla diferentes máscaras prefijadas, así como la posibilidad de incorporar otras de tercer orden, definida por el usuario, asignando los valores del kernel.

Otro procesamiento usual consistió en la conversión de formato. Para que fuera eficaz, se diseñó una utilidad que permite acumular en una lista todos los ficheros del tipo SSI que deban ser convertidos, y el programa en pocos segundos los convierte secuencialmente al formato BMP evitando la operación de hacerlo uno a uno, tal como se muestra en la fig. 31.

Por otra parte, cuando quisimos determinar la pérdida de fluorescencia, el centro de gravedad o los transientes producidos en una región determinada, se generaba un nuevo fichero correspondiente a esa región, de manera que se consideraba a todos los efectos como si fuese una imagen independiente.

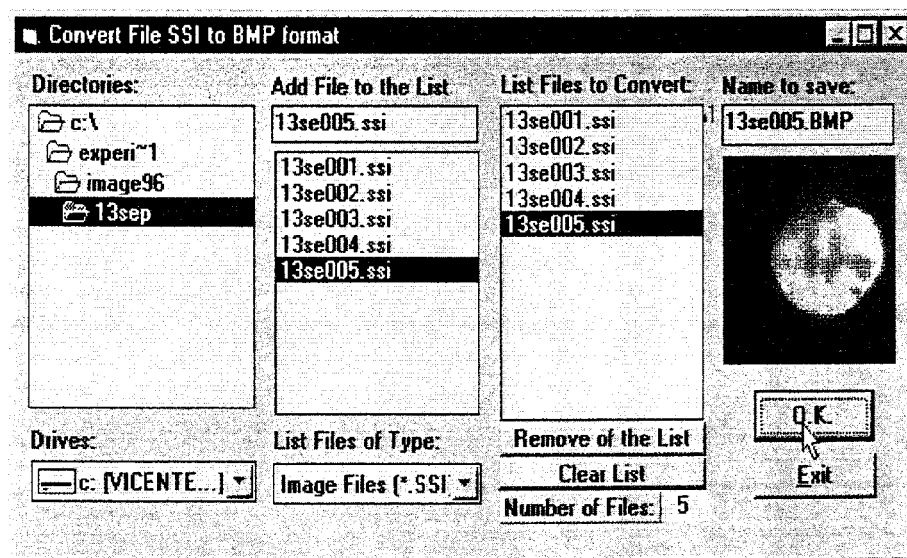


Fig. 31. Seleccionando el directorio (primera columna) donde se ubican los ficheros que se desea convertir y marcando los mismos con el ratón (segunda columna), se van acumulando en la tercera columna. Una vez finalizada la selección de los ficheros, se activa el proceso de conversión que trabajará secuencial y automáticamente sobre todos los ficheros hasta convertirlos.

8.4. Análisis de las imágenes

La base principal del análisis consistió fundamentalmente en cuantificar la intensidad luminosa en regiones concretas de la imagen. De esta forma pudimos conocer diferentes parámetros objeto de nuestro estudio, como la fusión de vesículas, que implicaba pérdida de fluorescencia, las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia, que indicaban transientes de calcio o la movilidad del centro de gravedad de la imagen. Por otra parte, poder cuantificar la intensidad de fluorescencia, bien de forma global, bien en regiones de interés, permite aplicar el método del cociente de intensidades de fluorescencia para calcular la concentración intracelular del ion calcio.

En la fig. 32 se muestra de qué forma cuantificábamos y representamos gráficamente la intensidad de fluorescencia. Esto nos permitía ver de forma inmediata las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia, tanto de forma cualitativa como cuantitativa.

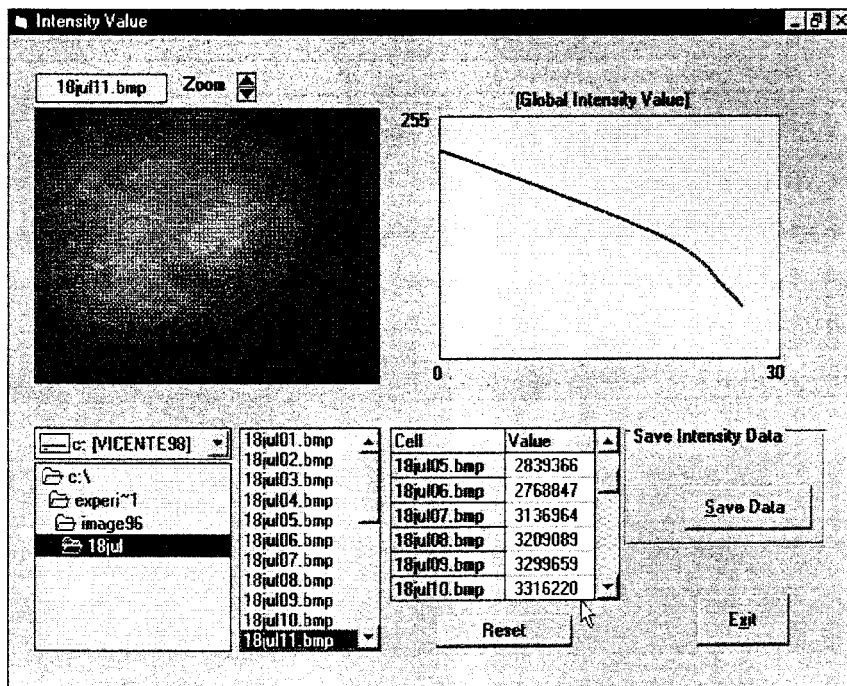


Fig. 32. Cada vez que seleccionábamos un fichero, se visualizaba su imagen correspondiente, y un algoritmo —escrito en “C” e invocado como una DLL— permitía leer el valor de cada píxel. Mediante el sumatorio de todos los que componían la imagen, podíamos conocer el valor de intensidad luminosa de la región seleccionada.

En los experimentos que hicimos con quinacrina era interesante poder observar de una forma cómoda de qué manera se producía la fusión. A veces, al comparar dos imágenes, separadas en el tiempo, de mastocitos a los que se les indujo la exocitosis con el secretagogo 48/80 (producto condensado del N-metil-p-metoxi-fenilamina con formaldehído) a una concentración de 2mM, era posible apreciar la fusión de un grano secretor. Sin embargo, para facilitar esta observación, programamos una utilidad que nos permitía visualizar una película del mastocito degranulándose, a partir de las imágenes adquiridas previamente. En esta película seleccionábamos las imágenes que la componían, así como la velocidad o intervalo entre imágenes. De esta forma pudimos observar más claramente el proceso de exocitosis y estudiar su cinética, teniendo en cuenta el punto de aplicación del secretagogo que origina dicho proceso.

RESULTADOS

1. EXISTE UNA RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN CÉLULAS CEBADAS CARGADAS CON QUINACRINA Y LA EXOCITOSIS INDUCIDA POR 48/80

La observación mediante microscopía de fluorescencia, junto con la utilización de técnicas de imágenes, permiten estudiar el transcurso temporal de la exocitosis en células cebadas cargadas con quinacrina.

Para teñir las células, han de estar en contacto con el colorante durante 10 min. aproximadamente, con el fin de que éste penetre de forma pasiva al interior celular y se aloje en las vesículas. El resto de fluoróforo, que permanecía en el medio extracelular, se elimina mediante un intenso lavado con solución externa, evitando, de esta forma, el ruido ocasionado por la indeseable fluorescencia de estas partículas.

Es muy importante determinar el periodo de incubación óptimo para que las vesículas queden teñidas, y no sobrepasarlo, con el objeto de evitar durante la experimentación el exceso de colorante que incrementa el daño celular ocasionado por la fototoxicidad atribuida a la quinacrina.

El intervalo de tiempo entre adquisiciones consecutivas fue de 4 seg. y la magnificación del objetivo empleado de x63 de inmersión de aceite. La exocitosis se indujo aplicando a la preparación el secretagogo 48/80, un polication que activa el proceso de degranulación.

La degranulación del mastocito provoca una pérdida de fluorescencia debida a la difusión al exterior celular del colorante que permanecía atrapado en el interior de las vesículas.

1.1. Las células cebadas cargadas con quinacrina, cuando exocitan, presentan una pérdida de intensidad de fluorescencia en un breve periodo de tiempo.

La observación directa al microscopio pone de manifiesto que las células cebadas cargadas con quinacrina experimentan una atenuación de su intensidad de fluorescencia cuando se activa el proceso de exocitosis con 48/80. Para cuantificar dicha observación, se adquirieron imágenes con una cámara CCD digital, lo cual permite registrar y analizar la variación de la fluorescencia emitida por la célula durante el transcurso temporal de la degranulación.

En la fig. 33 puede apreciarse, de izquierda a derecha y de arriba abajo, cómo disminuye la intensidad de la fluorescencia de una célula cebada cargada con el colorante a medida que nos desplazamos por la secuencia de imágenes.

Inmediatamente después de adquirir el segundo fotograma, se aplicó a la preparación, mediante una micropipeta, el compuesto 48/80, lo que provocó una rápida degranulación celular y, como consecuencia, la disminución de la intensidad de fluorescencia a la que nos referimos, motivada por la difusión del colorante al medio extracelular una vez que la vesícula se funde con la membrana.

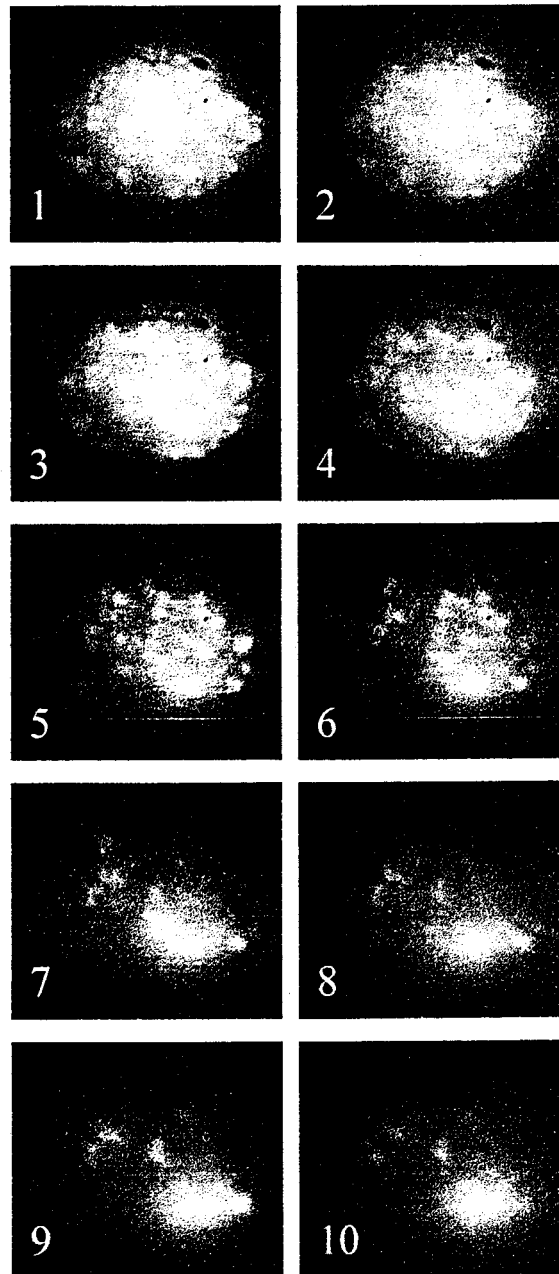


Fig. 33. Célula cebada cargada con quinacrina. Inmediatamente después de adquirirse la imagen, se aplicó a la preparación el compuesto 48/80 para inducir la degranulación. Cuantificando la intensidad de fluorescencia, podemos observar un decrecimiento exponencial de la misma y en función de un ajuste exponencial, se determinó su constante de tiempo, que fue de 25.35 seg.

1.2. Cuantificando la intensidad de fluorescencia de las imágenes, se evidencia un decrecimiento de tipo exponencial.

Mediante el diseño de nuestros propios algoritmos y de su implementación en nuestra aplicación informática, pudimos cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida por la célula. Este procedimiento, encuadrado dentro del análisis de imágenes, consiste en leer el valor numérico de cada píxel y realizar el sumatorio sobre todos los que componen la imagen. Para que los valores finales correspondientes a cada imagen puedan ser evaluados de forma más cómoda, se normalizan de manera que el valor de intensidad máximo de una imagen respecto a las de su secuencia sería del 100%.

En la fig. 34 se representa dicha cuantificación. El eje de abscisas representa el tiempo expresado en segundos, y el eje de ordenadas, la intensidad de fluorescencia en porcentaje. En la gráfica puede verse una meseta inicial correspondiente a la adquisición antes de aplicar el compuesto 48/80, seguida de una fuerte pendiente que corresponde al decrecimiento de la intensidad luminosa provocada por la degranulación celular.

La meseta inicial se debe a la constante intensidad de fluorescencia que provoca el almacenaje del fluoróforo en el interior celular. Sin embargo, cuando se inicia el proceso de exocitosis, esta circunstancia cambia a medida que las vesículas se funden con la membrana y secretan su contenido, entre ellos el colorante que difunde al medio extracelular.

Siguiendo un ajuste exponencial sencillo, descrito mediante la función,

$$y = A_0 + A_1 \cdot e^{-A_2 \cdot x} \quad (22)$$

podemos encontrar la constante de tiempo correspondiente al decrecimiento de intensidad luminosa, que, como puede verse, se ajusta en gran medida a dicha función exponencial. De esta forma, en diferentes experimentos de este tipo, calculamos la constante de tiempo, que era del orden de 20-30 seg^{-1} .

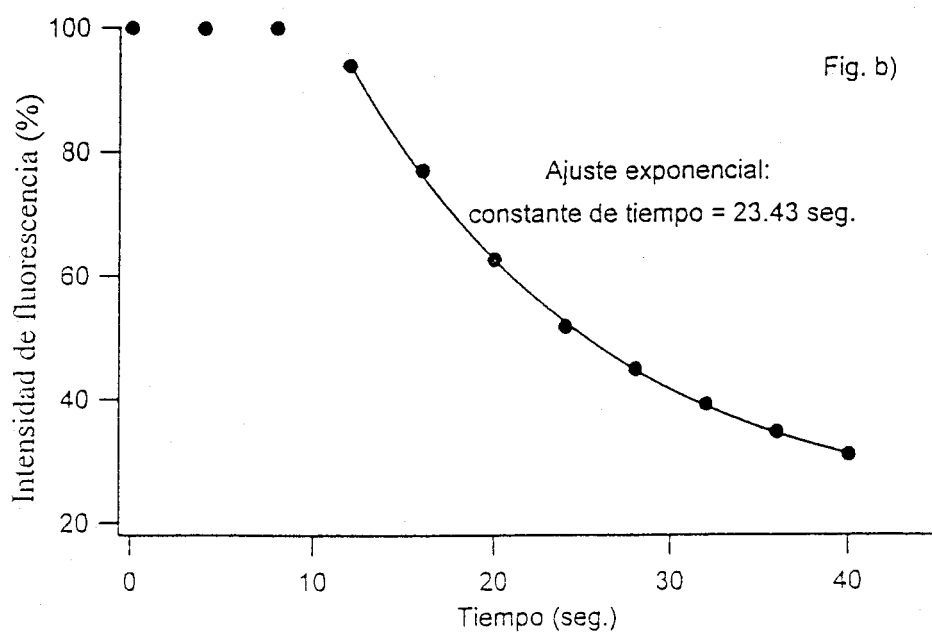
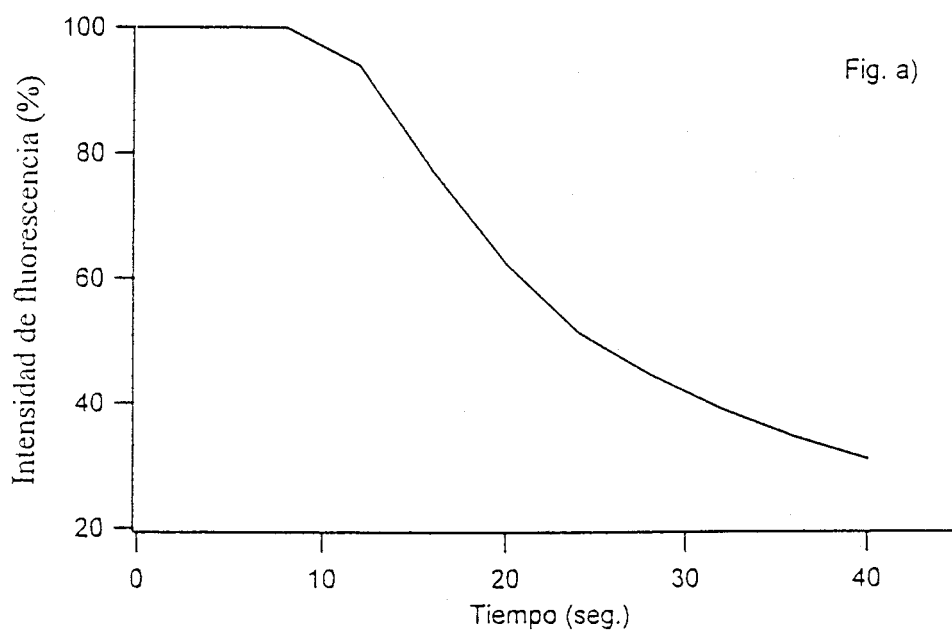


Fig. 34. En las dos figuras se representa el decaimiento de la intensidad de fluorescencia después de inducir, tras la adquisición de la segunda imagen, la degranulación con el compuesto 48/80. En la fig. a) se han unido los puntos que representan la intensidad de fluorescencia mediante una línea poligonal. Para poner de manifiesto la forma en que decrece dicha intensidad, realizamos en la fig. b) un ajuste a una curva exponencial y determinamos la constante de tiempo de la misma.

1.3. La pérdida de intensidad de fluorescencia guarda una relación inversamente proporcional a la capacidad eléctrica de la membrana.

En el registro de la capacidad eléctrica de la membrana adquirido en nuestro laboratorio (fig. 35) se representa el cambio de capacidad, dado en pF, respecto al tiempo, dado en ms. La curva tiene tres fases bien diferenciadas. La primera corresponde a un estado previo a la exocitosis en el que la superficie de la membrana permanece constante. Posteriormente, aparece una fase de subida ocasionada por la fusión de las vesículas a la membrana plasmática que hace aumentar su superficie y, por tanto, la capacidad eléctrica de la célula. Por último, en la tercera fase, cuando la degranulación es completa, no se aprecia cambio de capacidad y la superficie de membrana permanece de nuevo constante.

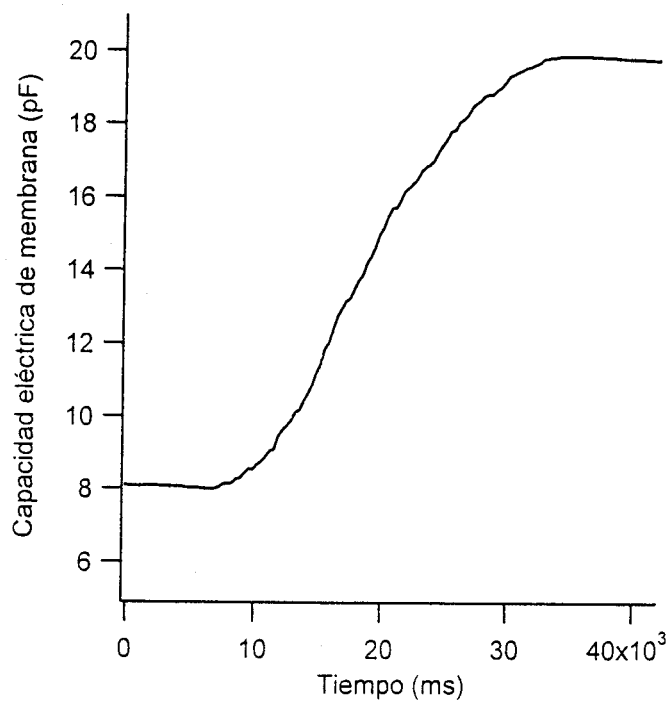


Fig. 35. Representación del cambio de capacidad eléctrica de la membrana en el transcurso temporal de la degranulación. Esta capacidad viene expresada en pF y la unidad de tiempo es el ms. El registro corresponde a experimentos realizados en nuestro laboratorio (cedidos por Rafael Fernández Chacón), e ilustra el aumento de la superficie de la membrana durante la exocitosis. La degranulación se indujo con 48/80.

En los registros que expresan la pérdida de fluorescencia de los mastocitos durante la exocitosis se evidencia una cierta similitud. A una fase de constante intensidad de fluorescencia, previa al proceso secretor, sigue una fase decreciente correspondiente al periodo de degranulación celular.

Corroborando nuestra hipótesis inicial, en esta última fase existe una correlación inversa entre los registros de capacidad y de intensidad de fluorescencia. Mientras que en el primer caso la capacidad aumenta, en el segundo la fluorescencia disminuye.

En la fig. 36 pueden verse los registros antes descritos y la forma exponencial de la fase de subida, en el caso de la capacidad, y de la fase de bajada, en el de la intensidad de fluorescencia.

La razón que explica la relación inversa entre ambas magnitudes se basa en el hecho de que cada vesícula, al fundirse con la membrana, aporta a ésta un incremento de su superficie, mientras que simultáneamente resta un cierto porcentaje de intensidad de fluorescencia al eliminar el colorante al medio extracelular.

En la fig. 37 se ilustra, en el primer sistema de ejes coordenados, la capacidad y la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo para mostrar la relación inversa entre ambas magnitudes. En el segundo sistema de ejes, se representa capacidad frente a fluorescencia para reflejar el decremento de una magnitud respecto a la otra.

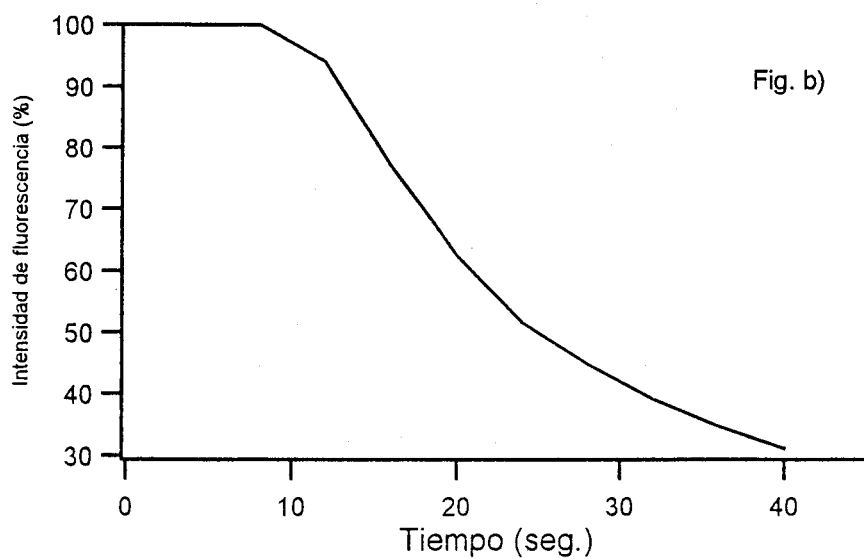
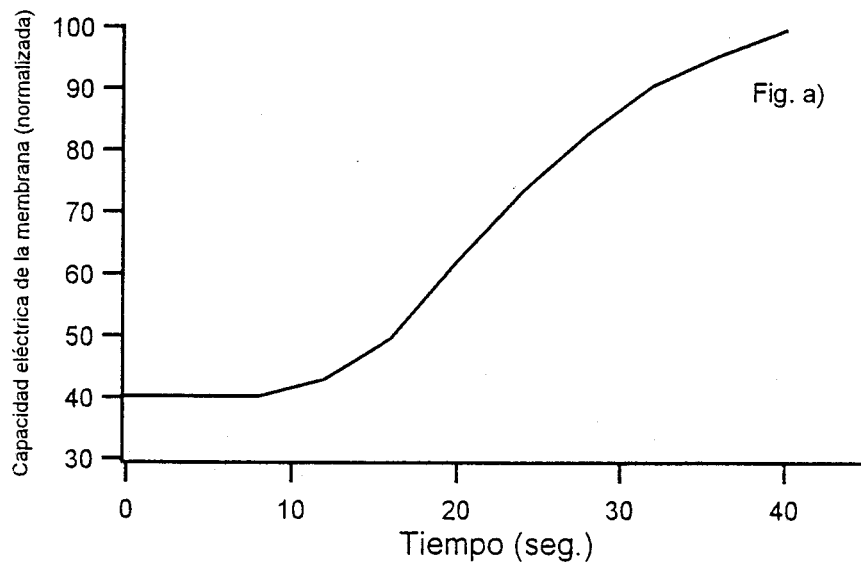


Fig. 36. En la fig. a) se muestra un registro (cedido por Rafael Fernández Chacón) de capacidad obtenido en nuestro laboratorio. El aumento de capacidad de la membrana plasmática durante el proceso de degranulación es exponencial y guarda una estrecha relación con la disminución de la intensidad de fluorescencia en células cebadas cargadas con quinacrina, tal como se muestra en la fig. b). El aumento de capacidad se ha normalizado a 100.

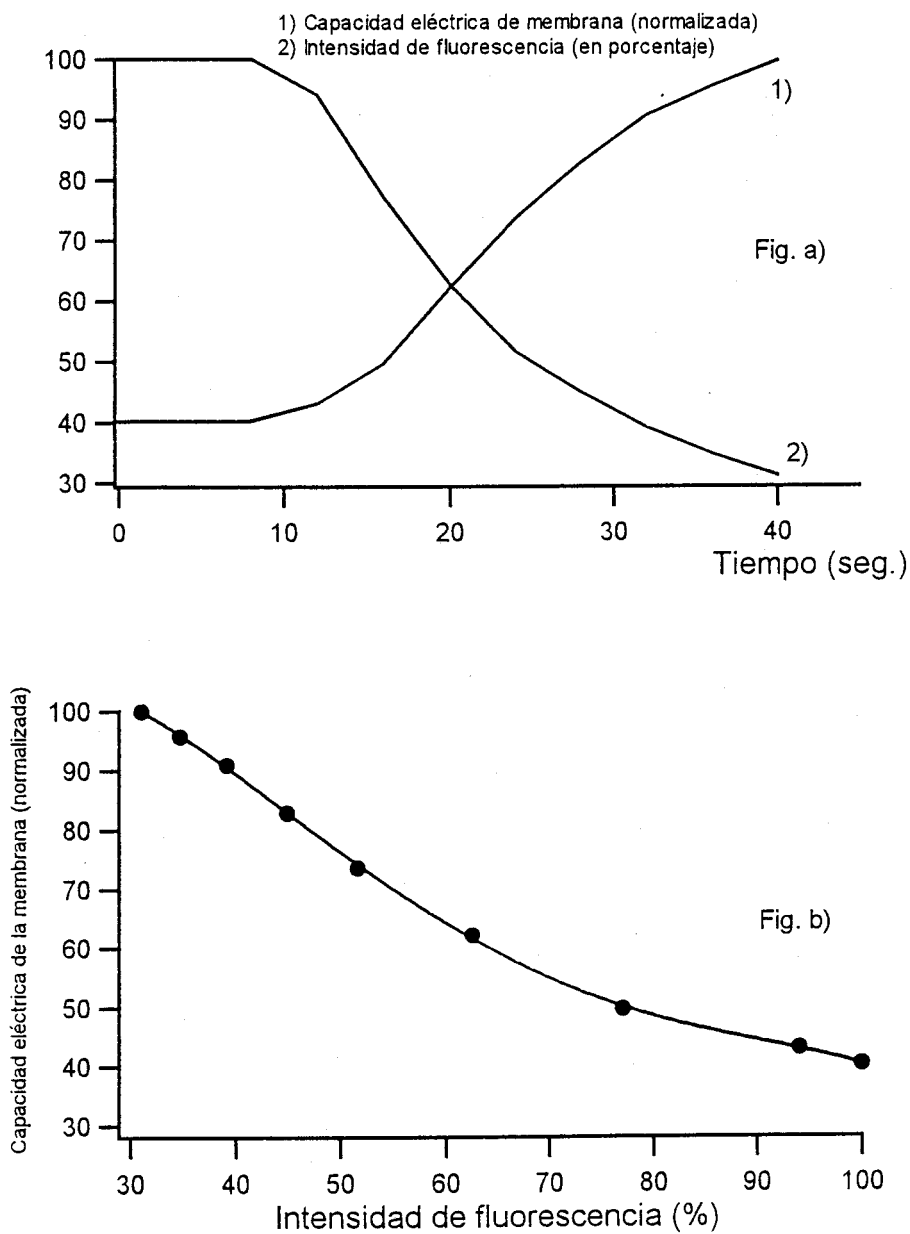


Fig. 37. En este caso se ha representado en el mismo sistema de ejes, fig. a), la capacidad eléctrica de la membrana y la intensidad de fluorescencia. Puede verse cómo mientras una exponencial es creciente (aumento de la superficie de membrana durante la degranulación), la otra es decreciente (disminución de la intensidad de fluorescencia). En la fig. b) se representa en el eje de abscisas la capacidad eléctrica de la membrana, y en el de ordenadas la intensidad de fluorescencia. De esta manera, se pone de manifiesto su relación inversamente proporcional durante el curso temporal.

1.4. La pérdida de intensidad de fluorescencia no es uniforme.

Tomando como origen imágenes que muestren la pérdida de fluorescencia, y escogiendo dos regiones distintas de la misma célula, puede observarse que la pérdida de intensidad de fluorescencia no es uniforme en toda la célula, sino que se produce de forma local debido a que el proceso de exocitosis es focal y, como consecuencia, esta pérdida de fluorescencia dependerá del número de vesículas que se fusionen a la membrana plasmática y de la localización de las mismas.

En la fig. 38 se escogieron dos regiones distintas de la célula para analizar las diferencias existentes entre ambas durante el periodo excitotico.

En la región a), situada en la parte izquierda de la imagen, la disminución de intensidad se produce de forma muy tenue, casi inapreciable, mientras que en la región b) este fenómeno es mucho más acusado.

Cuantificando la intensidad de fluorescencia en ambas regiones por separado, y representando el curso temporal de las mismas, se evidencia la irregular pérdida de fluorescencia. Este hecho es, por tanto, una demostración inequívoca de la selectividad local que poseen estas células durante la secreción.

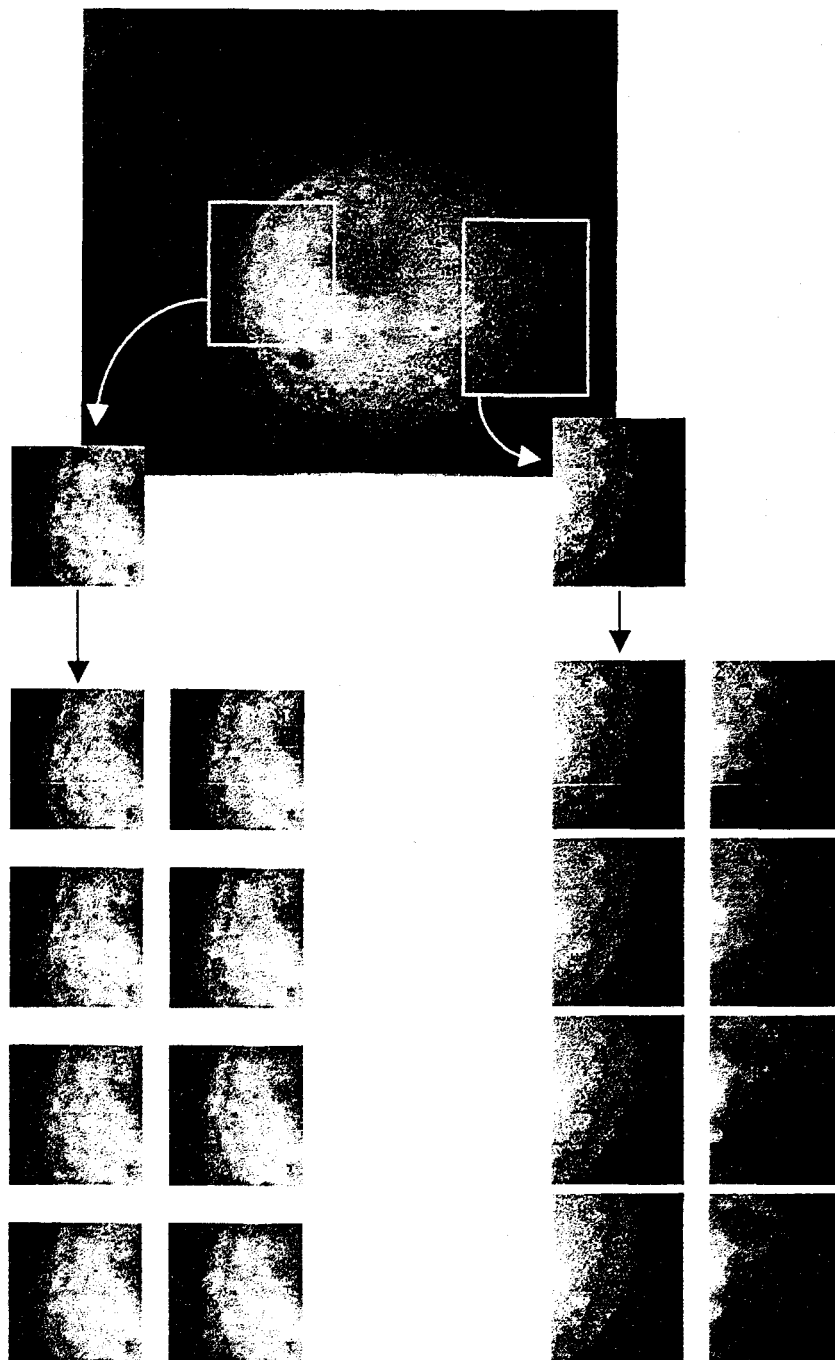


Fig. 38. El decrecimiento de la intensidad de fluorescencia no es uniforme, sino que depende de la región que se estudie. En la figura puede verse que en la región a) el valor de intensidad a lo largo del tiempo prácticamente no varía, mientras que en la b) el decrecimiento es muy acusado.

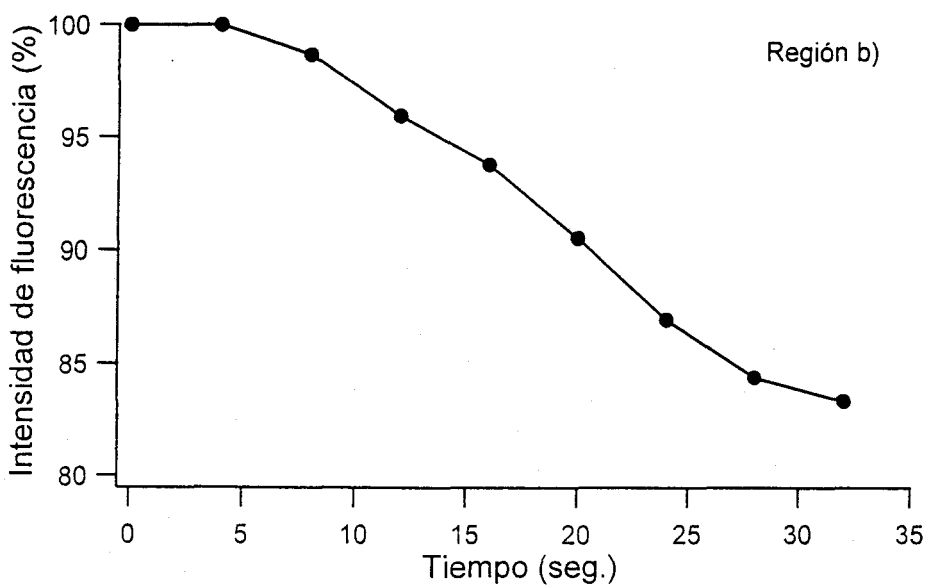
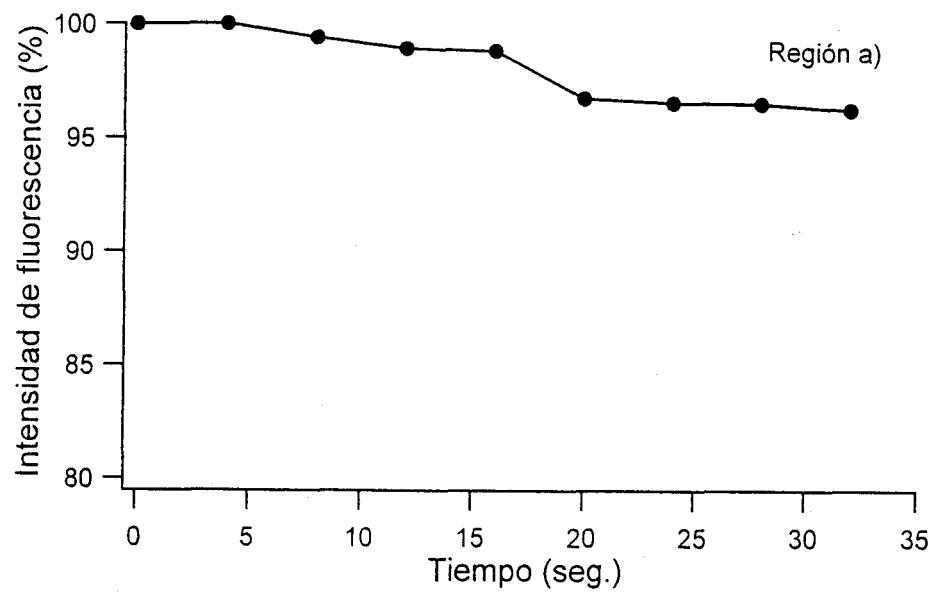


Fig. 39. Cuantificando la intensidad de fluorescencia en dos regiones correspondientes a la misma célula, podemos observar que la pérdida de intensidad, cuando se induce la degranulación con 48/80, no es uniforme, sino que, por el contrario, varía de una forma muy acusada.

2. EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES ES UNA POTENTE HERRAMIENTA QUE PERMITE ESTUDIAR, EN EL ÁMBITO DE GRANO ÚNICO, EL TRANCURSO TEMPORAL DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CEBADAS CARGADAS CON QUINACRINA.

Tal como se describió detalladamente en “Material y métodos”, las propiedades ópticas de los microscopios convencionales dotados de iluminación de epifluorescencia, no producen una imagen perfecta del espécimen, sino que, por el contrario, está contaminada con información fuera de foco. Como resultado, la imagen tiene un reducido contraste y un incremento de la profundidad de campo. Este problema es especialmente importante cuando se pretende tener una alta resolución espacial que permita la observación detallada de las vesículas.

Este inconveniente se resolvería adquiriendo la imagen con la técnica de microscopía confocal que sólo detecta información que esté a foco. Sin embargo, tiene la gran desventaja de provocar una alta fototoxicidad en células cargadas con quinacrina, ocasionada por la gran energía que conlleva la excitación con láser.

Una alternativa es recurrir al procesamiento digital y a algoritmos que eliminen información fuera de foco.

En los resultados que se describen en este apartado, así como en las imágenes expuestas a continuación, se han recurrido a las siguientes manipulaciones que clasificaremos en dos categorías:

1.- *Análisis de imágenes* (producen información descriptiva de la imagen digital). Como ya hemos detallado, se cuantifica el valor de intensidad de fluorescencia de la imagen leyendo los valores de cada píxel.

El desarrollo de la programación de nuestros propios algoritmos en el laboratorio permite una gran versatilidad en la lectura de la intensidad de fluorescencia de la imagen, de forma que es posible realizarla en píxeles individuales o regiones aisladas que sean de interés.

2.- *Mejora de la calidad de la imagen* (no aporta información descriptiva). A partir de las imágenes adquiridas durante los experimentos, se genera otra

secuencia correspondiente a regiones de interés que forman parte de las imágenes originales.

Seguidamente se procesan estas regiones, alterándose el contraste y el brillo de la imagen. Tales manipulaciones afectan tan sólo a los valores de gris de píxeles individuales y no alteran para nada la información espacial.

Como consecuencia de estos dos tratamientos digitales, se obtiene una gran definición de las vesículas de modo que se puede seguir el curso temporal de la degranulación con una gran resolución espacial.

El procesamiento empleado habitualmente consistió en una transformación del contraste y brillo de la imagen mediante la implementación de nuestros propios algoritmos basados en los descritos en la literatura y ya expuestos con anterioridad.

El procedimiento consiste en representar las imágenes, cuantificando los valores numéricos de los píxeles que la forman, en histogramas de frecuencias. Considerando una tabla de doble entrada y aplicando una transformación según una función lineal, se hace corresponder al valor de cada píxel original, otro valor resultado de dicha transformada.

Siguiendo la descripción gráfica de la fig. 40, y tomándola como ejemplo, a los píxeles que tienen valores numéricos de 50 y 100 (valor de X) de intensidad de fluorescencia, se les hace corresponder mediante la función lineal $Y = 2 * X + 50$ los valores de:

$$Y = 2 * 50 + 50 = 150$$

$$Y = 2 * 100 + 50 = 250 \quad (23)$$

Esto significa que dos píxeles vecinos con intensidades de 50 y 100, se transforman en dos píxeles que tienen una mayor diferencia en sus valores numéricos correspondientes, 150 y 250, es decir aumenta el contraste de la imagen.

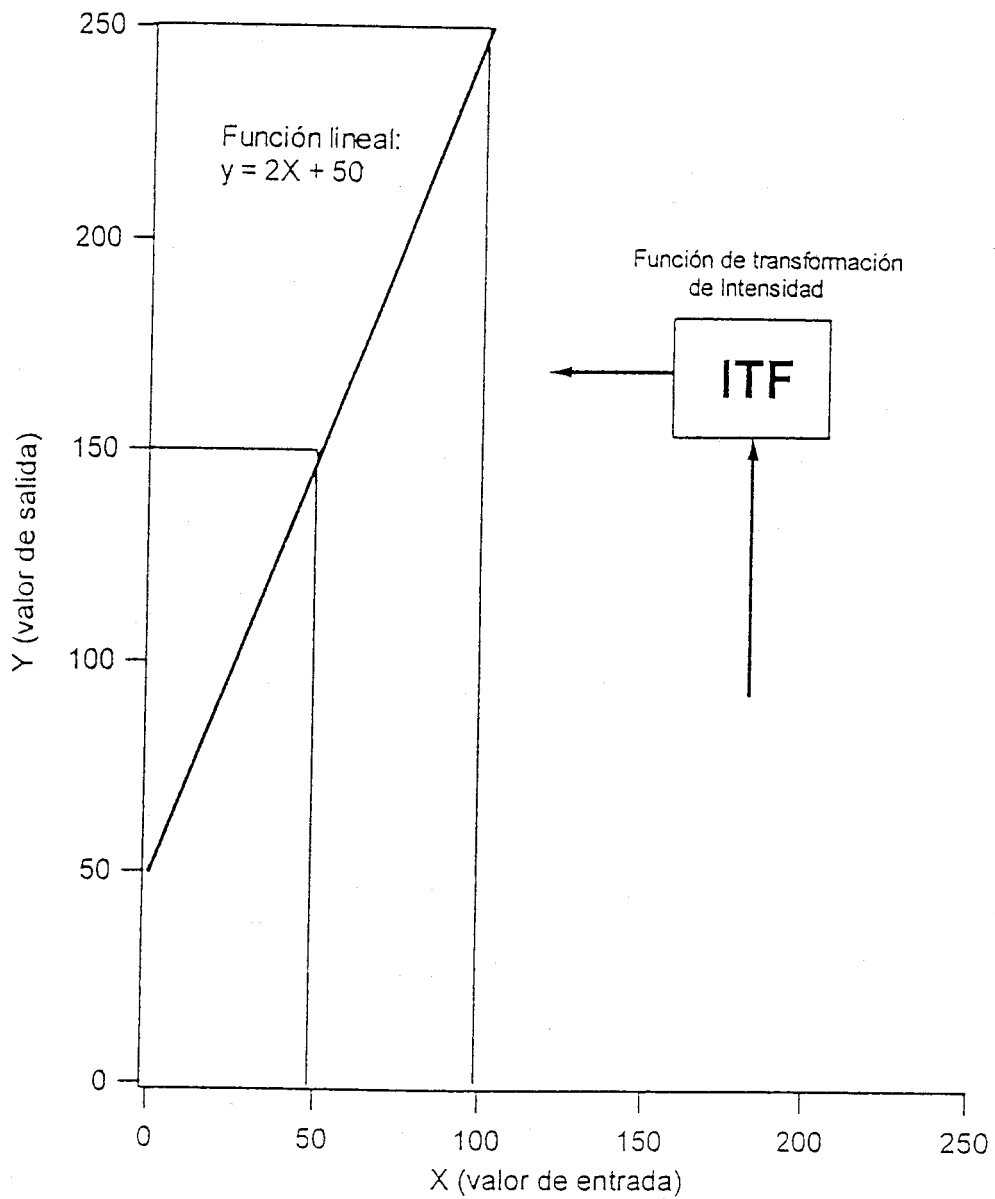


Fig. 40. En el eje de abscisas se representan los valores iniciales correspondientes a los píxeles de la imagen original antes de ser procesada. Levantando la proyección vertical de cada valor inicial hasta que corte a la recta descrita por la función afín correspondiente, y proyectando sobre el eje de ordenadas dicho punto, se obtiene el valor de salida, es decir, el valor que tendría cada píxel de la imagen una vez procesada.

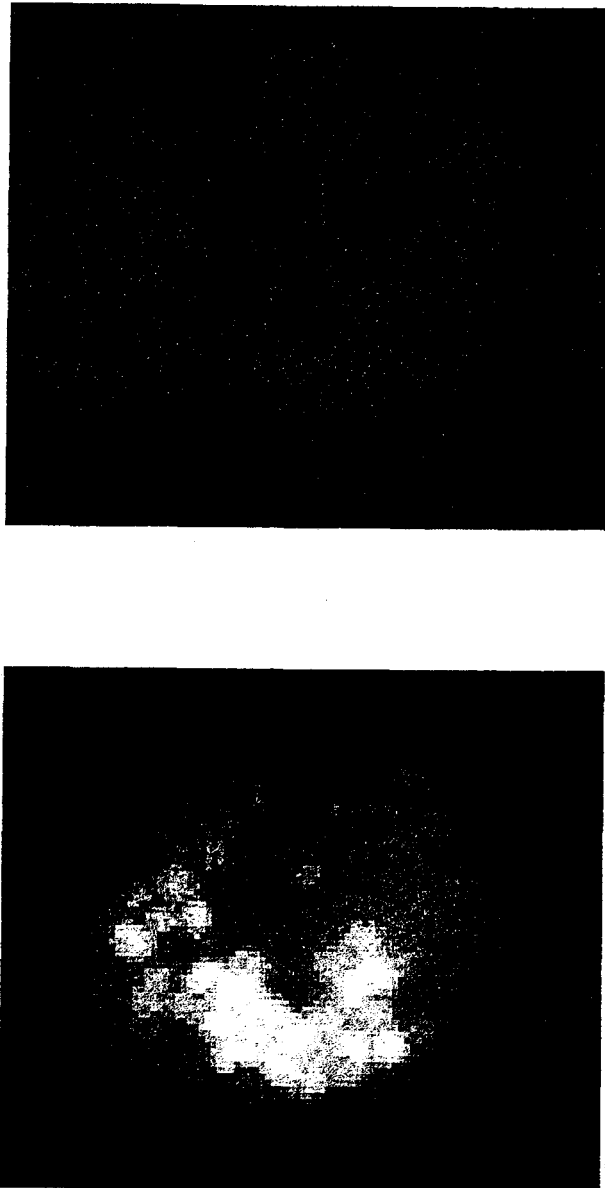


Fig. 41. Estas imágenes, correspondientes a la misma célula cebada y cargada con quinacrina, sirven para ilustrar cómo afecta el cambio del brillo y contraste. a) En la imagen superior, correspondiente a la adquirida inicialmente por la cámara CCD digital, queda poco patente el contorno no sólo de los granos, sino incluso de la propia célula. Además, presenta una elevada fluorescencia en el medio extracelular que no ha de cuantificarse por no ser debida a la fluorescencia de la propia célula. b) Sin embargo, tras el procesado (parte inferior de la figura), en la imagen se destacan más claramente tanto el contorno de la célula como la propia vesícula. La fluorescencia que proviene del exterior ha sido excluida.

2.1. La pérdida de intensidad de fluorescencia se produce en saltos discretos que corresponden a fusiones individuales de granos secretores.

Nuestro programa de análisis tiene la opción de visualizar una película a partir de imágenes adquiridas de forma secuencial. En esta película se puede especificar la rapidez en la presentación de los diferentes fotogramas que la forman, con lo que se tiene una mayor facilidad para observar las fusiones individuales de los granos secretores con la membrana plasmática.

Siguiendo esta metodología, generamos una secuencia de nuevas imágenes a partir de las originales, pero considerando tan sólo la región delimitada por las coordenadas establecidas en dicha selección.

El siguiente paso es cuantificar la intensidad de fluorescencia de estas nuevas imágenes, que corresponderían a un número muy reducido de vesículas. Representando dicha cuantificación a lo largo del tiempo en unos ejes cartesianos, queda patente que cada salto corresponde a la fusión de una vesícula y que se manifiesta en las imágenes como un agujero negro donde antes había una vesícula fluorescente.

En la parte superior de la fig. 42 se muestra la selección de la región hecha sobre una célula cebada cargada con quinacrina. El estudio de dicha región a través del tiempo nos muestra la desaparición de la fluorescencia grano a grano, mientras dura el proceso de fusión. En la gráfica inferior, mediante diagrama de barras, se representa la intensidad de fluorescencia (en porcentaje) respecto al tiempo. Cada descenso en la altura de las barras indica la fusión de una vesícula y, por consiguiente, una disminución de la fluorescencia.

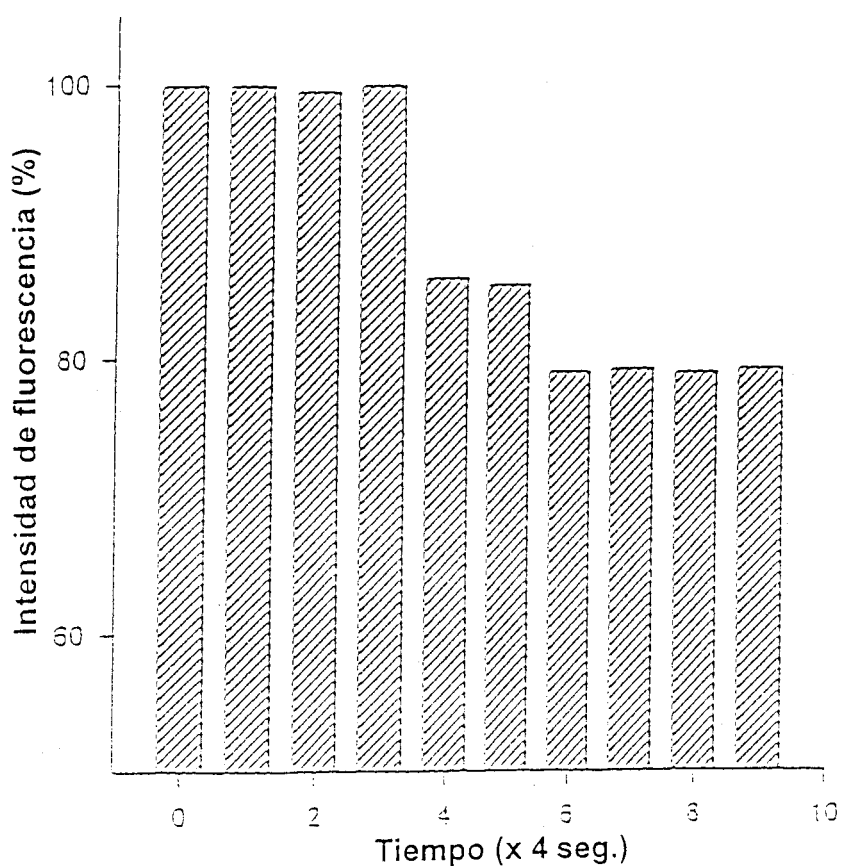
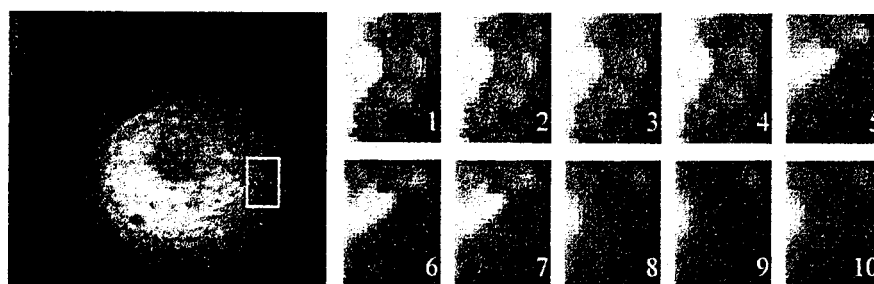


Fig. 42. A partir de la secuencia de imágenes original de la célula completa, se han extraído otras tantas correspondientes a la región identificada dentro del rectángulo. Se aplicó 48/80 tras adquirirse la tercera imagen. En las imágenes se identifica claramente la fusión de las vesículas por la desaparición de la intensidad de fluorescencia. Cuantificando dicha intensidad, se describe un salto cada vez que una o varias vesículas se funde con la membrana y libera al exterior la quinacrina.

2.2. Los histogramas de frecuencias que representan el número de píxeles frente a la intensidad de fluorescencia constituyen un procedimiento eficaz para detectar vesículas.

En la literatura se describen algoritmos cuyo objetivo es separar regiones representadas con diferente intensidad luminosa. Por ejemplo, mediante un histograma de frecuencias se puede distinguir a una célula de su entorno.

Nosotros hemos desarrollado un algoritmo que se basa en el ya descrito, y en el cual realizamos una lectura de intensidad de fluorescencia en una línea de la imagen.

El algoritmo consiste en ir leyendo línea a línea los valores de intensidad de los píxeles que las componen. Cada vez que la lectura de intensidad devuelva un valor superior a un determinado valor umbral, y esta lectura se repita secuencialmente al menos un número determinado de veces, nos encontramos con una vesícula.

El inconveniente de este método radica en la posibilidad de que dos o más vesículas se encuentren tan juntas que la lectura de la línea no se interrumpa y las considere como una única vesícula.

Para solventar este problema, aislamos regiones de la imagen celular en las que se identifiquen vesículas únicas, de forma que no queden enmascaradas con otras vecinas que permanezcan demasiado próximas.

3. EL CONCEPTO DE CENTRO DE GRAVEDAD Y SU DETERMINACIÓN EN UNA SECUENCIA DE IMÁGENES PERMITE EL SEGUIMIENTO LOCAL DE LA VESÍCULA DURANTE EL TRANCURSO TEMPORAL DE LA EXOCITOSIS.

Cuando representamos una imagen como una matriz ordenada de números, se define el centro de gravedad (CG) de la misma como,

$$CG = \sum A_{ij} \quad (24)$$

donde “i” y “j” son las filas y las columnas respectivamente de la matriz, y A_{ij} es un elemento de la misma.

La importancia del concepto de centro de gravedad estriba en su correspondencia con la vesícula cargada con quinacrina, por poseer ésta una mayor intensidad de fluorescencia y, como resultado, un mayor valor numérico en las líneas que la recorren.

3.1. El centro de gravedad en una secuencia de imágenes sufre, en ocasiones, desplazamiento.

A partir de una secuencia de imágenes adquiridas con una latencia de 4 seg., generamos otras tantas correspondientes a subregiones de las mismas y que definen a una única vesícula.

A estas nuevas imágenes les aplicamos el protocolo de lectura descrito anteriormente para calcular sus respectivos CG. Una vez cuantificada la posición del CG en cada imagen, se representa la secuencia temporal de los mismos en dos sistemas de ejes cartesianos. En el primero, la posición respecto al eje horizontal de la imagen, y en el segundo respecto al eje vertical. Se considera el origen del sistema de referencia en el vértice inferior izquierdo de la imagen.

En la fig. 43, se ilustra el transcurso temporal de una vesícula antes de fundirse. En las imágenes 11 y 12 se pierde la fluorescencia debida a la fusión del grano.

La variación que se describe en este caso es significativa. Una unidad de desplazamiento en los ejes X ó Y supone, considerando el diámetro de la vesícula de 0.7 μm , una movilidad de 80 nm aproximadamente, lo que nos hace suponer que dicha vesícula no permanece anclada a la membrana ya que necesitó emigrar, y por tanto moverse, a las posiciones secretoras de la membrana, antes de su fusión.

Por el contrario, en la secuencia presentada en la fig. 44, el centro de gravedad no sufre prácticamente ningún desplazamiento, y ello indica que la vesícula permanece anclada. A partir de la imagen 10, la célula cebada comienza acusando el efecto fototóxico ocasionado por la prolongada excitación y no se considera representativo el cambio producido en su fluorescencia en cuanto al estudio de la movilidad vesicular se refiere.

En las figs. 45 y 46 se ilustra el proceso seguido hasta la obtención de las vesículas aisladas objeto de estudio.

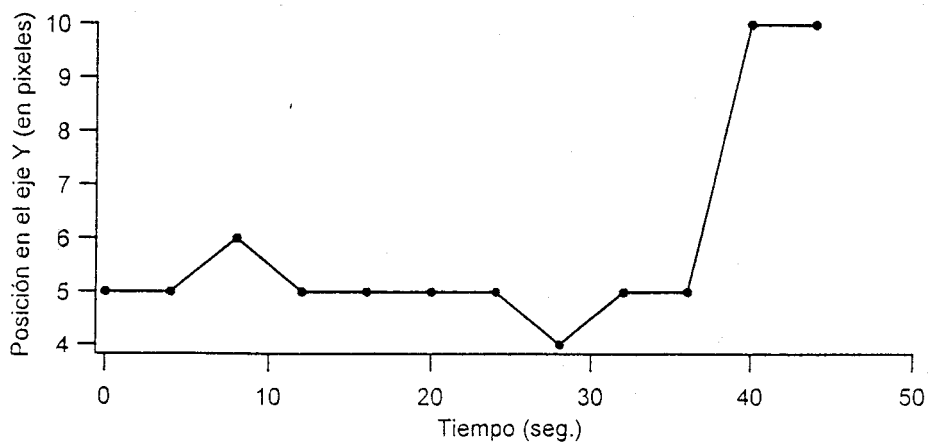
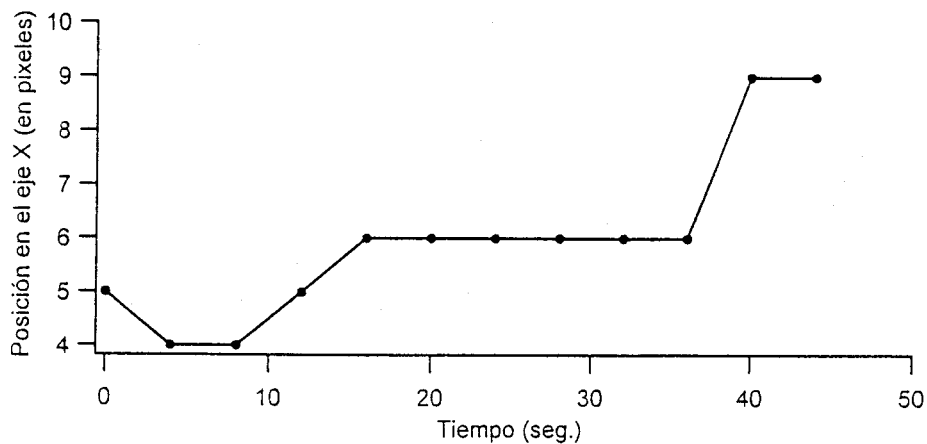
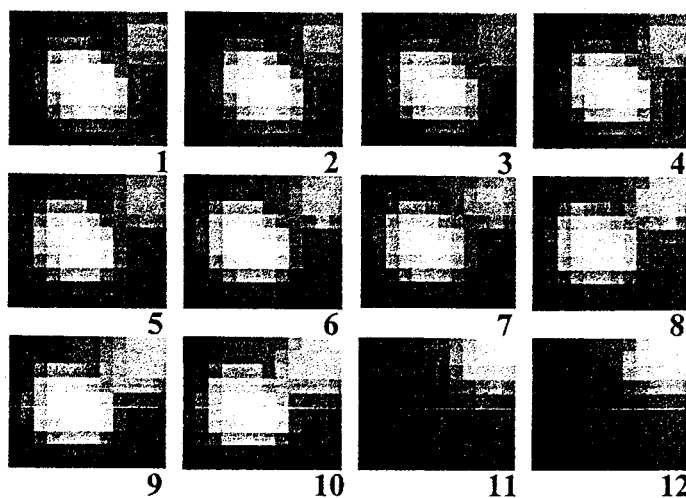


Fig. 43. Secuencia de imágenes ampliadas donde se ilustra el transcurso temporal de una vesícula hasta su degranulación. Calculando el centro de gravedad de la vesícula en cada imagen, y representando sus coordenadas espaciales respecto al tiempo, puede estudiarse su movilidad.

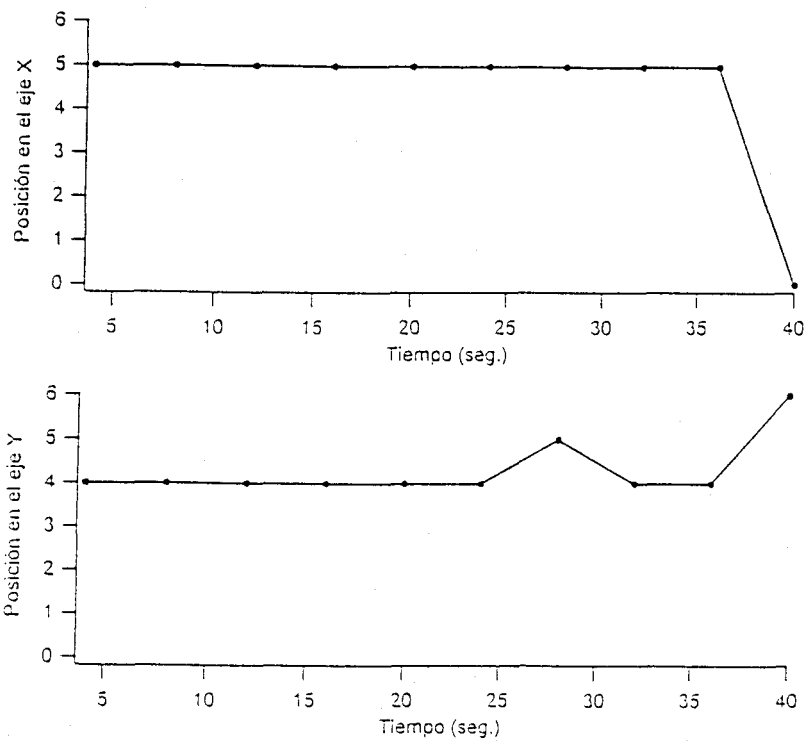
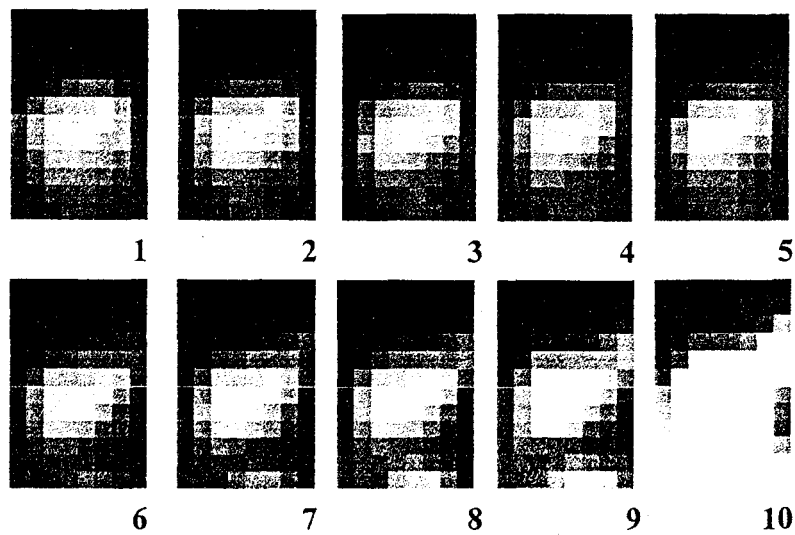


Fig. 44. En esta secuencia de imágenes, se observa que el centro de gravedad de la vesícula no sufre desplazamiento sobre el sistema de ejes bidimensional. En cuanto al movimiento respecto al eje Z, que sería el perpendicular al plano focal y que no se cuantifica, tampoco es apreciable ya que no se produce un cambio de foco del grano.

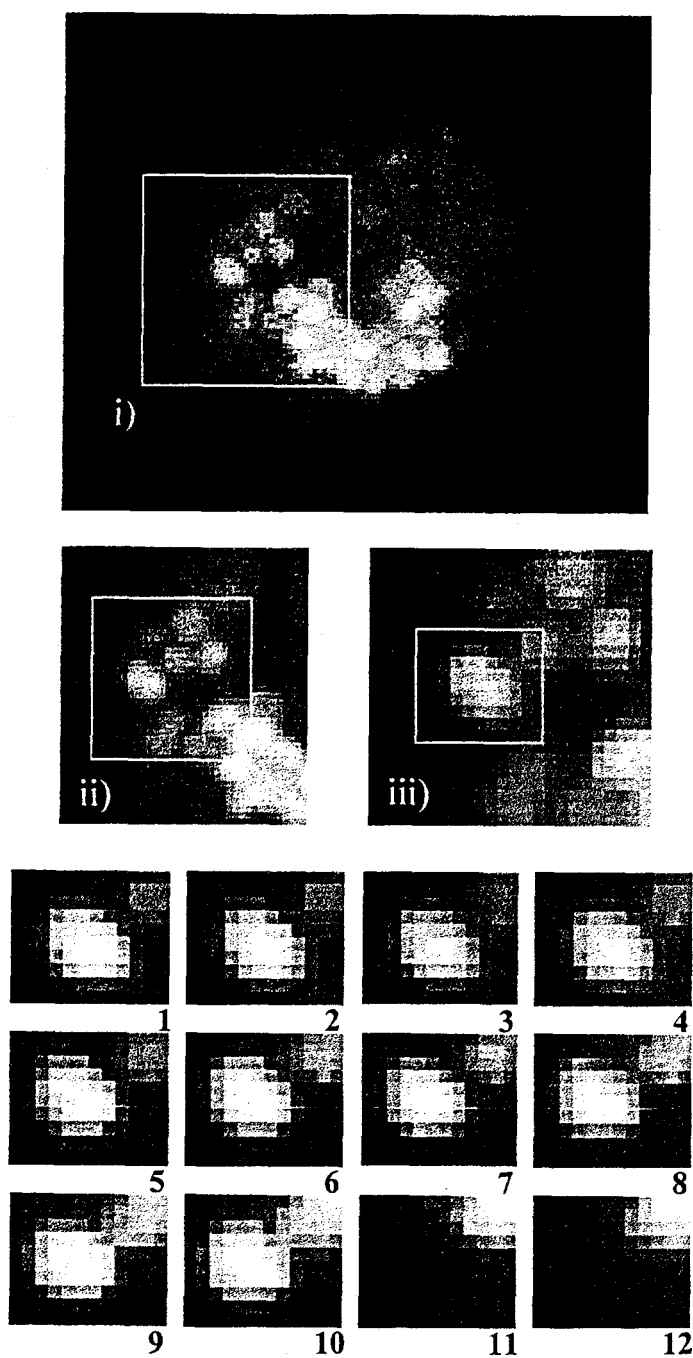


Fig. 45. A partir de la imagen original i) se ha generado una nueva imagen mediante la selección de la región especificada en el rectángulo. Este proceso que se muestra en sucesivos pasos, ii) e iii), para ilustrar el tamaño de la vesícula respecto a la imagen original, en realidad se realiza directamente una vez que se determina la región específica que define a un grano único.

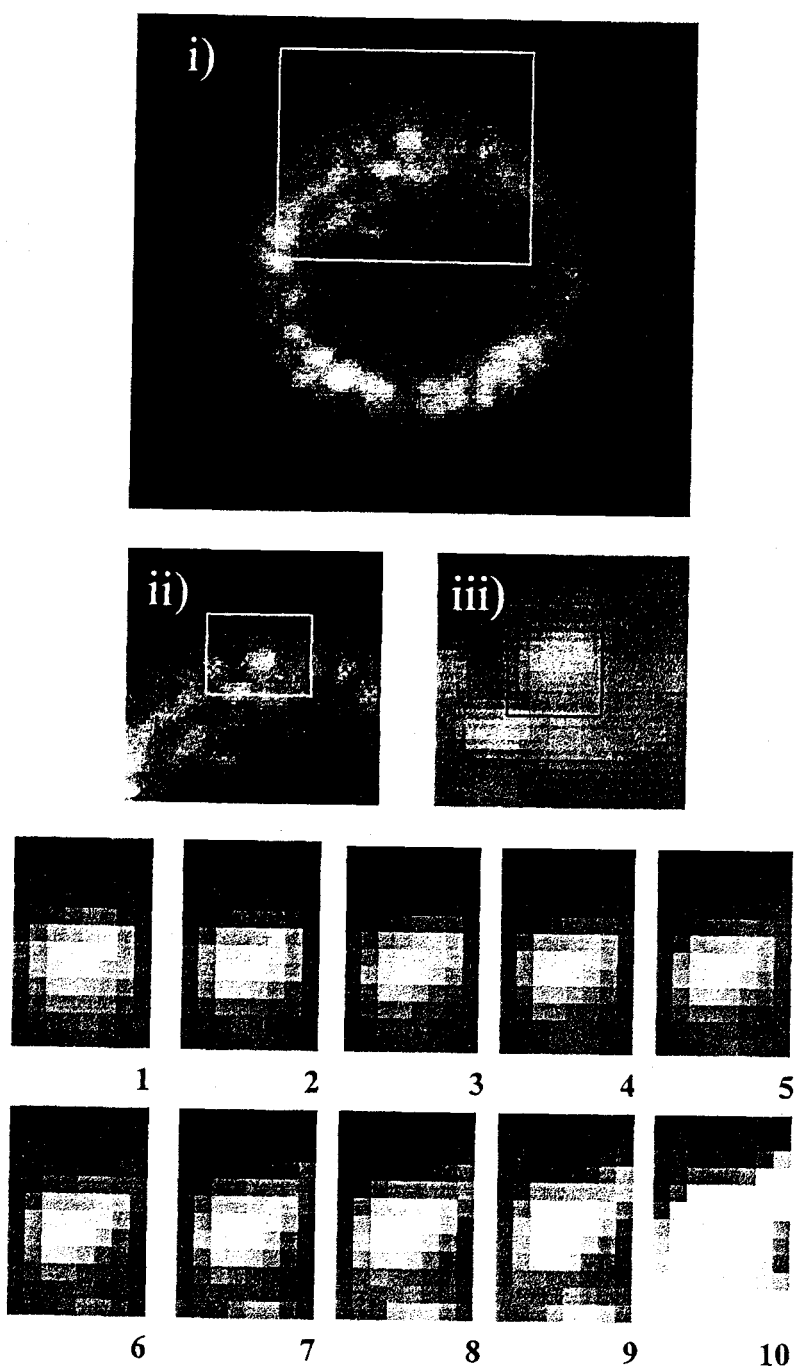


Fig. 46. En este caso, al determinar las posiciones del CG en las sucesivas imágenes, no se detecta movimiento vesicular. En las dos últimas imágenes se aprecia un cambio en la fluorescencia que no debe considerarse importante puesto que coincide con cambios morfológicos no relacionados con la exocitosis y sí con los efectos fototóxicos.

4. EL COLORANTE FM1-43 PERMITE, AL IGUAL QUE LA QUINACRINA, ESTUDIAR EL CURSO TEMPORAL DE LA EXOCITOSIS.

Puesto que no había antecedentes en el Departamento sobre la utilización de este marcador de membrana, frecuentemente utilizado para analizar los procesos de endocitosis y exocitosis, comenzamos observando sus propiedades en diferentes situaciones, para centrarnos posteriormente en la importante información que puede facilitar.

Para estudiar la exocitosis, y poder controlar mejor los experimentos que se describen a continuación, se emplearon dos posibles vías para inducir la degranulación en células cebadas. Una de ellos es la incorporación del secretagogo 48/80 al medio extracelular. El otro consiste en aproximar una micropipeta de "patch-clamp" a la membrana de la célula cebada y sellar la punta con la membrana plasmática. Después de acceder al citosol y dializar el interior celular a través de la pipeta (previamente llenada con solución interna estándar y GTP γ S), comienza el proceso de degranulación.

Esta vía por la que se induce la exocitosis permite seleccionar una única célula y controlar el instante en que se producirá la secreción. El otro método, empleando el secretagogo 48/80, no es selectivo a la célula diana que queremos observar y, por lo tanto, induce la degranulación de todas las células cebadas presentes en la preparación.

En la parte superior de la fig. 47 puede apreciarse la sombra de la micropipeta que formará una unión (sello) con la membrana. En la imagen inferior, la célula cebada ya está completamente degranulada y puede identificarse más claramente la micropipeta de "patch-clamp" que originó, por medio del GTP γ S, la exocitosis.

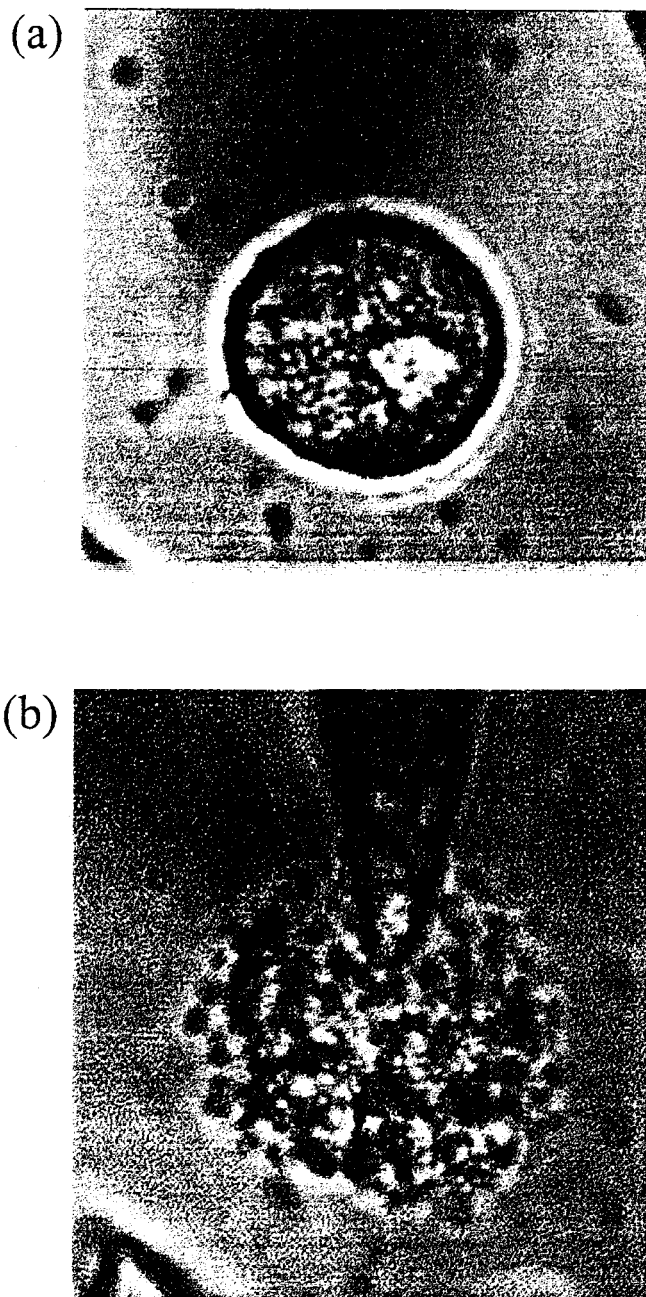


Fig. 47. El acusado cambio morfológico presente en estas dos imágenes de la misma célula cebada, en diferentes instantes de tiempo, es ocasionado por la degranulación inducida a través de la micropipeta de "patch-clamp" con $GTP\gamma S$.

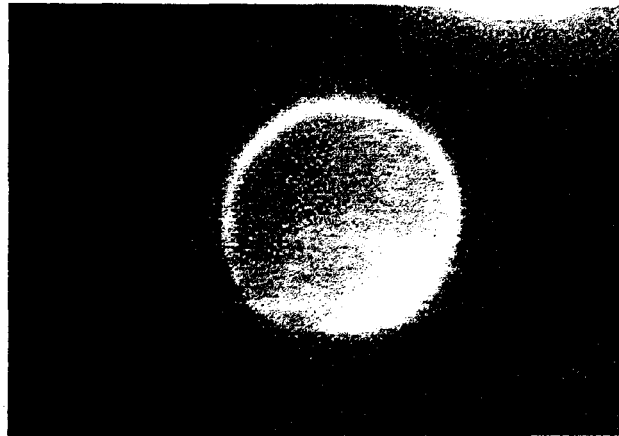
4.1. El FM1-43 es un colorante no fluorescente en solución acuosa que al unirse a la membrana provoca que ésta adquiera dicha propiedad.

Puesto que el FM1-43 se une a la cara externa de la membrana celular, mantuvimos ésta en contacto con el fluoróforo, durante el tiempo en que transcurrió el experimento, mediante una micropipeta de "patch-clamp" situada en la vecindad de la célula. Cada vez que se ejercía una presión positiva sobre la pipeta llena con el colorante, éste difundía al medio extracelular y se unía a la membrana, con el consiguiente incremento de la intensidad de fluorescencia.

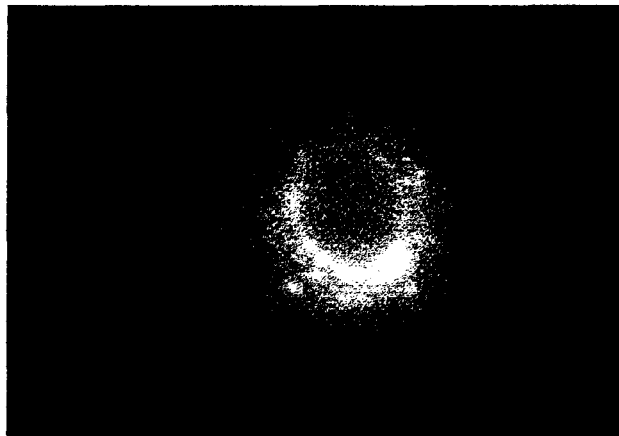
El aspecto inicial de la imagen celular en fluorescencia es el de un anillo fluorescente que define la forma y tamaño celular. Sin embargo, transcurrido cierto tiempo (10 ó 15 minutos), la fluorescencia del anillo correspondiente a la membrana plasmática queda enmascarada por la disminución del contraste que provoca la gran luminosidad que proviene del citosol.

Aunque el FM1-43 es un colorante que no permea a través de la membrana, sino que se ancla a la misma, existen otros mecanismos tales como la endocitosis constitutiva que internaliza el colorante y ofrece una explicación sobre la tinción que ocurre en el interior celular. En la imagen superior de la fig. 48, tomada en el inicio del experimento, destaca un anillo que irradia fluorescencia, mientras que ni en el citosol ni en el medio extracelular es apreciable dicho fenómeno. En la imagen inferior en cambio, la fluorescencia se irradia desde el interior celular.

El siguiente paso experimental fue inducir la exocitosis, lo que conlleva una serie de cambios morfológicos que favorecen un mayor número de uniones entre las moléculas del colorante y la membrana plasmática, cuando éste reside en el medio extracelular. Mientras que en un instante previo a la degranulación la fluorescencia tiene forma de anillo, después de la inducción de la degranulación con el compuesto 48/80 se produce un notable incremento de la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de superficie de membrana aportada durante las sucesivas fusiones de los granos secretores.



(a)



(b)

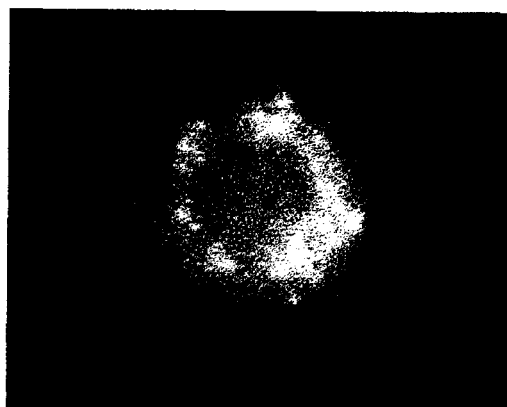
Fig. 48. En la imagen a), tomada en el inicio del experimento, la fluorescencia tiene forma de anillo. Las moléculas del colorante permanecen adheridas a la membrana. En b), transcurridos 15 minutos, las moléculas del fluoróforo se han internalizado debido a la endocitosis constitutiva.

En el momento en que se produce la fusión de la vesícula con la membrana, las moléculas de fluoróforo entran a través del poro y tiñen la membrana vesicular. Cuando esta circunstancia se da repetidamente, ocasionará una gran fluorescencia que puede confundirse con la producida cuando un colorante permea al citosol. En la figura fig. 50 se ilustra la forma que tiene de internalizarse el colorante, sin que esto signifique que haya permeado, atravesando la membrana plasmática, al interior celular.

La diferencia entre la fluorescencia de moléculas que han difundido por endocitosis constitutiva y las que lo hacen durante el proceso exocitótico, es que esta última no necesita periodo de difusión, sino que es inmediata a la secreción.



(a)



(b)

Fig. 49. a) Fluorescencia con forma de anillo correspondiente al instante anterior a la degranulación. El colorante permanece continuamente en el medio extracelular. b) Tras inducir la degranulación con el compuesto 48/80, las moléculas del FM1-43 se internalizan, con lo que aumenta la intensidad de fluorescencia. En esta situación, la fluorescencia anular queda enmascarada por la mayor fluorescencia que proviene de los granos secretores.

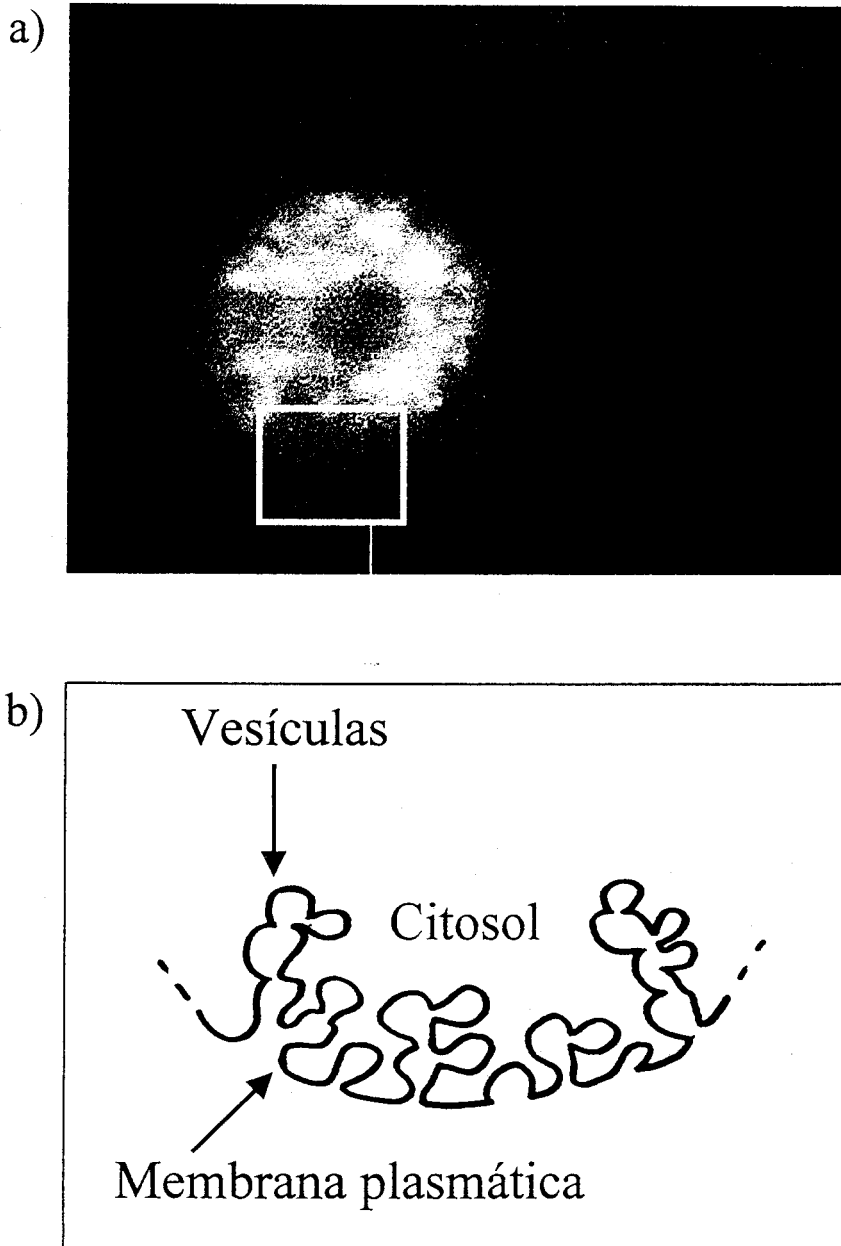


Fig. 50. En la imagen superior a), pueden distinguirse las vesículas fluorescentes tras la degranulación. El dibujo b) representa la incorporación de la membrana vesicular a la membrana celular lo que facilita el anclaje de moléculas del colorante a regiones internas y que simulan una fluorescencia irradiada desde el citosol.

4.2. Cuando se añade al medio extracelular el compuesto 48/80 inactivo, el FM1-43 tiñe no solamente la membrana vesicular sino también la matriz de proteoglicano.

Para conseguir una buena resolución que permita distinguir y observar con claridad los granos, añadimos al medio extracelular el compuesto 48/80 en estado inactivo, lo cual provoca que se tiña la matriz de proteoglicano además de la membrana vesicular. La observación directa al microscopio evidencia cómo sin el 48/80 tan sólo quedan teñidas las membranas vesiculares y no la matriz.

La exocitosis se induce con una micropipeta que contiene solución interna estándar con GTP γ S (100 μ M). En la fig. 51 pueden verse el anillo fluorescente, ya descrito en el apartado anterior, así como algunas matrices que permanecen junto a la membrana celular.

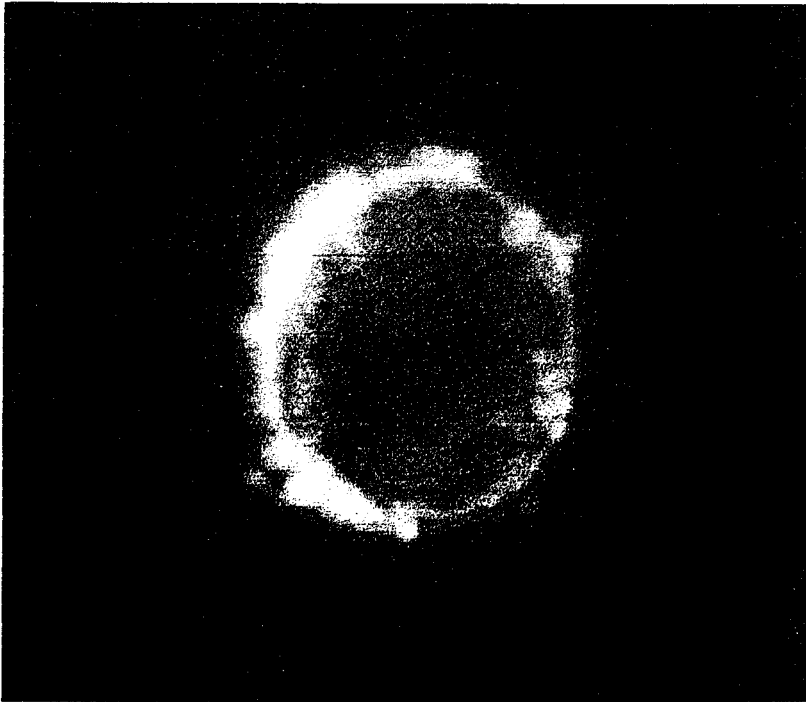


Fig. 51. La imagen muestra una célula cebada en la que se ha iniciado el fenómeno secretor. Pueden distinguirse puntos densos de fluorescencia producidos por la tinción de la matriz de proteoglicano junto a la esperada coloración de la membrana vesicular.

4.3. La inducción lenta de la degranulación con el compuesto 48/80 permite visualizar su desarrollo paso a paso, facilitando la posibilidad de registrar simultáneamente cambios de capacidad de membrana y relacionarla con la intensidad de fluorescencia.

Provocando la degranulación celular con el secretagogo 48/80 muy diluido (0.2 μ M), ésta ocurre de forma muy lenta. Así podemos visualizar, mediante el sistema de adquisición de imágenes, cómo se desarrolla este proceso, teniendo en cuenta que cada grano fundido con la membrana plasmática aporta a la misma una emisión de fluorescencia adicional, en proporción a la superficie vesicular, ya que esta ampliación de la superficie que entra en contacto con el espacio extracelular permite el anclaje de nuevas moléculas de FM1-43. La tinción afecta no solamente a la membrana, sino que la matriz de proteoglicano también queda teñida, lo que favorece la observación de las sucesivas etapas de la degranulación.

Si pudiéramos registrar simultáneamente la capacidad eléctrica de la membrana, sería posible relacionar superficie de membrana con intensidad de fluorescencia. Una calibración de este tipo favorecería, mediante el método de imágenes y en función de la intensidad de fluorescencia, el conocimiento acerca del número de vesículas que se han fundido o endocitado.

En la fig. 52 es fácilmente distinguible la fluorescencia de dos vesículas que se funden con la membrana plasmática momentos después de iniciarse la exocitosis. El hecho de poseer una elevada y uniforme intensidad de fluorescencia indica que sus correspondientes matrices de proteoglicano no han difundido al medio extracelular.

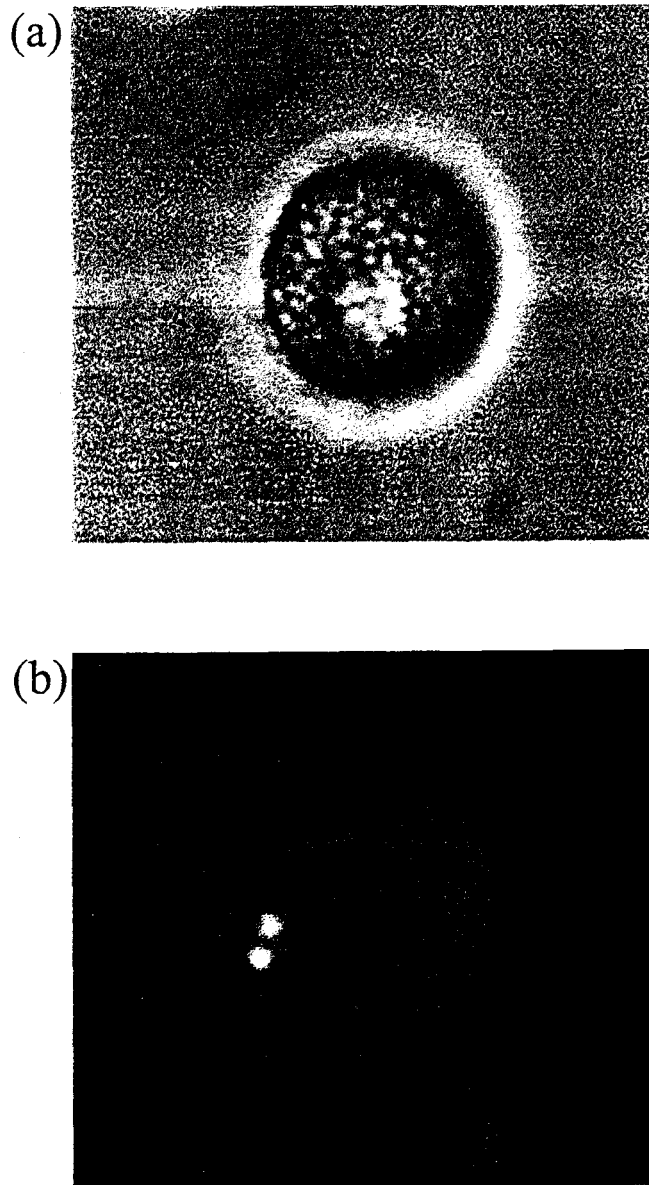


Fig. 52. a) Imagen de un mastocito en campo claro antes de iniciarse la degranulación. b) Segundos después de añadir al medio extracelular el secretagogo 48/80 muy diluido ($0.2 \mu\text{M}$), se inicia la exocitosis, que queda patente en esta imagen donde se observan dos granos que se han fundido con la membrana plasmática y por tanto permiten la incorporación del FM1-43 a sus respectivas membranas vesiculares, así como a las matrices de proteoglicano.

4.4. Las matrices de proteoglicano, después de que el grano se ha fundido, presentan comportamientos diferentes: unas quedan atrapadas en el interior vesicular y otras difunden al medio extracelular.

En los experimentos en los que se indujo la exocitosis, quedó de manifiesto con el FM1-43 que algunas matrices de proteoglicano, tras la fusión del grano con la membrana plasmática, quedan atrapadas en su interior mientras que otras son liberadas al medio extracelular donde difunden libremente. En la imagen de fluorescencia de la fig. 53 se aprecia un rosario de vesículas cuya fluorescencia es debida tanto a la membrana vesicular como a su matriz de proteoglicano. La luminiscencia de la membrana plasmática, observada en otras imágenes, no es apreciable debido a su escasa intensidad respecto a la que emiten los granos.

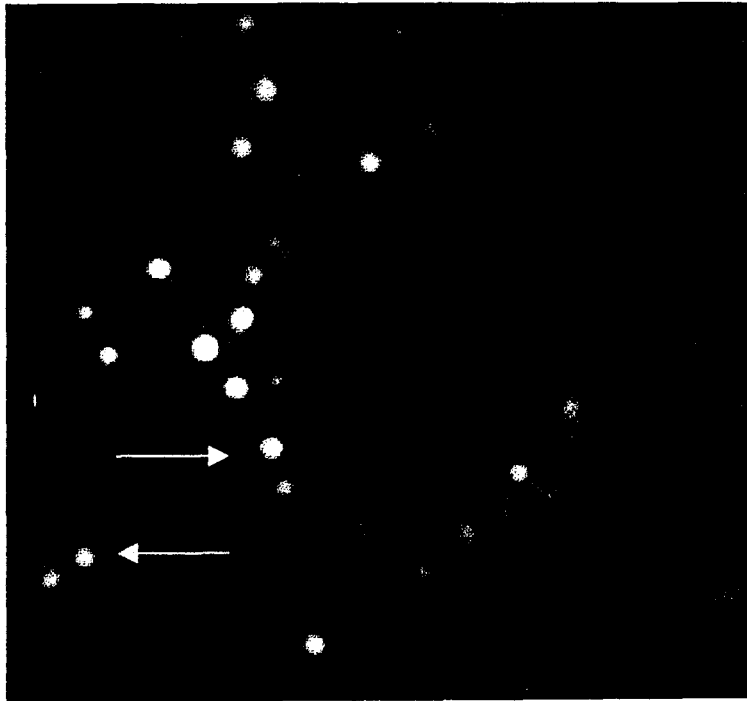


Fig. 53. Aunque la célula no queda definida por el anillo fluorescente correspondiente a la membrana plasmática, se puede intuir por la disposición de un gran número de granos fluorescentes en el extrarradio celular. La flecha a) indica un grano que permanece anclado en la membrana y que, por lo tanto, carece de movilidad. Por el contrario, una matriz de proteoglicano, señalada en b), ha sido expulsada al medio extracelular, donde seguirá un movimiento aleatorio propio de la difusión de las moléculas en dicho medio.

4.5. La focalización de la exocitosis se manifiesta por un incremento de la intensidad de fluorescencia en una determinada región celular.

De la misma manera que se estudió la focalización de la exocitosis con la quinacrina, este nuevo colorante permite seguir el curso de la degranulación de manera que, a medida que se funde un grano, éste aporta un incremento de intensidad de fluorescencia. Así, en la fig. 54 se muestran imágenes adquiridas en intervalos de 4 seg. cuya intensidad de fluorescencia es superior en una región específica y va aumentando a medida que transcurre el tiempo.

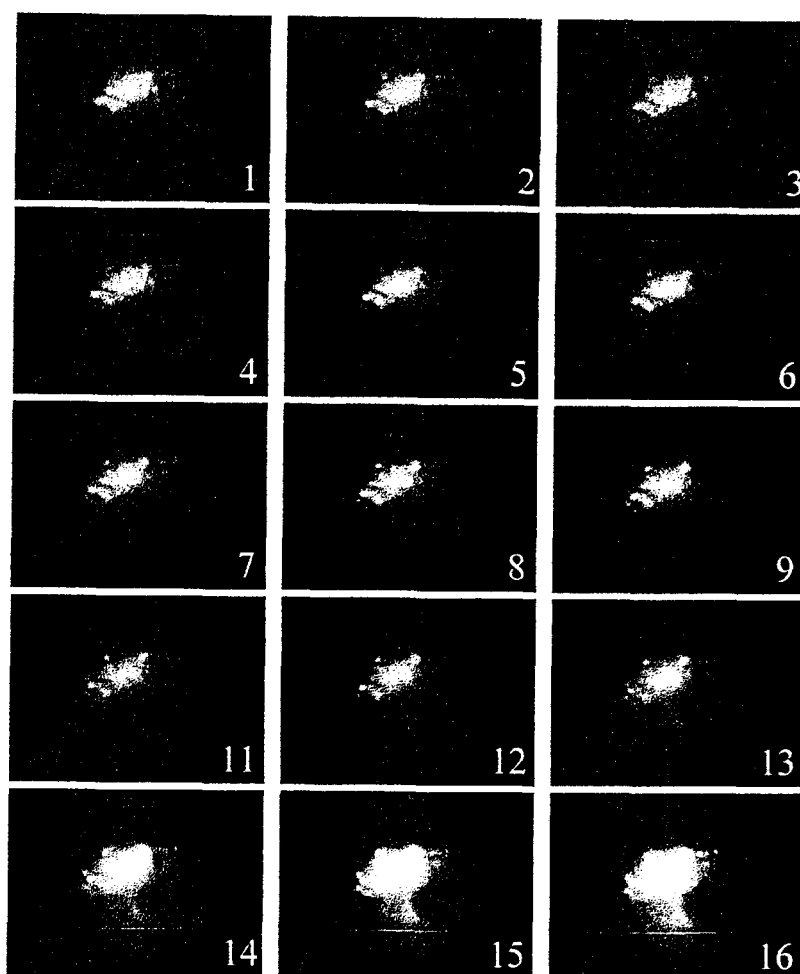


Fig. 54. Las imágenes fueron adquiridas con intervalos de 4 seg. El medio extracelular contenía FM1-43, por lo que, a medida que progresaba la degranulación, se iba incrementando la intensidad de fluorescencia. Destaca la focalización de la intensidad de fluorescencia que se va incrementando alrededor de una única región.

4.6. Mediante el análisis de imágenes, podemos estudiar el movimiento de las matrices y determinar si están ancladas, si presentan un desplazamiento predeterminado o si están sujetos a la aleatoriedad de la difusión en el medio extracelular.

De la misma forma que pudimos detectar si había o no movimiento de las vesículas cargadas con quinacrina antes de su incorporación a la membrana celular, ahora se puede estudiar dicho comportamiento después de la degranulación

En la fig. 55 se representa la posición de una matriz de proteoglicano que ha difundido al medio extracelular y que, por tanto, está sometida al movimiento Browniano que viene descrito para la difusión de moléculas en un medio acuoso.

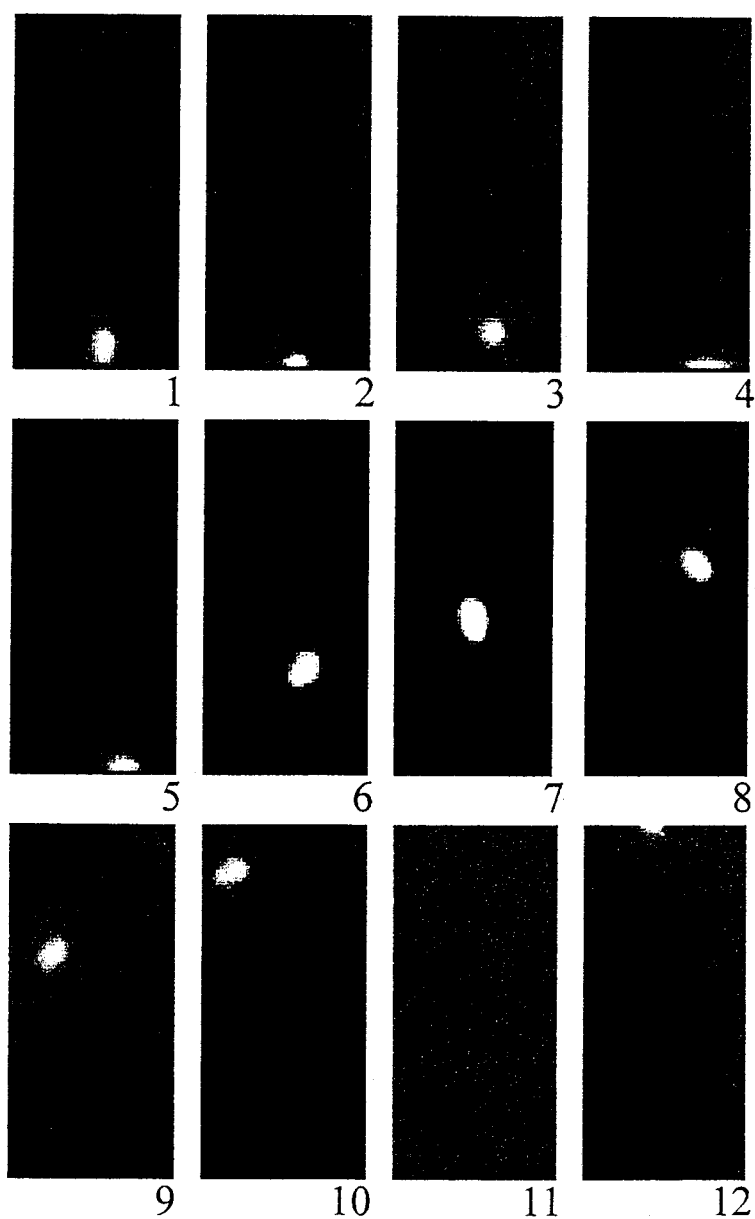


Fig. 55. La matriz de proteoglicano presenta una intensa fluorescencia, lo que permite estudiar su movilidad a lo largo del tiempo. En este caso, la matriz no se halla anclada a la membrana y, por tanto, puede difundir libremente por el medio extracelular siguiendo un movimiento Browniano.

5. LA ADQUISICIÓN DE IMÁGENES CON UNA CÁMARA CCD DIGITAL PUEDE SER EMPLEADA COMO HERRAMIENTA DE REGISTRO PARA DETERMINAR CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} CITOSÓLICO

La elevación de la concentración de calcio intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, es el principal factor desencadenante de la secreción en células excitables. Sin embargo, existen diferencias en la cuantía que debe alcanzar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para causar secreción en distintos tipos celulares. Por ejemplo, en células neuroendocrinas, donde parece que el grado de acoplamiento entre el canal de calcio y la maquinaria secretora es escaso, los niveles que debe detectar el hipotético sensor de calcio, responsable de la fusión de membranas, deben ser pequeños (1-10 mM).

Por el contrario, en sinapsis, parece que el sensor de calcio está estrechamente ligado a la maquinaria secretora, por lo que sólo detectaría niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por encima de 100 mM; esta baja sensibilidad permitiría una respuesta rápida y de corta duración (fásica) en la transmisión sináptica. Para intentar abordar este problema, desarrollamos un sistema de monitorización de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con la idea de que tuviera una resolución espacial y temporal suficiente para detectar las modificaciones de este ión.

En los estudios preliminares se adquirieron secuencias de imágenes de células cebadas cargadas con fura-2, excitadas a una única longitud de onda (390 nm). La primera imagen fue tomada a 360 nm, para un posterior cálculo de la razón de intensidades y la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

En la fig. 56 se ilustra una secuencia de imágenes en la que puede observarse un cambio de intensidad de fluorescencia. Este cambio se produce de forma espontánea, significando un cambio en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Entre cada dos imágenes consecutivas transcurre un periodo de tiempo de 20 seg. Por las características espectroscópicas intrínsecas del colorante, una disminución de intensidad de fluorescencia, cuando se excita a 390 nm, implica una disminución de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

En la fig. 57 se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo, demostrando que la $[Ca^{2+}]_i$ sufre variaciones espontáneas durante el transcurso temporal.

Se ha recurrido al seudocolor (ver fig. 58) para favorecer la observación del cambio de intensidad de fluorescencia. Se sustituyó la paleta correspondiente a la escala de grises por otra escala de color. La imagen obtenida en color muestra los gradientes de intensidad más evidentes, debido a que el ojo humano detecta más fácilmente las diferencias en la escala cromática que en la escala de grises.

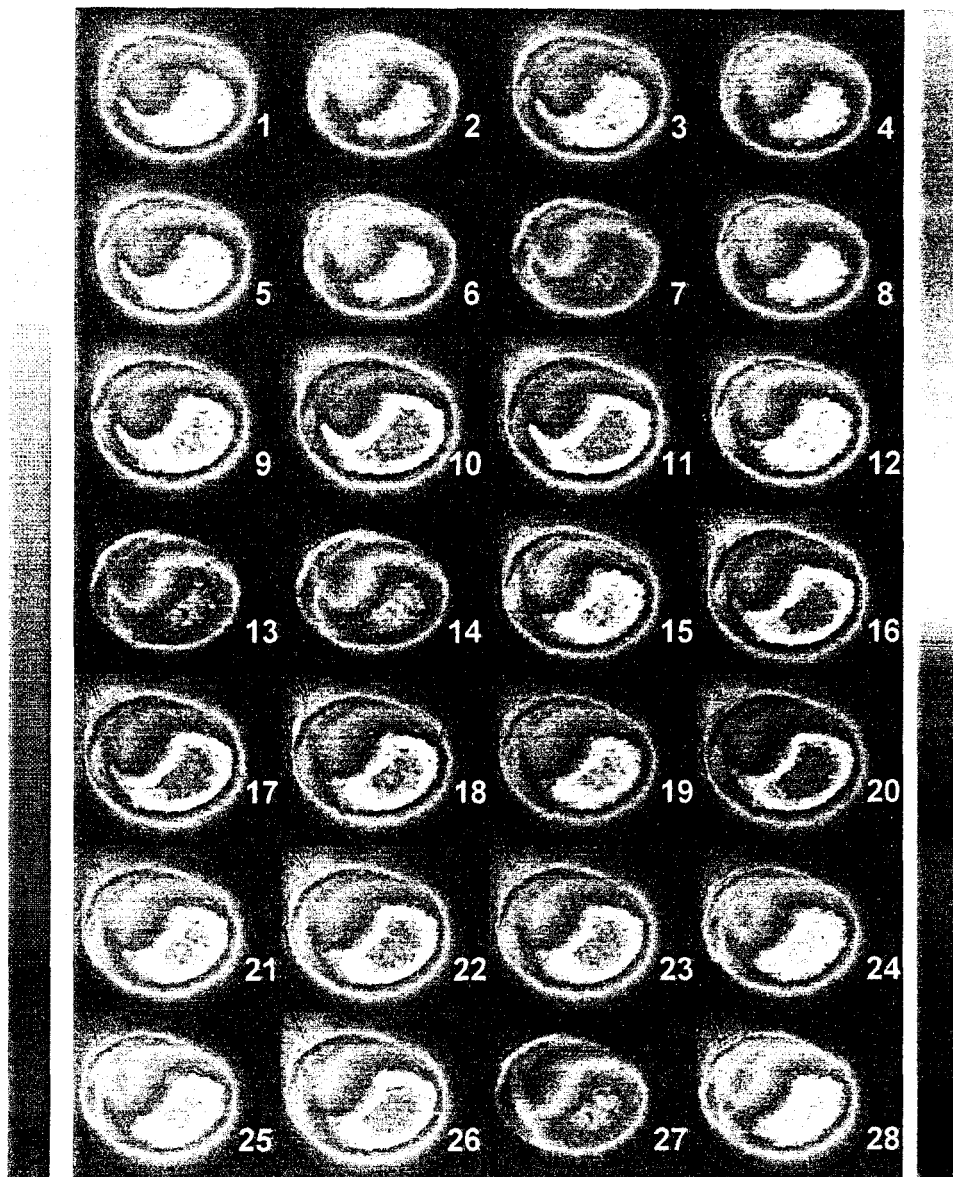


Fig. 56. De izquierda a derecha y de arriba abajo se muestra la secuencia temporal de imágenes de una célula cebada cargada con fura-2. Puede observarse la variación de intensidad de fluorescencia que conlleva, por las características del colorante quelante de calcio, una variación en la $[Ca^{2+}]_i$.

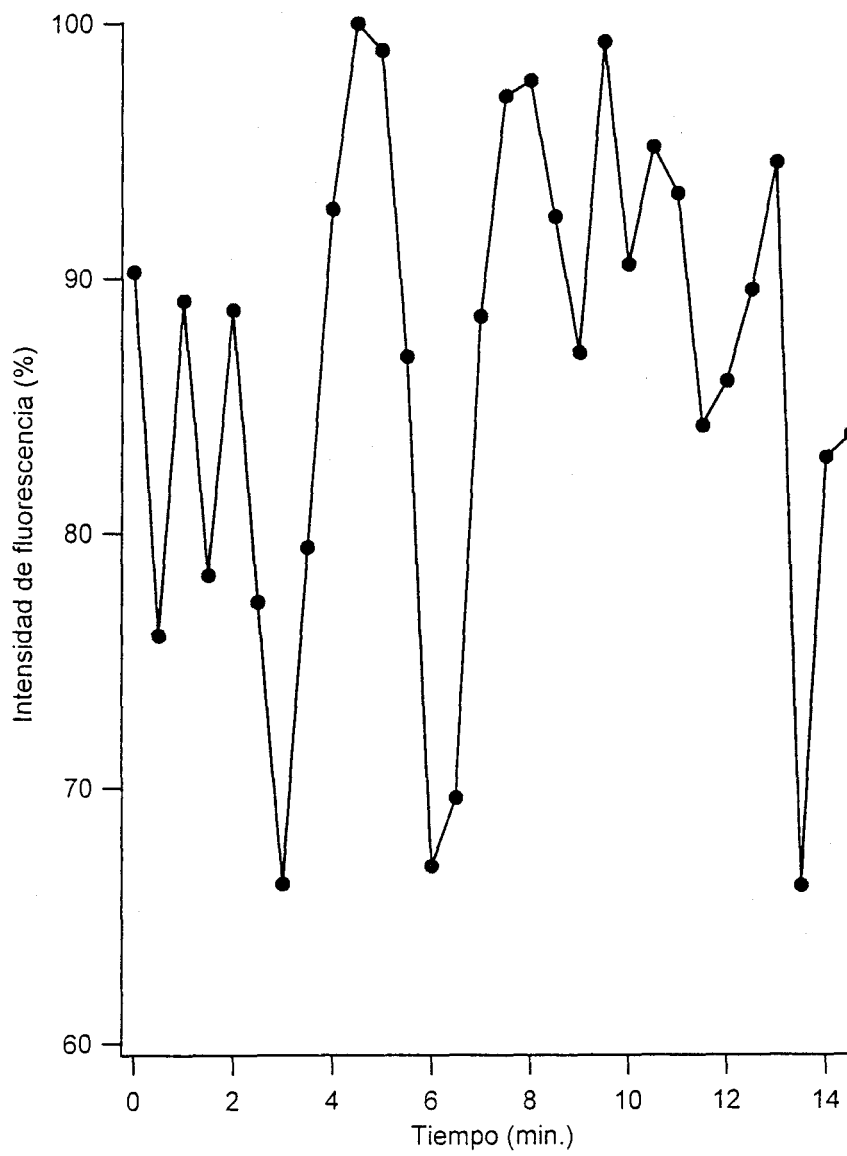


Fig. 57. Correlacionando la cuantificación de la intensidad de fluorescencia y el tiempo, se evidencia la variación, producida de forma espontánea, de la $[Ca^{2+}]_i$. Aunque entre cada dos puntos se tomaron 9 imágenes más, se presentan intervalos de 20 seg. con la idea de resaltar dicho cambio.

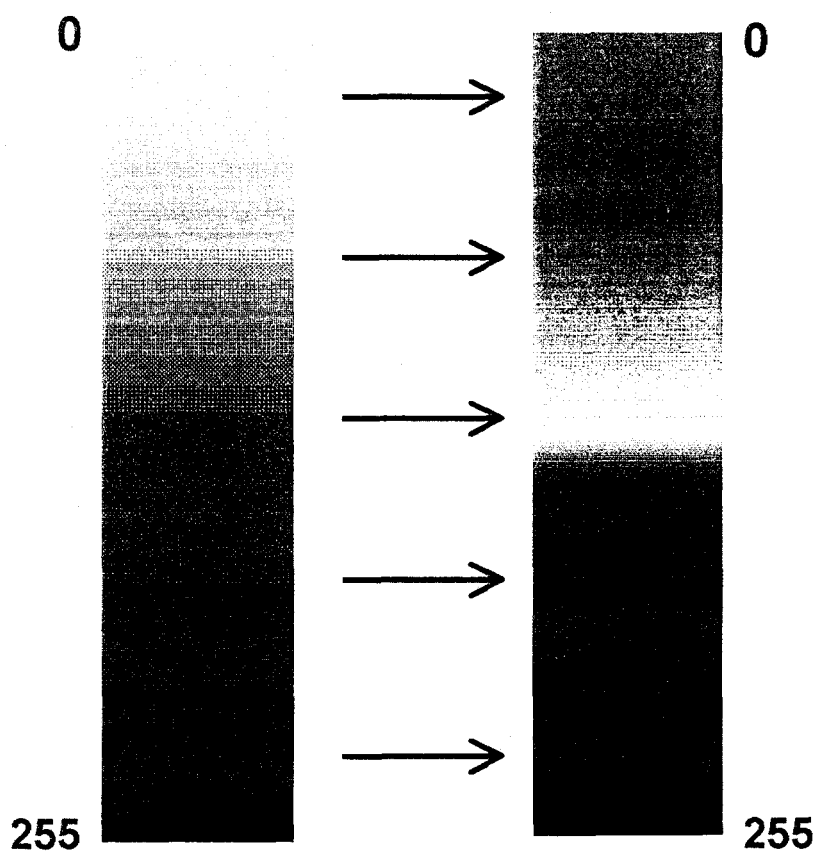


Fig. 58. El seudocolor es un procesamiento de imágenes habitual cuando se pretende observar sutiles variaciones de intensidad de fluorescencia. A partir de la imagen original, adquirida en una escala de grises, se produce una reasignación arbitraria de color a cada valor de intensidad luminosa.

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS CON TÉCNICAS FLUORESCENTES EN MASTOCITOS

Para estudiar la exocitosis hemos aplicado la técnica de microscopía de fluorescencia, y hecho uso de colorantes muy diferentes entre sí: la quinacrina y el FM1-43 para monitorizar el fenómeno en sí de la exocitosis; y el fura-2 para estudiar los cambios de la concentración de Ca^{2+} intracelular. El uso de los colorantes fluorescentes de quinacrina y FM1-43 ha servido para estudiar mediante técnicas de procesamiento de imágenes los fenómenos que tienen lugar durante la fusión de vesículas con la membrana plasmática, pero mostrándonos estos dos colorantes aspectos diferentes y complementarios del fenómeno secretor.

La quinacrina es un colorante que se almacena en los compartimentos ácidos de la célula ya que se introduce mediante un transporte de protones. Esta característica de la quinacrina, pues, permite que las vesículas secretoras presenten un aspecto amarillo intenso al cargarse de colorante y que, en el momento de la exocitosis, pierdan esta fuerte intensidad fluorescente debido a la dilución del

colorante en el espacio extracelular. Además, la quinacrina tiene la particularidad de modificar su intensidad en función del pH del compartimento donde se acumula. Sin embargo, no es posible cuantificar los cambios de pH ya que, además de cambiar sus propiedades en función de la concentración de protones, volumen, concentración de colorante, pKa, presenta una desviación en el espectro de emisión hacia el rojo que hace muy difícil su calibración. Dadas estas limitaciones, hemos utilizado este colorante única y exclusivamente para estudiar cómo se produce la exocitosis, y si ésta se produce de forma focalizada a lo largo de la superficie celular, ya que su fuerte intensidad de fluorescencia lo hace apto para captar imágenes fluorescentes.

El FM1-43 es un fluoróforo derivado de los colorantes sensibles al voltaje que ampliamente se han utilizado para estudiar los cambios de potencial de membrana en grupos celulares mediante la aplicación de técnicas de imagen (Taylor y Wang, 1989). Estos colorantes tienen la particularidad de ser lipofílicos, ya que presentan una cadena alifática de longitud variable que hace que el colorante se reparta en una interfase agua-lípido. Los colorantes de la familia del FM tienen la particularidad de no ser muy sensibles al voltaje y repartirse entre los lípidos en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada. Esta familia de colorantes fue utilizada a principios de los noventa por el laboratorio del W. Betz (ver Betz, Mao y Smith, 1996), y aplicada al estudio del reciclado vesicular en la placa neuromuscular (Betz y Bewick, 1992, Angleson y Betz, 1997) y células cromafines bovinas (Smith y Betz, 1996). El estudio del reciclado de vesículas se basa en que el colorante, cuando se deposita en el medio extracelular y entra en contacto con el ambiente hidrofóbico de la membrana plasmática, modifica sus propiedades de fluorescencia, siendo fácilmente identificable bajo un microscopio de fluorescencia dotado con filtros similares a los utilizados para visualizar la fluoresceína. Para estudiar el reciclado vesicular, Betz y col., lavan el medio extracelular, permaneciendo únicamente fluorescente el colorante que ha quedado atrapado en el interior celular. En etapas posteriores es posible volver a estimular el terminal nervioso y ver que el colorante que había quedado atrapado puede

focalizada (Lawson, Fewtrell y Raff, 1978), no se había realizado ningún estudio del curso temporal de dicho fenómeno. En el presente trabajo hemos realizado el estudio sobre la secreción desde dos perspectivas complementarias: una, relacionando la pérdida total de intensidad de fluorescencia de la quinacrina con los incrementos de superficie de membrana que tienen lugar durante la exocitosis (Fernández, Neher y Gomperts, 1984); dos, poniendo de manifiesto lugares de focalización durante el proceso secretor.

Para estudiar la exocitosis hemos estimulado los mastocitos con el compuesto 48/80, que se sabe que es un potente activador de la secreción (Rohlich y col., 1974). La aplicación se realizó mediante una micropipeta alojada a una distancia variable (100-300 μm) de la membrana celular. En estas condiciones asumimos que el estímulo se produce de forma global en la célula y que, por tanto, la secreción debe ocurrir de forma uniforme sobre la superficie celular. El incremento de capacidad debido a la fusión de vesículas secretoras se produce de forma sigmoidal (Fernandez y col., 1987), estando el comienzo ligeramente enlentecido debido probablemente al tiempo que tarda en activarse el proceso secretor en la superficie celular. Con la monitorización de la fluorescencia de la quinacrina, hemos podido observar que el decremento en la intensidad de fluorescencia se produce de forma paralela al incremento de capacidad de la membrana, lo que demuestra que el fenómeno secretor observado con la pérdida de fluorescencia de quinacrina es un buen marcador de la exocitosis. Estos resultados son similares a los obtenidos por Breckerindge y Almers (1987) en mastocitos del ratón mutante "beige", donde pudieron relacionar la pérdida de fluorescencia de quinacrina en vesículas únicas (mediante la utilización de un fotomultiplicador) con los incrementos de capacidad de la membrana plasmática. En nuestro caso, esta comparación se ha realizado en mastocitos normales y utilizando la técnica de procesamiento de imágenes, habiéndose obtenido resultados similares. Un abordaje diferente para correlacionar la pérdida de fluorescencia de quinacrina con la secreción, la han realizado Tatham y col (1991) mediante la determinación con voltametría de la liberación de serotonina. Estos

autores mostraron que la integral del registro voltamétrico, es decir, la cantidad acumulada de serotonina oxidada en el detector electroquímico, se correlacionaba muy bien con la pérdida de fluorescencia de quinacrina. Ambos abordajes indican que la determinación de la pérdida de fluorescencia de la quinacrina es una medida fiable para cuantificar la exocitosis.

La gran ventaja de las técnicas de imágenes es que permiten resolver espacialmente el lugar donde se produce la exocitosis. Este tipo de estudio no se había realizado hasta la fecha. Aunque no es objeto de los resultados de este trabajo de tesis, en los registros globales de incrementos en la superficie de la membrana plasmática, el ajuste a la ecuación descrita por Eckstein y col. (1987) no es perfecto, ya que se observan a veces incrementos rápidos en el registro de capacidad. Estas desviaciones del ajuste no han sido tratadas en la literatura ya que en muchas ocasiones no es más que una apreciación subjetiva, y aún no se ha mostrado el origen de estos incrementos transitorios.

En nuestros experimentos de análisis de imágenes hemos podido observar que la desgranulación tiene lugar de forma bastante uniforme a lo largo de la superficie celular, o que la pérdida de fluorescencia de quinacrina se produce de manera más focalizada. Por ejemplo, en la fig. 38 se ha mostrado un registro donde, en la parte *a)* de la figura, la pérdida de fluorescencia es muy poco apreciable, mientras que en la zona *b)*, esta pérdida se produce de forma más evidente. En este experimento la aplicación se realizó de forma global, por lo que el inicio de la desgranulación, en principio, no es atribuible a una exposición local de la zona *b)* al compuesto 48/80. Más bien nos inclinamos a pensar que el proceso secretor comienza en una zona concreta de la membrana celular, y a partir de esa zona, y a través de los mensajeros intracelulares que se han generado, se amplifica el fenómeno secretor a zonas adyacentes. No obstante, como se ilustra en la fig. 38, la exocitosis puede tener lugar en varias zonas de la superficie celular. Por ejemplo, en la zona *a)* de esta figura, a pesar de ser muy constante el

nivel de fluorescencia del área, se observa un ligero decremento en la intensidad de fluorescencia.

Para realizar el análisis de la exocitosis a nivel de vesícula única se ha hecho necesario tratar las imágenes con diversos filtros para incrementar el contraste. Con técnicas de análisis de imágenes se puede resolver la exocitosis compuesta, algo que no puede ser detectado mediante la determinación de la capacidad eléctrica de membrana, ya que no distingue entre dos vesículas únicas que se funden simultáneamente en localizaciones diferentes de la membrana y una vesícula que se funde con una segunda cuando la primera se funde con la membrana plasmática. Experimentos de este tipo no se habían realizado hasta la fecha en mastocitos. En la fig. 42, gracias al incremento de contraste de la imagen, se pueden visualizar vesículas secretoras únicas y cómo, en una secuencia de imágenes, una vesícula secretora pierde su intensidad de fluorescencia. Este tipo de registros muestra, por primera vez, la exocitosis compuesta mediante técnicas de imágenes. Desafortunadamente, debido a que las vesículas secretoras se encuentran en distintos planos, es muy difícil realizar, con técnicas de imágenes en un microscopio convencional, un estudio cuantitativo que ponga de manifiesto cuál es la velocidad de desgranulación en vesículas que se han fundido con la membrana vesicular de otras vesículas previamente fundidas con la membrana plasmática (exocitosis compuesta). Este tipo de estudios serían muy útiles para establecer cuál es la probabilidad de fusión de una vesícula secretora con la membrana plasmática y cuál es la probabilidad de fusión de una vesícula con la membrana de otra vesícula secretora. Para llevar a cabo este tipo de estudios de manera cuantitativa haría falta monitorizar la capacidad de la membrana plasmática en la modalidad de célula completa y simultáneamente determinar con técnicas de imágenes el lugar donde se produce este incremento de capacidad. Para realizar este tipo de investigación, haría falta implementar en nuestro sistema de imágenes la posibilidad de adquirir imágenes a distintos focos, para así poder observar si la pérdida de fluorescencia de quinacrina de varias vesículas secretoras se corresponde con los incrementos de capacidad de la membrana. Estudios

realizados en esta dirección pondrían de manifiesto si realmente la exocitosis compuesta justifica los cambios rápidos de capacidad.

Como ya se apuntaba en la introducción, en células endocrinas existen controversias sobre el tamaño (Gillis y col., 1996) e incluso la existencia de vesículas ancladas a la membrana (Trifaró y Vitale, 1993). Por otra parte, no se conoce con exactitud la forma y rapidez con que las vesículas son reemplazadas en sus posiciones secretoras. Recientemente, Steyer y col. (Steyer y col., 1997) identificaron en células cromafines bovinas, mediante microscopía electrónica, un conjunto de vesículas que permanecen ancladas a la membrana, y que se reducen de forma selectiva cuando se provoca la exocitosis. Tomando esta referencia como punto de partida, analizaron el movimiento de las vesículas, teñidas con naranja de acridina, adquiriendo imágenes de fluorescencia. Para excitar la preparación emplearon una onda evanescente (microscopía de reflexión interna total), que evita la extinción de la fluorescencia (el estímulo luminoso posee un bajo nivel energético) y conlleva una estrecha profundidad de campo que reduce la contaminación ocasionada por planos focales próximos al que se focaliza.

Además, utilizan algoritmos que mejoran la calidad de la imagen. Concretamente, y en este caso, sustraen de la imagen original otra versión de la misma al que aplican un filtro paso de baja.

En el presente trabajo hemos estudiado la movilidad de las vesículas secretoras antes y durante el proceso de la exocitosis. Para realizar este estudio hemos tomado imágenes a distintos tiempos y determinado la posición de las vesículas con relación a un objeto fijo que habíamos identificado previamente bajo el microscopio. Esta maniobra permite alinear la vesícula secretora con el objeto de eliminar movimientos globales de la preparación, la cámara, o el microscopio. En general, podemos decir que las vesículas secretoras de los mastocitos se encuentran fijas en el citoplasma y/o la membrana plasmática durante el proceso de la exocitosis.

Sólo en fechas muy recientes se ha podido estudiar la movilidad de las vesículas secretoras mediante el microscopio de reflexión interna total. Steyer y

col. (1997) estudiaron las etapas por las que atraviesa una vesícula secretora en células cromafines bovinas. Esta técnica permite estudiar la movilidad de las vesículas de secreción en el plano donde se produce la reflexión del haz de luz. Dependiendo de las características ópticas del sistema, este plano se circunscribe a unos 300-400 nm de la membrana plasmática, que se encuentra reposando sobre el cubreobjetos de la preparación. Steyer y col., (1997) consiguieron identificar granos cromafines que, si bien poseían una movilidad en el citoplasma (de hasta 114 nm/s), cuando entraban en contacto con la membrana plasmática sufrían una retención en la misma, probablemente debido a anclajes moleculares que serían los responsables del “docking” vesicular. En otras ocasiones, estos anclajes podían ser reversibles; es decir, una vesícula secretora podía fijarse transitoriamente con la parte interna de la membrana plasmática y volver a circular libremente por el citosol. Otro aspecto importante en estos estudios es que las vesículas, en el citosol, no se mueven aleatoriamente en todas las direcciones del espacio. Por el contrario, Steyer y col., (1997) demostraron un trasiego direccional de las vesículas secretoras preferentemente hacia la membrana plasmática. Estos datos indican un papel predominante del citoesqueleto en la aproximación de vesículas a la membrana. En nuestros experimentos, hemos observado que las vesículas de mastocitos se encuentran fijas durante todo el proceso secretor, no observándose modificaciones apreciables en su transporte citosólico. Únicamente hemos observado cambios en la forma de la vesícula cuando se ha producido la exocitosis, lo cual puede ser indicativo de la difusión al espacio extracelular de la matriz de heparina del grano secretor.

Los experimentos realizados con el colorante FM1-43 han permitido monitorizar qué ocurre después de que tenga lugar la exocitosis. En estos experimentos el colorante se aplicó al medio extracelular y posteriormente se estimuló para la exocitosis con el compuesto 48/80. Hemos podido observar que la tinción por FM1-43 se limitó fundamentalmente a la matriz del grano secretor, hecho que se hizo mucho más patente cuando las células fueron estimuladas con 48/80 para segregar. En estas condiciones, la fluorescencia se limitó a las zonas

donde se había producido la exocitosis, a diferencia de lo que ocurre con la quinacrina, donde la exocitosis aparece como un vacío en la tinción de la célula. El colorante FM1-43 tiñó la matriz vesicular de heparina, como lo pone de manifiesto la fuerte intensidad fluorescente que adquirieron las matrices que habían sido expulsadas al espacio extracelular. Éstas permanecieron fluorescentes incluso después de ser eliminada la célula del campo bajo el microscopio. Sin embargo, en algunos experimentos donde la secreción se indujo mediante la diálisis citosólica con un nucleótido no hidrolizable de guanina (GTP γ S), en ausencia de 48/80, la tinción del FM1-43 ofreció imágenes muy difusas, donde no se pudo observar la tinción de la matriz intragranular. Estos datos indican que el FM1-43 es un buen marcador no sólo de la membrana plasmática sino que, además, en presencia del polication 48/80, puede teñir la matriz intragranular. Esta característica es muy útil en nuestros experimentos ya que nos permite ver la focalización de la exocitosis.

El FM1-43 se ha utilizado ampliamente para estudiar el ciclo de las vesículas sinápticas ya que se reparte en la interfase lípido-agua (no atraviesa la membrana). Esta característica hace que, si una zona de membrana plasmática es internalizada mediante endocitosis, la vesícula endocitada permanecerá con fluorescencia en el interior celular. Murthy y Stevens (1998), muy recientemente han demostrado, con la utilización de este colorante, que las vesículas sinápticas son internalizadas y susceptibles de volver a liberar el FM1-43 en una segunda estimulación sin necesidad de tener que atravesar una nueva vía de síntesis de vesículas sinápticas. La interpretación de estos experimentos se basa en que si el FM1-43 tuviera que diluirse en una mayor cantidad de membrana endosomal, la concentración del colorante disminuiría a unos niveles casi imperceptibles. Esto conllevaría que una nueva estimulación produciría la pérdida total de fluorescencia. Nuestros experimentos muestran, en mastocitos, que esta vía de endocitosis es poco relevante y que el análisis cuantitativo puede estar contaminado por la tinción adicional de la matriz del grano secretor.

En el Departamento donde se ha realizado la presente investigación, existen diferentes antecedentes sobre la determinación del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ utilizando el colorante quelante de calcio fura-2, sobre diferentes tipos celulares (Marín y col., 1996; Marín-Caballos, 1995; Toledo-Aral, 1992; Ureña y col., 1994).

En todos los casos, la técnica empleada consistió en la determinación de la intensidad de fluorescencia por medio de un fotomultiplicador. En nuestro caso, el sistema de registro fue la cámara CCD digital, con la idea de poder determinar si en la proximidad de la vesícula, durante el proceso secretor, existen variaciones en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$.

Frente a la ventaja que supone poder establecer, con la cámara digital, regiones puntuales de la célula para seguir el curso temporal de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, existen varios inconvenientes que nos disuadieron de seguir empleando dicha técnica.

El primero de ellos fue la lenta frecuencia de adquisición de la cámara. Aunque era posible tomar 1 ó 2 imágenes por segundo, sin embargo la emisión de fluorescencia no era lo suficientemente intensa para permitir la adquisición. Por otra parte, teniendo en cuenta la importancia de registrar sutiles variaciones de intensidad, se hace imprescindible la adquisición a mayor velocidad para realizar el promedio de varias imágenes y eliminar de esta forma el ruido intrínseco a la adquisición.

Un segundo problema añadido es el de sincronizar a altas velocidades, el giro de la rueda de filtros y la adquisición de imágenes a dos longitudes de onda.

Por este motivo, sólo se presentan en los resultados aquellos experimentos previos en los que detectamos cambios de fluorescencia, que indican cambio de $[Ca^{2+}]_i$, pero sin llegar a cuantificar dicha concentración.

Las imágenes obtenidas de los niveles de Ca^{2+} citosólico son cualitativas ya que no hemos realizado el cociente de intensidades de fluorescencia. Aunque nuestros registros ponen de manifiesto que la concentración de Ca^{2+} es focal, sin

embargo no hemos podido determinar si existe un paralelismo entre estos cambios en los niveles de Ca^{2+} y los lugares de focalización de la exocitosis.

2. JUSTIFICACIÓN DEL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES. ASPECTOS RELACIONADOS CON EL MISMO

Aunque existen muchos métodos de adquisición y análisis en el mercado, éstos se han desarrollado para aplicaciones concretas que miden, por ejemplo, la concentración de iones sensibles a marcadores como el fura-2, fluo-3 o quin-2. Por otra parte, conviene destacar que las aplicaciones existentes en el mercado fueron fruto de las investigaciones llevadas a cabo por grupos científicos, que necesitaban nuevas herramientas que respondieran a preguntas concretas.

Actualmente, cada vez es mayor el número de colorantes que se sintetizan para tareas muy específicas, y que poseen propiedades espectrales muy dispares. Tienen diferentes longitudes de onda de excitación y emisión, presentan una característica de fluorescencia en lugares concretos que varían espacialmente a lo largo del tiempo, se unen a diferentes iones, etc. Ello conlleva necesariamente sistemas de adquisición y algoritmos particulares en el análisis para cada aplicación y colorante.

2.1. Etapas cubiertas en el desarrollo

En la realización del sistema de adquisición y análisis, desarrollado en nuestro propio laboratorio, y con el objetivo de estudiar la exocitosis en células cebadas, se cumplieron distintas etapas que se pasan a discutir a continuación:

1. Puesta a punto del microscopio, para optimizar la iluminación de epifluorescencia. Esto supone focalizar la lámpara de mercurio para maximizar la intensidad de excitación. Más tarde, durante los experimentos realizados con la quinacrina, observamos que era más aconsejable el desenfoco de la misma, para evitar una excesiva intensidad luminosa sobre la célula cargada con el colorante, que inducía una gran fototoxicidad.

2. Diseño del filtrado necesario para la luz de epifluorescencia, que serviría, entre otras cosas, para excitar la preparación a una determinada longitud de onda. La disposición que teníamos en el laboratorio de filtros compatibles con las propiedades espectroscópicas de la quinacrina, el bajo coste de dicho colorante y la posibilidad de utilizarlo como marcador vesicular, nos llevaron a elegir este fluoróforo para las primeras observaciones de las células cebadas utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia. En el cajetín, dispuesto para tal fin en el microscopio (Axiovert-35, Carl-Zeiss), instalamos los filtros requeridos por la quinacrina y testeamos el sistema de fluorescencia. Para verificar que los filtros eran los adecuados, se midieron sus propiedades espectroscópicas (transmisión y absorbancia) y se vio la adecuación de los mismos a las propiedades del colorante dadas por el fabricante. Este estudio permite conocer el grado de optimización que se realiza con los filtros de excitación, dicróico y emisión.

3. Determinación de los tiempos de incubación más favorables para cargar el colorante. Aunque esta etapa no pertenece estrictamente al montaje del sistema, sin embargo es importante para poder controlar y verificar su funcionalidad.

Es muy importante conocer el tiempo que deben permanecer las células en contacto con el colorante, de forma que los granos secretores, de carácter ácido, se carguen lo suficiente para poder observar fluorescencia, sin que se vea afectada excesivamente la preparación por la fototoxicidad del colorante. Si sobrepasaban este tiempo de incubación, la exocitosis no se contemplaba como una disminución paulatina de la intensidad de fluorescencia a medida que se fundían los granos, sino que provocaba la fotodestrucción celular, manifestada por intensidades de fluorescencia irregulares, posiblemente por el cambio morfológico que presentaban los mastocitos sin que necesariamente hubieran degranulado, así como por la falta de sensibilidad al compuesto 48/80 que inducía la degranulación.

4. Existen diferentes sistemas de registro de la fluorescencia, como los fotomultiplicadores, cámaras de vídeo y cámaras CCD digitales. Nos decidimos por esta última opción, frente a la videocámara, ya que poseía mejor resolución. Las cámaras de vídeo tienen como sensor una CCD, la señal que registran es

analógica y su resolución está limitada a un byte. Además, la sensibilidad es mucho menor debido a la diferente forma de aplicar la etapa de ganancia respecto a las cámaras digitales. Por otro lado, estas últimas presentan una menor relación señal-ruido. Un último inconveniente es que la información es unidireccional, de modo que no permite controlar algunos aspectos de la adquisición como el número de píxeles o la región de la CCD que serán expuestos (“subframes”).

Respecto al fotomultiplicador, que empleamos en nuestros primeros experimentos, fue descartado porque realizaba una lectura global de la intensidad de fluorescencia. Aunque tenía una gran resolución temporal, y podía restringirse la región celular con un diafragma, sin embargo presentaba una gran dificultad la selección de dicha región.

Por el contrario, tomar una imagen celular con la cámara CCD digital, permite que el área ocupada por la oblea de silicio funcione como múltiples fotomultiplicadores independientes, que registran de forma individual la intensidad de fluorescencia en puntos concretos de la preparación.

5. En los primeros experimentos en los que adquirimos imágenes de fluorescencia, utilizamos el software que el fabricante distribuye con la cámara. Este programa tenía algunas carencias importantes que nos obligaron a desarrollar nuestro propio software de adquisición. Por ejemplo, no permitía adquirir las imágenes en un formato que fuera posible visualizar en otras aplicaciones de uso general como editores de texto, editores gráficos, etc. Era difícil controlar los tiempos de exposición y los intervalos entre adquisiciones. No era posible controlar otros periféricos, como tarjetas multifuncionales. No permitía la visualización de las imágenes en adquisición continuada. Estas limitaciones pudieron ser solventadas con la aplicación que programamos.

En definitiva, las ventajas que aporta el desarrollo de un sistema propio son:

- Accesibilidad a posibles modificaciones que deban ser realizadas durante la elaboración de distintos protocolos experimentales.
- Flexibilidad respecto a la posibilidad de suprimir o incorporar nuevos elementos (de hardware o de software) al sistema.

- Conocimiento más profundo de la tecnología empleada y, por consiguiente, de las posibilidades y opciones disponibles para la observación de fenómenos biológicos.
- Economía, ya que un sistema de este tipo, por lo general, no se puede adquirir por menos de dos millones de pesetas en el mercado.

Para resaltar la idea de un sistema modular, flexible y exportable, cabría destacar que a partir del diseño que hicimos en el laboratorio para una aplicación concreta, el estudio de la excitosis, se diseñó otro sistema de adquisición y análisis, con una cámara similar montada en un microscopio diferente, que adquiriría imágenes en campo claro, no fluorescentes, y permitirían estudiar en otro tipo celular, ovocitos, la variación de su volumen celular cuando eran sometidos a un choque hiperosmótico.

2.2. Comparación con sistemas existentes en el mercado

Debido a la amplia variedad de sistemas comerciales de adquisición y procesamiento de imágenes y a la diferencia de precios que presentan, el futuro usuario se pregunta en qué radican dichas diferencias. En general, los parámetros objetivos, referidos al hardware, especifican ciertas propiedades físicas, mientras que los subjetivos, acerca del software, dependen del gusto, preferencias y requisitos del usuario.

Respecto a las cámaras CCD digitales, las características físicas más importantes que se deben tener en cuenta son:

- La calidad del sensor, dado por el número de píxeles erróneos.
- Ruidos de lectura y electrónico (sobre todo, para señales de baja señal luminosa).
- Respuesta espectral (que sea lineal).
- Refrigeración.
- Calidad de la electrónica.

A continuación se detallan algunas empresas que distribuyen sistemas de imágenes, con alguna de sus características y precios de los mismos.

Photon Technology International. Los productos de esta casa, que distribuye en España Optilás, están basados en sistemas que miden el cociente entre intensidades de fluorescencia. Ofrece hasta 50 sistemas, más que el resto de las compañías competidoras juntas. Divide en cuatro grandes grupos sus sistemas fluorimétricos en función de la preparación que se estudie: células en suspensión, tejidos y células adheridas (Grupo I); concentración de iones en célula única (Grupo II); sistema de imágenes, con medidas de la razón de fluorescencia (Grupo III); centro multifunción (Grupo IV).

Sin duda es un gran fabricante, que ofrece un amplio abanico de posibilidades, lo que supone, prácticamente, diseñar un sistema a la medida de las necesidades del usuario. Por tanto, una de sus características más notables es la flexibilidad. Los equipos que incorporan un sistema de imagen montan cámaras CCD digitales con intensificadores. Disponen de tres modelos (IC-110, IC-200 y IC-300) cuyos precios oscilan entre 900.000 pts. y 3.000.000 pts. Sus mejores virtudes son la velocidad de adquisición (30 imágenes por segundo) y su sensibilidad (200, 300 y 800 $\mu\text{A}/\text{lum}$). Los intensificadores tienen ganancias de 10.000, 15.000 y 30.000, y la CCD contiene 768 x 494 píxeles.

Till Photonics. Distribuye un completo sistema de adquisición de imágenes, que comprende diferentes fuentes de excitación (iluminación a múltiples longitudes de onda y lámparas de arco de Xenón), cámaras CCD digitales y el software que permite elegir entre diferentes protocolos de adquisición.

Dispone de dos cámaras CCD digitales con prestaciones diferentes. Una tiene un área de 640 x 480 píxeles, la otra 1280 x 1024, siendo el tamaño del píxel 9.9 x 9.9 μm^2 y 6.9 x 6.9 μm^2 respectivamente. La cámara más barata cuesta 12.000 dólares (1.800.000 pts.).

La eficiencia cuántica, para una longitud de onda de 500 nm, es del 40%. Posee una resolución de 12 bits (4096 valores de gris). Es importante destacar en esta cámara su velocidad de muestreo (30 imágenes por segundo exponiendo la totalidad de la CCD, o 140 imágenes en la opción "subframes") y la velocidad del obturador electrónico (2.5 μs). Los pozos de potencial de cada píxel permiten

alojar 35.000 ó 25.000 e⁻, dependiendo del tipo de cámara. La frecuencia de muestreo es de 12.5 MHz, para la cual posee un ruido equivalente a la carga de 13 e⁻. En oscuridad, debido al efecto térmico, pueden observarse, como mucho, 2 pixeles con una carga superior a la correspondiente a más de 5 e⁻.

SpectraSource Instruments. Ésta es una compañía joven (1989), que inicialmente vendía cámaras CCD digitales destinadas exclusivamente a la observación astronómica. De hecho, en su logotipo aparece la letra inicial de la empresa sobre un fondo azul con nubes.

Sin embargo, el bajo precio que tenían sus cámaras (desde 225.000 pts. la más barata hasta 500.000 pts. la más cara), sirvió, en algunos casos, como justificación para que algunos científicos se decidiesen a montar un sistema de imágenes de bajo coste destinado a estudios biológicos.

Una de las fuertes bazas con las que tratan de convencer a sus potenciales clientes es la opción de compra sobre las librerías que gobiernan la cámara. Ésta es, sin duda, una de las características más importantes cuando nos decidimos a comprar sus cámaras (MCD220 y MCD400), que formarían parte de nuestro sistema de imagen. Las especificaciones técnicas de estas cámaras están incluidas en el apéndice.

Quizás la desventaja de estas cámaras sea su limitada velocidad de muestreo respecto a otras cámaras del mercado. Sin embargo, excepto para los estudios relacionados con la determinación de la [Ca²⁺]_i, éste no ha sido un factor limitante.

2.3. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia

Testeando modelos clásicos mediante microscopía de fluorescencia, Murthy y Stevens (Murthy y Stevens, 1998) cuantificaron la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante FM1-43 cuando se unía a la membrana. Demostraron de esta forma que la cantidad de colorante internalizado por cada vesícula durante la endocitosis era equivalente al liberado por exocitosis.

La metodología empleada por estos autores consistió en identificar como región de interés (ROI) los puntos luminosos correspondientes a la fluorescencia

de la vesícula. Posteriormente, se determinó el centro de masa de dicha región, y alrededor de él, en una matriz 7 x 7, se hizo el promedio de la intensidad de fluorescencia de los píxeles que la formaban.

El valor de intensidad de fluorescencia de cada píxel estaba comprendido entre 0 y 255, lo que suponía que la resolución era de 8 bits, la misma que nosotros empleábamos cuando analizábamos las imágenes en formato "BMP". Esto representa una pérdida de resolución respecto a las imágenes adquiridas originalmente por la cámara (en nuestro caso de 12 bits, 4096 valores).

La metodología que se ha seguido en este trabajo ha sido muy similar. Se aislaba la región de interés y se cuantificaba la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, existen algunas diferencias importantes:

- a) La región de interés quedaba restringida a la correspondiente a una vesícula. Esto supone, en células cebadas cargadas con quinacrina, que la región es extremadamente pequeña (10 x 10 píxeles como máximo), ya que las vesículas cargadas con el colorante están muy próximas entre sí y se debe evitar la lectura de más de una vesícula.
- b) Dependiendo del tipo de análisis que se hiciera, se calculaba o no el centro de masas. Si se registraba la pérdida de fluorescencia con el fin de correlacionarla con la fusión de las vesículas, no tenía utilidad conocer el centro de masas, puesto que únicamente se realizaba la media de intensidad de fluorescencia en la región de interés. El centro de masas solamente fue calculado cuando se estudiaba la movilidad de la vesícula.
- c) El tamaño de la matriz correspondiente a puntos circundantes al centro de masas no era siempre el mismo, sino que dependía del ancho de la región de interés. Esta circunstancia es intrínseca a la heterogénea distribución de las vesículas. Normalmente nuestro objetivo eran aquellas vesículas que permanecían relativamente aisladas y, por lo tanto, facilitaban la obtención de una región donde no hubiera más de un grano secretor.

Sin duda, la mejor forma de aprovechar la resolución de la cámara, para cuantificar la intensidad de fluorescencia, sería adquiriendo las imágenes en su

formato original. Sin embargo, aunque existe la posibilidad de implementar una forma de adquisición que delimite una región particular de la imagen, tiene el inconveniente de la dificultad de conocer cuál es la región que verdaderamente tendrá interés a lo largo del experimento.

2.4. Adquisición de imágenes

En el mismo se tiene la posibilidad de activar el mecanismo que enfría la CCD para evitar ruido eléctrico (peltier) así como seleccionar el tiempo de exposición. Podemos realizar una única adquisición o bien continua. En este último caso, se especificará el intervalo de tiempo existente entre exposición y exposición. Este parámetro viene delimitado por el tiempo de integración necesario en la toma de la imagen, y puede ser reducido en función del número de píxeles que se expongan y del soporte de grabación, disco duro o memoria RAM.

Tanto en la adquisición única como en la continua, las imágenes son archivadas en diferentes formatos: SSI (que aprovecha la máxima resolución de la cámara, 12 bits) y BMP. Este último formato permite exportar las imágenes a cualquier editor gráfico. Cuando se realiza algún tipo de análisis sobre la imagen, es conveniente realizarlo sobre la imagen en el formato que aprovecha la máxima resolución. Sin embargo, cuando no son importantes las sutiles diferencias de intensidad luminosa entre imágenes sucesivas, puede hacerse el análisis, por comodidad, en las imágenes de 8 bits. Por ejemplo, en medidas de calcio, es imprescindible analizar las imágenes de 12 bits, pero no es tan decisivo en la determinación del curso temporal de la degranulación de mastocitos cargados con quinacrina.

El sistema, además, controla la rueda de filtros y un obturador externo mediante una tarjeta multifunción de entrada-salida que también programamos e integramos en nuestra aplicación. Esto nos permitió una perfecta sincronización del obturador de la cámara con el que se intercalaba entre la lámpara de excitación y la preparación, así como con el filtro que empleábamos en cada momento. El obturador que delimita la excitación de la preparación en el instante en que se

realiza la adquisición, es pieza fundamental en el sistema de microscopía de fluorescencia. Gracias a él se puede controlar el experimento, al evitar los problemas que conlleva un prolongado tiempo de exposición a la luz de excitación.

Pruebas realizadas con la quinacrina y el FM1-43, en las que no empleamos dicho obturador, hicieron patente la fototoxicidad del colorante, que evitaba la actuación del compuesto 48/80 para inducir la degranulación.

2.5. Procesamiento de imágenes

El registro de imágenes de fluorescencia mediante microscopios convencionales de epifluorescencia está limitado, debido a que la finita apertura numérica del objetivo provoca la distorsión de la imagen y reduce su contraste. La luz procedente de una fuente puntual ideal, se difumina y adopta una forma tridimensional (Agard, 1984; Castleman, 1979). Como resultado, la imagen observada es borrosa y está contaminada con luz fuera de foco.

Una alternativa, para corregir la distorsión de la imagen, así como para eliminar la información fuera de foco, es el procesamiento digital. Un procedimiento relativamente sencillo es el esquema de eliminación de la borrosidad de vecinos próximos (Monck y col., 1992b). La contribución de la luz de secciones vecinas es estimada adquiriendo imágenes adyacentes borrosas, mediante la convolución de la imagen fuera de foco, y posteriormente son sustraídas de las imágenes a foco, para finalmente aplicar a las imágenes resultantes un filtro Wiener inverso.

Sin embargo, el sistema más sencillo consiste en sustraer de la imagen original otra versión suavizada. En definitiva, el objetivo del procesamiento de imágenes es eliminar la débil fluorescencia de células vecinas alejadas del plano focal.

El procesamiento que nosotros hemos realizado se basa en esta metodología. Mediante un cambio de contraste (ver "Material y métodos"), hemos conseguido aumentar la diferencia de intensidad de fluorescencia entre vecinos

próximos. Así, aquellos píxeles con bajas intensidades de fluorescencia (correspondientes a la fluorescencia de planos fuera de foco), después del procesamiento seguirán teniendo una débil fluorescencia, mientras que los que están a foco aumentan notablemente su intensidad en la nueva versión.

Si bien es verdad que no se consigue eliminar esa débil fluorescencia correspondiente a la información fuera de foco, sin embargo el tratamiento digital resuelve dos importantes problemas:

- a) Identificar el contorno vesicular De esta forma es posible observar con gran nitidez, en mastocitos peritoneales de rata, granos únicos cargados con quinacrina.
- b) Evitar que la fluorescencia de vesículas que están por debajo o por encima enmascaren la lectura de la intensidad luminosa del grano objeto de estudio.

2.6. Software

La aplicación informática, que permite la adquisición y procesamiento de imágenes bajo el entorno Windows, se desarrolló en Visual Basic y en lenguaje "C". Visual Basic, porque permite, de forma rápida e intuitiva, diseñar e implementar las pantallas con las que el usuario puede acceder a las utilidades de la aplicación, y "C" porque es el lenguaje de programación más cercano al lenguaje máquina (de bajo nivel) y, por tanto, posibilita una mayor rapidez en la ejecución de los diferentes algoritmos presentes tanto en la adquisición como, sobre todo, en el análisis. Para comprobar la diferencia en la rapidez de procesado, se empleó el mismo algoritmo de conversión de formato y se programó en "C" y Visual Basic. El primero fue 20 veces más rápido que el segundo en convertir una imagen grabada en formato "SSI" a formato "BMP" (1 y 20 seg. respectivamente).

El Visual Basic permite la incorporación de las DLL (ver "Material y Métodos") que fueron previamente escritas en "C". De esta forma podemos fusionar ambos lenguajes y sacar partido de las mejores cualidades de cada uno. La gran ventaja que tiene incorporar las DLL al programa escrito en Visual Basic es que puede permanecer el esqueleto completamente inalterado, de forma que, si

se quiere introducir una modificación, sólo habrá que realizarla sobre la DLL sin que cambie para nada el esqueleto del programa.

En la aplicación podemos destacar dos fases bien diferenciadas: la adquisición de imágenes (ver apartado 1.4 de esta "Discusión") y el análisis.

a) *Sistema de adquisición.* Existen diferentes aspectos que suponen una notable mejora respecto a la aplicación de uso general que distribuye el fabricante junto con la cámara. En primer lugar, la accesibilidad sobre los diferentes parámetros que controlan la adquisición, y que aparecen en todo momento en la pantalla. En segundo, la presentación de cada imagen en pantalla cuando se selecciona la adquisición continua. Por último, la posibilidad que existe de grabar durante la adquisición en formato SSI, BMP o en ambos simultáneamente. Esta característica favorece la rapidez de procesamiento y análisis.

b) *Sistema de análisis.* Gracias a él se procesan las imágenes para mejorar su definición, se delimita la zona de la imagen objeto de estudio (ROI), se cuantifica la intensidad luminosa y se determina el centro de gravedad de la imagen.

La mayoría de los datos obtenidos en el análisis (cuantificación de la intensidad y cálculo del CG) son grabados en archivos que pueden ser exportados a procesadores de datos comerciales como Igor o Sigma Plot, donde es posible proceder a un exhaustivo análisis de los datos obtenidos.

CONCLUSIONES

1.- Hemos desarrollado un sistema para el registro de imágenes fluorescentes con resolución espacial y temporal suficiente para ser aplicado en el estudio de la exocitosis en células cebadas. Este sistema también puede ser utilizado en células neurosecretoras que contienen vesículas secretoras de menor tamaño.

2.- El sistema puede incorporarse a cualquier sistema convencional de fluorescencia dotado de fotomultiplicador, permitiendo un análisis combinado con resolución espacial o temporal en función de las necesidades de cada experimento. En nuestro caso, hemos utilizado el sistema con la cámara CCD digital y obtenido imágenes con una resolución temporal de hasta 2 imágenes por segundo.

3.- El análisis de las imágenes se ha diseñado para cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida por una célula única. De esta forma podemos seguir el curso temporal de la desgranulación en mastocitos, con los colorantes fluorescentes quinacrina o el FM1-43, y detectar cambios en su $[Ca^{2+}]_i$, con el fura-2, mediante la determinación de la razón de fluorescencia emitida cuando se excita la preparación a dos longitudes de onda.

4.- El diseño modular de este sistema de imágenes permite modificar o incorporar nuevos elementos al mismo. Esta posibilidad deja un amplio margen de

maniobrabilidad para optimizar el sistema en función de nuevas necesidades técnicas requeridas en nuevos experimentos.

5.- La aplicación de este sistema a mastocitos ha revelado que la pérdida de fluorescencia de quinacrina que tienen lugar durante el proceso secretor se corresponde fielmente con la cinética de la exocitosis que tiene lugar en los mastocitos, como lo demuestra la buena correlación inversa existente entre el registro fluorimétrico y el incremento de la capacidad eléctrica de la membrana.

6.-El uso de la quinacrina ha permitido ver la exocitosis en mastocitos en vesículas únicas. Para la obtención de estos registros se ha hecho necesario un tratamiento de imágenes consistente en el aumento de contraste y filtrado de la señal. Estos registros han permitido observar imágenes de fusión en cadena que se pudieran corresponder con la exocitosis compuesta que se sabe tiene lugar en estas células.

7.- Las vesículas de secreción en los mastocitos permanecen casi inmóviles en el citosol, indicando que durante el proceso secretor las vesículas, a diferencia de lo que ocurre en otros tipos celulares como en las células cromafines bovinas, se encuentran ancladas y listas para ser fundidas con la membrana plasmática ante la llegada del estímulo secretor. La inmovilidad de las vesículas de secreción obliga a que el fenómeno secretor en los mastocitos deba producirse a través de exocitosis compuesta, es decir, a través de la fusión de las vesículas con la membrana de vesículas previamente fundidas.

8.- La utilización del colorante FM1-43 ha mostrado ser una herramienta útil para monitorizar la exocitosis en mastocitos una vez producida la desgranulación. Esta herramienta es particularmente útil cuando se añade al medio un polication, como el compuesto 48/80, que permite la tinción por el colorante de la matriz de heparina del grano secretor. Con este abordaje se puede hacer un mapa de la superficie celular donde ha tenido lugar la exocitosis. Sin embargo, la

tinción adicional de la matriz complica el análisis de la endocitosis en este tipo celular.

9.- El uso combinado de técnicas fluorescentes y de tratamiento de imágenes es una herramienta muy poderosa para el estudio de la exocitosis y su regulación. Además, la aplicación combinada con técnicas electrofisiológicas y/o de determinación electroquímica de sustancias, permitirá estudiar de forma escalonada las distintas etapas del proceso secretor. La realización de este tipo de estudio en células neurosecretoras y sinapsis del sistema nervioso, abrirá nuevas perspectivas en el conocimiento del acoplamiento estímulo secreción y del ciclo vital de las vesículas sinápticas.

APÉNDICE

APÉNDICE I:

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LAS CÁMARAS CCD UTILIZADAS EN LA ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Las dos cámaras descritas a continuación fueron adquiridas a Spectra Source Instruments (31324 Via Colinas, Suite 114 Westlake Village, CA 91362):

1. MCD220 CCD

- Formato: 192x165 pixeles
- Tamaño del píxel: 16x13.75 μm
- Área activa: 0.264 cm x 0.264 cm
- Eficacia cuántica: > 50 % a 650 nm
- Eficacia en la transferencia de carga: 99.998 %
- Corriente en oscuridad: <1.3 e/seg/píxel a -36°C
- Capacidad del pozo de potencial: ~150,000 e/píxel
- Temperatura de la CCD: -30°C a 20°C de temperatura ambiente
- Duración de la exposición: de 0.01 a 4000 seg
- Resolución del convertor A/D: 12 bits (4096 niveles de gris)
- Velocidad max. de adquisición: 2 imágenes/seg modo “subframe”

2. MCD400 CCD

- Formato: 243x336 pixeles
- Tamaño del píxel: 10 μm x 10 μm
- Área activa: 0.336 cm x 0.243 cm
- Eficacia cuántica: > 63 % a 650 nm
- Eficacia en la transferencia de carga: 99.998 %
- Corriente en oscuridad: <0.6 e/seg/píxel a -36°C
- Capacidad del pozo de potencial: ~150,000 e/píxel
- Temperatura de la CCD: -30°C a 20°C de temperatura ambiente
- Duración de la exposición: de 0.01 a 4000 seg
- Resolución del convertor A/D: 16 bits (65536 niveles de gris)
- Velocidad max. de adquisición: 2 imágenes/seg modo “subframe”

APÉNDICE II:**CONFIGURACIÓN DE LA TARJETA MULTIFUNCIONAL AT-MIO-16**

Las características más importantes de la tarjeta multifuncional AT-MIO-16 (National Instruments Corporate Headquarters, Austin, Texas, USA) son las siguientes:

- * Conversor A/D de 12 bits.
- * Ocho entradas analógicas (existe la posibilidad de configurarla para 16).
- * Dos salidas de voltaje.
- * Ocho líneas TTL (digitales).
- * Tiempo de conversión: 9 μ s.
- * Puede alcanzar un ratio de adquisición de 100 kH.
- * Las funciones de interfase de la tarjeta nos permiten la adquisición de datos mediante doble buffer, salida analógica, generación de formas de onda, I/O digital, operaciones de contador, mensajes de error, etc.
- * Existe la posibilidad de configurar mediante hardware y software el rango de configuración con el fin de aprovechar el rango dinámico para aumentar la precisión hasta 2.44 mV (basta cambiar la ganancia para las diferentes configuraciones):
 - de 0 a +10 V (de 0 a 1 V, de 0 a 0.1 V, de 0 mV a 20 mV)
 - de -5 a +5 V (de -0.5 a 0.5 V, de -50 a 50 mV, de -10 a 10 mV)
 - de -10 a +10 V (de -1 a 1 V, de -0.1 a 0.1 V, de -20mV a 20 mV)

FUNCIONES DE LA INTERFASE DE USO MÁS FRECUENTE:

1.- *NI_DAQ_Mem_Alloc*. Reserva memoria para un "array" de tamaño el producto del número de elementos por el tamaño de cada elemento (viene especificado por los parámetros que se le pasa).

Sintaxis: *status = NI_DAQ_Mem_Alloc (handle, elementSize, numElements, memType, memSource)*

2.- *NI_DAQ_Mem_Lock*. Incrementa el contador para el "handle" y devuelve el "lockedHandle" de la memoria alojada por *NI_DAQ_Mem_Alloc*.

Sintaxis: *status = NI_DAQ_Mem_Alloc (handle, lockedHandle)*

3.- *DAQ_Rate*. Convierte el ratio de adquisición de datos en la base de tiempo y el intervalo de muestreo necesarios para proporcionar el ratio deseado.

Sintaxis: *status = DAQ_Rate (rate, units, timebase, sampleInterval)*

4.- *DAQ_Start*. Inicializa un canal asíncrono de adquisición de datos y lo almacena en un "array".

Sintaxis: *status = DAQ_Start (deviceNumber, chan, gain, buffer, count, timebase, smpInterval)*

5.- *AI_VRead*. Lee por un canal una señal analógica de entrada (inicia una conversión A/D sobre un canal de entrada) y devuelve el resultado escalado a voltaje. Las unidades vienen dadas en voltios.

Sintaxis: *status = AI_VRead (deviceNumber, chan, gain, voltage)*

6.- *AO_VWrite*. Acepta un valor de voltaje en punto flotante, lo transforma al número binario correspondiente y escribe dicho número como salida analógica en el canal especificado.

Sintaxis: *status = AO_VWrite (deviceNumber, chan, voltage)*

7.- *WFM_Load*. Asigna un buffer donde se almacena la información que se generará en la salida.

Sintaxis: *status = WFM_Load (deviceNumber, numChans, chanVect, buffer, count, iterations, mode)*

8.- *WFM_Clock_Rate*. Especifica el *ratio* y el retraso de una salida analógica para un grupo de canales.

Sintaxis: *status = WFM_ClockRate (deviceNumber, group, whichclock, timebase, interval, mode)*

9.- *WFM_Group_Control*. Controla la generación de la forma de onda para un grupo de canales de salida analógica.

Sintaxis: *status = WFM_Group_Control (deviceNumber, group, operation)*

10.- *CTR_Pulse*. Genera un pulso especificado por el contador, el retraso y el ancho del mismo.

Sintaxis: *status = CTR_Pulse (deviceNumber, ctr, timebase, delay, pulseWidth)*

APÉNDICE III:

ESTRUCTURA E INVOCACIÓN DE LAS DLL

1. Estructura de una DLL

Toda DLL debe constar necesariamente de tres partes:

* *LibMain*. Su finalidad es la de inicializar la DLL y es invocada una sola vez cuando ésta es cargada. Los parámetros que son pasados a LibMain son: HANDLE, WORD, WORD y LPSTR.

* *Wep* (Windows Exit Procedure). Permite descargar limpiamente la librería de funciones. En general es conveniente incluirla en el módulo de definición (.DEF).

* *Funciones de exportación*. Éstas son las funciones propiamente dicha que son requeridas en la DLL. Al igual que la Wep, se suelen declarar en el módulo de definición.

2. Llamada de las DLL desde Visual Basic

En Visual Basic, todas las funciones, entre las que se incluyen las DLL, deben ser declaradas. La declaración puede hacerse en una "Form" en cuyo caso sería privada a la misma, o en un "Module" si queremos que sea transparente a todas las partes del programa. Un ejemplo de declaración es el siguiente:

```
Declare Function CCDCameraExpose% Lib "c:\dll\runcdd.dll" (ByVal MiliSec&,
ByVal AntiBloom%, ByVal LookInterval%)
```

La "Lib" runcdd.dll es la librería DLL donde reside la función. Ésta tiene tres argumentos que se le deben pasar y que, tal como se especifica, son dados por valor.

Las DLL pueden retornar o no un valor. En el primer caso se declarará la misma como un "Function", mientras que si no devuelve valor alguno, se declarará como una "Sub". Una vez que se declara la función, ésta es llamada como cualquier otra de Visual Basic. Es importante destacar que los parámetros utilizados en "C" y en Visual Basic no siempre coinciden, por lo que se debe prestar especial atención a encontrar el tipo de dato apropiado que se le pasa a la

función.

Por defecto, Visual Basic pasa todos los argumentos por referencia; sin embargo, muchas DLL necesitan pasar los argumentos por valor. Por esta razón se debe especificar en los argumentos, si procede, "ByVal".

APÉNDICE IV:

ESTRUCTURA DE UN FICHERO BITMAP (BMP)

1.- Header (tamaño: $14+40+1024=1078$ bytes)

1.1 Bitmapfileheader (14 bytes):

- Tipo de fichero (2 bytes) = BM
- Tamaño de la imagen (4 bytes)
- Bytes activados a cero (2 bytes)
- Bytes activados a cero (2 bytes)
- Bytes en que comienza "Info" (4 bytes)

1.2 BitmapInfo (40+1024 bytes). Se subdivide en:

1.2.1 Bitmapinfoheader (40 bytes):

- Tamaño del bitmapinfoheader en bytes (4 bytes)
- Anchura de la imagen en pixeles (4 bytes)
- Altura de la imagen en pixeles (4 bytes)
- Número de planos para el dispositivo blanco (2 bytes)
- Número de bits por pixeles (2 bytes)
- Tipo de compresión (4 bytes)
- Tamaño en bytes de la imagen (4 bytes)
- Resolución horiz. en pixeles/m del dispositivo blanco (4 bytes)
- Resolución vertical en pixeles/m del dispositivo blanco (4 bytes)
- Número de colores usados por el bitmap (4 bytes)
- Número de colores importados para el bitmap (4 bytes)

1.2.2 Rgbquad (1024 bytes). Es lo que comúnmente se conoce como "paleta de color" o LUT y define los colores del bitmap. Esta paleta es del tipo RGB (red-green-blue) y en función de la proporción de cada uno de estos colores primarios se genera uno nuevo, haciendo corresponder el color resultante a un determinado valor de intensidad luminosa.

- Intensidad de color azul (1 byte)
- Intensidad de color verde (1 byte)
- Intensidad de color rojo (1 byte)
- Bytes no usado, activado a cero (1 byte)

2. - Info. Es la información correspondiente a los valores de intensidad luminosa, es decir, de la imagen propiamente dicha (carga almacenada en cada píxel de la cámara). Se almacena píxel a píxel en forma binaria comenzando desde la esquina superior izquierda hasta la esquina inferior derecha fila a fila.

APÉNDICE V: SUBROUTINAS DE CONTROL DE LA CÁMARA

1. Programa: RUNCCD.C

Este programa está escrito en "C" y el ejecutable es una "DLL". Esta DLL es llamada desde Visual Basic para la adquisición de imágenes. Gobierna diferentes funciones de la cámara como inicializar, enfriar la CCD, abrir y cerrar el obturador, limpiar o llevar la tensión almacenada de los pixeles a tierra, exponer el cristal de silicio, integrar los valores y digitalizarlos.

```
#include <stdio.h>
#include "c:\dll\camara.h"
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
//*****
HANDLE hmodDLL;
WORD PixelArray[256];
int YOffset, YSize;
int XOffset, XSize;
FILE *f;
// *****
VOID FAR PASCAL _export CCDCameraCooler (BOOL bOn) // Enfría la CCD
{
    bOn=bOn;
    CameraCooler(bOn);
    return;
}
// La siguiente función asigna una determinada dirección de memoria
BOOL FAR PASCAL _export CCDCameraInitialize (WORD wPortAddress)
{
    wPortAddress=0x120;
    #ifdef MAC
    CameraInitialize();
    #else
    CameraInitialize(wPortAddress); /*Inicializa a la dirección de memoria
especificada/
    #endif
    return TRUE;
}
// Esta función abre el obturador de la CCD
VOID FAR PASCAL _export CCDCameraOpenShutter (VOID) {
    CameraOpenShutter(); /*Abre el obturador de la cámara/
    return;
```

```

}
// Esta función descarga a tierra la carga de la CCD
VOID FAR PASCAL _export CCDCameraClearCCD (VOID)
{
    CameraClearCCD(); /*Descarga los pozos de potencial a tierra */
    return;
}
// Esta función integra los valores de la CCD
VOID FAR PASCAL _export CCDCameraBeginIntegrate (VOID)
{
    CameraBeginIntegrate(); /*Comienza la integración de los valores
asignados a la carga de cada píxel, mediante la tarjeta digitalizadora */
    return;
}
// Esta función determina el tiempo de exposición de la CCD
BOOL FAR PASCAL _export CCDCameraExpose (ULONG MiliSec, WORD
AntiBloom, WORD LookInterval)
{
    MiliSec=MiliSec;
    AntiBloom=AntiBloom;
    LookInterval=LookInterval;
    CameraExpose (MiliSec,AntiBloom,LookInterval);
/* Expone el sensor de la CCD durante el tiempo especificado por las variables y
con la posibilidad de AntiBloom*/
    return FALSE;
}
// Esta función regula la integración de la CCD
VOID FAR PASCAL _export CCDCameraEndIntegrate (VOID)
{
    CameraEndIntegrate(); /*Finaliza la integración */
    return;
}
// Esta función cierra el obturador de la CCD
VOID FAR PASCAL _export CCDCameraCloseShutter (VOID)
{
    CameraCloseShutter(); /*Cierra el obturador de la cámara */
    return;
}
/* A continuación están programadas las funciones de digitalización y archivo de
la imagen*/
VOID FAR PASCAL _export CCDSampleDigitize (VOID)
{
    int y;
    long d;
    char *p;
    YOffset = 0;    /* >0 = salta YOffset líneas */

```

```

XOffset = 0; /* >0 = salta XOffset columnas */
YSize = 165; /* 165 líneas, para nuestro sensor */
XSize = 192; /* 192 pixeles/línea líneas, para nuestro sensor */
bHardware = TRUE;
/* Especificamos el nombre del fichero donde se almacena la imagen así como el
tipo. En nuestro caso es un fichero de acceso binario de lectura y escritura. */
if( !(f = fopen("c:\\image\\temp.ssi", "wb+" )) )
{
    return;
}
CameraCCDParallel(YOffset);
/* A continuación se digitaliza línea a línea */
for (y=0; y < YSize; y++)
{
    CameraDigitizeLine( &PixelArray[0], Xsize, Xoffset, FALSE, 1, 1);
    p=(char *) &PixelArray[0]; /* direccionamos el puntero al buffer */
    for( d=0; d<XSize; d++ )
    {
        /*el primer argumento indica la dirección, el segundo sizeof (char) el tamaño el
tercero el número de datos y el cuarto el puntero del fichero */
        fwrite( p,sizeof(char), 1, f); /*byte más significativo */
        fwrite( p+1,sizeof(char), 1, f); /*byte menos significativo */
        p +=2;
    }
}
fclose( f);
}
// *****
/*El siguiente módulo forma parte de la estructura de una DLL*/
int FAR PASCAL LibMain (HANDLE hModule, WORD wDataSeg, WORD
cbHeapSize, LPSTR lpszCmdLine)
{
    wDataSeg=wDataSeg;
    cbHeapSize=cbHeapSize;
    lpszCmdLine=lpszCmdLine;
    hmodDLL=hModule;
    return 1;
}
#ifdef _MSC_VER<610
int FAR PASCAL WEP(int fSystemExit);
#pragma alloc_text(WEP_TEXT,WEP)
int FAR PASCAL WEP
(
    int fSystemExit
)
{

```

```

    fSystemExit=fSystemExit;
    return 1;
}
#endif//C6

```

2. Programa: SSI_BMP.C

Este programa ha sido también compilado para ser una DLL que será utilizada en el entorno Windows. Concretamente, contiene la función “CCDwrite” empleada en la adquisición de imágenes invocada desde el programa desarrollado en Visual Basic. Esta función traduce el archivo SSI que aprovecha la resolución de 12 bits de la cámara, en un archivo BMP que nos permitirá visualizar la imagen en cualquier programa de uso comercial.

```

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include "c:\dll\camara.h"
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
//*****
HANDLE hmodDLL;
int val1,val2;
int value;
long valfloat;
int cont;
int j;
int dato;
int dato1;
long ValLut;
char ValLutRGB;
//***** Definimos el cabecero del BIT MAP (⊗) *****
int bftype = 19778;
int bftype = 14 + 40 + 1024 + 192 * 165;
int bfreserved1 = 0;
int bfreserved2 = 0;
long bfoffbits = 1078;
long bisize = 40;
long PixWidth360 = 192;
long PixHeight360 = 165;
int bitplanes = 1;
int bibitcount = 8;
long bicompression = 0;
long bisizeimage = 31680; /*bftype-bfoffbits */

```

```

long bixpelspermeter = 1;    /*cm/píxel ; factcal% */
long biypelspermeter = 1;    /*cm/píxel ; factcal% */
long biclrused = 256;
long biclrimportant = 0;
// ***** Se terminó de definir el cabecero del BIT MAP *****
VOID FAR PASCAL _export CCDwriteFile (VOID)
{
/* Se abren tres fichero simultáneamente, uno de lectura de la imagen (formato
SSI), el otro de lectura de la paleta usada y el último el fichero de almacén de la
nueva imagen una vez convertida. */
FILE *fptr;
FILE *lut;
FILE *ssi;
if ( (fptr=fopen("c:\\image\\temp.bmp","wb+") ) ==NULL) /* Nombre del
fichero BMP*/
{
return;
}
//*** Escribimos en el fichero el cabecero del BIT MAP (**) ***
fwrite(&bftype,sizeof(int),1,fptr);
fwrite(&bfsz,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&breserved1,sizeof(int),1,fptr);
fwrite(&breserved2,sizeof(int),1,fptr);
fwrite(&bfoffbits,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&bisize,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&PixWidth360,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&PixHeight360,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&bitplanes,sizeof(int),1,fptr);
fwrite(&bibitcount,sizeof(int),1,fptr);
fwrite(&bicompression,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&bisizeimage,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&bixpelspermeter,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&biypelspermeter,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&biclrused,sizeof(long),1,fptr);
fwrite(&biclrimportant,sizeof(long),1,fptr);
// ***** Finaliza el cabecero del BIT MAP *****
// ***** Escribimos en el fichero el LUT del BITMAP (***) ***
if ( (lut=fopen("c:\\image\\redlut.dat","rb+") ) ==NULL) /*Fichero donde se
almacena la paleta */
{
return;
}
while (fread(&ValLut,sizeof(long),1,lut)==1)
{
fwrite(&ValLut,sizeof(long),1,fptr);
}
}

```

```

fclose(lut);
// ***** Finaliza el LUT del BIT MAP *****
// **** Se abre el fichero SSI Para ser leído *****
    if ( (ssi=fopen("c:\\image\\temp.ssi", "rb+" ) ) ==NULL)
    {
        return;
    }
for(cont=0;cont<165;cont++)
{
    for(j=0; j<192; j++)
    {
        fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
        val1= dato;
        fread(&dato1,sizeof(char),1,ssi);
        val2=dato1;
        valfloat=(float)(val2*256+val1)*256/4096;
        value =(int) valfloat ;
        fwrite(&value,sizeof(char),1,fptr);
    }
}
fclose(ssi);
fclose(fptr);
}

```

3. Programa: CAMARA.C

Este programa está compilado bajo el sistema operativo MS-DOS. Ejecuta diferentes funciones de la cámara para tomar una imagen, pero no la archiva en disco. Fue el primer programa que escribimos a partir de un ejemplo que incluía el fabricante en el software que distribuye.

```

#include <stdio.h>
#include "c:\\dll\\camara.h"
#define __WINDOWS_H
#ifdef _MSC_VER
#define asm _asm
#define inport _inpw
#define inportb _inp
#define outport _outpw
#define outportb _outp
#endif
// *****
WORD PixelArray[192];
int YOffset, YSize;
int XOffset, XSize;

```

```

long ExposureTime;
int AntibloomInterval;
FILE *f;
int SampleDigitize(void)
{
    int y;
    int d;
    char *p;
    printf("\nExposing...");
    CameraClearCCD();
    CameraOpenShutter();
    CameraBeginIntegrate();
    CameraExpose(ExposureTime, AntibloomInterval, 0);
    CameraCloseShutter();
    CameraEndIntegrate();
    CameraCCDParallel(YOffset);
    for (y=0; y < 165; y++)
    {
        CameraDigitizeLine(&PixelArray[0],192,0,TRUE,0,0);
        p=(char *) &PixelArray[0]; /* puntero al buffer */
        for( d=0; d<192; d++ )
        {
            /* el primer argumento indica la dirección, el segundo sizeof(char) el tamaño el
            tercero el número de datos y el cuarto el puntero del fichero */
            fwrite( p,sizeof(char), 1, f ); /* byte más significativo */
            fwrite( p+1,sizeof(char), 1, f ); /* byte menos significativo */
            p +=2;
        }
        printf("\nlínea %d: %d \r", y, PixelArray[10]);
    }
    CameraCooler(FALSE); /* TRUE activa el colore */
}
/* a continuación, el fichero DATA.RAW contiene el valor de cada píxel
ordenado secuencialmente byte a byte. */
void main(void)
{
    #ifdef MAC
    CameraInitialize();
    #else
    CameraInitialize(0x120);
    #endif
    CameraCooler(TRUE); /* TRUE activa el cooler */
    printf("done!\n");
    YOffset = 0; /* >0 = salta YOffset líneas */
    XOffset = 0; /* >0 = salta XOffset columnas */
    YSize = 165; /* 165 líneas, para la cámara utilizada */
}

```

```
XSize = 192;      /* 192 pixeles/línea para nuestra cámara */
printf("\nDuración de la exposición?: ");
scanf("%i", &ExposureTime );
AntibloomInterval = 0;      /* no activa el Antibloom */
bHardware = TRUE;
if( !( f = fopen("C:\\CCD\\D", "wb+" )) )
    {
        printf("\n\nFILE OPEN ERROR. EXITING.\n");
        return;
    }
SampleDigitize();
fclose( f );
}
```


APÉNDICE VI:

SUBROUTINAS EMPLEADAS EN EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Todas la subrutinas descritas a continuación fueron escritas en Quick "C" y compiladas como Windows DLL. De esta forma, y tras ser declaradas en la aplicación desarrollada en Visual Basic, fueron invocadas en tiempo de ejecución.

1. Programa: BIT400.C

Descripción: Genera, a partir de una imagen BMP adquirida con la cámara MCD400 (244x336 pixeles), otra correspondiente a una subregión específica, definida mediante las coordenadas determinadas por el usuario.

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
int value,dato;
int ancho, alto;
long valfloat;
long cont;
int j;
long ValLut;
char ValLutRGB;
long offset;
// ***** Definimos el cabecero del BITMAP *****
                                (⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BITMAP *****
long FAR PASCAL _export BitBMP400
(
    int X1,int Y1,int X2,int Y2
)
{
    FILE *fptr;
    FILE *lut;
    FILE *ssi;
// *****
    if ( (ssi=fopen("c:\\image\\temp.bmp", "rb+" ) ) ==NULL)
```

```

    {
    return 1;
    }
    for(cont=0;cont<18;cont++)
    {
    fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
    }
    for(cont=0;cont<1;cont++)
    {
// Calculo el ancho de la imagen
    fread(&ancho,sizeof(long),1,ssi);
    }
    for(cont=0;cont<1;cont++)
    {
//Calculo el alto de la imagen
    fread(&alto,sizeof(long),1,ssi);
    }
// *****
ImageWidth=Y2-Y1;
ImageHeight=X2-X1;
bfsize = 14 + 40 + 1024 + ImageWidth * ImageHeight;
bysizeimage=bfsize-bfoffbits;
// *****
    if ( (fptr=fopen("c:\\image\\tempbit.bmp","wb+") ) ==NULL)
    {
    return 1;
    }
// ***** Escribimos en el fichero el cabecero del BIT MAP ****
                                (⊗⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BIT MAP *****
// ***** Escribimos en el fichero el LUT del BITMAP *****
                                (⊗⊗⊗)
// ***** Finaliza el LUT del BIT MAP *****
    for(cont=X1;cont<X2;cont++)
    {
    offset=cont*336+Y1+1078;
    fseek(ssi,offset,0);
    for(j=Y1; j<Y2; j++)
    {
    fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
    value=dato;
    fwrite(&value,sizeof(char),1,fptr);
    }
    }
    fclose(ssi);
fclose(fptr);

```

```

    return 1;
}

```

2. Programa: CONTRAS.C

Descripción: Modifica, a partir de una imagen BMP, el contraste y el brillo de la misma. Se especifica la pendiente y la ordenada en el origen de la recta definida por la función de transformación.

```

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
float m; // variable para calcular el contraste (la pendiente)
int b; // variable para calcular el contraste (la ordenada en el origen)
float r;
int value,dato;
long ValLut;
int ancho, alto;
long cont;
long offset;
long filesize;
// ***** Definimos el cabecero del BITMAP *****
                                (⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BITMAP *****
long FAR PASCAL _export ContrasBMP
(
    int X1,int Y1
)
{
    FILE *fptr;
    FILE *ssi;
    FILE *lut;
// *****
    if ( (ssi=fopen("c:\\image\\temp.bmp", "rb+" ) ) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
    for(cont=0;cont<18;cont++)
        {
            fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);

```

```

    }
    for(cont=0;cont<1;cont++)
    {
//Calculo el ancho de la imagen
        fread(&ancho,sizeof(long),1,ssi);
    }
    for(cont=0;cont<1;cont++)
    {
//Calculo el alto de la imagen
        fread(&alto,sizeof(long),1,ssi);
    }
        filesize=ancho*alto+1078;//filelength(fileno(fp));
bfsiz = filesize;
PixWidth360 = ancho;
PixHeight360 = alto;
bisizeimage = ancho*alto; //bfsiz-bfoffbits
// *****
        if ( (fptr=fopen("c:\\image\\tempcon.bmp","wb+") ) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
// ***** Escribimos en el fichero el cabecero del BIT MAP ***
                (☹☹)
// ***** Finaliza el cabecero del BIT MAP *****
// ***** Escribimos en el fichero el LUT del BITMAP *****
                (☹☹☹)
// ***** Finaliza el LUT del BIT MAP *****
        offset=1078;
        fseek(ssi,offset,0);
        for(cont=0;cont<filesize-1078;cont++)
        {
            fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
            m = 1 + X1*4E-2;
            b = Y1;
            dato = dato * m + b;
            if(dato < 0)
            {
                dato=0;
            }
            if(dato > 254)
            {
                dato=254;
            }
            fwrite(&dato,sizeof(char),1,fptr);
        }
        fclose(ssi);

```

```

fclose(fp);
return 1;
}

```

3. Programa: CREABIT.C

Descripción: Genera, a partir de una imagen en formato SSI adquirida con la cámara MCD220 (192 x 165 píxeles), otra correspondiente a una subregión específica, definida mediante las coordenadas determinadas por el usuario.

```

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
int val1,val2;
int value;
long valfloat;
long cont;
int j;
int dato;
int dato1;
long ValLut;
char ValLutRGB;
long offset;
char Buffimage[32768];
long t;
// ***** Definimos el cabecero del BITMAP *****
                                (⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BITMAP *****
long FAR PASCAL _export BitBMP
(
    int X1,int Y1,int X2,int Y2
)
{
    FILE *fp;
    FILE *lut;
    FILE *ssi;
// *****
    if ( (ssi=fopen("c:\\image\\temp.ssi", "rb+")) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
}

```

```

t=0;
for(cont=X1;cont<X2;cont++)
{
offset=((cont*192)+Y1)*2;
fseek(ssi,offset,0);
for(j=Y1;j<Y2;j++)
{
fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
val1= dato;
fread(&dato1,sizeof(char),1,ssi);
val2=dato1;
valfloat=(float)(val2*256+val1)*256/4096;
value =(int) valfloat ;
t=t+1;
Buffimage[t]=value;
}
}
fclose(ssi);
// *****
ImageWidth=Y2-Y1;
ImageHeight=X2-X1;
bfsiz = 14 + 40 + 1024 + ImageWidth * ImageHeight;
bisizeimage=bfsiz-bfoffbits;
// *****
if ( (fptr=fopen("c:\\image\\temp.bmp","wb+")) ==NULL)
{
return 1;
}
// ***** Escribimos en el fichero el cabecero del BIT MAP *****
(⊗⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BIT MAP *****
// ***** Escribimos en el fichero el LUT del BITMAP *****
(⊗⊗⊗)
// ***** Finaliza el LUT del BIT MAP *****
for(cont=1;cont<=t;cont++)
{
value=Buffimage[cont];
fwrite(&value,sizeof(char),1,fptr);
}
fclose(fptr);
return 1;
}

```

4. Programa: GRAVCEN.C

Descripción: Determina a partir de una imagen en formato BMP el centro de gravedad de la misma. La función lee, fila a fila y columna a columna, hasta encontrar las correspondientes líneas cuyo sumatorio de intensidades sea máximo. La intersección de ambas líneas será el centro de gravedad.

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <io.h>
#include <windows.h>
#include <fcntl.h>      /* _O_ constant definitions */
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
int handle;
int cont,j;
int dato;
int MaxFila,MaxColumna;
unsigned long PesoGravedad;
unsigned long PesoGravedad2;
long ancho,alto;
long sum;
long MaxValor;
long filesize;
long offset;
// *****
long FAR PASCAL _export ReadCentroGrav
(
    VOID
)
{
    FILE *ssi;
    FILE *fptr;
// *****
    if ( (ssi=fopen("c:\\image\\temp.bmp", "rb+" ) ) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
// *****
    MaxFila=0;
    MaxValor=0;
    /***** Direcciono el puntero a la posición donde se almacena
    en valor de las variables alto y ancho *****/
```

```

        offset=18;
        fseek(ssi,offset,0);
        fread(&ancho,sizeof(long),1,ssi);
        fread(&alto,sizeof(long),1,ssi);
    /******* Direcciono el puntero a la posición donde se almacenan
    los datos de la imagen propiamente dicha *****/
        offset=1078;
        fseek(ssi,offset,0);
    // **** Calculo la FILA de intensidad Máxima ****
        for(cont=0;cont<alto;cont++)
        {
            sum=0;
            for(j=0;j<ancho;j++)
            {
                fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
                sum=sum+dato;
            }
            if(MaxValor<sum)
            {
                MaxValor=sum;
                MaxFila=cont;
            }
        }
    // ****
    MaxColumna=0;
    MaxValor=0;
    // **** Calculo la COLUMNA de intensidad Máxima ****
        for(cont=0;cont<ancho;cont++)
        {
            sum=0;
            for(j=0;j<alto;j++)
            {
                offset=(j*ancho)+cont+1078;
                fseek(ssi,offset,0);
                fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
                sum=(sum+dato);
            }
            if(MaxValor<sum)
            {
                MaxValor=sum;
                MaxColumna=cont;
            }
        }
        fclose(ssi);
    // ****
        if ( (fptr=fopen("c:\\image\\valcg.dat","wb+") ) ==NULL)

```



```

    {
    return 1;
    }
    fwrite(&MaxFila,sizeof(int),1,fptr);
    fclose(fptr);
return MaxColumna;
}

```

5. Programa: BMPTOBIT.C

Descripción: Genera, a partir de una imagen BMP adquirida con la cámara MCD220 (192 x 165 pixeles), otra correspondiente a una subregión específica, definida mediante las coordenadas determinadas por el usuario.

```

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
int value,dato;
int ancho, alto;
long valfloat;
long cont;
int j;
long ValLut;
char ValLutRGB;
long offset;
// ***** Definimos el cabecero del BITMAP *****
                                     (⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BITMAP *****
long FAR PASCAL _export BMPBitBMP
(
    int X1,int Y1,int X2,int Y2
)
{
    FILE *fptr;
    FILE *lut;
    FILE *ssi;
// *****
if ( (ssi=fopen("c:\image\temp.bmp", "rb+")) ==NULL)
    {
        return 1;
    }
}

```

```

    }
    for(cont=0;cont<18;cont++)
    {
        fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
    }
    for(cont=0;cont<1;cont++)
    {
//Calculo el ancho de la imagen
        fread(&ancho,sizeof(long),1,ssi);
    }
    for(cont=0;cont<1;cont++)
    {
//Calculo el alto de la imagen
        fread(&alto,sizeof(long),1,ssi);
    }
// *****
ImageWidth=Y2-Y1;
ImageHeight=X2-X1;
bfsize = 14 + 40 + 1024 + ImageWidth * ImageHeight;
bysizeimage=bfsize-bfoffbits;
// *****
    if ( (fptr=fopen("c:\\image\\tempbit.bmp","wb+") ) ==NULL)
    {
        return 1;
    }
// ***** Escribimos en el fichero el cabecero del BIT MAP *****
                                (⊗⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BIT MAP *****
// ***** Escribimos en el fichero el LUT del BITMAP *****
                                (⊗⊗⊗)
// ***** Finaliza el LUT del BIT MAP *****
for(cont=X1;cont<X2;cont++)
{
offset=cont*192+Y1+1078;
fseek(ssi,offset,0);
    for(j=Y1; j<Y2; j++)
    {
        fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
        value=dato;
        fwrite(&value,sizeof(char),1,fptr);
    }
}
fclose(ssi);
fclose(fptr);
return 1;
}

```

6. Programa: MAXLINE.C

Descripción: Determina la línea de intensidad máxima de la imagen. Este cálculo permite conocer la posición de los granos y en que momento se produce la fusión del mismo.

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <io.h>
#include <fcntl.h>      /* _O_ constant definitions */
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
int handle;
int j,cont;
long MaxValor;
int MaxFila;
int dato;
long ancho,alto;
long sum;
long filesize;
long offset;
// *****
long FAR PASCAL _export ReadMaxFila
(
    VOID
)
{
    FILE *ssi;
    // *****
    if ( (ssi=fopen("c:\\image\\templee.bmp", "rb+" ) ) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
    // *****
    MaxFila=0;
    MaxValor=0;
    /****** Direcciono el puntero a la posición donde se almacena
    en valor de las variables alto y ancho *****/
    offset=18;
    fseek(ssi,offset,0);
    fread(&ancho,sizeof(long),1,ssi);
    fread(&alto,sizeof(long),1,ssi);
```

```

/***** Direcciono el puntero a la posición donde se almacenan
los datos de la imagen propiamente dicha *****/
    offset=1078;
    fseek(ssi,offset,0);
for(cont=0;cont<alto;cont++)
{
sum=0;
    for(j=0;j<ancho;j++)
    {
fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
sum = sum + dato;
    }
    if(MaxValor<sum)
    {
MaxValor = sum;
MaxFila = cont;
    }
    }
    fclose(ssi);
return MaxFila;
}

```

7. Programa: PALBMP.C

Descripción: Genera una archivo con los valores de una paleta determinada, LUT, y lo utiliza para crear la imagen de dicha paleta de color.

```

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// ****
HANDLE hmodDLL;
int value;
int cont;
char valchar;
int j;
long ValLut;
// ***** Definimos el cabecero del BITMAP *****
                                (⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BITMAP *****
int FAR PASCAL _export PaletaBMP
(

```

```

)
{
FILE *fdat;
FILE *fptr;
FILE *lut;
// *****
if ( (fdat=fopen("c:\\image\\paleta.dat", "wb+" ) ) ==NULL)
{
return 1;
}
for(cont=0;cont<256;cont++)
{
valchar=cont;
fwrite(0,sizeof(char),1,fdat);
fwrite(&valchar,sizeof(char),1,fdat);
fwrite(&valchar,sizeof(char),1,fdat);
fwrite(0,sizeof(char),1,fdat);
}
fclose(fdat);
// ***** Escribimos en el fichero el cabecero del BITMAP *****
                                (⊗⊗)
// ***** Finaliza el cabecero del BITMAP *****
// ***** Escribimos en el fichero el LUT del BITMAP *****
                                (⊗⊗⊗)
// ***** Finaliza el LUT del BITMAP *****
// A continuación generamos valores de la imagen de la paleta
// *****
for(cont=0;cont<256;cont++)
{
for(j=0; j<100; j++)
{
value =cont;
fwrite(&value,sizeof(char),1,fptr);
}
}
fclose(fptr);
}

```

8. Programa: PSCOLOR.C

Descripción: Desplaza la paleta de color que posea una imagen por otra paleta diferente. Aplicaseudocolor.

```

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>

```

```

#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
long ValLut;
long offset;
// *****
int FAR PASCAL _export Paleta0
(
)
{
    FILE *fptr;
    FILE *lut;
// *****
    if ( (fptr=fopen("c:\\image\\temp.bmp", "wb+" ) ) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
// *****
    if ( (lut=fopen("c:\\image\\paleta.dat", "rb+" ) ) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
    offset=54;
    fseek(fptr,offset,0);
    while (fread(&ValLut,sizeof(long),1,lut)==1)
        {
            fwrite(&ValLut,sizeof(long),1,fptr);
        }
    fclose(lut);
    fclose(fptr);
    return 1;
}

```

9. Programa: VALITSY.C

Descripción: Determina el valor de intensidad de fluorescencia de la imagen. El cómputo lo realiza sobre todos los pixeles que la componen mediante un sumatorio de sus valores de intensidad.

```

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <ctype.h>
#include <io.h>
#include <fcntl.h> /* _O_ constant definitions */

```

```

#include <windows.h>
#include <string.h>
#include <c:\vb\cdk\vbapi.h>
// *****
HANDLE hmodDLL;
int handle;
int cont,j;
int dato;
long ancho,alto;
long sum;
long offset;
// *****
long FAR PASCAL _export ReadValBMP
(
    VOID
)
{
    FILE *ssi;
// *****
    if ( (ssi=fopen("C:\\IMAGE\\TEMP.BMP", "rb+" ) ) ==NULL)
        {
            return 1;
        }
    /****** Direcciono el puntero a la posición donde se almacena
en valor de las variables alto y ancho *****/
        offset=18;
        fseek(ssi,offset,0);
        fread(&ancho,sizeof(long),1,ssi);
        fread(&alto,sizeof(long),1,ssi);
    /****** Direcciono el puntero a la posición donde se almacenan
los datos de la imagen propiamente dicha *****/
        offset=1078;
        fseek(ssi,offset,0);
    /*** Calculo la FILA de intensidad Máxima *****/
        sum=0;
    for(cont=0;cont<alto;cont++)
    {
        for(j=0;j<ancho;j++)
        {
            fread(&dato,sizeof(char),1,ssi);
            sum=sum+dato;
        }
    }
// *****
        fclose(ssi);
    sum=sum;
}

```

```
return sum;  
}
```


APÉNDICE VII:

SUBROUTINAS PROGRAMADAS EN VISUAL BASIC

Debido a la complejidad y volumen que supondría incluir en este apéndice todas las formas, módulos, declaraciones, propiedades, etc. escritos en Visual Basic, tan sólo se muestra una forma, correspondiente a la adquisición de imágenes, para intentar mostrar cómo es el código y estructura en este lenguaje de programación.

Módulo del programa: EXPOSURE.FRM

En este módulo se describe la adquisición de imágenes. El uso de las funciones de control de la cámara viene precedido por la declaración de las mismas. Esto se hace invocando desde Visual Basic a las DLL que incluyen dichas funciones.

También son invocadas otras funciones de control para la tarjeta convertidora A/D AT-Mio-16 de National Instrument.

“Comando selector de filtro”. Mediante la función AO_VWrite mandamos un voltaje de 4 V a un pequeño motor que hace girar la rueda en la que se alojan los filtros (cuando dicha acción es exitosa devuelve el valor “0” y en caso contrario devuelve un código de error). Si el pulso es positivo la rueda gira en un sentido y si es negativo, en sentido contrario. El reloj “TimerFilter” indica el tiempo durante el cual aplicamos dicha tensión.

```
Sub Cmd3D360_Click ()
    er = AO_VWrite(1, 0, 4)
    TimerFilter.Enabled = True
    Flag360 = 1
End Sub
```

“Comando de control del obturador del microscopio”. Mediante la función AO_VWrite se aplica un voltaje de 5 V que activa un electroimán y, como consecuencia, se abre el obturador. En este caso, la preparación es excitada con la luz de epifluorescencia. Para cerrarlo se vuelve a invocar a la función, pero llevando a la salida de la convertidora un pulso de 0 V.

```
Sub Cmd3DOpShutter_Click ()
    er = AO_VWrite(1, 0, 5)
End Sub
```

“Comando de activación del Cooler”. Se presenta en pantalla el modo de activación mediante el panel Pan3DCooler.

```

Sub Cmd3DCooler_Click ()
If FlagCooler = 0 Then
    er = CameraCooler(1)
    Pan3DCooler.Caption = "Activation"
Else
    er = CameraCooler(0)
    Pan3DCooler.Caption = "Inactivation"
End If
FlagCooler = Not FlagCooler
End Sub

```

“Comando de activación de la adquisición”. Mediante la variable FlagImage se conmuta el estado de adquisición. Si el valor es 1 (True) se ejecuta la adquisición. Se contempla las opciones de “Single Frame” y “Multy Frame” gracias al comando-opción Opt3DMulty.

```

Sub Cmd3DOnExpose_Click ()
    FrameNum = 0
    If FlagImage = 0 Then
        FlagImage = 1
    Else
        FlagImage = 0
    End If
    If Opt3DMulty.Value = True Then
        Path = CurDir
        BaseName = GetFileName ("Enter the name to create a base name")
        'BaseName = Path + BaseName
    End If
End Sub

```

“Comando de inactivación de la adquisición”.

```

Sub Cmd3DOffExpose_Click ()
    FlagImage = 0
End Sub

```

“Comando cambio de paleta”. Con este comando se da acceso a la parte del fichero de la imagen correspondiente al LUT o paleta de color. De esta forma, lo único que se hace es modificar una porción del fichero con la consiguiente rapidez de procesado.

```

Sub Cmd3DPaleta_Click ()
Dim p%, q%, fourbytes&
    Dim Msg ' Declare variables.
    On Error Resume Next ' Set up error handling.
    ValSpin = Val(ColorPan3D.Caption)

```

```

If ValSpin = 0 Then
*****
*****PALETA 0 -- PALETA DE GRIS *****
Open "C:\VB\IMAGE\REDLUT.DAT" For Binary As #1
'Cargar LUT
p = 1
For q = 1 To 1024 - 3 Step 4
    Get #1, q, fourbytes&
    LUT&(p) = fourbytes&
    p = p + 1
Next q
Close #1
p = 55
Open "C:\DLL\TEMP.BMP" For Binary As #1
'Cargar LUT
For q = 1 To 256
    Put #1, p, LUT&(q)
    p = p + 4
Next q
Close #1
End If
If ValSpin = 1 Then
*****
***** PALETA 1 *****
Open "C:\VB\IMAGE\SAMPLES\PALETA1.PAL" For Binary As #1
'Cargar LUT
p = 1
For q = 1 To 1024 - 3 Step 4
    Get #1, q, fourbytes&
    LUT&(p) = fourbytes&
    p = p + 1
Next q
Close #1
p = 55
Open "C:\DLL\TEMP.BMP" For Binary As #1
'Cargar LUT
For q = 1 To 256
    Put #1, p, LUT&(q)
    p = p + 4
Next q
Close #1
End If
Image1.Picture = LoadPicture("C:\DLL\TEMP.BMP")
If Err Then
    Msg = "Could not find the .BMP file."
    MsgBox Msg ' Display error message.

```

```

Exit Sub ' Quit if error occurs.
End If7
End Sub

```

"Timer controlador de la adquisición".

```

Sub TimerCCD_Timer ()
Dim NumCeros%
If FlagImage = 1 Then
screen.MousePointer = 11
FrameNum = FrameNum + 1
NumCeros = Len(CStr(FrameNum))
If NumCeros = 1 Then
NameFile = BaseName + "00" + CStr(FrameNum)
End If
If NumCeros = 2 Then
NameFile = BaseName + "0" + CStr(FrameNum)
End If
If NumCeros = 3 Then
NameFile = BaseName + CStr(FrameNum)
End If
Pan3DNameFile.Caption = NameFile
If Check3DShutter.Value = True Then
er = AO_VWrite(1, 0, 5)
End If
er = CameraInitialize(120)
CameraOpenShutter
CameraClearCCD
er = CameraExpose(TimeExposition, 0, 0)
CameraBeginIntegrate
CameraEndIntegrate
CameraCloseShutter
er = AO_VWrite(1, 0, 0)
SampleDigitize
writeFile
frmExposure.Image1 = LoadPicture("c:\dll\temp.bmp")
FileCopy "C:\DLL\TEMP.SSI", Pan3DCurrentDir + "\" + NameFile + ".SSI"
FileCopy "C:\DLL\TEMP.BMP", Pan3DCurrentDir + "\" + NameFile +
".BMP"
If Opt3DSingle.Value = True Then
FlagImage = 0
End If
screen.MousePointer = 1
End If
End Sub

```

BIBLIOGRAFÍA

Adams, R. N. Applications of modern electroanalytical techniques to pharmaceutical chemistry. *J Pharm Sci* **58**, 1171-84 (1969).

Agard, D. A. Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions. *Annu Rev Biophys Bioeng* **13**, 191-219 (1984).

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D., Garland Publishing, Inc. (1994).

Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G. y Lindau, M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* **389**, 509-512 (1997).

Alés, E., Tesis doctoral: *Desarrollo y aplicación de la técnica de amperometría en parche al estudio de la exocitosis en células aisladas mastocitos y cromafines*, Fisiología Médica y Biofísica (Universidad de Sevilla, Sevilla, 1998).

Almers, W. y Neher, E. Gradual and stepwise changes in the membrane capacitance of rat peritoneal mast cells. *Journal of Physiology* **386**, 205-217 (1987).

Almers, W. y Tse, F.W. Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* **4** (1990a).

Alvarez de Toledo, G. y Fernández Chacón, R. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* **373**, 555-557 (1993).

Alvarez de Toledo, G. y Fernández, J.M. The events leading to secretory granule fusion. In *Cell Physiology of Blood*, R.B. Gunn and J.C. Parker, eds., 334-344 (1988).

Alvarez de Toledo, G. y Fernández, J.M. Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *Journal of General Physiology* **95**, 397-409 (1990).

Armstrong-James, M. y Fox, K. The electrochemical detection of enkephalins in bulk solution and following iontophoresis. *Journal of Physiology* **313**, 38P (1981).

- Axelrod, D. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *Cell Biology*, 141-145 (1981).
- Axelrod, D., Thompson, N.L. y Burghardt, T.P. Total internal reflection fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 19-28 (1983).
- Behrendt, H., Lindl, T. y Cramer, H. In vitro effects of histamine liberator compound 48/80 on rat superior cervical ganglia with special regard to the small granule-containing cells. *Cell Tissue Research*, 71-81 (1976).
- Bergendorff, A. Intracellular distribution of amines taken up by rat mast cells. *Acta Physiologica Scandinavica* **95**, 133-41 (1975).
- Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* **56**, 159-93 (1987a).
- Berridge, M. J. Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* **494**, 39-51 (1987b).
- Betz, W. J. y Bewick, G. S. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* **255**, 200-3 (1992c).
- Betz, W.J. y Henkel, A.W. Okadaic acid disrupts clusters of synaptic vesicles in frog motor nerve terminals. *Journal of Cell Biology* **124**, 843-854 (1994).
- Betz, W. J., Mao, F. y Bewick, G. S. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* **12**, 363-75 (1992a).
- Betz, W. J. y Wu, L. G. Synaptic transmission. Kinetics of synaptic-vesicle recycling. *Curr Biol* **5**, 1098-101 (1995).
- Bindokas, V. P. y Miller, R. J. Excitotoxic degeneration is initiated at non-random sites in cultured rat cerebellar neurons. *J Neurosci* **15**, 6999-7011 (1995).
- Blinks, J. R., Wier, W. G., Hess, P. y Prendergast, F. G. Measurement of Ca²⁺ concentrations in living cells. *Prog Biophys Mol Biol* **40**, 1-114 (1982).
- Breckenridge, L. J. y Almers, W. Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* **328**, 814-7 (1987a).
- Breckenridge, L. J. y Almers, W. Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory granules. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 1945-9 (1987b).
- Broadie, K., Prokop, A., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Schulze, K.L. y Sweeney, S.T. Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. *Neuron*, 663-673 (1995).

Burgess, T.L. y Kelly, R.B. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual Review of Cell Biology* **3**, 243-293 (1987).

Burgoyne, R.D. y Morgan, A. Regulated exocytosis *Biochemical Journal* **293**, 305-316 (1993).

Cahill, PS, Walker, QD, Finnegan, JM, Mickelson, GE, Travis, ER y Wightman, RM. Microelectrodes for the measurement of catecholamines in biological systems. *Analytical Chemistry* **68**, 3180-6 (1996).

Cahill, PS y Wightman, RM. Simultaneous amperometric measurement of ascorbate and catecholamine secretion from individual bovine adrenal medullary cells. *Analytical Chemistry* **67**, 2599-605 (1995).

Casadio, R. y Melandri, B. A. The behavior of 9-aminoacridine as an indicator of transmembrane pH difference in liposomes of natural bacterial phospholipids. *J Bioenerg Biomembr* **9**, 17-29 (1977).

Castleman, K. R., *Digital Image Processing*. N. J. Englewood Cliffs, Ed. (Prentice-Hall, Inc., 1979).

Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P. y Mauro, A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**, 499-524 (1973).

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. y Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* , 802-805 (1994).

Chen, T.K., Luo, G. y . Amperometric monitoring of stimulated catecholamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells at the zeptomole level. *Analytical Chemistry* **66**, 3031-3035 (1994).

Chow, R.H., Ruden, L. y Neher, E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring on single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* **356**, 60-63 (1992).

Cockroft, S. y Gomperts, B.D. Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. *Journal of Physiology* **296**, 229-243 (1979).

Cohan, C.S., Connor, J.A. y Kater, S.B. Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones. *Journal of Neuroscience* , 3588-3599 (1987).

Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M. y Lippincott-Schwartz, J. Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* , 797-801 (1996).

Connor, J. A., Cornwall, M. C. y Williams, G. H. Spatially resolved cytosolic calcium response to angiotensin II and potassium in rat glomerulosa cells measured by digital imaging techniques. *Journal Biological Chemistry* , 2919-2927 (1987).

Cormack, B.P., Valdivia, R.H. y Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* , 33-38 (1996).

Cousin, M. A., Held, B. y Nicholls, D. G. Exocytosis and selective neurite calcium responses in rat cerebellar granule cells during field stimulation. *Eur J Neurosci* 7, 2379-88 (1995).

Crespi, F. *In vivo* voltammetric detection of neuropeptides with micro carbon fibre biosensors: Possible selective detection of somatostatin. *Analytical Biochemistry* 194, 69-76 (1991).

Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. y Tsien, R.Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochemical Science* , 448-455 (1995).

Davidson, H. W., McGowan, C. H. y Balch, W. E. Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation. *J Cell Biol* 116, 1343-55 (1992a).

Del Castillo, J. y Katz, B. Quantal components of the end-plate potential. *Journal of Physiology* 124, 560-573 (1954).

Douglas, W.W. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British Journal of Pharmacology* 34, 451-474 (1968).

Douglas, W.W. y Rubin, R.P. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *Journal of Physiology* 159, 40-57 (1961).

Fernández Chacón, R., Tesis Doctoral: *Estudio de la exocitosis mediante detección electroquímica y técnica de "patch-clamp" en células cebadas*, Fisiología Médica y Biofísica (Universidad de Sevilla, Sevilla, 1995b).

Fernández-Chacon, R., Alés, E. y Alvarez de Toledo, G. On line quantification of mast cell degranulation with electrophysiological techniques. *Inflammation Research* 46, S5-S6 (1997).

Fernández, J.M., Neher, E. y Gomperts, B.D. Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature* 312 (1984).

García-Sancho, J., Sanchez, A. y Herreros, B. All-or-none response of the Ca²⁺-dependent K⁺ channel in inside-out vesicles. *Nature* , 744-746 (1982).

- Gerisch, G., Albrecht, R., Heizer, C., Hodgkinson, S. y Maniak, M. *Current Biology*, 1280-1285 (1995).
- Gillespie, J.I. The effect of repetitive stimulation on the passive electrical properties of the presynaptic terminal of the squid giant synapse. *Proceedings of the Royal Society (London)*, 293-306 (1979).
- Gillis, K., Mösser, R. y Neher, E. Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* **16**, 1209-1220 (1996).
- Goldstein, J.L., Brown, M., Anderson, R.G.W., Russel, D.W. y Schneider, W.J. Receptor mediated exocytosis. *Annual Review of Cell Biology* **1**, 1-39 (1985).
- Gomperts, B. D., Baldwin, J. M. y Micklem, K. J. Rat mast cells permeabilized with Sendai virus secrete histamine in response to Ca²⁺ buffered in the micromolar range. *Biochem J* **210**, 737-45 (1983).
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J. y Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**, 780-5 (1993).
- Griffiths, G. y Simons, K. The *trans* Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443 (1986).
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260** (1985).
- Heinemann, C., von Ruden, L., Chow, R. H. y Neher, E. A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Arch* **424**, 105-12 (1993).
- Helander, H.F. y Bloom, G.D. Quantitative analysis of mast cell structure. *Journal of Microscopy* **100**, 315-321 (1974).
- Heuser, J. E. y Reese, T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**, 315-44 (1973).
- Hunt, J.M., Bommert, K., Charlton, M.P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G.J. y Betz, H. A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 1994 Jun; **12**(6):1269-1279, 1269-1279 (1994).
- Jacques, L.B. Standardisation of heparin for clinical use. *Lancet* . , 287 (1975).
- Jaffe, L. A., Hagiwara, S. y Kado, R. T. The time course of cortical vesicle fusion in sea urchin eggs observed as membrane capacitance changes. *Dev Biology* **67**, 243-248 (1978).

- Jahn, R. y Südhof, T.C. Synaptic vesicles and exocytosis. *Annual Review of Neuroscience* **17**, 219-246 (1994).
- Johnson, R.G., Carty, S.E., Fingerhood, B.J. y Scarpa, A. The internal pH of mast cell granules. *FEBS letters* **120**, 75-79 (1980).
- Kaether, C. y Gerdes, H.H. Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Letters* , 267-271 (1995).
- Katz, B. y Miledi, R. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proceedings of the Royal Society (London)* **161**, 496-503 (1965c).
- Kelly, R.B. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* **230**, 25-32 (1985).
- Kennedy, R.T., Huang, L., Atkinson, M.A. y Dush, P. Amperometric monitoring of chemical secretions from individual pancreatic b-cells. *Analytical Chemistry* **65**, 1882-1887 (1993).
- Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M. y De Camilli, P. Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J Neurosci* **15**, 4328-42 (1995).
- Lagnado, L., Gomis, A. y Job, C. Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron* **17**, 957-67 (1996).
- Lang, T., Wacker, I., Steyer, J., Kaether, C., Wunderlich, I., Soldati, T., Gerdes, H.H. y Almers, W. Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron* , 857-863 (1997).
- Lawson, D., Fewtrell, C. y Raff, M. C. Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads. Implications for the Ca²⁺ hypothesis of stimulus-secretion coupling. *J Cell Biol* **79**, 394-400 (1978).
- Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Near, J.A. y Wightman, R.M. Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry* **56**, 1855-1863 (1991).
- Lichtman, J. W., Wilkinson, R. S. y Rich, M. M. Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. *Nature* **314**, 357-9 (1985).

- Lindau, M. y Almers, W. Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 509-517 (1995).
- Liu, G. y Tsien, R. W. Synaptic transmission at single visualized hippocampal boutons. *Neuropharmacology* 34, 1407-21 (1995).
- Loew, L. M. y Simpson, L. L. Charge-shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophys J* 34, 353-65 (1981).
- Marín-Caballos, A., Tesis Doctoral: *Estudio de la señal de calcio y las corrientes iónicas en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción en células pineales en la rata*, Fisiología Médica y Biofísica (Universidad de Sevilla, Sevilla, 1995).
- Marin, A., Urena, J. y Tabares, L. Intracellular calcium release mediated by noradrenaline and acetylcholine in mammalian pineal cells. *Journal of Pineal Research*, 15-28 (1996).
- Minta, A. y Tsien, R. Y. Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem* 264, 19449-57 (1989).
- Monck, J.R., Oberhauser, A.F., Keating, T.J. y Fernandez, J.M., Thin-section ratiometric Ca²⁺ images obtained by optical sectioning of fura-2 loaded mast cells. *Journal of Cell Biology*, 745-759 (1992b).
- Monck, J. R., Williamson, R.E., Rogulja, I, Fluharty, S. J. y Williamson, J. R. Angiotensin II effects on the cytosolic free Ca²⁺ concentration in N1E-115 neuroblastoma cells: kinetic properties of the Ca²⁺ transient measured in single fura-2 loaded cells. *Journal of Neurochemistry*, 278-287 (1990b).
- Moser, T. y Neher, E. Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *Journal of Neuroscience* 17, 2314-2323 (1997a).
- Murthy, V. N. y Stevens, C. F. Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature* 392, 497-501 (1998).
- Neher, E. The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *Journal of Physiology* 395, 193-214 (1988).
- Neher, E. y Almers, W. Fast calcium transients in rat peritoneal mast cells are not sufficient to trigger exocytosis. *Embo J* 5, 51-3 (1986b).
- Neher, E. y Marty, A. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 79, 6712-6716 (1982).

Neher, E., Sakman, B. y Steinbach, J.H. The extracellular patch-clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv* **375**, 219-228 (1978).

Neher, E. y Zucker, R.S. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* **10**, 21-30 (1993a).

Nicaise, G., Maggio, K., Thirion, S., Horoyan, M. y Keicher, E. The calcium loading of secretory granules. A possible key event in stimulus-secretion coupling. *Biol Cell* **75**, 89-99 (1992).

Oberhauser, A., Robinson, I.M. y Fernández, J.M. Simultaneous capacitance and amperometric measurements of exocytosis: a comparison. *Biophysical Journal* **71**, 1131-1139 (1996).

Oheim, M., Loerke, D., Stuhmer, W. y Chow, R.H. The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *European Biophysical Journal*, 83-98 (1998).

O'Neill, S. C., Valdeolmillos, M., Lamont, C., Donoso, P. y Eisner, D. A. The contribution of Na-Ca exchange to relaxation in mammalian cardiac muscle. *Ann NY Acad Sci* **639**, 444-52 (1991).

O'Sullivan, A. J., Cheek, T. R., Moreton, R. B., Berridge, M. J. y Borgoyne, R. D. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO Journal*, 401-411 (1989).

Palade, G.E. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358 (1975).

Parras, C.D. y Kennedy, R.T. Electrochemical detection of exocytosis at single rat melanotrophs. *Analytical Chemistry* **67**, 3633-3637 (1995).

Penner, R. y Neher, E. Secretory responses of rat peritoneal mast cells to high intracellular calcium. *FEBS Letters*, 307-313 (1988).

Penner, R., Pusch, M. y Neher, E. Washout phenomena in dialyzed mast cells allow discrimination of different steps in stimulus-secretion coupling. *Bioscience Rep.*, 313-321 (1987).

Philippon, M. Les lois de la resistance electrique des tissus vivants. *Bulletin de la Academie Royale. Belgique. Cl. Sci.* **7**, 387-403 (1921).

Poon, K.C., Liu, P.I. y Spicer, S.S. Mast cell degranulation in beige mice with the Chediak-Higashi defect. *Am. Journal of Pathology*, 142-149 (1981).

Poyato, J.M., Tesis Doctoral: *Estudio de la cinética de la exocitosis en células cromafines aisladas aplicando la técnica de amperometría en parche*, Fisiología Médica y Biofísica (Universidad de Sevilla, Sevilla, 1998).

Rabenstein, T.D. Proton nuclear magnetic resonance studies of mast cell histamine. *Biochemistry* 26, 6923-6926 (1987).

Reuter, H. Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca(2+)-channel blockers. *Neuron* 14, 773-9 (1995).

Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M. y Pozzan, T. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Current Biology*, 635-642 (1995).

Robinson, I.M., Finnegan, J.M., Monck, J.R., Wightman, R.M. y Fernandez, J.M. Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92, 2474-8 (1995).

Rooney, T. A., Sass, E. J. y Thomas, A. P. Agonist-induced cytosolic calcium oscillations originate from a specific locus in single hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 10792-10796 (1990).

Rüden, L.V. y Neher, E. A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science*, 1061-1065 (1993).

Ryan, T. A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F. E., Tsien, R. W. y Smith, S. J. The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron* 11, 713-24 (1993).

Ryan, T. A. y Smith, S. J. Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. *Neuron* 14, 983-9 (1995).

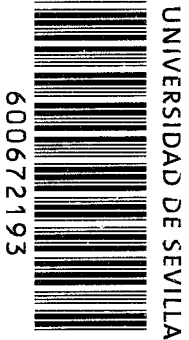
Schroeder, T.J., Jankowski, J.A., Kawagoe, K.T. y Wightman, R.M. Analysis of diffusional broadening of vesicular packets of catecholamines released from biological cells during exocytosis. *Analytical Chemistry* 64, 3077-3083 (1992).

Smith, C. B. y Betz, W. J. Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature* 380, 531-4 (1996).

Söllner, T., Bennet, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H. y Rothman, J.E. A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential

- steps of synaptic vesicles docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418 (1993a).
- Söllner, T., Whiteheart, W.S., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. y Rothman, J.E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324 (1993b).
- Stamford, J.A., Palij, P., Davidson, C., Jorm, C.M. y Millar, J. Simultaneous "real-time" electrochemical and electrophysiological recording in brain slices with a single carbon-fibre microelectrode. *Journal of Neuroscience Methods* , 279-290 (1993).
- Stevens, C. F. y Tsujimoto, T. Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 846-9 (1995).
- Steyer, J.A., Horstmann, H. y Almers, W. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* **388**, 474-478 (1997).
- Stout, A.L. y Axelrod, D. Evanescent field excitation of fluorescence by epiillumination microscopy. *Applications Optics* , 5237-5242 (1989).
- Südhof, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**, 645-53 (1995).
- Tatham, P. E., Duchen, M. R. y Millar, J. Monitoring exocytosis from single mast cells by fast voltammetry. *Pflugers Arch* **419**, 409-14 (1991).
- Terakawa, S., Fan, J.H., Kumakura, K. y Ohara-Imaizumi, M. Quantitative analysis of exocytosis directly visualized in living chromaffin cells. *Neuroscience Letters* , 82-86 (1991).
- Toledo-Aral, J.J., Tesis Doctoral: *Regulación por neuropéptidos de la actividad de los canales de Na⁺ y K⁺, y de los niveles citosólicos de Ca²⁺ en neuronas centrales*, Fisiología Médica y Biofísica (Universidad de Sevilla, Sevilla, 1992).
- Trifaro, J.M. y Vitale, M.L. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends in Neuroscience* **16**, 466-471 (1993).
- Tsien, R. y Pozzan, T. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ with quin2. *Methods Enzymol* **172**, 230-62 (1989b).
- Tsien, R. Y. Fluorescence ratio imaging of dynamic intracellular signals. *Acta Physiol Scand Suppl* **582**, 6 (1989a).
- Tsien, R. Y. Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci* **12**, 227-53 (1989c).

- Tsien, R.Y. y Rink, T.J. Current Methods in Cellular Neurobiology. *Barker, J.L. y McKelvy, J.F., eds. III*, 249-312 (1983).
- Ureña, J.M., Fernández Chacón, R., Benot, A., Alvarez de Toledo, G. y López Barneo, J. Hypoxia induced voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **91**, 10208-10211 (1994)
- Uvnäs, B. Histamine storage and release. *Fed Proc* **33**, 2172-6 (1974a).
- Valdeolmillos, M., Nadal, A., Soria, B. y Garcia-Sancho, J. Fluorescence digital image analysis of glucose-induced [Ca²⁺]_i oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* , 1210-1214 (1993)
- Wacker, I., Kaether, C., Kromer, A., Migala, A., Almers, W. y Gerdes, H.H. Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *Journal of Cell Science* 1997 , 1453-1463 (1997).
- Steyer, J.A., Horstmann, H. y Almers, W. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* **388**, 474-478 (1997).
- Tatham, P. E., Duchen, M. R. y Millar, J. Monitoring exocytosis from single mast cells by fast voltammetry. *Pflugers Arch* **419**, 409-14 (1991).
- Trifaro, J.M. y Vitale, M.L. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends in Neuroscience* **16**, 466-471 (1993)
- Wasserman, S.I. The mast cell. (*Pepys, J. y Edwards, A.M. eds.*) pag. 9. *Pitman, England.* (1979).
- Wier, W.G., Cannell, J.R., Berlin, E., Marban, E. y Lederer, W.J. Cellular and subcellular heterogeneity of [Ca²⁺]_i in single heart cells revealed by fura-2. *Science* , 325-328 (1987).
- Wightman, R.M., Jankowski, J.A., Kennedy, R.T, Kawagoe, K.T., Schroeder, T.J., Leszczyszyn, D.J., Near, J.A., Diliberto, E.J. y Viveros, O.H. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **88**, 10754-10758 (1991).
- Williamson, J. R. y Monck, J. R. Hormone effects on cellular Ca²⁺ fluxes. *Annu Rev Physiol* **51**, 107-24 (1989).
- Wu, L.G. y Betz, W.J. Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction. *Neuron* , 769-779 (1996).



Vicente Velasco Cuenplido
Monitorización de la excitación mediante técnicas
de fluorescencia en células cebadas

Sobresaliente "cum laude"

12 Enero

99

borradores	pilas	(P)
OP	A4	Vicente Velasco