

202



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ALGORITMOS PARA LA METRICA DE LA MORFOLOGIA  
DE MACROFAGOS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

**DENNISE DEBORAH DALMA-WEISZHAUSZ**

México, D. F.

JUNIO, 1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

1.0	Introducción.	3
1.1	Morfología celular y citoplasma.	
1.1.1	Estructuras del citoesqueleto en células no musculares.	
1.1.2	Organización.	
1.1.3	Macrófagos.	
1.2	Moduladores de la forma y actividad celular.	
1.2.1	Biológicos.	
1.2.2	Químicos.	
1.3	Análisis de imágenes.	
1.3.1	Métodos de análisis para la cuantificación de la morfología celular.	
2.0	Objetivo.	15
3.0	Materiales y métodos:	16
3.1	Cultivo celular.	
3.1.1	Línea celular J774.	
3.1.2	Línea celular F388D1.	
3.1.3	Macrófagos peritoneales.	
3.1.4	Macrófagos peritoneales estimulados.	
3.2	Moduladores:	
3.2.1	Partículas látex.	
3.2.2	Interferón- $\gamma$ murino.	
3.2.3	Extracto proteico de un filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	
3.3	Microscopía electrónica.	
3.4	Morfometría.	
3.4.1	Digitización.	
3.4.2	Algoritmos morfométricos utilizados.	
3.4.2.1	$4\pi$ Area / Perímetro <sup>2</sup> .	
3.4.2.2	Dimensión fractal.	
3.4.2.3	Transformada de Fourier.	
3.4.3	Programas adicionales.	
3.4.3.1	Menu.	
3.4.4	Equipo de cómputo.	

4.0 Resultados.	28
4.1 Aplicación de algoritmos a figuras simuladas.	
4.2 Análisis utilizando $4\pi$ área/perímetro <sup>2</sup> .	
4.21 Tipos celulares.	
4.22 Efecto de interferón y partículas látex.	
4.23 Efecto de antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	
4.3 Análisis con otros modelos.	
4.31 Fractales.	
4.32 Transformada de Fourier.	
5.0 Discusión.	35
5.1 Los algoritmos	
5.2 Los macrófagos.	
5.3 Conclusiones.	
6.0 Apéndice.	42
6.1 Tablas.	
6.11 Proteínas que interaccionan con microfilamentos.	
6.12 Proteínas que interaccionan con microtúbulos.	
6.13 Resultados comparativos entre área y Fourier.	
6.14 Resultados de células.	
6.2 Programas.	
6.2.1 Área.	
6.2.2 Dimensión fractal.	
6.2.3 Transformada de Fourier.	
6.2.4 Menu.	
6.3 Diagramas de flujo.	
6.31 $4\pi$ área/perímetro <sup>2</sup> .	
6.32 Dimensión fractal.	
6.33 Transformada de Fourier.	
7.0 Bibliografía.	87

## 1.0 Introducción:

### 1.1 Morfología celular y citoplasma.

Las células eucariontes pueden modificar su forma reorganizando sus estructuras y organelos internos. Las propiedades de forma, organización interna, movimiento celular y fagocitosis dependen de redes muy complejas de filamentos de proteínas en el citoplasma llamadas en conjunto citoesqueleto. La capacidad para medir cambios morfológicos en las células nos permite cuantificar alteraciones en el citoesqueleto que produzcan estos cambios.

Existen tres tipos de filamentos formando el citoesqueleto de células no musculares: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Además de estos, el citoesqueleto contiene muchas proteínas accesorias que unen un tipo de filamento con otro, unen estos filamentos con otros componentes de la célula o ayudan a la regulación de la polimerización-despolimerización de estas estructuras.

#### 1.1.1 Estructuras del citoesqueleto en células no musculares.

##### a) Los microfilamentos:

Los microfilamentos se encuentran localizados preferentemente en la periferia de las células (1), en concentraciones de  $\approx 10$  mg/ml, y tienen una longitud promedio de 100 nm. Están compuestos básicamente por una proteína globular, monomérica, y altamente conservada denominada actina-G (2), la cual tiene un peso molecular de 42,000 daltones. Se encuentra ligada en forma no covalente a una molécula de  $\text{Ca}^{+2}$  y a una molécula de ATP. Para su polimerización, requiere de varios factores:  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$ , ATP, y NaCl. Cuando se polimeriza, lo hace formando una hélice de doble cadena, de aproximadamente 4 nanómetros de diámetro, tomando entonces el nombre de actina-F.

Aunque el fosfato terminal de la molécula de ATP se hidroliza al formar la actina-F, la energía desprendida de esta hidrólisis no es necesaria para la polimerización, lo cual se ha estudiado in vitro formando la fibra en presencia de un análogo no hidrolizable de ATP.

La polimerización de estos filamentos no se lleva a cabo a una velocidad constante (FIGURA 1): la primera parte de ésta es el paso limitante; deben encontrarse tres moléculas de actina-G en una conformación específica, denominada nucleación para poder proseguir con la elongación. Después de esto, la polimerización procede rápidamente hasta que la concentración de actina-G libre llega al punto crítico, (punto en el cual la concentración de actina-G es igual a la concentración de actina-F) no puede seguir, y empieza la despolimerización (FIGURA 2). Los

filamentos no son una estructura simétrica respecto a sus polos. éstos tienen diferentes velocidades de polimerización-despolimerización (FIGURA 3a). Estos filamentos pueden adquirir varias conformaciones, dependiendo de la concentración local de actina y de otras proteínas reguladoras. Actualmente se considera que a distintas conformaciones de los filamentos, corresponden distintas funciones de éstos.

Existen 4 funciones básicas que dependen de la estructura que adopta esta polimerización:

La primera es aumentar la viscosidad de la solución en que se lleva a cabo. Los cambios en la forma en que se ensamblan los filamentos en distintas partes de la célula pueden ser los responsables de las diferencias en la consistencia citoplásmica local. Esta red de proteínas determina el tamaño de los organelos que puedan atravesarla.

La segunda función contribuye a mantener la configuración espacial de la célula misma o de algunas de sus partes. Esto es posible, cuando la polimerización origina haces de fibras largas de actina.

La tercera función involucra la contracción celular; esto se debe a que la actina, en asociación con otra proteína llamada miosina, tiene la capacidad de generar dicha fuerza contráctil.

Por último, estas fibras pueden mantener unidas varias partes de la célula, incluyendo la membrana plasmática.

La interacción de la actina con otras proteínas le brinda una alta versatilidad y una regulación precisa de sus funciones (Tabla 1).

Una de las conformaciones más estudiadas es la de haces en paralelo (23). Estos haces son evidentes en las microvellosidades, en el brush border de células epiteliales (FIGURA 4) y en las proyecciones que se extienden desde la superficie de diversos tipos celulares.

Aunque la proteína llamada miosina es un componente básico de las células musculares, también se encuentra en otros tipos celulares de vertebrados, donde su interacción con actina es muy importante (24).

#### b) Filamentos intermedios:

Estos filamentos se han identificado en casi todas las células diferenciadas y es muy posible que existan proteínas similares en células eucariontes primitivas. Fueron denominados 'intermedios' porque su tamaño es intermedio entre aquél de los microtúbulos y el de los microfilamentos, ya que miden aproximadamente 10 nm de diámetro. Existen por lo menos 5 clases distintas de proteínas que componen estos filamentos en diferentes células o tejidos, algunas de estas son: desmina o esqueletina en células miogénicas; vimentina o decamina en células derivadas de mesénquima; y un grupo más complejo de queratínas en células epiteliales (25).



Los filamentos intermedios son más insolubles que el resto de las estructuras del citoesqueleto, esto sugiere que tienen funciones distintas. Su vida media es muchas veces mayor a la del ciclo celular; su articulación no es reversible, por lo que su función es más mecánica y menos dinámica que la de microtúbulos y microfilamentos.

Utilizando microscopía electrónica en células de la epidermis crecidas en cultivo, se ha visto que estos filamentos emanan de la región perinuclear y se extienden a la periferia celular.

#### c) Microtúbulos:

Están compuestos por un polipéptido globular de peso molecular de 50,000 daltones, que generalmente se aísla como dímero de dos moléculas diferentes:  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, unidas a 2 moléculas de GTP. Al generar los microtúbulos, estas moléculas forman protofilamentos de polipéptidos de tubulina organizados en hileras con la  $\beta$ -tubulina de un dímero unida a la  $\alpha$ -tubulina del siguiente dímero (FIGURA 5). Usualmente estos protofilamentos se unen en grupos de 13, formando un tubo aparentemente hueco de 25 nm de diámetro.

La formación de estos filamentos se parece a la de los microfilamentos en varios puntos:

- 1) Se necesita la hidrólisis de un nucleótido, sólo que en el caso de los microfilamentos se requiere ATP; mientras

que en la formación de microtúbulos, se requiere de GTP y esto tiene un efecto muy importante en la polimerización del filamento.

2) Esta polimerización ocurre espontáneamente in vitro.

3) Los dos extremos del túbulo presentan diferentes velocidades de polimerización-despolimerización (FIGURA 5b).

El ensamble de microtúbulos requiere de otros factores además del GTP (25), incluyendo  $Mg^{+2}$ , algún agente quelante de  $Ca^{+2}$  y NaCl. Existen muchas proteínas que se asocian a los microtúbulos (MAPs) y regulan su ensamble (Tabla 2).

Esto lo hacen de diversas maneras: estabilizando o concentrando subunidades en una región definida logrando así superar la concentración crítica de ensamble, funcionando como moldes para la iniciación de núcleos donde empezará la elongación y estabilizando a los microtúbulos durante el ensamble. Las MAPs también regulan la articulación negativamente, pegándose a la tubulina monomérica, disminuyendo así la concentración de tubulina libre o pegándose a los extremos del túbulo evitando que continúe su elongación. También existen estructuras llamadas 'centros organizadores de microtúbulos' (MOCs), donde los microtúbulos se inician o interaccionan.

Es importante señalar que la mitosis es un mecanismo dependiente de éstos túbulos y que, por esto, muchas drogas que los afectan, inhiben la reproducción celular (27).

### 1.1.2 Organización:

Los microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos no son estructuras independientes. Aparentemente estos filamentos están interconectados por proteínas que todavía no se han logrado purificar. El conjunto de todas estas estructuras es llamado 'red microtrabecular'. Se cree que la actina es la responsable de la forma 'fina' de las células y de algunas de sus funciones dinámicas, mientras que los microtúbulos son los responsables de darles la forma general.

Aunque se ha avanzado mucho en el estudio del citoesqueleto, los mecanismos moleculares de funciones como la fagocitosis, la mitosis y el movimiento celular todavía no se conocen.

### 1.1.3 Macrófagos, sus propiedades y componentes del citoesqueleto.

Los macrófagos son células del sistema inmune. Una de sus funciones más importantes es la fagocitosis. Estas células tienen una capa especializada de citoplasma muy cerca de la membrana plasmática, la cual es muy dinámica y forma una gran variedad de proyecciones, incluyendo pseudópodos, microvellosidades y ondulaciones (28). La actina es la proteína más abundante en estas células y llega a componer hasta el 12% de las proteínas celulares totales,

y aunque generalmente se encuentra en fibras paralelas, en los macrófagos se encuentra formando redes de diferente organización (29). Existen varios tipos de moléculas, de diferente origen, que tienen la capacidad de modificar esta red, y por lo tanto, la forma celular. A éstas moléculas se les dá el nombre de moduladores. El mecanismo molecular mediante el cual logran estos cambios es también diverso, y su cuantificación sería el primer paso hacia la determinación de su origen bioquímico.

#### 1.2 Moduladores de la forma y/o actividad celular.

Entre los moduladores mejor caracterizados sobresalen el interferón, la colchicina, las citocalasinas B y D, el taxol, el forbol miristato, la aglutinina de semilla de trigo y las proteínas ras.

##### 1.2.1 Biológicos:

###### Interferón:

El interferón es realmente un conjunto de proteínas especie-específicas que inhiben la replicación de muchos tipos de virus además de la proliferación de una gran variedad de células normales y tumorales (30). Las moléculas de interferón generalmente se unen a receptores membranales y activan respuestas celulares de regulación fisiológica (31). Se sabe que el tratamiento con interferón afecta la

organización total del citoesqueleto; en particular se le ha adjudicado una inhibición de la polimerización y organización de microfilamentos (32), aunque no se conoce su acción sobre los otros componentes de la red microtrabecular. Por otro lado, existe contradicción respecto a las funciones que puede desempeñar, pues parece aumentar la capacidad fagocítica, mientras inhibe la pinocitosis (33), y dificulta el movimiento de los macrófagos (34).

Extracto protéico de Mycobacterium tuberculosis:

Recientemente se ha observado en el laboratorio que el extracto protéico de Mycobacterium tuberculosis induce cambios morfológicos en macrófagos de la línea celular J774.1. Bajo el microscopio de luz, las células aumentan sus proyecciones y después de un tiempo son incapaces de fijarse al sustrato del recipiente en el cual se encuentran.

1.2.2 Químicos

Colchicina:

Una molécula de colchicina se une a un dímero de tubulina evitando su polimerización. Como los microtúbulos son los responsables de la organización de organelos durante la mitosis y de la forma celular, las células al entrar en contacto con la colchicina no pueden llevar a cabo la mitosis ni mantener una forma definida más que aquella que obtienen debido a los microfilamentos y filamentos intermedios (35).

Taxol:

Este fármaco aumenta el grado de polimerización de la tubulina in vitro. Además, cuando se le añade a un cultivo celular, causa que la tubulina se polimerice y forme microtúbulos (36).

Vinblastina y Vincristina:

Inhiben la formación de microtúbulos (37).

Citocalasina B, D, E:

Inhiben la polimerización de microfilamentos. Se unen a un extremo de los filamentos inhibiendo el anclaje posterior de moléculas de actina-G (38).

Acetato de Forbol Miristato:

Estimula la pinocitosis, también altera la organización del citoesqueleto y la distribución de organelos. Estimula la polimerización de microtúbulos y microfilamentos (39).

Faloidina:

Estabiliza filamentos de actina (40).

Latex:

Estas partículas son usadas para inducir fagocitosis inespecífica en macrófagos.

### 1.3 Análisis de imágenes.

El análisis de imágenes está adquiriendo, cada día, una mayor importancia para la investigación científica, en particular en el área de la biomedicina (41).

Consiste en diversos métodos computacionales para facilitar el entendimiento de imágenes a través de modelos matemáticos.

Se basa en la digitización de una imagen (asignarle valores numéricos), y utilizar varios programas y filtros matemáticos para transformarla en valores cuantitativos. Existen dos maneras de lograr esto: la primera es dividir la imagen en cuadros iguales (por ejemplo 512 x 512) y asignar un valor numérico a la intensidad de color promedio que contenga cada cuadro. Posteriormente a estos valores se les

asigna un color arbitrario; a este proceso se le llama 'pseudocoloración'. Este método está siendo utilizado en la interpretación de radiografías, angiografías, tomografías y la investigación experimental en general. La segunda manera es resaltar los bordes o contornos de las imágenes y tomar éstos como datos manipulables de la forma general de las partículas o en este caso, de las células.

### 1.3.1 Métodos de análisis para la cuantificación de la morfología celular.

Existen varios métodos para describir la morfología celular, entre ellos destacan los cuantitativos (43) o los descriptivos (44), como son: la medición de la fuerza que oponen las células al ser presionadas por un microalambre, la medición de  $\text{perim.}^2/\text{área}$ ,  $\pi \times \text{diámetro}/2 \times (\text{área})^{1/2}$ , o simplemente la exposición de microfotografías para su comparación.



## 2.0 Objetivo.

El propósito de este trabajo es obtener algoritmos que sirvan para cuantificar cambios en la morfología celular y aplicar estos algoritmos a la medición del efecto del tipo celular, de moduladores y de antígenos micobacterianos sobre la morfología del macrófago.

El objetivo de esta tesis se dividió en dos partes:

1.- Desarrollo de técnicas para morfometría de imágenes.

2.- Utilización de éstas técnicas para:

a) Corroborar si la morfología en las células J774.1 se modifica al añadir extracto de Mycobacterium tuberculosis.

b) Utilizar estas mismas técnicas con otras estirpes celulares y en diferentes condiciones. (incubadas con interferón, látex, etc.)

### 3.0 Materiales y métodos:

#### 3.1 Cultivo celular.

Se utilizaron cuatro tipos de macrófagos de origen murino:

##### 3.1.1 La línea celular J774.

Estas células se mantuvieron en cultivo con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Chemical Co.), suplementado con suero de bovino fetal al 10% y una solución de antibióticos compuesta por penicilina (100 unidades/ml (Sigma)), y estreptomocina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma)).

Se mantuvieron en cajas de cultivo (Costar) de 35mm de diámetro a 37°C en presencia de una mezcla de aire y bióxido de carbono a una proporción de 95:5 respectivamente. Antes de cada experimento, se determinó la viabilidad de estas células por exclusión con azul de tripano (Gibco), siendo ésta más del 98%.

La cantidad de células por pozo utilizadas para cada experimento fue de  $1.5 \times 10^6$  células.

##### 3.1.2 La línea celular P388D1 .

Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con suero de bovino fetal (Sigma) al 5% y L-glutamina (GIBCO) 2mM con una mezcla de antibióticos a las

mismas concentraciones usadas anteriormente. Para su utilización, estas células se prepararon igual que las anteriores.

### 3.1.3 Macrófagos peritoneales.

Estos macrófagos fueron obtenidos de ratones hembras Balb/cJ de seis semanas de edad, mediante un lavado peritoneal con 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.01M, libre de  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  en condiciones estériles.

Después de esto fueron cultivados en DMEM y suero de bovino fetal al 20% durante 3 horas para permitir su adherencia. Una vez adheridas se lavaron y se incubaron con el mismo medio. Se hizo un conteo celular diferencial y se obtuvo un >90% de células adherentes con características de macrófagos por tinción con Giemsa.

### 3.1.4 Macrófagos peritoneales estimulados con medio de cultivo de tioglicolato de Brewer.

Estas células fueron obtenidas de ratones hembras Balb/cJ de 8 semanas de edad, las cuales fueron inoculadas intraperitonealmente con 5 ml de medio de cultivo de tioglicolato de Brewer (Difco) 72 horas antes de la extracción de macrófagos por lavado peritoneal con PBS 0.01M. Las células fueron procesadas de manera similar a las células peritoneales.

### 3.2 Moduladores.

#### 3.2.1 Partículas látex.

Se utilizó una solución de partículas latex de 8 $\mu$ m de diámetro a una concentración de 0.05M (peso/volumen). Los diversos tipos celulares se incubaron con esta solución por una hora después de la cual se lavaron 3 veces con PBS 0.01M y se fijaron a 4°C para su análisis posterior por microscopía electrónica.

#### 3.2.2 Interferón.

La solución utilizada consistió de interferón- $\tau$  murino a 62.5 UIR/ml (unidades de inhibición de replicación). Los diversos tipos celulares se incubaron con esta solución por una hora y se lavaron 3 veces con PBS 0.01M y se fijaron a 4°C para su análisis posterior.

#### 3.2.3 Extracto proteico de un filtrado de cultivo de Mycobacterium tuberculosis.

Este extracto fue obtenido de un filtrado del cultivo de la cepa H37Rv de M. tuberculosis, la cual se mantuvo por 4-6 semanas a 37°C en medio líquido de Proskauer-Beck-Ycumans (PBY). Se hizo una precipitación con sulfato de

amonio (con una concentración final de 50% peso/volumen) y se resuspendió en PBS con 0.2 mg/ml de fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) (Calbiochem, La Jolla, CA) como inhibidor de proteasas. El precipitado fue dializado contra PBS y conservado a -70°C con una concentración proteica final de aproximadamente 3mg/ml.

Las células fueron expuestas a diversas concentraciones de este extracto (0 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml), después de lo cual fueron lavadas y fijadas a 4°C para su análisis posterior.

### 3.3 Microscopía electrónica.

Las células se fijaron por el método de Karnovsky (45). Esta técnica consiste en disolver 2 mg de paraformaldehído en 25 ml de H<sub>2</sub>O y calentar a 60-70°C. se añaden una o dos gotas de NaOH hasta que la solución se torna transparente. La solución se enfría y se le añaden 5 ml de glutaraldehído (Biol. Union Carbide Co.) al 50%. y la solución se llevó a un volumen de 50 ml. con PBS, con un pH final de 7.2. Se añadieron 25 mg. de cacodilato anhidro. Se incubaron con esta solución por 30 minutos a 4°C. después de lo cual, se lavaron por 30 minutos con solución amortiguadora de cacodilatos 0.1M con un pH de 7.3. Se incubaron por 30 min. adicionales con tetróxido de osmio al 0.1% en la misma solución de cacodilatos. Se deshidrataron con etanol al 70%, 80%, 90%, por 10 mins. cada uno. Finalmente, se

deshidrataron tres veces más con etanol al 100% por 10 mins. Después de lavar, se añadieron 300 ml de óxido de propileno. Se despegó la monocapa y se centrifugó durante 20 mins.: después de lo cual se centrifugó dos veces más durante 10 min. con una mezcla de óxido de propileno-resina en una proporción de 1:1. Se dejó una hora con resina sola (EPON 812). Se procedió a hacer los cortes en un microtomo y a tajar las muestras con 2 colorantes: acetato de uranilo (Reynolds) por 5 min. y citrato de plomo (Reynolds) durante 2 min.

Las muestras fueron fotografiadas en un microscopio electrónico JEOL a una amplificación de 3000X-6000X.

### 3.4 Morfometría

Una vez teniendo las microfotografías por el método descrito anteriormente, se emplearon tres algoritmos para la métrica de la morfología de macrófagos y figuras simuladas, siguiendo la secuencia descrita a continuación (y en la FIGURA 6):

MICROGRAFIA DE CELULAS.  
|  
DIGITIZACION.  
|  
COORDENADAS (X,Y) DE CONTORNO.  
|  
PROGRAMA DE MORFOMETRIA.  
|  
PROMEDIOS Y ERRORES ESTANDAR.  
|  
RESULTADOS.

### 3.4.1 Digitización:

La digitización fué llevada a cabo en una tablilla gráfica (Hewlett-Packard 9111A Graphics Tablet) con coordenadas  $x \in [0, 10^2]$  y  $y \in [0, 10^2]$ , la cual tiene un poder de resolución de 3 mm.

El programa de digitización es llamado map.1 3 II, y fué realizado por Guillermo Olvera y Enrique Vincent (Instituto de Geofísica, UNAM., en prensa). Este programa guarda en un archivo de la computadora las coordenadas (x,y) de cada figura que se digitize.

### 3.4.2 Algoritmos morfométricos utilizados.

#### 3.4.2.1 $4\pi \text{Area} / \text{Perímetro}^2$ .

Este es un algoritmo utilizado frecuentemente en análisis morfológicos en biología (46). Este algoritmo relaciona el perímetro y el área de un círculo de la siguiente manera:

$$a/p = \pi r^2 / 2\pi r$$

donde:

a es el área del círculo.

p es su perímetro,

y r es el radio del mismo.

Si se multiplica el numerador por  $4\pi$  y se eleva el denominador al cuadrado se llega a la siguiente identidad:

$$4\pi A/p^2 = 4\pi^2 r^2 / 4\pi^2 r^2 = 1$$

Lo cual es una condición que solo se dará para el círculo perfecto. Para cualquier otra forma cerrada, el perímetro crecerá más rápido con respecto al área, y la medida:

$$4\pi A/\text{perímetro}^2 \text{ será menor de 1.}$$

Por lo que esto representa una medida, aunque limitada, de la forma de una imagen digitizada.

(FIGURA 7)

(véase Apéndice PROGRAMA 1)

### 3.4.2.2 Dimensión fractal.

'Fractal' es una palabra inventada por Benoit Mandelbrot que tomó del latín ~~fractus-frangere~~ o romper.

Existen figuras complejas en la naturaleza que no se habían caracterizado de ninguna manera geométrica. Mandelbrot rescató una herramienta matemática descrita por Hausdorff que llega a ser muy compleja y que logra no solo



caracterizar formas excesivamente irregulares como son montañas, nubes, etc. sino también simularlas (47,48,49).

Una de las acepciones más simples de esta teoría, aplicada a contornos celulares y a otras figuras cerradas parecidas es la siguiente: existen diversas escalas o sondas para la evaluación del perímetro, pero cada una de éstas llevan a la conclusión de que dichos perímetros tienen valores distintos. Si uno necesita comparar una forma con otra, tomando el perímetro como parametro no se logra mucho. Si por el contrario, se toman sondas de longitud  $dx$ , y se mide el contorno poniendo la sonda en un punto, tomando como origen el otro extremo de la sonda para el siguiente punto, y siguiendo así todo el contorno hasta que se vuelve al origen inicial, el número de veces que cabe la sonda en ese perímetro ( $L$ ) multiplicado por la longitud de la misma será el perímetro con esa sonda:

$$\text{perímetro} = L(dx)$$

Por lo que el perímetro estará en función de la longitud de la sonda.

Cuando hacemos que  $dx$  tienda a un número infinitamente pequeño nos acercaremos al valor verdadero del perímetro. En la práctica, cuando esto se lleva a cabo, el perímetro tiende a aumentar sin límite práctico, por lo que tampoco podemos conocer el valor de éste, pero sí podemos caracterizarlo. Si se hace una gráfica de logaritmo de  $(dx)$

v.s. logaritmo del perímetro ( $L * dx$ ) se llega a una gráfica similar a la mostrada en la (FIGURA 8a), donde se muestra una gráfica de este tipo para un círculo perfecto. Al hacerlo con formas celulares, la pendiente inicial de esta curva será más negativa debido a su complejidad (FIGURA 8b). Por definición, la dimensión fractal de una figura es:

$$1 - (\frac{\delta(\log(L * dx))}{\delta(\log(dx))})$$

Entre más complejo es el contorno celular, mayor será el valor de la dimensión fractal. El rango de este valor es entre 1 y 2.

(véase Apéndice PROGRAMA 2)

#### 3.4.2.3 Transformada de Fourier.

Las transformadas lineales son bien conocidas como técnicas para la solución de problemas en sistemas lineales.

Generalmente se usa la transformación para simplificar analíticamente el problema.

La transformada de Fourier es una función que describe las componentes de curvas senoidales de distintas frecuencias que, al ser sumadas, son idénticas a la función original (50).

Esta transformada se define como:

$$f(s) = \int f(x) e^{-1\pi^2 x s} dx;$$

donde  $s$  es la frecuencia de las componentes senoidales,  $f(s)$  es la transformada de Fourier para esa función,  $x$  es la coordenada  $x$  de la función bajo análisis y  $f(x)$  es la correspondiente coordenada  $y$ .

Si los datos son discretos, esta ecuación se separa en dos partes y se calcula independientemente la parte real y la parte imaginaria con las siguientes sumatorias:

$$f(s) = \sum f(n) \cos 2\pi sn \quad (\text{parte real})$$

$$f(s) = \sum f(n) \sin 2\pi sn \quad (\text{parte imaginaria})$$

Si se utiliza esta transformada numérica de Fourier, existen ciertas limitaciones en cuanto a los datos que influirán en el resultado final. Los datos se darán como medida de la variable independiente  $x$ . El intervalo  $\Delta x$  se puede escoger de tal manera que no se necesite interpolar valores intermedios de  $x$ . La función resultante no puede contener datos significativos de componentes Fourier con periodos menores a  $2\Delta x$ . Por este motivo, no es necesario continuar el proceso más allá de  $(2\Delta x)^{-1}$ .

En este caso en particular, era necesario hacer una transformación a los datos de la digitización, ya que estos no describían ninguna función pues el contorno celular se vertía sobre sí mismo haciendo que para cada valor de  $x$  existieran varios valores de  $y$ . Los datos  $(x,y)$  de la digitización se transformaron de tal manera que:

$$x = \text{dist}(x) = \text{dist}(n-1) + (\text{dist}(n) * 360 / \text{long})$$

$$y = \text{ang}(x) = \text{ang}(n) - \text{ang}(n-1)^*$$

\*la transformación para la obtención del ángulo está descrita con detalle en el programa Fourier.

La FIGURA 9a muestra el resultado de esta transformación para un círculo perfecto y la FIGURA 9b muestra este mismo procedimiento para una célula. Como se puede notar en estas figuras, existe ruido proveniente de la digitización, por lo que los resultados que provendrían de la transformada de Fourier son difíciles de entender. Si se escogiera otra manera de transformar los datos en una función, sin que esta transformación fuese tan sensible a cambios drásticos en los ángulos, tal vez sería posible reducir el ruido y usar la transformada de Fourier como medida morfométrica precisa de los contornos celulares.

#### (Apéndice PROGRAMA 3)

##### 3.4.3 Programas adicionales.

###### 3.4.3.1 Menu:

Este es un programa fácil de manejar, y representa una manera rápida de hacer funcionar todos los programas de morfometría utilizados en este trabajo.

#### (Apéndice PROGRAMA 4.)

#### 3.4.4 Equipo de cómputo.

Se usaron dos equipos de cómputo en este trabajo: una Computadora Hewlett-Packard 9000 en la cual se llevó a cabo la digitización y morfometría y una Computadora personal Printaform de 256 kB de memoria habilitada con los programas LOTUS 123 para manipulación de datos y TADPOLE para pruebas estadísticas.

#### 4.0 Resultados

Los resultados individuales para las células analizadas por los tres métodos se muestran en la Tabla 3.

##### 4.1 Aplicación de algoritmos a figuras simuladas.

En la FIGURA 10 se muestran los resultados de la determinación de rasgos morfológicos del contorno de objetos bidimensionales que son medidos con sensibilidad y continuidad por algunos de los algoritmos morfométricos presentados en este trabajo. Los incisos a-e muestran la evolución morfológica desde un círculo hasta una célula esquematizada, indicando los valores correspondientes para los parámetros antes descritos. En esta serie de objetos, el parámetro con mayor sensibilidad para detectar la transformación morfológica es el de  $\frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2}$ , variando por un factor de  $10^6$  entre el círculo y el triángulo. Este parámetro es óptimo para medir cambios morfológicos entre polígonos de distinto número de lados. Es menos sensible, sin embargo, a cambios en el contorno correspondientes a proyecciones a partir del círculo.

El desarrollo de proyecciones induce variaciones significativas en la dimensión fractal (figuras 10b, 10f, 10g). Este aumento, primero de la figura 10f, con relación al círculo ((1.4) v.s. (1.0)) y luego, cuando estas

proyecciones son más agudas (fig. 10g). Incrementándose hasta aproximadamente 1.7, sugiere que éste parámetro es sensible a cambios en contorno similares a los que podrían anticiparse en células con alteraciones estructurales en la interfase citoesqueleto-membrana.

El efecto de las proyecciones aisladas de dimensiones similares a las del objeto original se observa en las figuras 10h-10k. La dimensión fractal no es muy sensible a la forma de la proyección 10h y 10j v.s. 10i y 10k, pero sí al largo de ésta: 10h y 10i v.s. 10j y 10k. Es particularmente notable la diferencia observada como resultado de un aumento en la proyección del tamaño del radio (10j y 10k) al tamaño del diámetro (10h y 10i) del objeto original.

Los resultados reportados en esta tesis para las distintas muestras celulares son analizados partiendo del parámetro  $4\pi\text{área}/\text{perim}^2$ . Las mediciones obtenidas de otros parámetros son comparadas con éstas.

#### 4.2 Análisis utilizando $4\pi\text{área}/\text{perim}^2$ .

##### 4.2.1 Tipos celulares.

Los resultados obtenidos a partir de éste parámetro nos brindan una idea coherente de las pruebas morfológicas que deben cumplir todos los parámetros morfométricos con los que obtenemos información acerca de macrófagos. Sabemos que algunos parámetros que miden la asimetría y homogeneidad de tipos celulares discriminan entre la línea J774.1. que

encuentran, en promedio, casi redonda y uniforme, la línea P388D1, que dispone de una estructura más alargada, y los macrófagos residentes en peritoneo, con estructuras similares a las de la línea P388D1 (51), pero mucho más heterogéneas que ésta. La variación que encontramos con respecto a los datos reportados en la literatura se debe a la diferencia en la resolución a la cual se tomaron las muestras, ya que los datos reportados llevan a cabo la morfometría con observaciones hechas en microscopía óptica (resolución de  $.2\mu\text{m}$ ) mientras que en este estudio las observaciones se hicieron en microscopía electrónica (resolución de 15 Angstroms). Con base en lo que conocemos acerca de la activación de macrófagos estimulados, podríamos anticipar también que cualquier parámetro morfométrico medirá contornos más irregulares para estos últimos que para macrófagos residentes.

La FIGURA 11 resume los valores de este parámetro para estos tipos celulares. El máximo valor ( $5.5 \times 10^{-4}$ ) lo tiene la estirpe celular J774.1 y el mínimo ( $5.0 \times 10^{-5}$ ) lo tienen los macrófagos estimulados. En este rango se distribuyen las células P388D1 ( $2.6 \times 10^{-4}$ ) y los macrófagos peritoneales ( $1.2 \times 10^{-5}$ ). Estos resultados muestran una secuencia que concuerda con las expectativas y una discriminación excelente entre los diversos tipos celulares.



#### 4.22 Efecto de interferón y fagocitosis de látex.

Partiendo de la estructura original de la línea J774.1 podemos observar en la FIGURA 12 que tanto el interferón como la fagocitosis de partículas látex disminuyen el valor de este parámetro por un factor de 100 aproximadamente. Esto significa que las células así modificadas tienen un contorno semejante en complejidad al del tipo celular más complejo, el de macrófagos estimulados. Con estos resultados estamos determinando también los límites posibles para este parámetro referente a macrófagos.

Los resultados correspondientes a la línea P388D1 (FIGURA 13) son particularmente interesantes, pues tanto el efecto del interferón como el de la presencia de partículas de látex es el de un aumento en el valor de este parámetro. Estas células adquieren contornos más sencillos, cuando fagocitan o son activados por el interferón. El efecto de éste último es realmente dramático, logrando valores promedio para este parámetro ( $2 \times 10^{-2}$ ) superiores en un 400% a los de la J774.1.

Los macrófagos residentes pueden ser activados por el interferón- $\gamma$  (51), así como por actividades fisiológicas como la fagocitosis. Para dichos macrófagos, este parámetro disminuye en un factor de aproximadamente 2 (FIGURA 14) como resultado de la presencia de partículas látex, alcanzando precisamente valores correspondientes a los macrófagos sacados originalmente ( $5 \times 10^{-6}$ ). El interferón por sí solo

induce contornos aún más complejos, llegando a valores de  $5 \times 10^{-7}$ .

En los macrófagos estimulados (FIGURA 15) observamos un efecto casi nulo de la presencia de látex, y un aumento, llegando al valor correspondiente a los peritoneales, inducido por la adición del interferón- $\tau$ . Los modelos bioquímicos de que disponemos para el efecto del interferón (52) no contemplan con claridad un efecto como el que observamos. Si recurrimos a los trabajos previos (53) éstos reportan efectos fisiológicos un tanto contradictorios como resultado de la incubación de macrófagos con el interferón.

#### 4.23 Efecto de antígenos de Mycobacterium tuberculosis.

El efecto de los antígenos de M. tuberculosis sobre este parámetro en la línea J774.1, se observa en la FIGURA 16. Los antígenos micobacterianos inducen una disminución en este parámetro en un factor de 1000, con el consiguiente aumento en la complejidad del contorno celular. Estos antígenos convierten el contorno de una célula J774.1 en el de un macrófago estimulado.

#### 4.3 Análisis con otros modelos.

##### 4.31 Fractales.

Los cálculos de la dimensión fractal para las muestras analizadas en este trabajo se presentan en las FIGURAS 17-22

y en la TABLA 6.14. Si bien estas FIGURAS muestran algunas diferencias entre la J774.1 y la P388D1, y entre el testigo de la línea P388D1 con relación a las células de esta misma estirpe tratadas con interferón- $\tau$ , así como entre las muestras de células J774.1 tratadas con antígenos de Mycobacterium tuberculosis, el análisis estadístico de todos estos resultados (prueba t) revela que ninguna de estas es significativa. El contraste con los resultados obtenidos para  $4\pi\text{área}/\text{perímetro}^2$ , los cuales sí son significativos, sugiere que la dimensión fractal es un parámetro que sirve menos para este tipo de análisis. Existen escalas alternas que podrían ser definidas para amplificar más las diferencias entre estas muestras, aunque habría que revisar detalladamente esta alternativa pues parece difícil resaltar solo aquello que es realmente significativo.

#### 4.32 Transformada de Fourier.

El problema, al igual que en el caso de los modelos cuyos resultados fueron presentados en la sección 4.1, es que al menos para los parámetros aquí definidos y bajo las condiciones de digitización descritas, no observamos suficiente sensibilidad para los parámetros escogidos o continuidad para el máximo del primer período de la función, que nos permita analizar fácilmente los cambios estructurales presentados en este trabajo. Por ejemplo (TABLA 6.13) mientras que el parámetro que utiliza el área

describe un cambio continuo y a través de dos órdenes de magnitud para el efecto de los antígenos de Mycobacterium tuberculosis sobre el contorno de macrófagos, el parámetro de  $a+b/c$  varía a través de menos de un 15%, y el máximo de la función varía a través de 4 órdenes de magnitud, pero con resultados aparentemente discontinuos.

## 5.0 Discusión.

### 5.1 Los algoritmos.

Disponer de percepciones matemáticas de la morfología celular ha sido hasta ahora equivalente a describir a niveles más bien básicos la morfología general de las células, midiendo excentricidades, y con menor frecuencia algún parámetro relacionado con el contorno celular. La aplicación de la metodología desarrollada para el análisis de imágenes no se ha utilizado para conseguir información correlacionable con la fisiología y bioquímica celular. En los trabajos disponibles acerca del tema, existe poco rigor al considerar las características físicas de cada parámetro, particularmente su continuidad y sus límites, y menos claridad en las características morfológicas precisas medidas por cada uno de estos parámetros (53).

Al acercarnos al problema del macrófago, una célula cuyo contorno es singularmente plástico, nos encontramos con dos necesidades morfométricas distintas: describir la forma geométrica de la célula y medir independientemente la complejidad de su contorno. Si bien existen variables comunes a estas dos medidas, existe también una diferencia fundamental en el nivel de resolución en el cual son aplicables. La forma del macrófago, a nivel de resolución de microscopía óptica, se verá afectada por cambios globales de su citoesqueleto, particularmente por la proyección de

pseudópodos. La complejidad de su contorno, en cambio, dependerá exclusivamente de la organización de los microfilamentos en micropodios, detectable a nivel de resolución del microscopio electrónico.

Aquellos parámetros particularmente sensibles a cambios en el largo del perímetro con relación al área celular ( $\# \text{vértices} / \text{perim.}^2$ ), son de utilidad en la detección de cambios en la forma, para áreas constantes, y también, aunque con una correlación morfológica menos clara, en la definición de la complejidad del contorno celular. El principal problema es que estos métodos son tan sensibles a la longitud del perímetro, que no es posible distinguir entre alteraciones en la forma celular y cambios en la complejidad del perímetro celular.

Los parámetros que dependen exclusivamente de la complejidad del contorno celular, tales como los fractales y las transformaciones de Fourier, indican diferencias debidas primordialmente a cambios en el número y extensión de micropodios. La diferencia principal entre los fractales y las transformaciones de Fourier, es que la dimensión fractal tiene límites interrango, mientras que la inversión de Fourier aunque goza de una alta sensibilidad, este mismo es su error, ya que el ruido descrito antes no nos permite y los escalares que se define con fundamento en ésta, tienen rango abierto.

## 5.2 Los macrófagos.

Al aplicar estos algoritmos a diversos problemas morfométricos relacionados con macrófagos, observamos que podemos disponer de los rangos más amplios y continuos para el parámetro  $4\pi\text{área}/\text{perímetro}^2$ . Con este parámetro obtuvimos resultados que concuerdan con las expectativas originadas de trabajos previos (54) en relación a los diversos tipos celulares que informan un incremento en la complejidad de su contorno en el siguiente orden: J774.1 < P388D1 < macrófagos de peritoneo < macrófagos de peritoneo estimulados. Sin embargo, los efectos de interferón- $\tau$  sobre los diversos tipos celulares resultan menos anticipables que los de sus controles correspondientes.

Los resultados de la aplicación de estos algoritmos al análisis del contorno de los macrófagos revelan células que difieren mucho en la complejidad de sus contornos. La complejidad del contorno de los diversos tipos celulares revela una interesante correlación entre su valor y la actividad fisiológica y bioquímica de éstas. Las de contorno más sencillo son las J774.1, una línea celular cuyo contenido enzimático en lisosomas y en el aparato de Golgi (55), es limitado. El contorno más complejo lo tienen los macrófagos estimulados, los cuales disponen de un mayor contenido enzimático y una actividad fisiológica acelerada en comparación con los otros tipos celulares estudiados. Medimos efectivamente un parámetro que correlaciona con la

actividad plástica de la célula: su motilidad y la eficiencia mecánica de su citoesqueleto.

Es por esto que los resultados de los experimentos utilizando interferón- $\tau$ , que es un activador de la fagocitosis e inhibidor de la pinocitosis, confirman que los efectos estructurales de un mediador pueden ejercerse en múltiples puntos del citoesqueleto, incidiendo sobre la complejidad del contorno en formas un tanto contradictorias. En la línea J774.1, el efecto del interferón- $\tau$  se refleja en un aumento en la complejidad de su contorno; pero en la línea P388D1, este efecto disminuye la complejidad del contorno celular. En macrófagos residentes de peritoneo, la activación con este modulador produce un contorno más complejo, pero en aquellos que han sido estimulados produce un contorno más sencillo. No disponemos de información adecuada para evaluar estos resultados desde una perspectiva estructural, pero estos resultados sí indican la necesidad de conocer detalladamente la infraestructura celular que es afectada por diversos tipos de efectores celulares.

Si el interferón- $\tau$  actúa como un efector estructural, qué efecto tiene sobre el contorno celular la presencia y/o actividad fagocítica de partículas de látex?. En las FIGURAS 12-15 este efecto se revela estirpe-dependiente. En las J774.1, es similar al interferón y al realizar el experimento simultáneo el resultado es el mismo. En cambio, en las P388.D1 el efecto del interferón- $\tau$  es muy superior al de látex y en la dirección opuesta, simplificando el



contorno de estas células. También se observan efectos contradictorios entre el interferón- $\tau$  y la fagocitosis de partículas látex para los macrófagos peritoneales y estimulados.

Estos efectos aparentemente contradictorios se observan también para los antígenos de Mycobacterium tuberculosis. Por un lado, los resultados aquí expuestos indican que dichos antígenos aumentan la complejidad celular. Sin embargo, otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio utilizando microcinematografía indican que disminuye la frecuencia con la cual los macrófagos de la línea J774.1 proyectan pseudópodos. La toxicidad estructural de estos antígenos parecería entonces inducir cambios en el citoesqueleto en focos de infraestructura diversos.

Un modelo razonable para interpretar, a través de nuestros resultados el traslado de la actina entre diversas estructuras de la célula requeriría del almacenamiento de actina en micropodios mientras no se esté utilizando en la producción de pseudópodos. Para el caso particular del efecto de los antígenos de Mycobacterium tuberculosis, podríamos anticipar que estos inducen el ensamblaje de pseudópodos detectables a nivel de resolución de microscopía óptica y simultáneamente facilitar el ensamblaje de los micropodios detectados por microscopía electrónica y medidos por los algoritmos desarrollados en este trabajo.

### 5.3 Conclusiones.

a) El algoritmo correspondiente al parámetro  $\frac{4\pi \text{Área}}{\text{perímetro}^2}$  provee la sensibilidad máxima para medir cambios en los tipos celulares analizados en este trabajo.

b) La complejidad en el contorno de estos tipos celulares sigue el siguiente orden: J774.1 < P388D1 < peritoneales < estimulado, consistente con datos presentados anteriormente.

c) El interferón- $\tau$  tiene efectos estructurales distintos dependientes de la estirpe celular.

d) La fagocitosis de látex produce cambios en el contorno celular dependientes del tipo celular y en general significativamente distintos a los inducidos por el interferón- $\tau$ .

e) Los antígenos de Mycobacterium tuberculosis inducen la formación de micropodios en el contorno celular de la línea J774.1.

f) Efectos opuestos sobre formación de pseudópodos y micropodios pueden visualizarse a través de modelos en los que los componentes moleculares de estas dos estructuras se encuentran en un equilibrio permanente que permite su intercambio entre las proyecciones plásticas de los pseudópodos y las estructuras relativamente constantes que son los micropodios.

g) Aunque la transformada de Fourier ha sido utilizada

frecuentemente para análisis morfológicos celulares. la manera que se escogió para digitizar y los parámetros que se utilizaron no sirven para describir macrófagos.

FIGURA 1

% polimerización

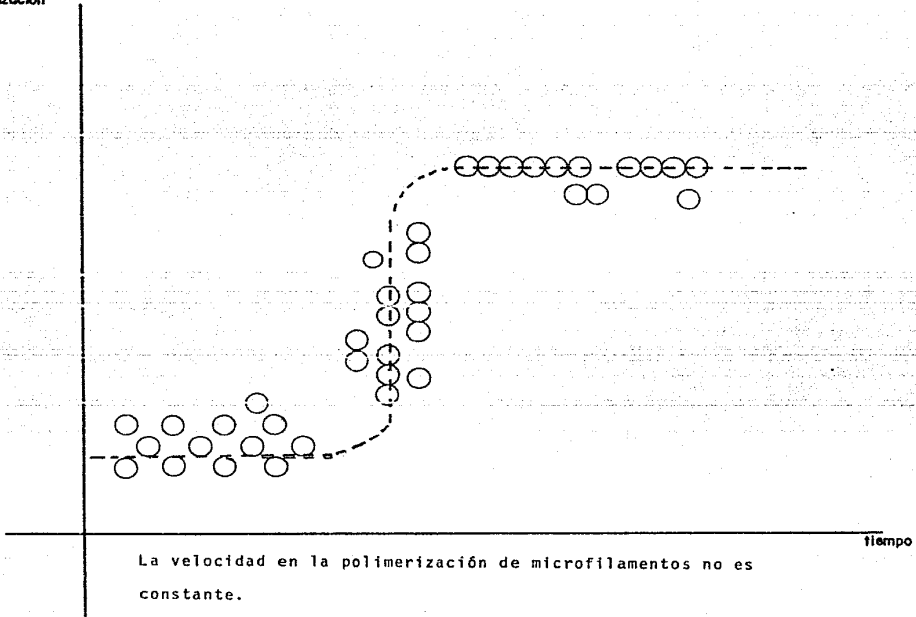


FIGURA 2

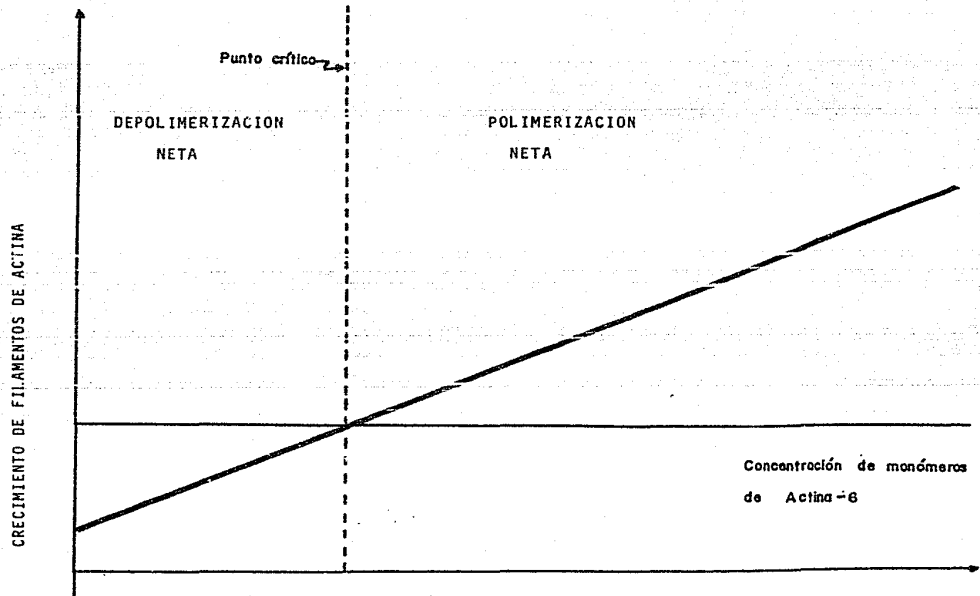
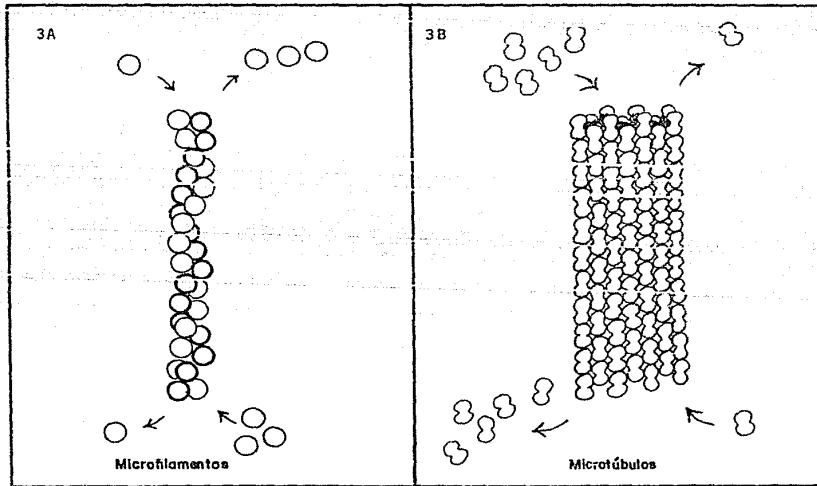
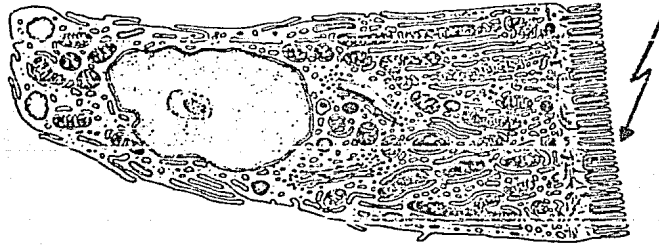


FIGURA 3



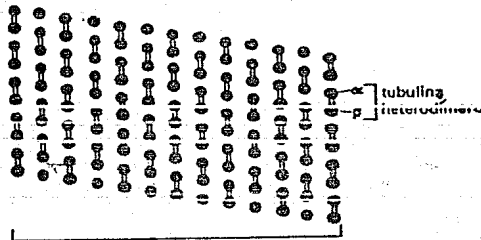
POLIMERIZACION-DESPOLIMERIZACION

FIGURA 4



BRUSH BORDER DE CELULAS EPITELIALES

FIGURA 5



FORMACION DE FILAMENTOS DE DIMEROS DE TUBULINA

SECUENCIA DE TRABAJO

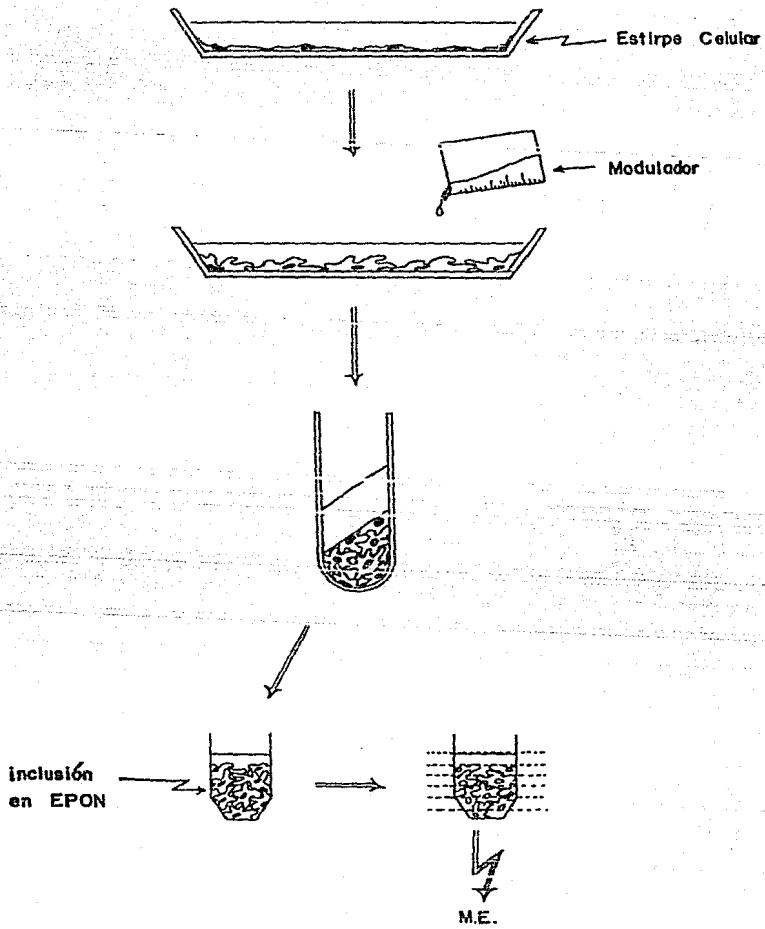
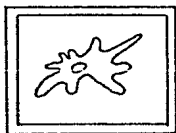


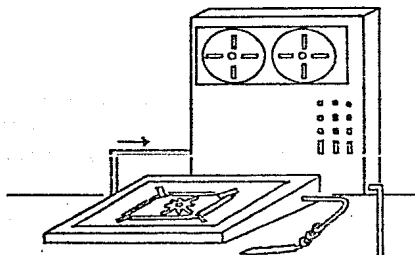


FIGURA 6'

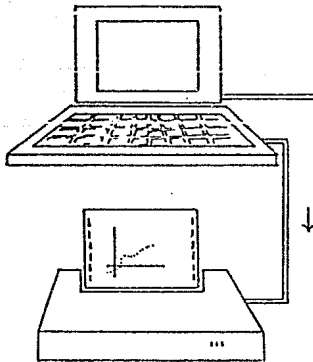
M.E.



Microfotografía



Digitación  
HP 9000.



Resultados  
Finales

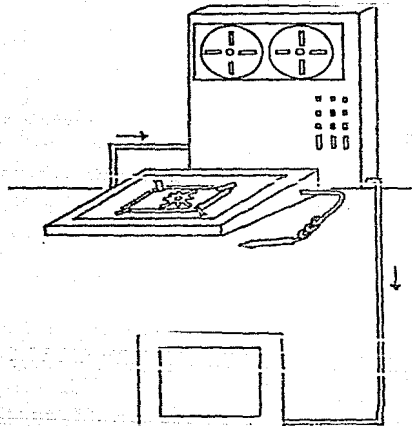
M.E.= Microscopia electrónica.

FIGURA 6

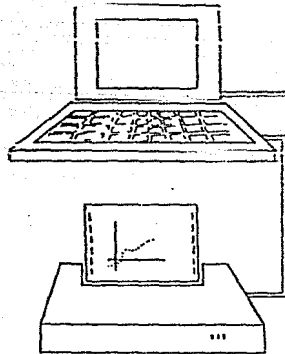
M.E.



Microfotografía



Digitación  
HP 9000.



Resultados  
Finales

M.E. = Microscopia electrónica.

FIGURA 7

$$4 \cdot \pi \cdot \text{area} / \text{perim.}^2$$

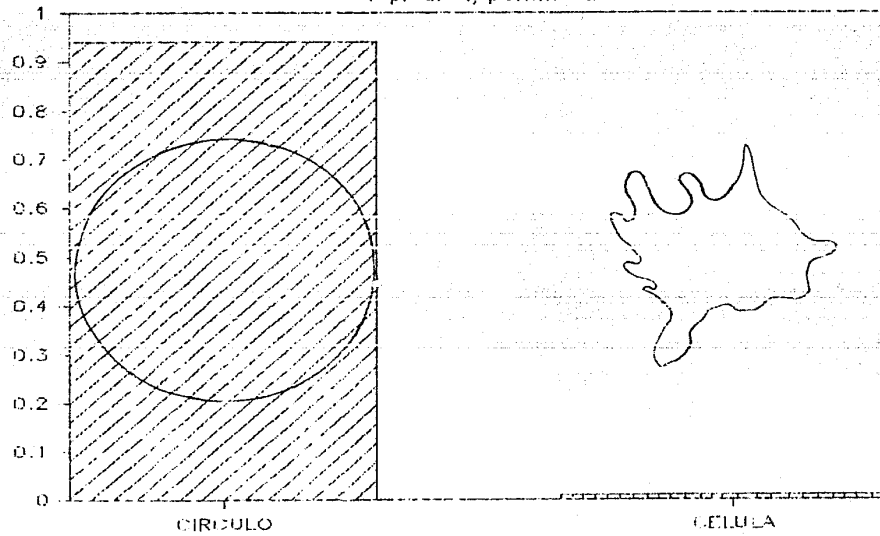


FIGURA 8 a  
MEDICION DE LA DIMENSION FRACTAL  
PARA UN CIRCULO.

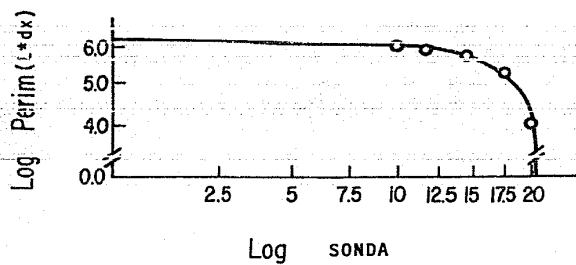


FIGURA 8 b  
MEDICION DE LA DIMENSION FRACTAL  
PARA UNA CELULA

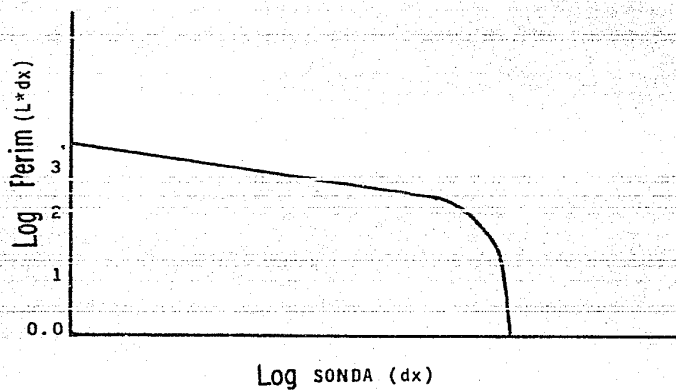


FIGURA 9 a

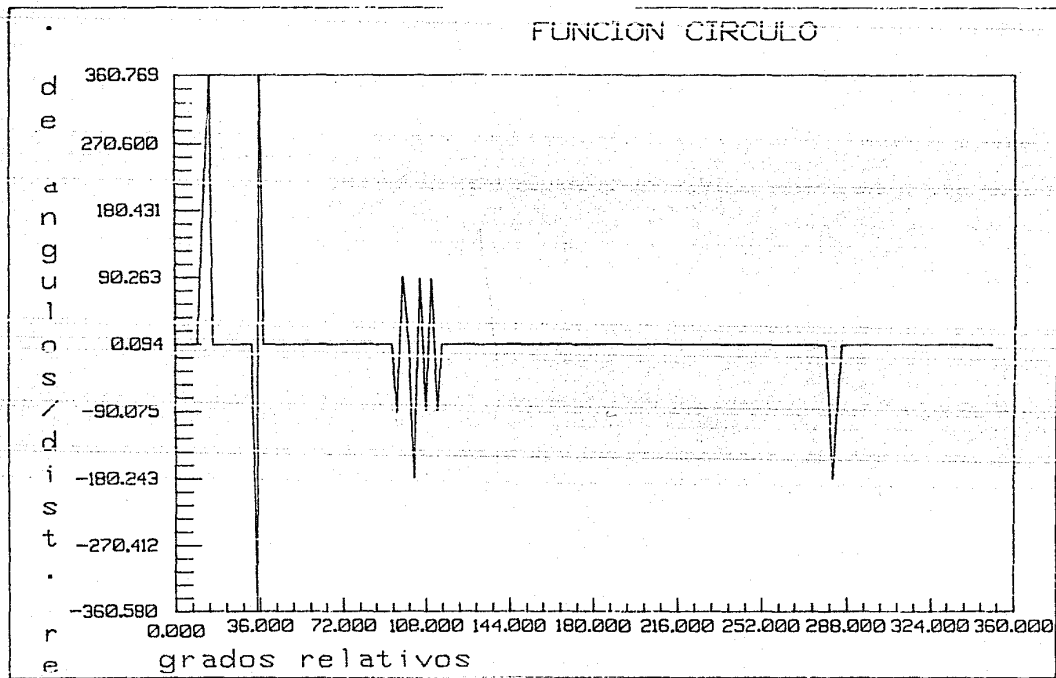


FIGURA 9 b

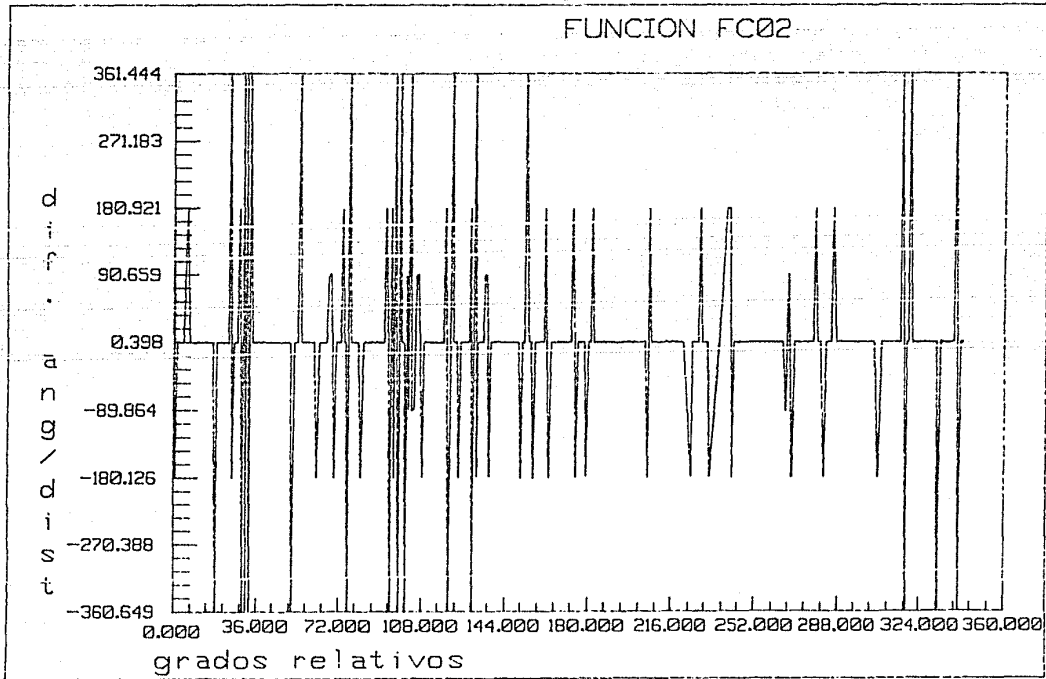




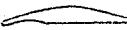



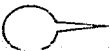





FIGURA 10  
 MODELOS DE FIGURAS SIMULADAS

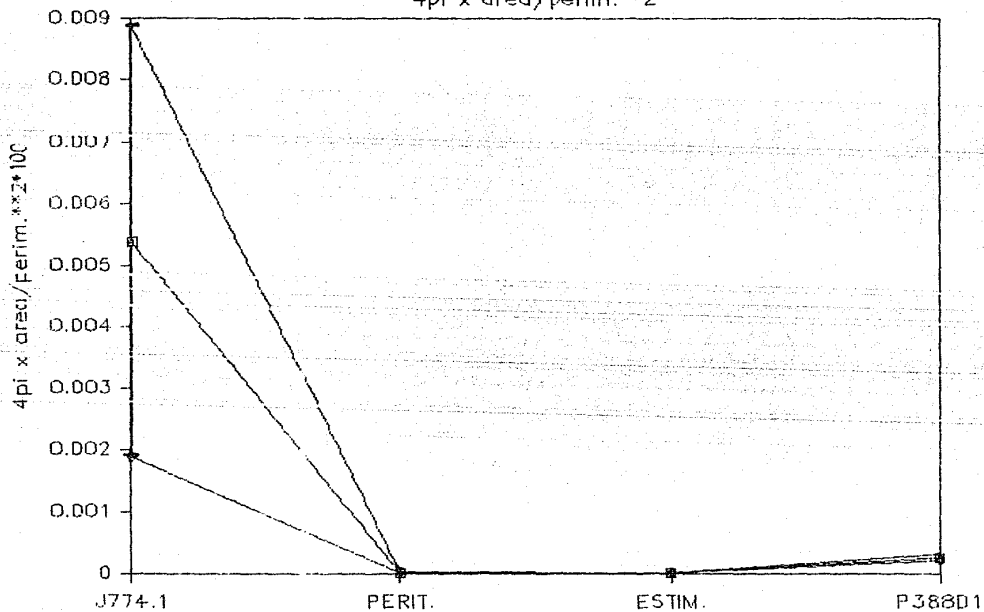
	FORMA	AREA	FRACTAL
a	 1	1.0000	1.0000
b	 2	$0.3970 \times 10^1$	1.0284
c	 3	$2.0308 \times 10^6$	1.0425
d		$2.0947 \times 10^6$	1.6312
e		$1.3381 \times 10^6$	1.5174
f		$2.3016 \times 10^5$	1.3972
g		$1.8375 \times 10^5$	1.7037
h		$1.5555 \times 10^5$	1.3333
i		$1.2918 \times 10^5$	1.6615
j		$1.2260 \times 10^5$	1.0723
k		$1.2845 \times 10^5$	1.0358
l		$1.1602 \times 10^5$	1.2810

1. Circulo teórico. 2. Fórmula del círculo. 3. Digitizaciones.



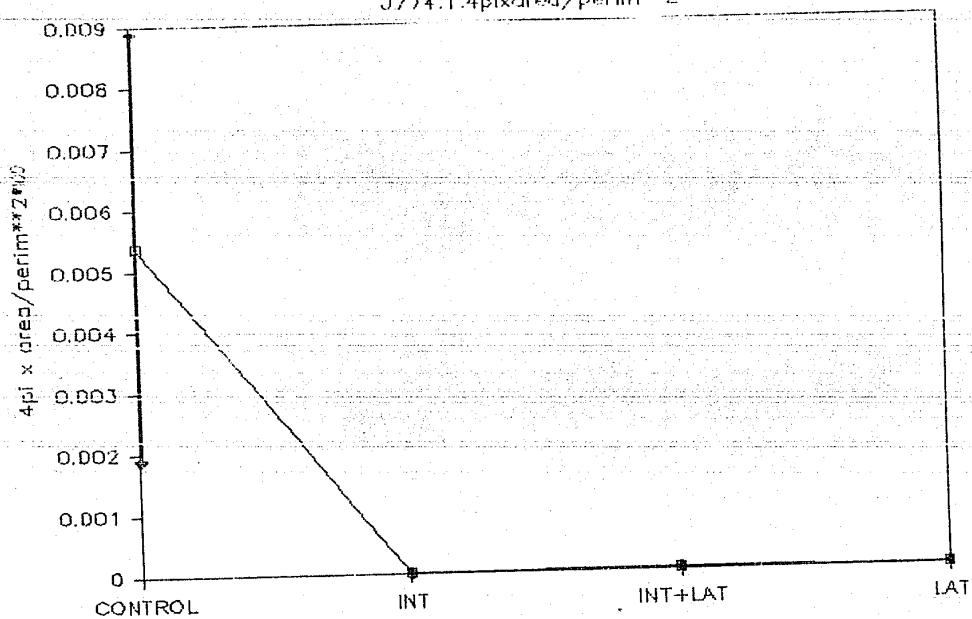
FIGURA 11

$$4\pi \times \text{area}/\text{perim.}^{**2}$$



Promedios +/- error estándar.

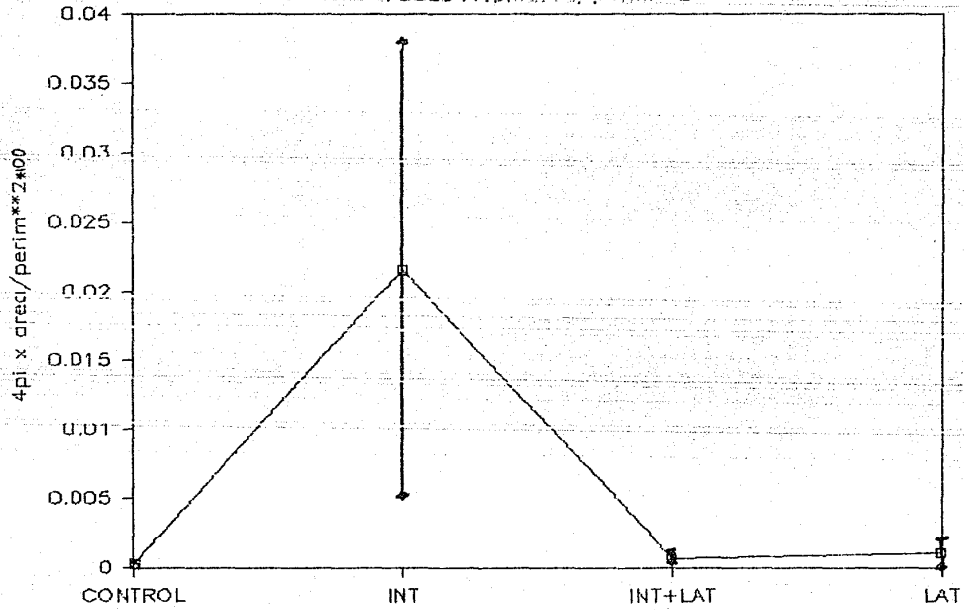
FIGURA 12  
J774.1.4pixarea/perim\*\*2



Promedios +/- Error estándar.

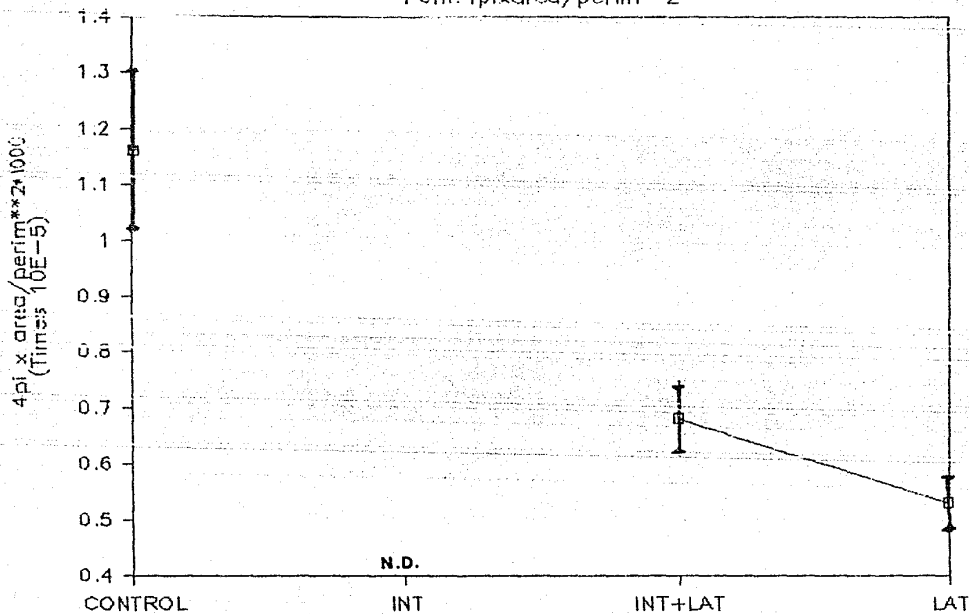
FIGURA 13

P388D1.4pixarea/perim\*\*2



# FIGURA 14

Peril. 4pixarea/perim\*\*2



N.D. No determinado

FIGURA 15

Estim.  $4\pi \times \text{area} / \text{perim}^2 \times 100000$

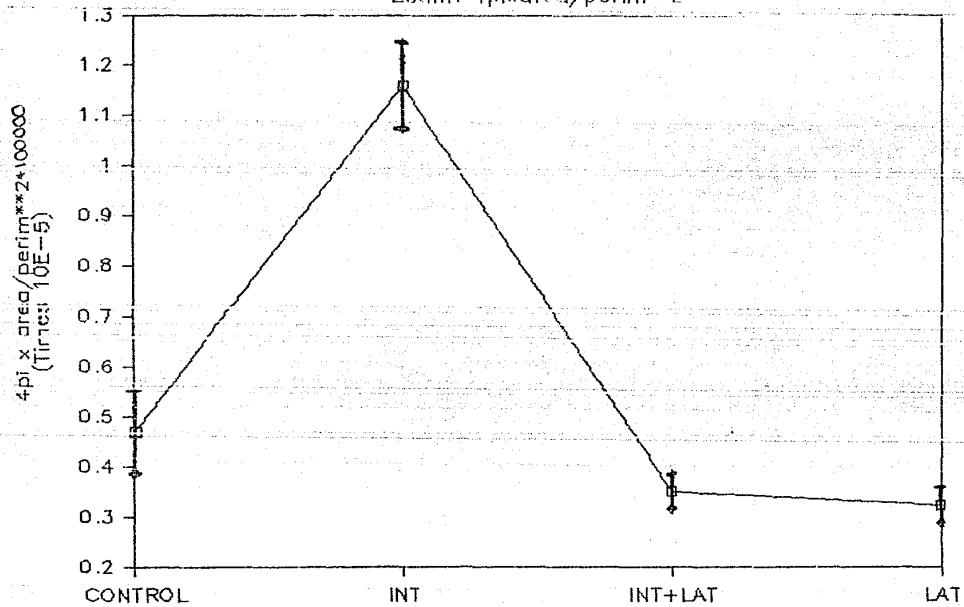


FIGURA 16

$4 \times \pi \times \text{AREA} / \text{PERIM}^2$

0774.1 + Prot.de M.tuberculosis.

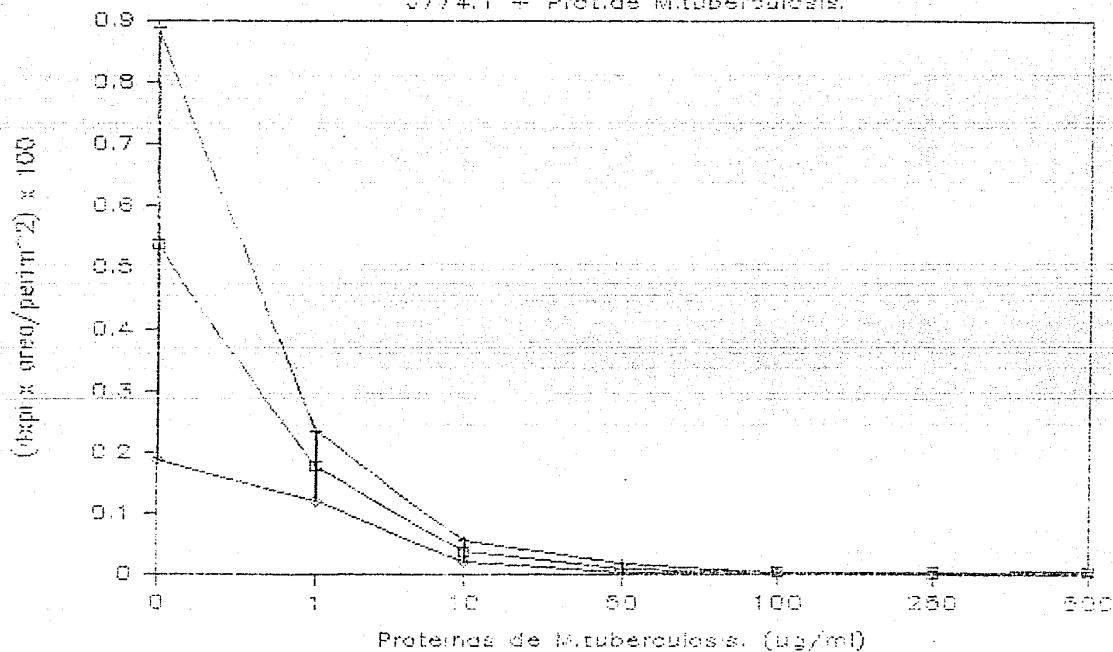


FIGURA 17  
Fractales .J774 1+prot.

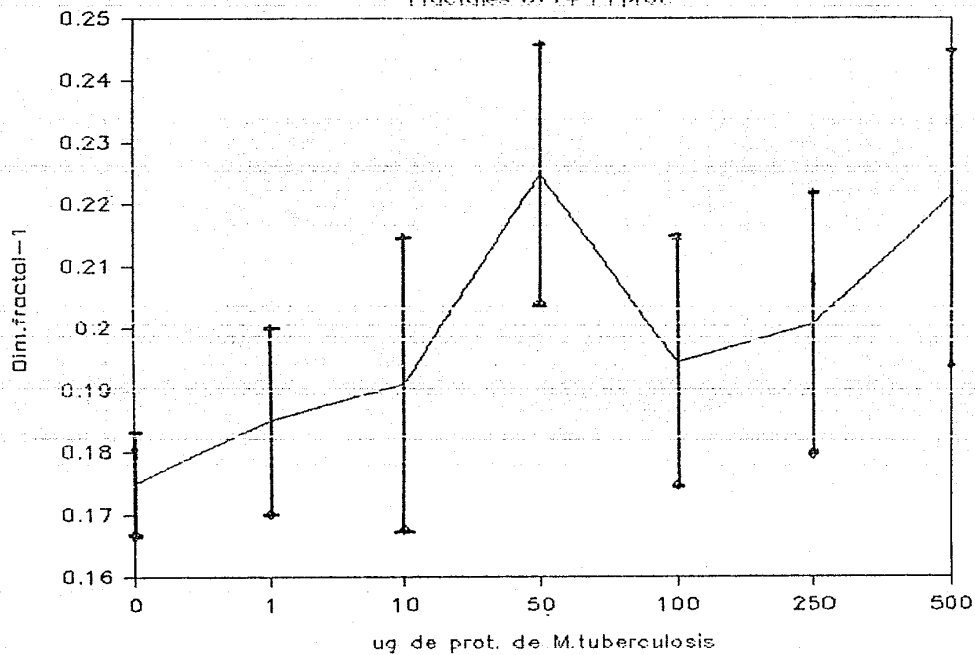


FIGURA 18

Fractales

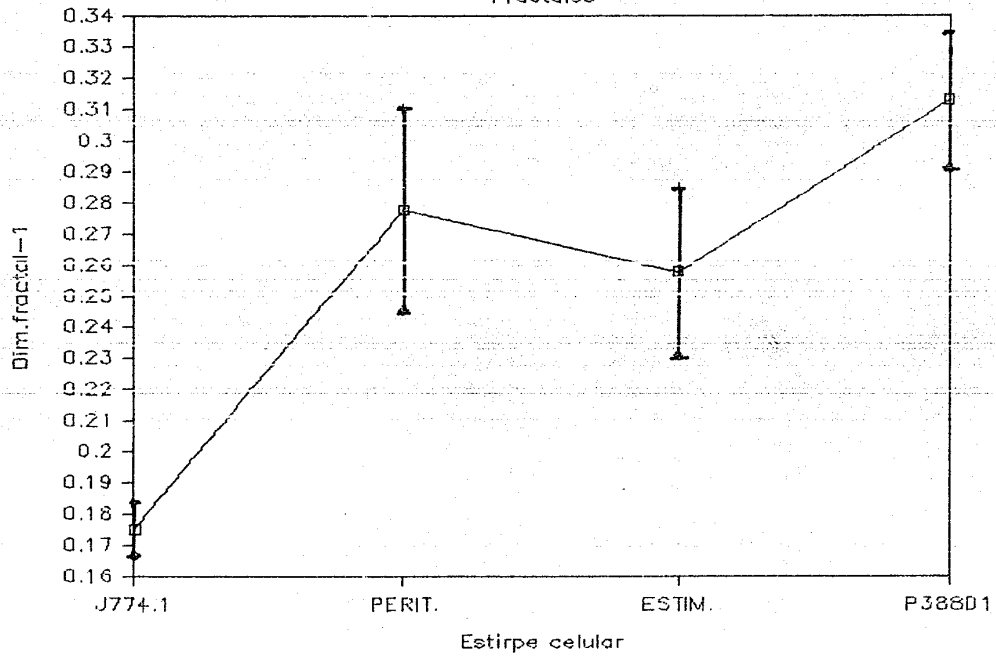




FIGURA 19

Fractales J774.1

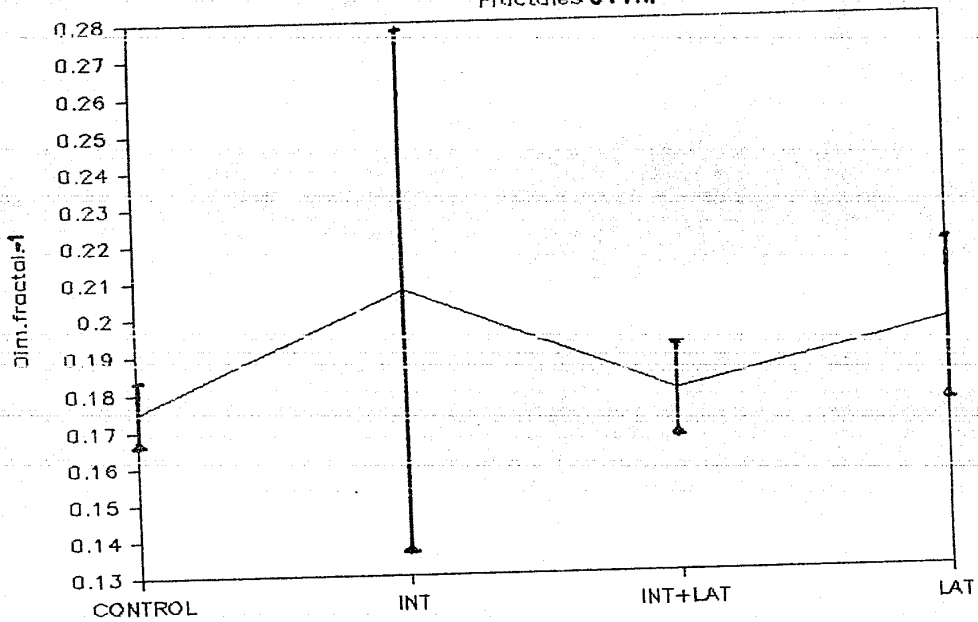


FIGURA 20

Fractales P388D1

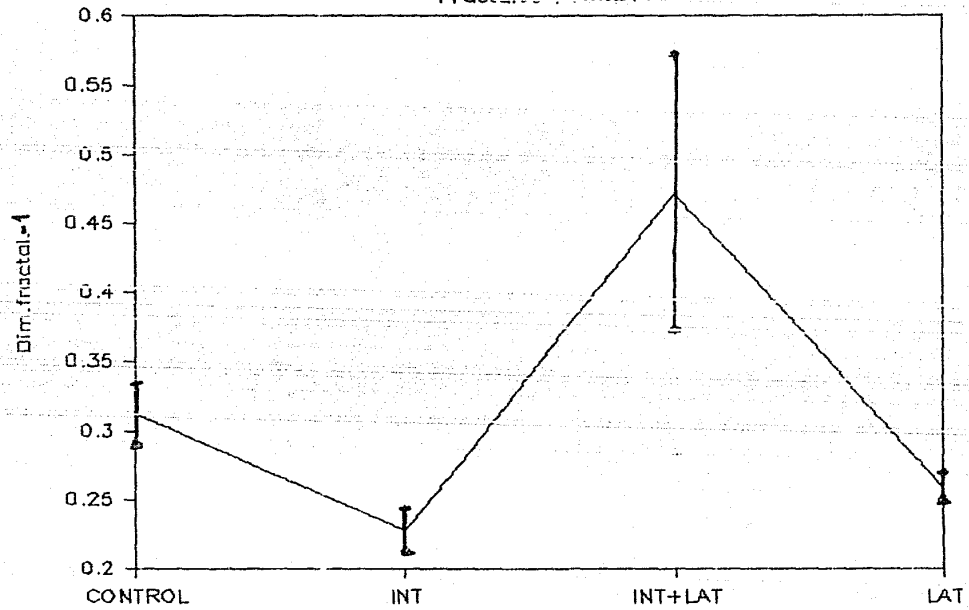


FIGURA 21

Fractales Perit.

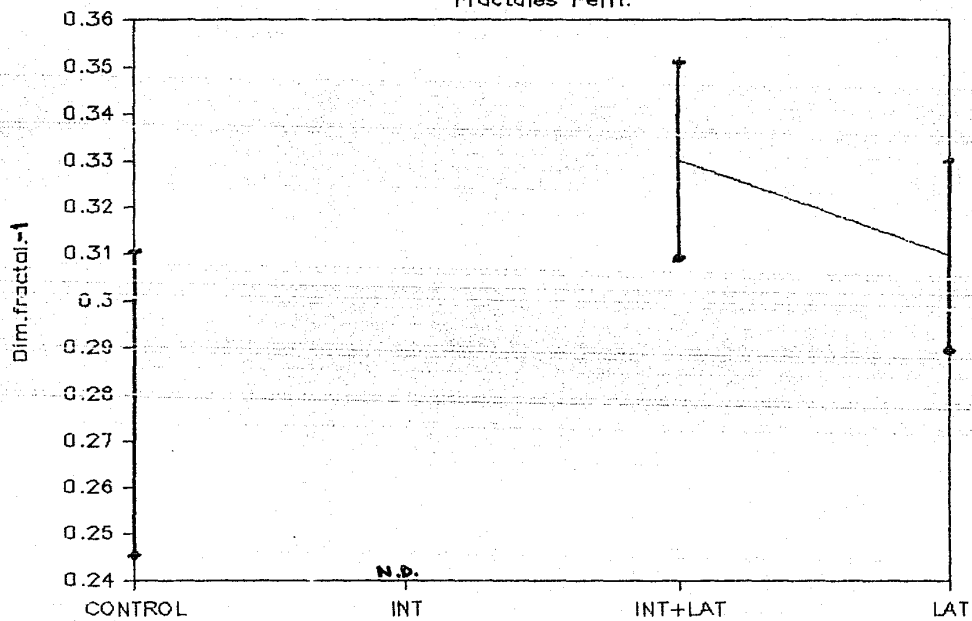
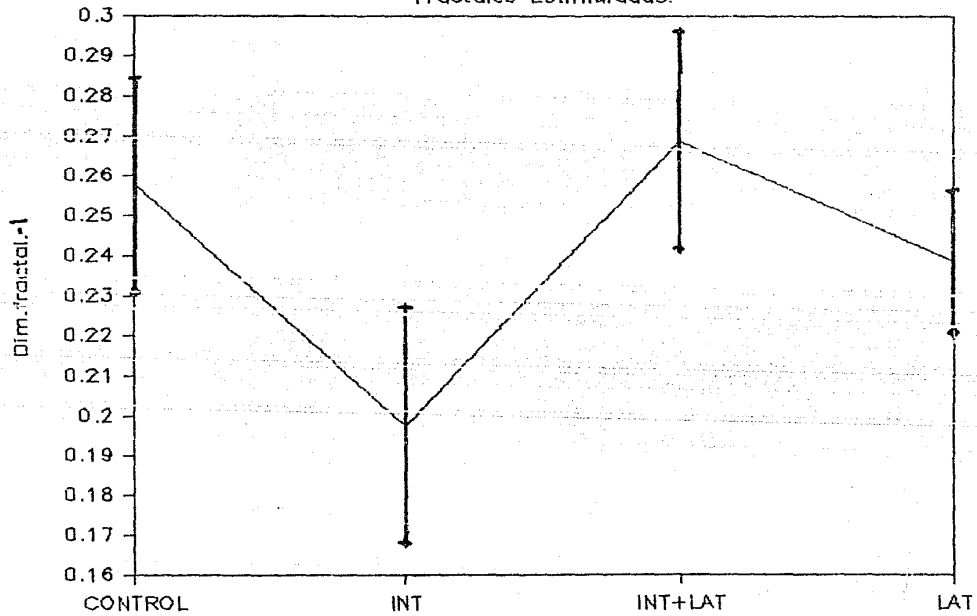


FIGURA 22  
Fractales Estimuladas.



## 6.0 Apéndice.

## 6.1 Tablas:

## TABLA (1)

## 6.11 PROTEINAS QUE INTERACTUAN CON ACTINA

Secuestradoras de actina monomérica:	
* Prorilina	(3)
* Depactina	(4)
Nucleadoras de filamentos, bloqueadoras y proteínas de desunión:	
* Gelsolina	(5)
* Villina	(6)
Proteínas de 'capping':	
* Fragmina	(7)
* Severina	(8)
* $\beta$ -Actinina	(9)
* Acumentina	(10)
Inhíbidoras de la fragmentación de filamentos:	
* Tropomiosinas	(11)
Formadoras de redes de actina en diversas estructuras:	
* Miosina	(12)
* Actin 'binding' protein	(13)
* Spectrina	(14)
* Fodrina	(15)
Proteínas formadoras de haces de actina	
* Fascina	(16)
* Fimbrina	(17)
* $\alpha$ -Actininas	(18)
Proteínas que unen microfilamentos con otras estructuras celulares:	
A plasmalema:	
* Spectrina	(19)
* Fodrina	(20)
* Vinculina	(21)
A microtúbulos:	
* Proteínas asociadas a microtúbulos	(22)

## TABLA(2)

## 6.12 PROTEINAS QUE INTERACTUAN CON MICROTUBULOS

Mediadoras de interacción de MT con otros componentes celulares y catalizadores en la formación de éstos (26):

En cerebro:

MAPs de alto peso molecular (=300.000)

MAP1

MAP2

tau MAPs 55.000-62.000 daltones

TABLA 6.13

CONDICION	AREA	FOURIER
CONTROL	5.3866E-03	1026.3018
1 UG/ML	1.7893E-03	643.6546
10 UG/ML	3.9177E-04	1287.6058
30 UG/ML	1.1196E-04	903.3777
100 UG/ML	4.8574E-05	826.3713
250 UG/ML	4.0640E-05	1.1753
500 UG/ML	5.8132E-05	708.3142

TABLA 6.14

CELULA	COND.	FRACTAL-1	AREA	FOURIER
5	1	0.1432	4.3058E-03	0.7939
6	1	0.2310	5.3754E-03	0.1856
7	1	0.1661	3.5021E-03	951.6228
8	1	0.1662	2.7084E-03	303.9941
9	1	0.2793	2.7043E-03	574.3100
19	1	0.1508	8.7116E-05	1609.6168
20	1	0.1623	5.3832E-05	1250.6847
29	1	0.1497	1.3457E-04	290.0598
93	1	0.2538	4.7822E-06	698.5526
111	1	0.2156	6.1476E-04	283.3760
134	1	0.1156	1.9060E-04	1117.0042
1	6	0.1492	1.8310E-01	0.9745
2	6	0.1403	5.6250E-02	1.1354
3	6	0.1600	3.3068E-02	286.6738
4	6	0.1681	1.2720E-02	1.8937
10	6	0.1267	2.1982E-03	400.5748
11	6	0.1267	4.6549E-04	1166.2317
12	6	0.2756	2.2462E-04	1.7194
13	6	0.2089	2.0910E-04	390.7786
14	6	0.2446	8.4057E-05	0.8100
15	6	0.1726	1.0505E-04	810.0607
16	6	0.1383	7.1595E-05	886.2678
17	6	0.0925	7.4559E-05	148.7072
31	6	0.1209	3.5943E-05	1911.4875
47	6	0.1370	3.0531E-05	1392.7102
56	6	0.2033	1.4087E-05	1987.0270
57	6	0.2330	2.0049E-05	1922.3579
58	6	0.1488	1.6715E-05	3016.5432
59	6	0.2212	1.9389E-05	2541.8754
60	6	0.2068	1.4444E-05	351.2442
61	6	0.0643	1.4659E-05	5236.8813
62	6	0.2740	2.3860E-05	1441.0195
63	6	0.1361	1.9642E-05	2112.7458
66	6	0.0930	1.0531E-06	2278.1567
67	6	0.1023	9.9263E-06	1001.1936
70	6	0.2391	8.4146E-06	1681.0370
71	6	0.1219	8.8342E-06	785.6348
73	6	0.1284	9.7751E-06	1346.3155
74	6	0.2077	8.0007E-06	1890.7443
101	6	0.0903	1.2996E-03	364.5626
108	6	0.0943	5.8872E-04	811.6866
109	6	0.2214	7.2936E-04	0.5526
112	6	0.1001	3.3051E-04	59.8288
113	6	0.2444	5.5093E-04	574.1512
114	6	0.2740	3.1004E-04	425.2418
116	6	0.2739	4.1875E-04	0.5118
117	6	0.1598	2.0064E-04	997.7767
118	6	0.0903	2.6290E-04	245.4280
119	6	0.2327	2.3065E-04	581.9337
120	6	0.2390	1.6705E-04	520.8105
121	6	0.2781	1.8986E-04	221.1027
122	6	0.1905	1.9902E-04	408.0847
123	6	0.1661	2.3972E-04	982.2068
124	6	0.1816	1.1788E-04	501.8861
125	6	0.2059	1.7267E-04	557.6154
126	6	0.1650	1.4054E-04	1545.7455
127	6	0.2329	2.1052E-04	183.3866
128	6	0.1485	1.7257E-04	1017.9679
129	6	0.1617	1.7254E-04	390.7785



131	6	0.0670	1.0478E-04	682.0383
132	6	0.0841	2.4562E-04	1193.9981
133	6	0.1780	1.5227E-04	1584.6622
135	6	0.3209	1.9179E-04	516.3788
481	6	0.2216	2.4285E-05	2733.8745
632	6	0.1532	2.1165E-06	3523.5520
633	6	0.1520	1.1455E-05	828.0123
88	10	0.3076	4.6038E-06	1328.0485
89	10	0.0542	4.1796E-06	1479.4501
92	10	0.2694	2.8322E-06	447.3713
94	10	0.1544	2.9143E-06	2527.7519
95	10	0.1201	1.9028E-06	1382.5441
96	10	0.3372	3.6870E-06	1917.4316
97	10	0.2181	1.8890E-06	2921.0537
99	10	0.1435	2.7602E-06	2048.1875
100	10	0.2850	1.7407E-03	145.8417
102	10	0.1591	1.0155E-03	853.2147
103	10	0.1694	7.3371E-04	0.8387
104	10	0.0945	9.8642E-04	397.5159
131	22	0.1877	2.8035E-04	3335.2480
636	22	0.3069	1.8116E-05	578.4803
479	23	0.2649	7.7289E-06	669.8106
583	23	0.2216	2.4391E-05	324.6185
584	23	0.1314	1.8932E-05	972.9388
585	23	0.2293	1.2866E-05	344.3393
586	23	0.2099	1.2161E-05	888.9006
587	23	0.1251	5.5063E-06	492.8618
589	23	0.1294	1.9894E-05	713.6187
590	23	0.1365	9.5845E-06	1160.3839
593	23	0.2190	6.4894E-06	609.8154
594	23	0.1346	1.4771E-05	542.3244
595	23	0.1775	1.2464E-05	2475.9475
596	23	0.1777	2.0710E-05	251.8149
598	23	0.1515	8.2727E-06	978.8728
600	23	0.2065	9.6647E-06	3010.7350
661	24	0.2619	1.4423E-05	286.5390
663	24	0.0894	1.0401E-05	1752.7215
664	24	0.2398	1.2231E-05	1415.8760
665	24	0.2727	7.7450E-06	2136.2800
666	24	0.2294	4.8808E-06	3110.5521
667	24	0.1537	3.1473E-06	12280.4453
668	24	0.1658	8.7889E-06	525.1511
670	24	0.1600	4.0430E-06	1780.3432
671	25	0.2585	1.1572E-05	1725.0867
673	25	0.4922	7.1173E-06	287.6397
674	25	0.5616	1.4804E-05	
675	25	0.1438	1.0560E-05	1610.1285
676	25	0.2535	1.1738E-05	585.0557
677	25	0.2610	1.1602E-05	597.2713
683	25	0.2275	7.0275E-06	931.3231
684	25	0.2140	1.1917E-05	698.7391
687	25	0.3340	8.5021E-06	440.0772
689	25	0.2158	7.2784E-06	347.9338
690	25	0.2647	1.2477E-05	290.3639
692	25	0.1492	2.7266E-05	2341.3027
694	25	0.2762	9.1199E-06	289.2363
732	27	0.4239	4.7538E-06	935.8294
733	27	0.3030	6.2666E-06	1102.6524
734	27	0.2860	9.4107E-06	1612.1552

735	27	0.4410	7.4067E-06	799.4675
736	27	0.2871	7.1331E-06	1109.1782
737	27	0.3553	9.2074E-06	313.2934
738	27	0.2394	3.2980E-06	2155.4426
739	27	0.3040	7.0000E-06	140.8607
740	27	0.3299	7.8023E-06	321.6638
741	23	0.3385	4.1432E-06	1503.6445
742	28	0.2489	7.9580E-06	424.7607
743	28	0.3722	5.5717E-06	752.9639
744	28	0.2540	3.9807E-06	368.5256
746	28	0.1503	7.1967E-06	395.3027
747	28	0.2264	4.6433E-06	1165.7945
748	28	0.2851	7.8960E-06	526.2868
772	28	0.3214	4.3944E-06	2701.3693
773	28	0.3545	2.2434E-06	3605.3052
774	28	0.2851	4.8197E-06	1214.6527
775	28	0.3701	2.0093E-06	430.2032
776	28	0.3229	7.8454E-06	429.2209
777	28	0.3647	4.9103E-06	286.6450
778	28	0.5160	2.6747E-06	287.3098
779	28	0.2714	4.3087E-06	327.4215
781	28	0.2529	7.2316E-06	287.7570
782	29	0.3030	1.7402E-06	287.4482
783	29	0.1765	6.6181E-06	411.2325
784	29	0.1352	6.9255E-06	3.4367
785	29	0.2188	1.6537E-06	457.6606
786	29	0.2565	3.8613E-06	1.8394
787	29	0.1636	4.0567E-06	465.8337
788	29	0.2777	2.9039E-06	1.6483
789	29	0.2140	1.3898E-05	473.2448
790	29	0.5089	5.0989E-06	0.4119
791	29	0.3694	2.7974E-06	370.5135
793	29	0.3699	6.5659E-06	
795	29	0.1953	3.9091E-06	1198.1214
804	29	0.1429	6.0195E-06	
805	29	0.2769	1.6467E-06	956.3060
78	50	0.2042	6.3523E-06	1670.6509
79	50	0.1846	5.5291E-06	1207.3784
80	50	0.1712	3.5515E-06	893.7642
82	50	0.2792	1.2228E-05	577.0390
84	50	0.2553	4.2477E-06	2327.2709
85	50	0.3964	4.4298E-06	292.9488
86	50	0.3267	4.6535E-06	455.0215
87	50	0.2329	4.2060E-06	1002.8473
105	50	0.2173	7.0256E-04	203.5020
115	50	0.1441	3.4078E-04	372.9239
130	50	0.1476	1.4329E-04	
26	100	0.2138	6.0469E-05	1468.2670
30	100	0.2056	5.4377E-05	983.4230
32	100	0.1909	8.1369E-05	128.6372
33	100	0.2157	5.0767E-05	624.2468
34	100	0.1758	4.6245E-05	1577.2215
35	100	0.1640	3.7663E-05	125.5522
36	100	0.1608	5.3497E-05	1139.6963
37	100	0.3576	3.0042E-05	623.8204
38	100	0.1099	2.6830E-05	697.9982
39	100	0.1508	4.4475E-05	894.8499
637	210	0.5455	8.2698E-06	280.5482
638	210	0.1677	1.6456E-05	1639.0968

638	210	0.1877	1.6456E-05	1639.0963
639	210	0.1269	1.1568E-05	835.8872
641	210	0.2539	1.6775E-05	1321.4160
642	210	0.1793	1.3863E-05	1787.1508
647	210	0.1368	1.1409E-05	143.0722
648	210	0.2148	7.6235E-06	405.1137
649	210	0.1162	1.2302E-05	2083.9975
650	210	0.1971	1.4232E-05	668.0539
651	210	0.0762	1.4508E-05	2306.1625
652	210	0.1163	1.1294E-05	1748.6892
654	210	0.2587	7.3230E-06	1856.9776
655	210	0.2231	9.9056E-06	1212.1949
656	210	0.1309	7.0735E-06	1802.5650
821	211	0.4245	5.5367E-06	481.7554
822	211	0.2104	3.7748E-06	612.4002
823	211	0.1429	2.8273E-06	433.3913
824	211	0.2073	1.5927E-06	458.7876
825	211	0.4245	4.4822E-06	287.3155
826	211	0.1912	5.4237E-06	2.7824
827	211	0.1459	2.3650E-06	738.1174
828	211	0.2870	5.0058E-06	350.4286
830	211	0.4006	1.9214E-06	448.2246
990	211	0.2147	2.6130E-06	1615.0477
991	211	0.2993	3.5372E-06	1807.6494
992	211	0.2782	3.1107E-06	651.8317
831	212	0.1267	5.4538E-06	341.4424
832	212	0.1517	5.1345E-07	877.6743
833	212	0.4326	3.9809E-06	187.6928
834	212	0.1963	1.3964E-06	653.7332
835	212	0.1401	6.1123E-06	237.4433
836	212	0.1739	8.4416E-07	624.9195
837	212	0.2259	2.7396E-06	726.3417
838	212	0.2456	1.3301E-06	1027.2280
839	212	0.1025	5.8407E-06	992.2355
840	212	0.1697	2.8081E-06	32.4215
841	212	0.2150	1.3141E-06	1037.7166
842	212	0.3553	1.9846E-06	580.0475
843	212	0.3643	2.6607E-06	280.9954
844	212	0.2840	6.2226E-06	694.4930
845	212	0.2362	1.5079E-06	797.5029
846	212	0.0840	5.1966E-07	1259.2150
847	212	0.3101	5.0267E-06	0.8323
848	212	0.2466	3.9220E-06	288.5639
849	212	0.3153	3.8058E-06	943.4415
851	212	0.1700	5.1216E-06	1567.5445
853	212	0.3608	3.2224E-06	1505.1347
854	212	0.3200	3.5435E-06	2311.5895
855	212	0.2252	3.5269E-06	1293.5600
856	212	0.2102	4.2459E-06	191.6421
870	213	0.2958	3.1392E-04	1096.1292
871	213	0.2613	3.1790E-04	917.2399
872	213	0.2141	4.5485E-05	145.1335
873	213	0.2445	5.1401E-04	868.5604
874	213	0.2580	4.5139E-04	467.1157
875	213	0.4502	3.8114E-04	0.7902
876	213	0.2899	2.9721E-04	1417.8903
877	213	0.4752	3.8797E-04	2131.5883
878	213	0.3619	2.4873E-04	1853.6772
879	213	0.3686	3.4628E-04	415.6253

880	213	0.3048	4.0582E-06	1267.3573
881	213	0.3059	1.7901E-06	660.1778
989	213	0.2386	2.3786E-06	250.3591
907	214	0.2997	1.6133E-06	620.4887
908	214	0.1337	3.7824E-06	690.8337
909	214	0.1852	4.2069E-06	877.3282
910	214	0.1243	1.1825E-03	812.0979
911	214	0.1969	1.2783E-03	303.3224
913	214	0.2113	2.5389E-03	286.4615
914	214	0.4284	8.3529E-03	324.1803
915	214	0.2657	7.0590E-03	260.3655
916	214	0.1775	4.1223E-05	1030.8991
917	214	0.2833	4.4864E-03	249.9758
918	214	0.1336	6.0456E-02	675.3839
919	214	0.2031	2.8354E-02	633.9557
920	214	0.1736	4.0000E-01	947.2833
921	214	0.3367	1.7341E-04	609.1543
922	214	0.1913	3.7007E-04	1015.2005
923	214	0.2009	3.3270E-04	914.8723
924	214	0.2896	4.4360E-04	572.5426
925	214	0.3052	1.4892E-04	2696.8747
926	214	0.1838	3.3521E-04	2517.5237
927	214	0.2416	2.3705E-04	1110.1659
928	214	0.3165	1.1087E-04	1121.8511
927	214	0.2179	2.3286E-04	1122.2019
930	214	0.2161	5.6233E-05	882.3786
931	214	0.1332	6.8756E-05	2431.3884
932	215	0.2387	5.4141E-05	767.7438
934	215	0.3024	1.1022E-04	291.6157
935	215	1.3126	3.6419E-05	2831.5805
936	215	0.2372	5.9342E-05	929.2045
937	215	0.2692	4.1037E-06	1189.9690
938	215		3.5313E-06	719.4834
973	215	0.2379	4.2239E-04	531.1326
975	215	0.4155	1.6415E-03	3438.4961
974	215	0.1050	3.1499E-03	2101.6269
977	215	0.2474	2.4779E-03	4532.1284
979	215		3.0393E-04	1832.6604
980	215	0.3378	3.4137E-03	508.9360
982	215	0.2001	1.6413E-06	3023.2241
983	215	0.1129	2.3263E-06	2149.9265
984	215	0.1768	2.2572E-06	1803.6015
986	215	0.2022	3.1774E-06	2179.5527
988	215		2.8825E-06	575.5442
942	216	0.2801	2.4832E-06	2021.2679
943	216	0.2455	5.0037E-05	528.2703
944	216	0.2929	5.2677E-06	657.3563
945	216	0.1209	3.9994E-06	1467.3656
946	216	0.2793	4.0635E-06	1750.6705
947	216	0.2829	3.5310E-06	1846.6656
949	216	0.2181	1.5984E-06	3431.0927
949	216	0.2724	2.1482E-06	790.4113
950	216	0.2710	3.9121E-06	2272.1899
951	216	0.3048	2.3091E-06	1389.7792
952	216	0.2684	2.2645E-06	1383.7174
953	216	0.2572	9.6122E-05	2649.4768
954	216	0.2732	4.9187E-05	470.8722
955	216		1.0250E-06	322.0712
955	216	0.1185	3.6239E-06	2206.4116

957	216	0.0840	4.5548E-06	1469.9143
958	216	0.0921	2.3069E-02	1764.0085
959	216	0.2079	3.2836E-06	812.5521
960	216	0.2211	3.5924E-06	3184.8601
961	216	0.2735	3.1068E-06	1427.5255
963	216	0.1865	1.1978E-06	1461.4524
964	216	0.2390	1.2450E-06	2312.5146
23	250	0.2981	8.7613E-05	1.1753
24	250	0.7373	5.0389E-05	
22	250	0.1840	7.0142E-05	1441.4697
45	250	0.0758	2.2067E-05	3722.2266
43	250	0.1208	3.2757E-05	2546.8291
49	250	0.2924	4.2492E-05	327.1081
50	250	0.2243	3.2652E-05	1092.9821
51	250	0.1615	2.5996E-05	564.5470
52	250	0.3126	2.9792E-05	1129.5776
53	250	0.1524	3.7880E-05	583.3575
54	250	0.2002	3.0244E-05	327.0345
55	250	0.1623	2.3059E-05	3961.0715
18	500	0.0662	5.6515E-05	1344.9572
21	500	0.2025	5.5197E-05	227.2225
22	500	0.2449	9.0599E-05	282.6550
25	500	0.1794	5.8178E-05	696.9824
27	500	0.1655	8.5939E-05	703.9213
40	500	0.2473	3.6247E-05	572.0581
41	500	0.2323	4.0706E-05	1174.2146
42	500	0.3620	6.1762E-05	517.2426
43	500	0.1723	5.7896E-05	453.8214
44	500	0.1884	3.6666E-05	842.9786
46	500	0.3534	2.9748E-05	972.6038

\*(vease Tabla 6.14 siguiente página.)

TABLA 6.14  
(viene de la Tabla 6.14)

	fractales	area	fourier
tipo	condic	media	desv.std.
J774.1	0	0.1750	0.0618
	1	0.1851	0.0494
	10	0.1910	0.0844
	50	0.2248	0.0690
	100	0.1945	0.0625
	250	0.2006	0.0727
	500	0.2214	0.0813
	CONTROL	0.1750	0.0618
	INT	0.2074	0.0225
	INT+LAT	0.1795	0.0459
	LAT	0.1969	0.0597
Perit.	CONTROL	0.2779	0.1169
	INT+LAT	0.3097	0.0807
	LAT	0.2578	0.1007
Estim.	CONTROL	0.1975	0.1103
	INT	0.2233	0.0976
	INT+LAT	0.2387	0.0868
	LAT	0.3130	0.0787
P388D1	CONTROL	0.2279	0.0743
	INT	0.4720	0.4210
	INT+LAT	0.2592	0.0450

## 6.2 Programas:

## 6.2.1 PROGRAM AREAS CELULARES

```

Program cell_ar
#long+s+ar**95 path, arch, cells, arch1
real dx, dy, long, s, x_1, x_2, y_1, y_2, area
integer*4 eof, eof1
parameter (path='/users/dlusers/pr/SISTEMA/dennise
*celulas/');
cells=path//'cells'
open(1, status='old', file='cells')
do while (eof.eq.0)
  read(1,*)arch1
  open(3, status='old', file=arch1)
  read(3, *, iostat=eof1)x_1, y_1
  y_1=y_1+10
  x_1=x_1+10
  srea=0
do while (eof.eq.0)
  read(3, *, iostat=eof1)x_2, y_2
  if(eof.eq.0)then
    x_2=x_2+10
    y_2=y_2+10
    dx=x_2-x_1
    dy=y_2-y_1
    dx=dx**2
    dy=dy**2
    s=dx+dy
    long=long+s ; AREA=((x2-x1)*y2)=AREA)
    area=(s*y_2)+area
    y_1=y_2
    x_1=x_2
  end if
end do
if(area.lt.0)then
area=abs(area)
end if
area=area/long**2
area=area*4*pi
print*, arch, area
close(3)
end if
end do
end

```

## 6.2.2 PROGRAM DIMENSION FRACTAL

```

Programa fractales (finalcut)
Program fractales
dimension x(0:1000), y(0:1000)
Character*90 arch, arch2, res, arch1
integer*4 ieof
open(4, status='old', file='/users/dlusers/pr/SISTEMA/de
*nnise/celulas/cforms')
open(1, status='new', file='/users/dlusers/pr/SISTEMA/den
*niisc/resultados/val_fra')
do while (ieof.eq.0)
read(4, fmt='a9', iostat=ieof) arch
if (ieof.eq.0) then
res='r'//arch
arch1=users/dlusers/pr/SISTEMA/dennise/celulas/
*//arch
open(2, status='old', file=arch1)
res='/users/dlusers/pr/SISTEMA/dennise/resultados/'
*//r//arch
open(3, status='new', file='res')
write(3, *) res
do 1 i=0, 999
read(2, *, end=80) x(i), y(i)
1 continue
stop
80 npuntos=i
diner=.3
dx=diner
pm=cpm(dx, npuntos, x, y)
do while (pm.ne.0)
tt=log(dx)
pp=log(pm)
write(3, *) tt, pp
dx=dx+diner
pm=cpm(dx, npuntos, x, y)
11 format(f10.3, 1x, f10.3)
end do
close(2)
close(3)
ss=0
call val__frac (res, ss)
write(1, *) arch, ss
endif
end do
close(4)
close(1)
end

function cpm(dx, npuntos, x, y)
real x(0:1000), y(0:1000)
cpm=0
do j=0, npuntos-1

```



```

i=j
perim=0
call busca(i,k,d,npuntos,dx,j,x,y)
  perim=perim+d
  do while((d.ge.dx).and.(k.ne.j))
    i=k
    call busca(i,k,d,npuntos,dx,j,x,y)
    perim=perim+d
  end do
return
end

subroutine val_frac (res,ss)
dimension x(500),y(500)
c:=pcrater**37 res.nom
open (7,status='old',file=res)
read(7,*,err=100,end=80) x(11), y(11)
2 continue
80 xj=0
  xk=0
  x1=0
  xm=0
  r2=0
  do 1 i=1,n
    xj=xj+x(i)
    xk=xk+y(i)
    x1=x1+(x(i)**2)
    xm=xm+(y(i)**2)
    r2=r2+(x(i)*y(i))
1 continue
  b=((n*r2)-(xk*xj))/((n*x1)-(xj**2))
  a:=(xk-(b*xj))/n
  ss=(1-b)
100 close(7)
return
end

```

## 6.2.3 PROGRAM TRANSFORMADA DE FOURIER

```

Program fourier
dimension x(1000), y(1000), ang(1000), dist(1000)
dimension F(1000), P(1000), G(1000)
real long, l
integer*4 eof, eof1
character*90 archi, archo, archol
pi=3.14159
open (1, status='old', file='users/diusers/pr/SISTEMA/
*dennise/celulas/fforms')
do while (eof1.eq.0)
  read (1, fmt='(a9)', iostat=eof1) archi
  if (eof1.eq.0) then
    archo='users/diusers/pr/SISTEMA/dennise/celulas/
*'&&archi
    open (2, status='old', file=archo)
    archol='users/diusers/pr/SISTEMA/dennise/
*resultados/ft'&&archi
    open (3, status='new', file=archol)
    i=0
    do while (eof.eq.0)
      i=i+1
      read(2, *, iostat=eof)x(i), y(i)
    end do
    eof=0
    x(i)=x(1)
    y(i)=y(1)
    long=0
    it=i-1
    do n=1, it
      dx=x(n+1)-x(n)
      dy=y(n+1)-y(n)
      dist(n)=sqrt((dx*dx)+(dy*dy))
      long=long+dist(n)
      if (dx.gt.0) then
        if (dy.eq.0) then
          ang(n)=0
        end if
        if (dy..gt.0) then
          ang(n)=atan (dy/dx)
        end if
        if (dy.lt.0) then
          ang(n)=360-atan(dy/dx)
        end if
      end if
      if (dx.lt.0) then
        if (dy.eq.0) then
          ang(n)=180
        end if
        if (dy.gt.0) then
          ang(n)=180-atan (dy/dx)
        end if
      end if
    end do
  end do
end program

```

```

        if (dy.lt.0)then
            ang(n)=180+atan(dy/dx)
        end if
    end if
    if(dx.eq.0)then
        if (dy.lt.0)then
            ang(n)=270
        end if
        if (dy.gt.0)then
            ang(n)=90
        end if
        if (dy.eq.0)then
            es el mismo punto
        end if
    end if
end do
dist(1)=dist(1)*360/long
do n=2,it
    dist(n)=dist(n-1)+(dist(n)*360/long)
    ang(n-1)=ang(n)-ang(n-1)
end do
F(n)=0
G(n)=0
P(n)=0
s1=.003
do m=1,100
do n=1,it
    parte real:
    P(n)=$((ang(n)*cos(2*pi*s1*dist(n)))+P(n))
    parte imaginaria:
    G(n)=$((ang(n)*sin(2*pi*s1*dist(n)))+G(n))
    espectro de la función:
    F(n)=sqrt((P(n)**2)+(G(n)**2))
end do
S(m)=-s1
R(m)=F(it-1)
s1=.003+s1
end do
do m=1,100
    cont=cont+abs(R(m))
    if((n.le.it/3).and.(n.gt.it/3-1))then
        a=cont/33+a
        cont=0
    else if
    else if ((n.le.it/3*2).and.(n.gt.it/3*2-1))then
        b=cont/33+b
        cont=0
    else if ((n.le.it).and.(n.gt.it-1))
        c=cont/34+c
        cont=0
    end if
    end do
    escalar=(a+b)/c
    write(3,*)arch1,escalar

```

```
close(2)
close(3)
end if
end do
end
```

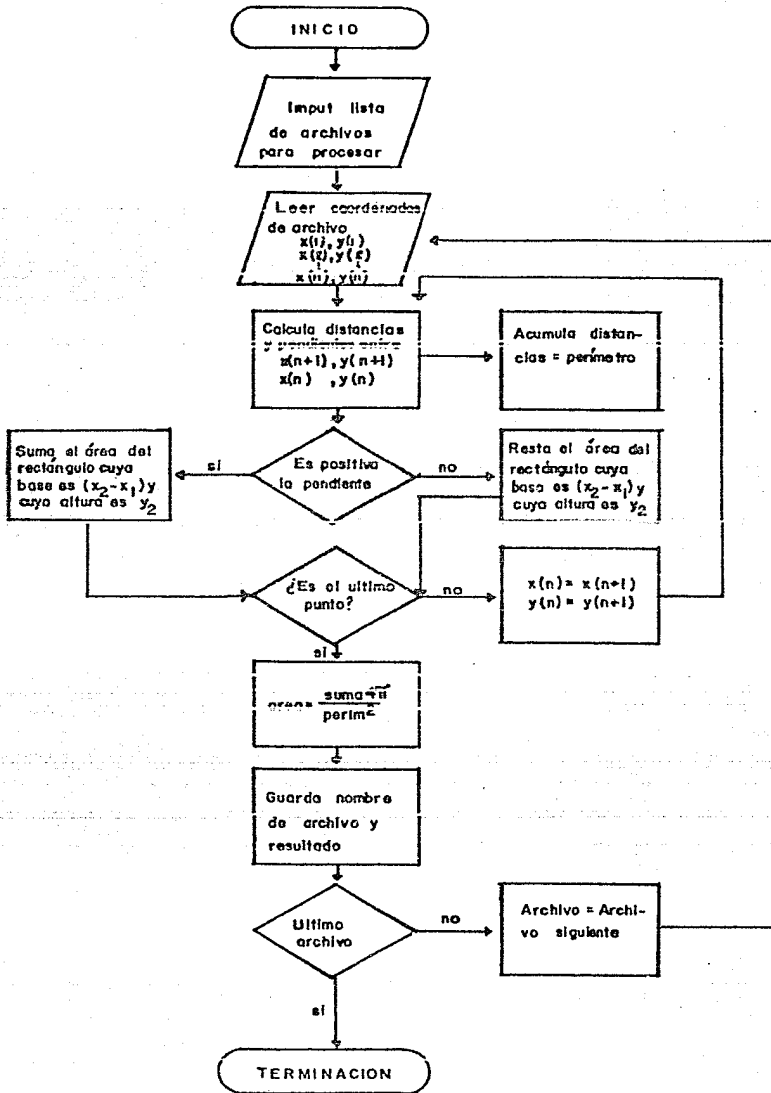
## 6.2.4 PROGRAM MENU

```

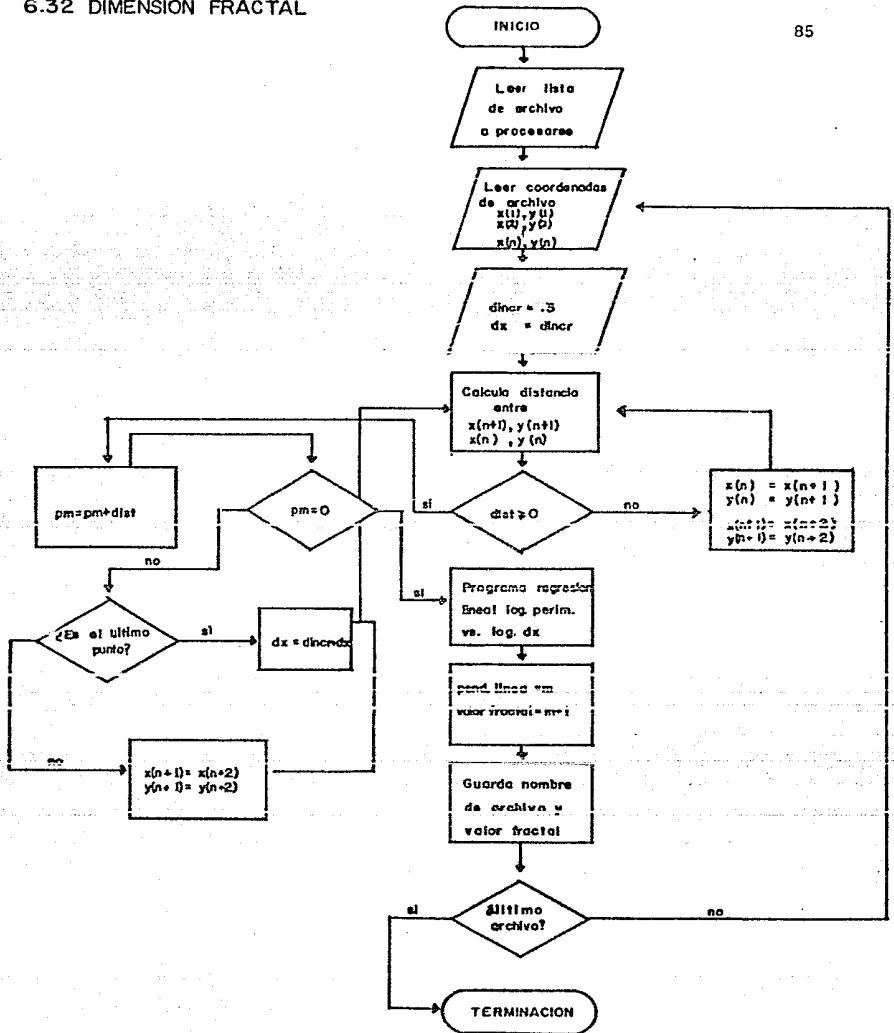
Program menu
opción="k"
while ` $opción != "s" ` $
do
clear
echo'          MENU PRINCIPAL DE MORFOLOGIA
echo'
echo'
echo'      D.-Digitalizar
echo'
echo'      F.-Fourier
echo'
echo'      A.-Areas
echo'
echo'      R.-Fractales
echo'
echo'      C.-Comando
echo'
echo'      S.-Salir
echo'
echo' "seleccione una opción : qc"
read opción
case $opción in
D)map ;;
F)fourier ;;
A)echo'
    echo "teclée el archivo de salida de areas :
    qc"
    read archi
    cell>/users/pr/dennise/resultados/$archi ;;
R)nohub finalout & ;;
C)echo "command : qc"
    read command
    $ command
    read cont ;;
esac
done
exit

```

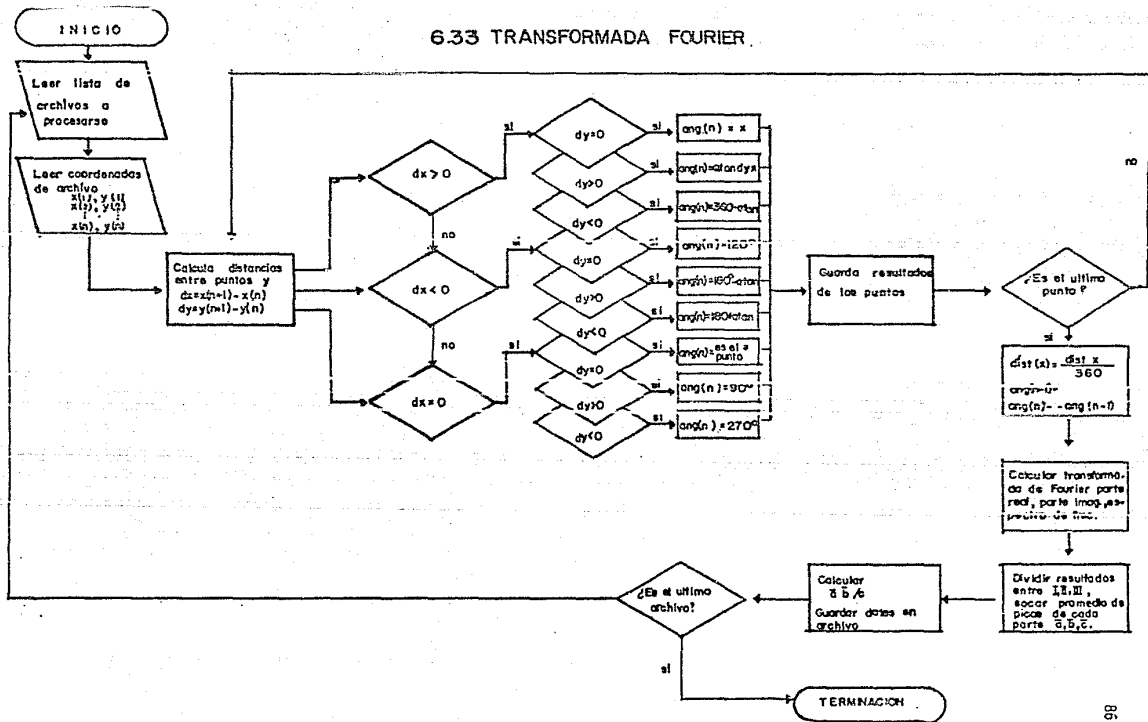
# 6.31 411 AREA / PERIMETRO<sup>2</sup>



### 6.32 DIMENSION FRACTAL



### 6.33 TRANSFORMADA FOURIER





## 7. 0 BIBLIOGRAFIA

- ( 1 ) Stossel, T. P. 1984  
Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix.  
J. Cell. Biol 99 (1): 155 - 215
- ( 2 ) Vanderkerckhove, J. and Weber, K. J. 1978  
At least six different actins are expressed in a higher mammal:  
an analysis based on the aminoacid sequence of the aminoterminal  
peptide J. Mol. Biol 126: 783 - 802
- ( 3 ) Carlsson, L., Nyström, L. E., Sundkvist, J., Markey, F., Lindberg,  
U. 1977  
  
Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular  
weight protein in non-muscle cells.  
J. Mol. Biol 115: 465 - 483
- ( 4 ) Mabuchi, I. 1983 An Actin - depolymerizing protein (depaectin) - -  
from starfish oocytes: properties and interactions with actin. - -  
J. Cell. Biol 97: 1612 - 1621
- ( 5 ) Yin, H. L., and Stossei, T. P. 1979.  
Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin,  
a calcium-dependent regulatory protein Nature 281: 583 - 586
- ( 6 ) Craig, S. W., and Powell, L. D., 1980  
Regulation of actin polymerization by villin, a 95,000 dalton - -  
cytoskeletal component of intestinal brush borders. Cell. 22: 739-  
746
- ( 7 ) Hinssen, H. 1981  
An actin modulating protein from Physarum polycephalum. Isolation  
and purification. Eur. J. Cell. Biol. 23: 225 - 233

- ( 8 ) Yamamoto, K., Pardee J. D., Reidler, J. Stryer, L. and Spudich J. A. 1982  
Mechanism of interaction of Dictyostelium severin with actin - filaments. J. Cell. Biol 95: 711 - 719
- ( 9 ) Maruyama, K., an Sakai, H. 1981  
Cell beta-actinin, an accelerator of actin polymerization, isolated from rat kidney cytosol.  
J. Biochem 89: 1337 - 1340
- ( 10 ) Southwick, F. S., Tatsumi, N., and Stossel, T. P. 1982  
Actumentin, an actin modulating protein of rabbit pulmonary - - macrophages. Biochemistry 24: 6321 - 6326
- ( 11 ) Cote, G. P., Smillie, L. B. 1981  
The interaction of equine platelet tropomyosin with skeletal - muscle actin. J. Biol. Chem 256: 7257 - 7261
- ( 12 ) Trinick, J. and Offer, G. 1979  
Cross linking of actin filament by heavy meromyosin. J. Mol. - Biol 133: 549 - 556
- ( 13 ) Stossel, T. P. and Hartwig, J. H. 1975  
Interactions of actin, myosin and an actin-binding protein of rabbit alveolar macrophages. Macrophage myosin Mg-adenosine - triphosphatase activity requires a cofactor for activation by actin. J. Biol. Chem 250: 5706 - 5712
- ( 14 ) Branton, D., Cohen, C., Tyler, J. 1981  
Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. Cell 24: 24 - 32
- ( 15 ) Glenney, J. R. Jr. and Glenney P. 1983  
Podrin is the general spectrinlike protein found in most cells whereas spectrin and the tw-protein have a restricted distribution. Cell 34: 503 - 512

- ( 16 ) Bryan, J. and Kane, R. E., 1978  
Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel. *J. Mol. Biol* 125: 207 - 204
- ( 17 ) Bretscher, A. 1981  
Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6849 - 6853
- ( 18 ) Mimura, N., Asano, A. 1979  
Ca-sensitive gelation of actin filaments by a new protein factor.  
*Nature* 282: 44 - 48
- ( 19 ) Branton, D., Cohen, C., Tyler, J. 1981  
Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte - membrane. *Cell* 24: 24 - 32
- ( 20 ) Glenney, J. R., Jr. Glenney, P., Weberik. 1983  
The Spectrin related molecule tw 260/240, crosslinks the actin bundles of the microvillus rootlets in the brush borders of intestinal epithelial cells, *J. Cell. Biol* 96: 1491 - 1496
- ( 21 ) Geiger, B. Avnur, Z., Rinnerthaler, G., Hinssen, H., Small, V. - J. 1984  
Microfilament organizing-centers in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion *J. - Cell. Biol.* 99 ( 1.PT2 ) : 93 - 91
- ( 22 ) Pollard, T. D., Selden, S. C., and Maupin, P. 1984  
Interaction of actin filaments with microtubules. *J. Cell. Biol.* 99 ( 1. PT2 ) 335 - 375
- ( 23 ) Stossel T. P. 1984  
Contribution of actin to the Structure of the Cytoplasmic Matrix *J. Cell Biol.* 99 ( 1. PT2 ) 155 - 215

- ( 24 ) Brinkley, B. R. 1982  
The cytoskeleton: A perspective. *Methods in Cell Biology* 24: 1-8
- ( 25 ) Steinert, P. M., Jones, J. C. R. and Goldman, R. D. 1984  
Intermediate filaments. *J. Cell. Biol* 99 ( 1PT2 ) 22S - 27S
- ( 26 ) Dustin, P. 1980  
*Microtubules Sci. Am.* 243 ( 2 ): 66- 76
- ( 27 ) Ikeue, S., Sato, H. 1967.  
Cell motility by labile association of molecules: The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. - *J. Gen. Physiol.* 50: 259 - 292
- ( 28 ) Alberts, B., Bray, D., Lewis, I., Raff, M., Roberts, K. Watson, J.. 1983  
*Mol. Biology of the Cell.*  
Garland Publishing, Inc.
- ( 29 ) Hartwig, J. H. and Stossel, T. P. 1982  
Macrophages: Their Use in Elucidation of the cytoskeletal roles of actin. *Methods in Cell. Biol* 25: 201 - 225
- ( 30 ) Beaupain, K., Millard, Falcoff, E., 1986  
Effects of human recombinant interferons-Alpha 2, -Beta and - Gamma on Growth and Survival of Human Cancer Nodules maintained in continuous organotypic culture. *Eur. J. Cancer Clin Oncol.* 22 ( 2 ) : 141 - 149
- ( 31 ) Virelizier, J. L., Arenzana - Seisdedos, F., 1985  
Immunological Functions of macrophages and their regulation - by interferons. *Med. Biol.* 63 ( 4 ) : 149 - 159
- ( 32 ) Kulesh, D. A., Greene J. J. 1986  
Shape-dependent regulation of proliferation in normal and malignant human cells and its alteration by interferon. *Cancer Res.* 46 ( 6 ) : 2793 - 2797

- ( 33 ) Wang, E., Michl, J., Pfeffer, L. M., Silverstein, S., Tamm, -  
J. 1984  
Interferon Suppresses Pinocytosis but Stimulates  
Phagocytosis in Mouse Peritoneal macrophages. Related changes in  
Cytoskeletal organization. J. Cell. Biol. 98: 1328 - 1341
- ( 34 ) Gresser, J. 1977  
On the varied biologic effects of interferon. Cell immunol 34:  
406 - 415.
- ( 35 ) Goldman R. 1976  
The effect of Cytochalasin B and colchicinin Con-A induced - -  
vacuolation in Mouse Peritoneal Macrophages. Exp. Cell Res 99: -  
385 - 394
- ( 36 ) Alberts, B., Bray, D., Lewis, I., Raff, M., Roberts, K. Watson,  
J. . 1983  
Mol. Biology of the Cell.  
Garland Publishing, Inc.
- ( 37 ) Alberts, B., Bray, D., Lewis, I., Raff, M., Roberts, K. Watson,  
J. . 1983  
Mol. Biology of the Cell.  
Garland Publishing, Inc.
- ( 38 ) Goldman R. 1976  
The effect of Cytochalasin B and Colchicin on Con-A induced  
vacuolation in Mouse Peritoneal Macrophages. Exp. Cell Res 99: -  
385 - 394
- ( 39 ) Phaire-Washington, L., Silverstein S., Wang, E. 1980  
Phorbol Myristate Acetate Stimulates Microtubule and 10 nm Fila-  
ment Extension and lysosomal redistribution in mouse macrophages.  
J. Cell. Biol 86: 641 - 655
- ( 40 ) Alberts, B., Bray, D., Lewis, T., Raff, M., Roberts, K. Watson,  
J.. 1983  
Mol. Biology of the Cell.  
Garland Publishing, Inc.

- ( 41 ) Beddow, J. R., Meloy, T. P. 1977  
Advanced particulate morphology. CRC. Press. Inc.
- ( 42 ) Satoh, H., Veda, T., Kobatake, Y. 1985  
Oscillations in Cell Shape and size during locomotion and in -  
contractile activities of Physarum polycephalum, Dictyostelium  
discoideum, Amoeba proteus and macrophages. Exp. Cell. Res 156.
- ( 43 ) Elson, E., Daily, B. B., Mc Connaughey, W. B. 1983  
Measurement of Forces Which Determine the shapes of adherent cells  
in culture. Elsevier Sci. Pub. Co., Inc. Frontiers in Biochem.  
Biophys. studies of Proteins and Membranes
- ( 44 ) Bar - Sagi, D., Feramisco, J. R. 1986  
Induction of Membrane Ruffling and Fluid-Phase Pinocytosis in - -  
Quiescent Fibroblasts by ras proteins. Science 233: 1061 - 1068
- ( 45 ) Karnovsky 1965, S. M., J. Cell Biol. 27: 137
- ( 46 ) Van Furth, R., Schadewijk-Niewstad, Elzenga-Claasen J., Corneli  
sse, C., Nibbering, P. 1984  
Morphological, cytochemical, Functional and Proliferative charac-  
teristics of four murine macrophage - like cell lines. Cell Immunol.  
90: 339 - 357
- ( 47 ) Batty, M. 1985  
Fractal - geometry between dimensions. New Scientist 1450: 31 - 36
- ( 48 ) Mandelbrot, B. 1983  
The Fractal Geometry of Nature. W. H. Freeman and Co.
- ( 49 ) Burrough, P. A. 1981  
Fractal dimensions of landscapes and other environmental data. Na-  
ture 294: 240 - 242
- ( 50 ) Bracewell, R. N. 1978  
The fourier transform and Its applications. Ed. Mc. Graw-Hill

- ( 51 ) Vireliezer, J. L., Arenzana - Seisdedos, F., 1985  
Immunological Functions of macrophages and their regulation -  
by interferons. Med. Biol. 63 ( 4 ) : 149 - 159
- ( 52 ) Blalock, S. 1980  
Common Pathways of interferon and hormonal action. Nature 283:  
406 - 408
- ( 53 ) Donahoe, R. M., and Huang, K. Y., 1976  
Interferon Preparations enhance phagocytosis in vivo. Infect.  
Immunol. 13: 1250 - 1253