

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 250**

51 Int. Cl.:

G06T 7/00 (2007.01)

G06T 7/254 (2007.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2014 PCT/GB2014/050154**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111732**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2014 E 14701598 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2946359**

54 Título: **Método para evaluar el envejecimiento celular**

30 Prioridad:

21.01.2013 GB 201301043

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.03.2021

73 Titular/es:

**SIBELIUS LIMITED (100.0%)
41 Cornmarket Street
Oxford, OX1 3HA, GB**

72 Inventor/es:

**AKOULITCHEV, ALEXANDRE;
HOPPER, JOANNE;
MELLOR, ELIZABETH, JANE y
YOUDELL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 810 250 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para evaluar el envejecimiento celular

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de alto rendimiento para evaluar la vida útil cronológica (CLS) de un organismo modelo, tal como *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

10 Antecedentes

15 *C. elegans* es un modelo bien estudiado usado en el envejecimiento y se ha utilizado en el análisis no solo de los procesos fundamentales que contribuyen al envejecimiento, sino también de las enfermedades relacionadas con la edad. Las técnicas tradicionales de evaluación de la vida útil implican el examen manual de una población de *C. elegans* con envejecimiento sincronizado y la evaluación de la fracción de la población que aún vive por medio de estimulación física individual. Los datos acumulados de esta manera pueden trazarse en el tiempo para generar un perfil de vida útil cronológica (CLS). Este método tiene la desventaja de que es lento, subjetivo y sujeto al error humano.

20 Se han desarrollado métodos automatizados para caracterizar el movimiento celular, tales como los descritos en el documento US2008/0304732. Sin embargo, estos métodos requieren una gran capacidad de procesamiento por computadora y tiempo para realizar complejas deconvoluciones de imágenes y análisis de datos.

25 El documento GB2479628 describe un método para rastrear el movimiento de un objeto biológico. El método comprende la substracción sucesiva de una serie de imágenes a partir de una imagen de referencia, lo que permite rastrear el movimiento de un único objeto biológico en el tiempo.

El documento US 5789242 describe un método para determinar la toxicidad de sustancias solubles en agua mediante la medición del cambio en la movilidad de organismos individuales dentro de una población en el tiempo.

30 El documento WO2007/042044 describe un método para determinar un cambio en una población celular en el tiempo como un método para seleccionar embriones para la fertilización *in vitro*.

El documento US 8265357 describe la determinación de un cambio en un cultivo celular mediante el análisis de una serie temporal de imágenes diferentes.

35 El desarrollo de un método automatizado de alto rendimiento para determinar la movilidad de una población de organismos sería una gran ventaja en los experimentos de envejecimiento. Los inventores han desarrollado dicho método, el cual puede usarse para evaluar la vida útil cronológica de un organismo modelo mediante el examen de la movilidad de una población dada. La movilidad puede después cuantificarse y expresarse como una fracción del número de organismos en el grupo para proporcionar un Coeficiente de movilidad (MoCo).

Resumen de la Invención

45 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tamizar y seleccionar al menos un compuesto de prueba que tiene un efecto sobre la vida útil cronológica de una población de organismos de acuerdo con la reivindicación 1.

Será evidente para el experto en la técnica que las etapas d) a g) del método pueden repetirse en puntos temporales adicionales para calcular el cambio en la movilidad de la población en el tiempo.

50 Como se usa en la presente, el término movilidad se refiere al movimiento de miembros de la población de organismos.

55 Se debe entender que el término movilidad como se usa en la presente no requiere la medición de la velocidad o tasa de movimiento de los organismos dentro de la población. La medición del cambio relativo en la velocidad de los organismos que forman la población en el tiempo no es necesaria para los métodos reivindicados. Además, el término movilidad se refiere a la movilidad de la población como un todo, no a la movilidad de organismos individuales dentro de la población.

60 En una modalidad, movilidad se refiere a identificar el movimiento de la población de organismos en dos dimensiones, preferentemente, en un medio sólido. Se debe entender que, en una modalidad preferida de la presente invención, los organismos no se inmovilizan en los medios, sino que pueden desplazarse libremente.

65 El experto en la técnica comprenderá que la movilidad de la población de organismos puede ser equivalente a la viabilidad de la población. El experto en la técnica comprenderá que a medida que los organismos envejecen, en general, se vuelven menos móviles y al morir dejan de moverse por completo. Cuando se toma a un nivel de población, el cambio en la movilidad general en el tiempo puede equipararse a la viabilidad de la población.

Será evidente que $\Delta D1$ es la movilidad de la población en un primer punto de tiempo (por ejemplo, día 0). Será evidente, además, que $\Delta D2$ es la movilidad de la población en un segundo punto de tiempo. El experto en la técnica entenderá que el cambio en la movilidad entre $\Delta D1$ y $\Delta D2$ es equivalente al cambio en la viabilidad de la población durante ese período de tiempo.

5

Se debe entender que la magnitud de ΔD es proporcional a la movilidad de toda la población visualizada y se calcula mediante la comparación de pares de imágenes apropiadas, por ejemplo, la primera (I1) y la segunda (I2) imágenes, y calcular la diferencia entre sus matrices derivadas (es decir, imágenes convertidas en tablas de intensidad de píxeles) con respecto a la población en su totalidad. Se suman los valores absolutos (es decir, los valores negativos se convierten en valores positivos) a partir de la diferencia entre las dos matrices. Este valor puede dividirse por la entrada de señal promedio (la suma promedio de la intensidad de las imágenes I1 e I2) para tener en cuenta cualquier variación en el número de gusanos en cada placa. Este valor se define en la presente descripción como el Coeficiente de movilidad (MoCo) y es una medida de la proporción de la población visualizada que puede desplazarse. Las posiciones de los organismos que forman la población pueden, opcionalmente, compararse indirectamente mediante la comparación de las matrices. Se debe entender que el método no se basa en el cálculo de la posición de cada organismo individual o hacia dónde se ha desplazado cada organismo, o en la medición de las distancias recorridas por los organismos individuales. El método implica calcular la diferencia absoluta entre la primera y la segunda imágenes, es decir, cuántos de los organismos se han desplazado desde sus posiciones iniciales. Esto permite un método para calcular la movilidad relativa de toda la población en el tiempo, lo que permite el desarrollo de métodos de tamizaje de alto rendimiento. Se debe entender además que, mediante el uso de este método, pueden obtenerse datos de movilidad cuantitativa a partir de una comparación de las imágenes.

10

15

20

Se debe entender que los métodos se refieren a la medición del cambio absoluto en la posición de la población como un todo y no al análisis separado de uno o más organismos individuales dentro de la población.

25

En una modalidad, el período de tiempo entre I1 y I2 (y cualquier par de imágenes subsiguientes, por ejemplo, I3 y I4) es, preferentemente, de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 5 minutos, de aproximadamente 140 ms a aproximadamente 3 minutos, de aproximadamente 200 ms a aproximadamente 90 s, de aproximadamente 300 ms a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente 400 ms a aproximadamente 45 s, de aproximadamente 500 ms a aproximadamente 30 s, de aproximadamente 600 ms a aproximadamente 15 s, de aproximadamente 700 ms a aproximadamente 10 s, de aproximadamente 750 ms a aproximadamente 5 s, de aproximadamente 800 ms a aproximadamente 3 s, de aproximadamente 850 ms a aproximadamente 2 s, de aproximadamente 900 ms a aproximadamente 1 s o de aproximadamente 1 s a aproximadamente 2 s.

30

35

En una segunda modalidad, el período de tiempo entre I1 e I2 (y cualquier par de imágenes subsiguientes, por ejemplo, I3 e I4) es, preferentemente, de aproximadamente 500 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 1 s, aproximadamente 2 s, aproximadamente 3 s, aproximadamente 4 s, aproximadamente 5 s, aproximadamente 6 s, aproximadamente 7 s, aproximadamente 8 s, aproximadamente 9 s o aproximadamente 10 s. Con la máxima preferencia, aproximadamente 1 s.

40

Será evidente para el experto en la técnica que la cantidad de tiempo transcurrido entre las dos imágenes determinará qué tan lejos se desplazarán los miembros de la población de organismos en el período intermedio.

45

Se debe entender por el experto en la técnica que el período de tiempo entre I1 e I2 (y cualquier par de imágenes subsiguientes, por ejemplo, I3 e I4), puede variar en dependencia del organismo usado en el método. Se debe entender que el período de tiempo debe ser suficiente para permitir el movimiento de los organismos desde sus ubicaciones iniciales, pero no lo suficientemente largo como para permitir que los organismos se desplacen a la ubicación inicial de otro organismo en la población.

50

Será fácilmente evidente para el experto en la técnica que el período de tiempo entre I1 e I2 y el período de tiempo entre I3 e I4 y cualquier par de imágenes subsiguientes debe ser el mismo.

Será evidente para el experto en la técnica que el período de tiempo entre I2 e I3 puede ser cualquier período de tiempo adecuado.

55

Se debe entender que el período de tiempo puede ser cualquier período adecuado de acuerdo con la vida útil del organismo que se prueba.

60

En una modalidad, el período de tiempo entre I2 e I3 es al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días o al menos aproximadamente 12 días. Preferentemente, al menos aproximadamente 1 día, con mayor preferencia, al menos aproximadamente 2 días, y con la máxima preferencia, al menos aproximadamente 4 días.

65

ES 2 810 250 T3

- En una modalidad preferida, $\Delta D1$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 0 y $\Delta D2$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 4. El período de tiempo entre I1 e I2, e I3 e I4 es, preferentemente, 1 s.
- 5 En una modalidad preferida adicional, $\Delta D1$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 0 y $\Delta D2$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 6. El período de tiempo entre I1 e I2, e I3 y I4 es, preferentemente, 10 s.
- En una modalidad preferida adicional, $\Delta D1$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 0 y $\Delta D2$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 6. El período de tiempo entre I1 e I2, e I3 e I4 es, preferentemente, 1 minuto.
- 10 En una modalidad adicional, cuando se miden los cambios en la movilidad en el tiempo, puede calcularse un perfil de vida útil cronológica. Será fácilmente evidente para el experto en la técnica que un aumento en la movilidad de los organismos en el tiempo equivale a un aumento en la vida útil cronológica de los organismos.
- 15 Será evidente para el experto en la técnica que las imágenes se toman a intervalos de tiempo adecuados para permitir la identificación y medición de los cambios en el movimiento de la población en el tiempo como un sustituto de la disminución de la viabilidad.
- 20 Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que, en modalidades preferidas, el período de tiempo entre los conjuntos de imágenes (I1 e I2, I3 e I4) debe ser el mismo para cada conjunto de puntos temporales.
- 25 Como se usa en la presente, el término población se refiere a una pluralidad de organismos que, en una modalidad, pertenecen al mismo grupo o especie. Se debe entender por el experto en la técnica que un organismo puede ser cualquier organismo adecuado (tal como un animal, un microorganismo o una forma de vida unicelular) capaz de moverse. Se debe entender que, en una modalidad preferida, el término movimiento se refiere a locomoción y no, por ejemplo, a la contracción de una célula tal como un cardiomiocito o al movimiento de una célula o células provocado por la división celular tal como se produce, por ejemplo, en un embrión u otra masa celular en división.
- 30 En una modalidad, la población comprende al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 110, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 650, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 850, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 950 o al menos aproximadamente 1000 organismos.
- 35 En una modalidad adicional, la población comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 10 a aproximadamente 750, de aproximadamente 20 a aproximadamente 500, de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, de aproximadamente 75 a aproximadamente 200, de aproximadamente 80 a aproximadamente 150, de aproximadamente 90 a aproximadamente 125 o de aproximadamente 95 a aproximadamente 100 organismos.
- 40 En una modalidad preferida adicional, la población comprende 50, 75, 80, 90, 100, 110, 125, 150, 175 o 200 organismos.
- 45 Como se usa en la presente, el término imagen se refiere a una representación visual de la población de organismos. Se debe entender que la imagen puede obtenerse mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante exploración con un detector o haz electromagnético. En una modalidad, se usa un microscopio de pantalla ancha. En una modalidad adicional, se usa un lector de placas de fluorescencia.
- 50 En una modalidad, los organismos pueden marcarse.
- 55 En una modalidad preferida, la población de organismos se marca fluorescentemente mediante cualquier medio adecuado. En una modalidad preferida adicional, la población de organismos se marca con proteína verde fluorescente (GFP).
- 60 Los inventores han descubierto que, al usar organismos con el marcador localizado en un área particular dentro del organismo, los datos generados para determinar el cambio en la movilidad son más precisos. El experto en la técnica comprenderá que esto permite usar poblaciones más densas, lo que reduce los errores de muestreo.
- 65 En una modalidad, los organismos son *C. elegans*. Preferentemente, *C. elegans* que expresan GFP. Con mayor preferencia, *C. elegans* con expresión de GFP en el músculo de la pared del cuerpo
- En otra modalidad, los organismos son *Danio rerio*. Preferentemente, *Danio rerio* que expresan GFP. Con mayor preferencia, *Danio rerio* con expresión de GFP en el músculo de la pared del cuerpo.

En una modalidad preferida, la expresión de GFP se localiza en un área en particular dentro de los organismos marcados.

En una modalidad más preferida, los organismos son *C. elegans* MYO2bus-5 (un gusano sensible a fármacos que expresa GFP en su faringe)

5

Además, los inventores han descubierto que el uso de dos loci marcados dentro de un único organismo permite la identificación de movimientos específicos de la cabeza y/o la cola. Esto permite que se tengan en cuenta los efectos secundarios de comportamiento y paralizantes al calcular la viabilidad.

10

El experto en la técnica conocerá los métodos para crear organismos marcados con fluorescencia que son parte del conocimiento general común.

15

Se usa un algoritmo para analizar el cambio en la posición de las señales de entrada entre pares de imágenes. El algoritmo convierte las imágenes a escala de grises, las umbraliza y compara las imágenes matemáticamente mediante el cálculo de las diferencias absolutas entre las dos imágenes. Este valor se divide a continuación por la señal de entrada promedio para expresar la movilidad de una población como una fracción del tamaño de la población. Este valor se denomina como el coeficiente de movilidad (MoCo).

20

Los inventores también han hecho el sorprendente descubrimiento de que durante el período comprendido entre el primer y el segundo o los subsiguientes puntos temporales, una proporción de los organismos puede escapar. Por lo tanto, la división por la señal de entrada promedio tiene en cuenta esta reducción en los números de organismos. Se debe entender que el coeficiente de movilidad (MoCo) será proporcional al número total de organismos presentes en comparación con el número inicial.

25

Será evidente para el experto en la técnica que la presente invención no se dirige a medir un cambio en el tamaño de la población, es decir, números absolutos aumentados o disminuidos, sino que se dirige a identificar un cambio en la movilidad y, por lo tanto, la viabilidad de la población. Por lo tanto, es conveniente mantener el tamaño de la población o tener en cuenta los cambios en el tamaño de la población.

30

Se debe entender que varias imágenes con el mismo intervalo de tiempo entre ellas pueden evaluarse de la manera anterior, lo que permite la generación de promedios y estadísticas de error.

En una modalidad, el algoritmo se usa para calcular un cambio en la movilidad de la población.

35

En una modalidad adicional, puede usarse el agrupamiento en contenedores para alterar la sensibilidad del método. El experto en la técnica sabrá que el agrupamiento en contenedores implica sumar celdas en la matriz de imagen antes de calcular la diferencia entre imágenes emparejadas. Será evidente que aumentar el tamaño del contenedor (BIN) reduce artificialmente la sensibilidad del ensayo. Los inventores han descubierto que esto permite la detección de cambios en la movilidad en poblaciones de más edad y con menor movilidad.

40

En una modalidad, se usa en el algoritmo un valor de BIN de 1 a 100, 2 a 75, 3 a 50, 4 a 25 o 5 a 10. En una modalidad preferida, se usa un valor de BIN de 1, 5, 10, 50 o 100 en el algoritmo. En una modalidad más preferida, se usa el valor de BIN de 1.

45

En una modalidad, el método puede usarse para evaluar el efecto de al menos un compuesto de prueba o al menos un factor ambiental sobre la viabilidad/CLS de la población. Será fácilmente evidente que al menos un compuesto de prueba puede ser cualquier compuesto adecuado, por ejemplo, una o más moléculas pequeñas o composiciones biológicas. Además, será fácilmente evidente que el compuesto de prueba puede aplicarse a los organismos mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, el compuesto de prueba puede aplicarse tópicamente, o puede ubicarse dentro del medio sobre el cual se mantienen los organismos.

50

Además, será evidente que el al menos un factor ambiental puede ser cualquier factor ambiental de interés, tal como la temperatura, la luz o factores atmosféricos, una o más condiciones nutricionales tales como, por ejemplo, un suplemento o deficiencia nutricional. Además, será fácilmente evidente que el factor atmosférico puede ser cualquier factor de interés, tal como el nivel de contaminación, la composición atmosférica, el nivel de humedad, etcétera.

55

Será evidente para el experto en la técnica que cualquier compuesto de prueba adecuado, tal como un compuesto contenido en una biblioteca combinatoria, puede usarse en el método de la presente invención. Además, será evidente que cualquier compuesto que, por ejemplo, extienda la CLS de los organismos de prueba según se mide a través de su movilidad, será un compuesto candidato que puede ser útil, por ejemplo, para combatir los efectos del envejecimiento o para el tratamiento de un trastorno relacionado con la edad. Además, será evidente que cualquier compuesto que reduzca la CLS de los organismos de prueba puede tener efectos tóxicos.

60

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso del método de acuerdo con el primer aspecto para el descubrimiento de fármacos y/o toxicología de acuerdo con la reivindicación 10.

65

Esto se logra mediante el cálculo del cambio global en el coeficiente de movilidad según se observa en una población completa de organismos en el tiempo en comparación con una población de control. En una modalidad preferida, los organismos son *C. elegans*.

5 Será evidente para el experto en la técnica que los organismos pueden mantenerse en cualquier aparato adecuado, por ejemplo, una placa de Petri/placa de un solo pocillo o una placa de múltiples pocillos. En una modalidad, la población se mantiene en una placa de un solo pocillo. En otra modalidad, la población se mantiene en un pocillo de una placa de múltiples pocillos, en donde cada pocillo comprende una población separada. En modalidades adicionales, el método se lleva a cabo mediante el uso de placas de 6 pocillos, 12 pocillos, 24 o 96 pocillos. En una modalidad preferida, el método se lleva a cabo mediante el uso de placas de 12 pocillos.

15 El experto en la técnica sabrá que FUDR es un fármaco quimioterapéutico que se usa en estudios con *C. elegans* para impedir la formación de la progenie de segunda generación, que de cualquier otra manera complicaría los experimentos de envejecimiento, y para producir poblaciones sincrónicas en edad. FUDR impide la síntesis de ADN y, por lo tanto, los huevos no eclosionan y no se desarrollan gusanos jóvenes. En los ensayos tradicionales, el tratamiento con FUDR se produce al transferir gusanos adultos cultivados en medios, por ejemplo, placas de agar NGM, en ausencia del medicamento, a una placa que se ha embebido con una solución de FUDR (método de transferencia).

20 Los inventores han descubierto que la generación de poblaciones de *C. elegans* sincrónicas en edad mediante la adición tópica de FUDR es posible y se prefiere a los métodos de transferencia porque el método puede llevarse a cabo en una sola placa o pocillo sin la necesidad de transferir los gusanos y con un mínimo de mantenimiento.

25 Se debe entender que después de la sincronización de la población ya sea en una placa de un pocillo o de múltiples pocillos, la población se trata tópicamente con FUDR, en donde la población no se transfiere a una nueva placa o pocillo.

30 Será evidente para el experto en la técnica que pueden usarse igualmente otros fármacos que realizan la misma función que FUDR en los métodos de transferencia y tópicos.

35 En un método preferido, después de la sincronización de la población en una placa de múltiples pocillos, la población se trata tópicamente con FUDR a un nivel de al menos 0,5 µg/ml de medio, al menos 1,0 µg/ml, al menos 1,5 µg/ml, al menos 17 µg/ml, al menos 2,0 µg/ml, al menos 2,5 µg/ml o al menos 3 µg/ml.

40 En una primera modalidad preferida, después de la sincronización de la población en una placa de 12 pocillos, la población se trata tópicamente con 17 µg de FUDR/ml de medio.

45 En una segunda modalidad preferida, después de la sincronización de la población en una placa de 6 pocillos, la población se trata tópicamente con 2 µg de FUDR/ml de medio.

50 En una tercera modalidad preferida, después de la sincronización de la población en una placa de 24 pocillos, la población se trata tópicamente con más de 2 µg de FUDR/ml de medio.

55 Será evidente para el experto en la técnica que la sincronización de la población debe llevarse a cabo antes de obtener la primera imagen (11).

60 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un programa de computadora de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende instrucciones operativas para configurar un aparato de procesamiento de datos para realizar el método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

65 La invención se describirá con más detalle en los Ejemplos con referencia a las siguientes figuras en las que:
La Figura 1 muestra una comparación del tratamiento con FUDR del mutante de *C. elegans* AM134*bus-5* mediante técnicas de transferencia y aplicación tópica en placas de 6 pocillos. Las imágenes muestran una población de gusanos sincronizados en diversos puntos temporales en una placa de 6 pocillos ya sea sin FUDR o con adición de FUDR después de 1 día de crecimiento (13-09).

La Figura 2 muestra una comparación del tratamiento con FUDR del mutante de *C. elegans* AM134*bus-5* mediante técnicas de transferencia y aplicación tópica en placas de 12 pocillos. Las imágenes muestran una población de gusanos sincronizados en diversos puntos temporales en una placa de 12 pocillos con una adición de FUDR después de 1 día de crecimiento (13-09).

La Figura 3 muestra una comparación del tratamiento con FUDR del mutante de *C. elegans* AM134*bus-5* mediante técnicas de transferencia y aplicación tópica en placas de 24 pocillos. Las imágenes muestran una población de gusanos sincronizados en diversos puntos temporales en una placa de 24 pocillos con una adición de FUDR después de 1 día de crecimiento (13-09).

La Figura 4 resume el algoritmo MatLab y el procesamiento y análisis de imágenes de GFP de un lapso de tiempo de *C. elegans*.

La Figura 5 muestra el efecto de variar el tiempo de separación entre imágenes sobre el MoCo calculado a partir de AM134*bus-5*.

La Figura 6 muestra el efecto de variar el tamaño del contenedor sobre el MoCo calculado a partir de AM134*bus-5*.

La Figura 7 muestra cepas con diferentes localizaciones de GFP de *C. elegans*.

La Figura 8 muestra el efecto de variar el tiempo de separación entre imágenes sobre el MoCo calculado a partir de *C. elegans MYO2bus-5*.

5 La Figura 9 muestra el efecto de variar el tamaño del contenedor sobre el MoCo calculado a partir de *C. elegans MYO2bus-5*.

La Figura 10 muestra las matrices de MoCo a partir de los experimentos mediante el uso de *C. elegans AM134bus-5* y *WYO2bus-5*.

La Figura 11 muestra un resumen de los resultados para gusanos *MYO2bus-5* y un intervalo de tiempo entre cada una de diez imágenes consecutivas de 140 ms, 800 ms y 1 segundo y un valor de BIN de 1.

10 La Figura 12 muestra el efecto de tanto cambiar el intervalo de tiempo entre las imágenes de lapso de tiempo de GFP durante la adquisición de imágenes como el valor de BIN durante el análisis MatLab sobre el MoCo que se calcula en una población de *C. elegans MYO2bus-5* a temperatura ambiente (alta movilidad) con relación a la misma población de gusanos después de un golpe de frío a 4 °C durante una hora (baja movilidad).

15 La Figura 13 muestra el MoCo relativo de una población de gusanos en una placa de 12 pocillos con pocillos tratados con FK506 o DMSO después del tratamiento con FUDR el día 0.

La Figura 14 muestra el efecto del día de medición y de la densidad de gusanos sobre el efecto relativo de FK506 sobre el MoCo.

La Figura 15 muestra una comparación del MoCo en 42 gusanos *MYO2bus-5* tratados simuladamente con 10 µl de DMSO y 51 gusanos *MYO2bus-5* tratados con FK506 mediante el uso de un intervalo de tiempo de 1 s entre imágenes.

20 La Figura 16 muestra una comparación del MoCo en 42 gusanos *MYO2bus-5* tratados simuladamente con 10 µl de DMSO y 51 gusanos *MYO2bus-5* tratados con FK506 mediante el uso de un intervalo de tiempo de 10 s entre imágenes.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1 optimización de la concentración de FUDR y mecanismo de aplicación para ensayos de vida útil en una sola placa

30 La 2'-desoxi-5-fluorouridina (FUDR) es un fármaco quimioterapéutico que se usa en estudios con *C. elegans* para impedir la formación de progenie de segunda generación que de cualquier otra manera complicaría los experimentos de envejecimiento. FUDR impide la síntesis de ADN y, por lo tanto, los huevos no eclosionan y no se desarrollan gusanos jóvenes. Tradicionalmente, el tratamiento se produce mediante la transferencia de gusanos adultos cultivados en placas con agar NGM en ausencia del fármaco mediante el uso de tampón M9 a una placa que se ha embebido con una solución de FUDR (método de transferencia). Transferir gusanos de esta manera es un proceso lento y, por lo tanto, costoso. Debido a la adhesión de los gusanos vivos al material plástico, también es propenso a errores, lo que da como resultado una variabilidad en el número de gusanos por población en envejecimiento.

40 Se llevaron a cabo experimentos para comparar el método de transferencia tradicional con un enfoque novedoso de ahorro de tiempo y reducción de errores en el que la FUDR se añade tópicamente a la población en envejecimiento (método tópico).

45 El método tópico permite llevar a cabo experimentos de envejecimiento en una sola placa con un mínimo de mantenimiento. Se comparó el uso de pocillos de diversos tamaños en platos de múltiples pocillos para determinar su idoneidad para llevar a cabo ensayos de envejecimiento para optimizar las placas más adecuadas para su uso en ensayos de alto rendimiento.

Se compararon los métodos tópicos y de transferencia de aplicación de FUDR y se evaluó la concentración óptima de FUDR en placas de 24 pocillos, 12 pocillos y 6 pocillos.

50 Los gusanos sensibles a fármacos *AM134bus-5* y *bus-8* se sincronizaron por blanqueamiento y después se colocaron en placas de múltiples pocillos y se les permitió desarrollarse hasta la edad adulta. Los adultos en la mitad de los pocillos se transfirieron a un pocillo separado que se había embebido con cantidades variables de solución de FUDR mediante el uso de tampón M9. Los pocillos restantes se trataron tópicamente con FUDR.

55 A continuación, los cultivos se visualizaron regularmente por microscopía de campo brillante y se alimentaron con OP50 cuando fue necesario.

60 La Figura 1 muestra una comparación del tratamiento con FUDR del mutante de *C. elegans AM134bus-5* mediante técnicas de transferencia y aplicación tópica en placas de 6 pocillos. Las imágenes muestran una población de gusanos sincronizada en una placa de 6 pocillos con una adición de FUDR después de 1 día (13-09). Los resultados se muestran 4 (17-09), 6 (19-09) y 11 (24-09) días después del tratamiento.

Las columnas 1 y 2 muestran pocillos sin adición de FUDR. En estos pocillos se presentan numerosos gusanos de diferentes edades, lo que hace imposible la evaluación de la vida útil.

65 Las columnas 3 y 4 muestran pocillos con una concentración de FUDR de 2 µg/ml (25 µl de FUDR 10 µg/ml a 5 ml de NGM). Incluso después de 11 días en estas condiciones, no puede observarse progenie. Se probaron de esta manera

volúmenes de FUDR de 1 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 25 μ l y 50 μ l y se identificó 25 μ l como la dosis eficaz más baja para impedir el desarrollo de la progenie. Como puede verse en las columnas 3 y 4, tanto los métodos tópicos como los de transferencia tuvieron éxito en impedir el desarrollo de la progenie de segunda generación.

5 La Figura 2 muestra una comparación del tratamiento con FUDR del mutante de *C. elegans* AM134bus-5 mediante técnicas de transferencia y aplicación tópica en placas de 12 pocillos. Las imágenes muestran una población de gusanos sincronizada en una placa de 12 pocillos con una adición de FUDR después de 1 día (13-09). Los resultados se muestran 4 (17-09), 6 (19/09) y 11 (24/09) días después del tratamiento.

10 Las columnas 1 y 2 muestran pocillos sin adición de FUDR. En estos pocillos se presentan numerosos gusanos de diferentes edades, particularmente el día 11 (24-9), lo que hace imposible la evaluación de la vida útil.

15 Las columnas 3 y 4 muestran pocillos con una concentración de FUDR de 1,7 μ g/ml (15 μ l de FUDR 10 mg/ml a 2,5 ml de NGM). Incluso después de 11 días en estas condiciones para la aplicación tópica, no puede observarse progenie (ver la parte inferior de la columna 4). Se probaron de esta manera volúmenes de FUDR de 1 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l y 20 μ l y se identificó 15 μ l como la dosis eficaz más baja para impedir el desarrollo de la progenie. La aplicación tópica parece ser más eficaz para impedir la progenie que el método de transferencia en estas condiciones (compare las imágenes inferiores en las columnas 3 y 4).

20 La Figura 3 muestra una comparación del tratamiento con FUDR del mutante de *C. elegans* AM134bus-5 mediante técnicas de transferencia y aplicación tópica en placas de 24 pocillos. Las imágenes muestran una población de gusanos sincronizada en una placa de 24 pocillos con una adición de FUDR después de 1 día (13-09). Los resultados se muestran 4 (17-09), 6 (19/09) y 11 (24/09) días después del tratamiento.

25 Las columnas 1 y 2 muestran pocillos sin adición de FUDR. En estos pocillos se presentan numerosos gusanos de diferentes edades, lo que hace imposible la evaluación de la vida útil.

30 Las columnas 3 y 4 muestran pocillos con una concentración de FUDR de 2 μ g/ml (5 μ l de FUDR 10 mg/ml a 1 ml de NGM). Después de 11 días en estas condiciones para el método tópico y de transferencia, puede observarse progenie (parte inferior de las columnas 3 y 4). Se probaron de esta manera volúmenes de FUDR de 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l y 5 μ l. A partir de estos experimentos, está claro que sería necesario añadir más FUDR a los pocillos en esta placa para evitar que la progenie de segunda generación interfiera con las mediciones. Sin embargo, la propensión de estos pequeños pocillos a secarse, agrietarse y separarse de los lados significó que no se consideraron adecuados para su propósito.

35 Conclusiones

Estos experimentos indican que la generación de poblaciones de *C. elegans* sincrónicas en edad mediante la adición tópica de FUDR es posible y se prefiere a los métodos estándar de transferencia con tampón M9. Los datos muestran que los parámetros experimentales óptimos para impedir el desarrollo de gusanos de la progenie en este ensayo es la adición de 15 μ l de FUDR 10 mg/ml por pocillo en una placa de 12 pocillos (1,7 μ g/ml en 2,5 ml de NGM)

Ejemplo 2 optimización de parámetros de análisis computacional y tipo de cepa.

45 El novedoso ensayo de la presente invención usa la movilidad relativa de una población de gusanos como sustituto de la viabilidad de la población. Cuando se miden los cambios en la viabilidad en el tiempo, puede calcularse un perfil de la vida útil cronológica.

50 Con este fin, se ha escrito un algoritmo MatLab (ver la Figura 4) para analizar el cambio en la posición de las señales de GFP entre pares de imágenes de campo ancho (es decir, imágenes que abarcan numerosos gusanos: 5 a 500). El código (mostrado en el apéndice 1) convierte las imágenes a escala de grises, las umbraliza y compara las imágenes matemáticamente mediante el cálculo de las diferencias absolutas entre las dos imágenes. Este valor se divide a continuación por la señal de entrada promedio para expresar la movilidad de una población como una fracción del tamaño de la población. Este valor se denomina como el Coeficiente de movilidad (MoCo). Se evalúan de esta manera varias imágenes con el mismo intervalo de tiempo entre ellas, lo que permite la generación de promedios y estadísticas de error.

55 El agrupamiento en contenedores puede usarse para alterar la sensibilidad del análisis. El agrupamiento en contenedores implica sumar las celdas en la matriz de la imagen (por ejemplo, 1x1 sin agrupamiento en contenedores- 2x2 grupos con agrupamiento en contenedores de 4 celdas juntas) antes de calcular la diferencia entre imágenes emparejadas. En teoría, aumentar el tamaño del contenedor reduciría artificialmente la sensibilidad del ensayo, lo que permite detectar cambios en la movilidad en poblaciones de más edad menos móviles.

Se llevaron a cabo experimentos para confirmar el uso del algoritmo para detectar cambios en la movilidad y optimizar el tiempo transcurrido entre imágenes y el tamaño del agrupamiento en contenedores para este tipo de análisis.

65 La Figura 4 resume el algoritmo MatLab y el procesamiento y análisis de imágenes de GFP de lapso de tiempo de los *C. elegans* que la expresan.

Etapa 1 Adquirir imágenes: la cantidad de tiempo transcurrido entre las dos imágenes determinará qué tan lejos se desplazarán los gusanos en el período intermedio.

Etapa 2 Definir el umbral: convertir la imagen a escala de grises y eliminar el fondo reduce el ruido y simplifica el análisis posterior.

5 Etapa 3 Agrupamiento en contenedores: las señales restantes se agrupan para combinar un número especificado de píxeles (agrupamiento en contenedores AxA).

Etapa 4: superponer imágenes consecutivas y calcular la diferencia absoluta entre ellas. Esto proporciona una estimación cuantitativa de la movilidad.

10 El panel izquierdo de la Figura 4 muestra que los gusanos con alta movilidad se desplazan relativamente lejos, de manera que cuando se procesa la imagen, las señales no se solapan, lo que genera un alto MoCo.

Por el contrario, los gusanos sin movilidad (panel de la derecha) se solapan absolutamente y, por lo tanto, no existe una diferencia absoluta entre las imágenes, cuyo resultado es un MoCo de 0 (NaN - columna de la derecha).

15 Las señales de gusanos con movilidad baja/intermedia (panel central) se solapan parcialmente, lo que resulta en un valor de MoCo intermedio.

20 El proceso se repite para numerosas imágenes y al analizarlas secuencialmente se calculan los valores medios y las medidas de error.

Ejemplo 3 optimización de la separación temporal de los pares de imágenes y el tamaño del contenedor sobre gusanos inmovilizados por golpe de frío.

25 Se realizaron experimentos para optimizar tanto la separación temporal de los pares de imágenes como el tamaño del contenedor sobre gusanos inmovilizados por golpe de frío. Una población de mutantes de *C. elegans* AM134bus-5 (expresión de GFP en el músculo de la pared del cuerpo) se sincronizó mediante blanqueamiento. Los gusanos eclosionados se maduraron hasta la edad adulta y se tomaron imágenes de GFP de lapso de tiempo tomadas por microscopía de fluorescencia. Las imágenes se tomaron cada 1 segundo durante 10 segundos, cada 10 segundos durante 30 1 minuto y cada minuto durante 5 minutos. Para reducir la movilidad de los gusanos en la población para confirmar la eficacia y optimizar el algoritmo descrito, los gusanos se inmovilizaron por golpe de frío. Para lograr esto, las placas se colocaron a 4 °C durante 1 hora y después se repitió la obtención de las imágenes como se indicó anteriormente.

35 La Figura 5 muestra el efecto de variar el tiempo de separación entre imágenes sobre el MoCo calculado a partir de AM134bus-5. La Figura 5 muestra el efecto de diferentes intervalos de tiempo entre imágenes consecutivas sobre los valores de MoCo calculados de gusanos con movilidad normal (temperatura ambiente) y baja movilidad (golpe de frío). Se visualizaron las poblaciones de gusanos AM134bus-5 cada 1 segundo durante 10 segundos (10 imágenes en total), cada 10 segundos durante 1 minuto (6 imágenes en total) y después cada 1 minuto durante 5 minutos (5 imágenes en total). Las imágenes se analizaron con un valor de BIN de 1. Las barras de error corresponden al error estándar de la 40 media de manera que $n = \text{el número de imágenes} - 1$. Un intervalo de tiempo de 1 s proporciona la diferencia más grande entre las dos condiciones. Los datos a partir de estas imágenes se usaron para optimizar el tamaño del contenedor.

45 Se identificó previamente 1 s como la separación entre imágenes óptima para detectar cambios en la reducción del MoCo inducida por el frío. La Figura 6 muestra el efecto de variar el tamaño de BIN durante el análisis MatLab sobre los valores de MoCo en gusanos AM134bus-5 de movilidad normal (temperatura ambiente) y baja (golpe de frío) para imágenes separadas por 1 s. El análisis para cada condición es de las mismas 10 imágenes consecutivas tomadas a intervalos de tiempo de 1 segundo y MoCo representa la media del coeficiente de movilidad medido entre las imágenes. Las barras de error representan el error estándar de la media calculado mediante el uso de los valores de desviación estándar generados por MatLab y donde $n-1 = 9$. Como puede verse en la Figura 6, un valor de BIN de 1 (es decir, sin agrupamiento en 50 contenedores) proporciona la diferencia relativa más grande entre las dos condiciones.

Ejemplo 4 influencia de cepas con diferentes localizaciones de expresión de GFP.

55 Para comparar la influencia de las cepas con diferentes localizaciones de expresión de GFP (es decir, puede encontrarse GFP en una parte diferente del gusano), se llevó a cabo un experimento repetido con *C. elegans* MYO2bus-5 (expresión de GFP más localizada en el área de la faringe). Mediante el uso de gusanos con regiones más pequeñas de expresión de GFP, los datos generados son más precisos y permiten que se cultiven poblaciones de gusanos más densas.

60 La Figura 7 muestra cepas con diferentes localizaciones de GFP de *C. elegans*. La imagen de campo brillante muestra el perfil de un gusano entero. La imagen central es de AM134 y muestra la región de expresión en esta cepa (músculo de la pared del cuerpo). La imagen de la derecha es de una cepa MYO2 que muestra una expresión de GFP más localizada en la faringe.

65 La Figura 8 muestra el efecto de diferentes intervalos de tiempo entre imágenes consecutivas sobre los valores calculados de MoCo de gusanos con movilidad normal (temperatura ambiente) y baja movilidad (golpe de frío) como se describió anteriormente para una población de gusanos MYO2bus-5. Las imágenes se tomaron cada 1 segundo durante 10

segundos (10 imágenes en total), cada 10 segundos durante 1 minuto (6 imágenes en total) y después cada 1 minuto durante 5 minutos (5 imágenes en total). Las imágenes se analizaron con un valor de BIN de 1 y las barras de error corresponden al error estándar de la media de manera que $n = \text{el número de imágenes} - 1$. Un intervalo de tiempo de 1 s proporciona la diferencia más grande entre las dos condiciones. Los datos de estas imágenes se usaron para optimizar el tamaño del contenedor (ver la Figura 9).

Los experimentos anteriores identificaron 1 s como la separación entre imágenes óptima para detectar el cambio del MoCo inducido por el frío. La Figura 9 muestra el efecto de variar el tamaño de BIN del análisis MatLab sobre los valores del MoCo en gusanos MYO2bus-5 de movilidad normal (temperatura ambiente) y baja movilidad (golpe de frío) para imágenes separadas por 1 s. El análisis para cada condición es de las mismas 10 imágenes consecutivas tomadas a intervalos de tiempo de 1 segundo y MoCo representa la media del coeficiente de movilidad medido entre las imágenes. Las barras de error representan el error estándar de la media calculado mediante el uso de los valores de desviación estándar generados por MatLab y donde $n-1 = 9$. Como puede verse a partir de la figura de la página siguiente, un valor de BIN de 1 (es decir, sin agrupamiento en contenedores) proporciona la diferencia relativa más grande entre las dos condiciones.

La Figura 10 muestra una comparación de las Matrices del MoCo de los mutantes de *C. elegans* AM134bus-5 y MYO2bus-5. Durante el análisis de laboratorio, se umbralizan los pares de imágenes y se comparan matemáticamente mediante el cálculo de la diferencia absoluta entre las imágenes. Estas Matrices de coeficientes de movilidad proporcionan una descripción visual de en qué parte de las placas están los gusanos móviles y del tamaño y origen de los valores de MoCo derivados. Se usó una separación entre imágenes de 1 s y sin agrupamiento en contenedores para estos datos. Las matrices muestran que existen diferencias más localizadas en los cambios de señal GFP entre las imágenes cuando se visualizaron gusanos MYO2bus-5 en comparación con los gusanos AM134bus-5 debido a un marcaje con GFP más preciso y que ambas cepas muestran una reducción dramática en la movilidad después de un golpe de frío

Tabla 1

AM134bus-5	Desv Est/MoCo
Temperatura ambiente	0.0733964
Golpe de frío	0.0967688
MYO2bus-5	Desv Est/MoCo
Temperatura ambiente	0.0359029
Golpe de frío	0.0662668

La Tabla 1 resume la desviación estándar como un porcentaje de la señal total. En los ejemplos anteriores, se han usado dos cepas para optimizar los ensayos, AM134bus-5 que lo expresa en el músculo de la pared del cuerpo y la MYO2bus-5 con expresión más localizada (expresión en la faringe de GFP). Para determinar cuál de estas cepas será la más eficaz para su uso en tamices de alto rendimiento, se calculó una comparación del error generado como una proporción de la media para cada uno mediante el uso de las configuraciones óptimas (un valor de BIN de 1 y las imágenes son a intervalos de 1 segundo). Los datos mostrados en la Tabla 1 anterior sugieren que la cepa MYO2bus-5 produce un error relativo más pequeño que la cepa AM134bus-5 durante el análisis de imágenes, especialmente cuando los gusanos tienen una mayor movilidad. Por lo tanto, se usó esta cepa en los estudios posteriores.

Ejemplo 5 confirmación de la separación temporal óptima para *C. elegans* MYO2bus-5.

El protocolo anterior se repitió con los gusanos MYO2bus-5 y un intervalo de tiempo entre cada una de las diez imágenes consecutivas de 140 ms, 800 ms y 1 segundo. Este experimento se llevó a cabo para confirmar el parámetro óptimo de separación entre imágenes. Los datos de todos estos experimentos se analizaron mediante el uso de diversas configuraciones de contenedor para permitir la determinación del valor óptimo para este parámetro.

La Figura 11 muestra un resumen de los resultados en los gusanos MYO2bus-5 con un intervalo de tiempo entre cada una de las diez imágenes consecutivas de 140 ms, 800 ms y 1 segundo, y un valor de BIN de 1. Se calcularon las medias de los coeficientes de movilidad (MoCo) de la misma población de gusanos adultos a temperatura ambiente e inmediatamente después de colocarse a 4 °C durante una hora mediante el uso de un valor de BIN de 1. Las barras de error representan el error estándar de la media dado que $n-1 = 9$. Estos resultados confirman que un intervalo de tiempo de 1 s es la separación óptima entre imágenes, es decir, proporciona la mayor diferencia en MoCo entre poblaciones de gusanos de diferentes motilidades.

La Figura 12 muestra el efecto de tanto cambiar el intervalo de tiempo entre las imágenes de lapso de tiempo de GFP durante la adquisición de imágenes como el valor de BIN durante el análisis MatLab sobre el MoCo que se calcula en una población de *C. elegans* MYO2bus-5 a temperatura ambiente (alta movilidad) con relación a la misma población de gusanos después de un golpe de frío a 4 °C durante una hora (baja movilidad). La figura muestra un pico en el MoCo

relativo cuando las imágenes se registran a una separación de 1 segundo y se analizan con un valor de BIN minimizado de 1, lo que muestra que estos parámetros proporcionan la mayor sensibilidad para detectar cambios en la movilidad.

Conclusiones

Someter los gusanos a un golpe de frío a 4 °C durante una hora redujo drásticamente su movilidad y se usó para imitar los efectos del envejecimiento (es decir, reducir la movilidad de una población). Las configuraciones de adquisición de imágenes se optimizaron con la identificación de 1 s como el intervalo de separación entre imágenes más eficaz. Durante el análisis de la imagen, no realizar el agrupamiento en contenedores parecía ser la opción óptima para distinguir poblaciones de movilidad diferente. Finalmente, se seleccionaron los gusanos *MYO2bus-5* como la cepa que debería usarse en el ensayo ya que los datos generados a partir de esta cepa produjeron un error mucho menor como un porcentaje de la señal que la cepa *AM134bus-5*, debido al marcaje con GFP más localizado.

Ejemplo 6 optimización del tipo de placa y la densidad

El objetivo de una técnica de alto rendimiento es maximizar el número de experimentos que pueden realizarse simultáneamente. Esto puede lograrse mediante el uso de placas de múltiples pocillos. Experimentos anteriores mostraron que las placas de 12 pocillos fueron el formato de placa más pequeño aplicable a la metodología. Se llevaron a cabo experimentos adicionales para optimizar la densidad de la población de gusanos y los puntos temporales a lo largo del proceso de envejecimiento en los que deben tomarse los datos. FK506, un compuesto conocido por extender la vida útil cronológica de *C. elegans*, se usó como control para optimizar el ensayo. Las placas de 12 pocillos se embebieron con FK506 o control con DMSO, se añadieron a cada pocillo *C. elegans MYO2bus-5* que se habían sincronizado por blanqueamiento. Para la placa de 12 pocillos, se añadieron 10, 50, 100 y 200 huevos por pocillo. Cuando los gusanos alcanzaron la edad adulta, se trataron tópicamente con FUDR y se visualizaron por microscopía de fluorescencia mediante el uso del filtro de GFP, las imágenes se tomaron por lapso de tiempo con un intervalo de 1 s durante 10 s (10 imágenes en total) y nuevamente con un intervalo de 10 s durante 1 min (6 imágenes en total) para cada pocillo. Se realizó el análisis MatLab y se usó un valor de BIN de 1.

La Figura 13 muestra el MoCo relativo de una población de gusanos en una placa de 12 pocillos con pocillos tratados con FK506 o DMSO después del tratamiento con FUDR el día 0. Estaban presentes aproximadamente 100 huevos cuando los gusanos se sincronizaron. Todos los datos se expresan como una fracción de los valores de MoCo calculados para el día 0. Las barras de error representan el error estándar de la media de manera que $n-1 = 9$ para las imágenes de lapso de tiempo de 1 segundo y 5 para las imágenes de lapso de tiempo de 10 segundos. La Figura 13 muestra que, en estas condiciones, como se esperaba, el MoCo relativo cae en el tiempo a medida que los gusanos envejecen y dejan de moverse. Como se esperaba, los gusanos tratados con FK506 tienen una vida útil cronológica extendida y, por lo tanto, tienen un MoCo más alto durante más tiempo.

Para determinar el número óptimo de huevos por placa y los mejores momentos para obtener imágenes de los gusanos, el efecto sobre el tratamiento con FK506 (MoCo de FK506 relativo/MoCo de control relativo) se representa para el intervalo de densidades de gusanos durante el período de tiempo (0, 1, 4, 6, 11 días) probadas para identificar las condiciones óptimas para detectar cambios en el envejecimiento. También se comparó la separación entre imágenes de 1 s y 10 s.

La Figura 14 muestra el efecto del día de medición y de la densidad de gusanos sobre el efecto relativo de FK506 sobre el MoCo. El efecto sobre el tratamiento con FK506 (expresado como MoCo de FK506 relativo/MoCo de control relativo) se grafica para el intervalo de densidades de gusanos (20, 50, 100 y 200 huevos por pocillo) y durante el período de tiempo (0, 1, 4, 6, 8 días) probados para identificar las condiciones óptimas para detectar cambios en el envejecimiento. Los datos que se muestran aquí sugieren que el uso de 100 huevos por pocillo es la densidad óptima de gusanos y la evaluación en los días 0 y 4 con una separación entre imágenes de 1 s y los días 0 y 6 con separación entre imágenes de 10 s sería óptimo para detectar cambios dependientes de la edad en el MoCo.

La Figura 15 muestra una comparación del MoCo en 42 gusanos *MYO2bus-5* tratados simuladamente con 10 μ l de DMSO y 51 gusanos *MYO2bus-5* tratados con FK506. La Figura 15 muestra el MoCo de las dos poblaciones con relación al MoCo inicial como se observó el día 0 después del tratamiento con FUDR, se tomaron imágenes a un intervalo de tiempo de 1 s durante 10 s (un total de 10 imágenes) y se usó un valor de BIN de 1 para el análisis por MatLab. Las barras de error representan el intervalo de confianza de manera que $n-1 = 9$ y $p = 0,01$. Estos resultados muestran que la población de *C. elegans* tratada con FK506 tiene una mayor movilidad que los gusanos tratados simuladamente a medida que envejecen durante un período de 8 días.

La Figura 16 muestra una comparación del MoCo en 42 gusanos *MYO2bus-5* tratados simuladamente con 10 μ l de DMSO y 51 gusanos *MYO2bus-5* tratados con FK506. La Figura 16 muestra el MoCo de las dos poblaciones con relación al MoCo inicial como se observó el día 0 después del tratamiento con FUDR, se tomaron imágenes a un intervalo de tiempo de 10 s durante 1 minuto (6 imágenes en total) y se usó un valor de BIN de 1 para el análisis de MatLab. Las barras de error representan el intervalo de confianza de manera que $n-1 = 5$ y $p = 0,01$. Estos resultados muestran que la población de *C. elegans* tratada con FK506 tiene una mayor movilidad que los gusanos tratados simuladamente a medida que envejecen durante un período de 8 días.

Conclusiones

5 Los datos descritos anteriormente muestran que una densidad de gusanos de 100 huevos por pocillo de un plato de 12 pocillos es la óptima para detectar cambios en la CLS. Los análisis en los días 0 y 4 con una separación entre imágenes de 1 s y los días 0 y 6 con separación entre imágenes de 10 s son los días óptimos para llevar a cabo lecturas para detectar cambios en la CLS.

10 Diversas modificaciones o variaciones de los métodos descritos y el sistema de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con las modalidades específicas preferidas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas modalidades específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias a los expertos en la técnica de bioquímica y biotecnología o campos relacionados se pretende que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

15 Apéndice 1 - Código Matlab

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

% Este código umbraliza un par de imágenes basado en un valor definido por el usuario, después toma
% la imagen en blanco y negro umbralizada y reduce la resolución mediante un segundo valor definido
% por el usuario. A continuación, genera la diferencia entre estas dos imágenes umbralizadas
% agrupadas en contenedores.
5
clear
close all

% Imágenes leídas
10
image1 = imread('1.jpg');
image2 = imread('2.jpg');
image3 = imread('3.jpg');
image4 = imread('4.jpg');
image5 = imread('5.jpg');
15
image6 = imread('6.jpg');
image7 = imread('7.jpg');
image8 = imread('8.jpg');
image9 = imread('9.jpg');
image10 = imread('10.jpg');

% Fijar el umbral (un valor entre 0 y 1) y el número del contenedor
20
threshold = 0.04;
BIN = 1; es decir, cambiar las celdas 4*4 a 1 celda , BIN = 4

% Convertir las imágenes a blanco y negro
25
thresholded_image1 = im2bw(image1,threshold);
thresholded_image2 = im2bw(image2,threshold);
thresholded_image3 = im2bw(image3,threshold);
thresholded_image4 = im2bw(image4,threshold);
thresholded_image5 = im2bw(image5,threshold);
thresholded_image6 = im2bw(image6,threshold);
30
thresholded_image7 = im2bw(image7,threshold);
thresholded_image8 = im2bw(image8,threshold);
thresholded_image9 = im2bw(image9,threshold);
thresholded_image10 = im2bw(image10,threshold);

% agrupar las imágenes
35
binned_image1 = zeros(size(image1,1)/BIN, size(image1,2)/BIN);

for i=1:size(image1,1)/BIN
    for j=1:size(image1,2)/BIN
        binned_image1(i,j) = (sum(sum(thresholded_image1(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:(j-
1)*BIN)+BIN)));
    end
40
end

binned_image2 = zeros(size(image2,1)/BIN, size(image2,2)/BIN);

for i=1:size(image2,1)/BIN
    for j=1:size(image2,2)/BIN
45
        binned_image2(i,j) = (sum(sum(thresholded_image2(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:(j-
1)*BIN)+BIN)));
    end
end

50
binned_image3 = zeros(size(image3,1)/BIN, size(image3,2)/BIN);

for i=1:size(image3,1)/BIN
    for j=1:size(image3,2)/BIN
55

60

65

```

ES 2 810 250 T3

```

    binned_image3(i,j) = (sum(sum(thresholded_image3(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:((j-1)*BIN)+BIN))));
    end
end
5
binned_image4 = zeros(size(image4,1)/BIN, size(image4,2)/BIN);

for i=1:size(image4,1)/BIN
    for j=1:size(image4,2)/BIN
10      binned_image4(i,j) = (sum(sum(thresholded_image4(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:((j-1)*BIN)+BIN))));
        end
    end

binned_image5 = zeros(size(image5,1)/BIN, size(image5,2)/BIN);
15
for i=1:size(image5,1)/BIN
    for j=1:size(image5,2)/BIN
        binned_image5(i,j) = (sum(sum(thresholded_image5(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:((j-1)*BIN)+BIN))));
20      end
    end

binned_image6 = zeros(size(image6,1)/BIN, size(image6,2)/BIN);

for i=1:size(image6,1)/BIN
    for j=1:size(image6,2)/BIN
25      binned_image6(i,j) = (sum(sum(thresholded_image6(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:((j-1)*BIN)+BIN))));
        end
    end

binned_image7 = zeros(size(image7,1)/BIN, size(image7,2)/BIN);
30
for i=1:size(image7,1)/BIN
    for j=1:size(image7,2)/BIN
        binned_image7(i,j) = (sum(sum(thresholded_image7(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:((j-1)*BIN)+BIN))));
35      end
    end

binned_image8 = zeros(size(image8,1)/BIN, size(image8,2)/BIN);

for i=1:size(image8,1)/BIN
    for j=1:size(image8,2)/BIN
40      binned_image8(i,j) = (sum(sum(thresholded_image8(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:((j-1)*BIN)+BIN))));
        end
    end

binned_image9 = zeros(size(image9,1)/BIN, size(image9,2)/BIN);
45
for i=1:size(image9,1)/BIN
    for j=1:size(image9,2)/BIN
        binned_image9(i,j) = (sum(sum(thresholded_image9(((i-1)*BIN)+1:((i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:((j-1)*BIN)+BIN))));
50      end
    end

binned_image10 = zeros(size(image10,1)/BIN, size(image10,2)/BIN);

for i=1:size(image10,1)/BIN
    for j=1:size(image10,2)/BIN
55

```

60

65

```

    binned_image10(i,:) = (sum(sum(thresholded_image10(((i-1)*BIN)+1:(i-1)*BIN)+BIN, ((j-1)*BIN)+1:(j-
1)*BIN)+BIN));
end
end
5
%
% Determinar la diferencia y generar las imágenes

difference_matrix_1_2 = abs(binned_image1 - binned_image2);
difference_matrix_2_3 = abs(binned_image2 - binned_image3);
10
difference_matrix_3_4 = abs(binned_image3 - binned_image4);
difference_matrix_4_5 = abs(binned_image4 - binned_image5);
difference_matrix_5_6 = abs(binned_image5 - binned_image6);
difference_matrix_6_7 = abs(binned_image6 - binned_image7);
difference_matrix_7_8 = abs(binned_image7 - binned_image8);
15
difference_matrix_8_9 = abs(binned_image8 - binned_image9);
difference_matrix_9_10 = abs(binned_image9 - binned_image10);

MoCo_1 = sum(sum((difference_matrix_1_2)))/((sum(sum(binned_image1))+sum(sum(binned_image2)))/2);
20
MoCo_2 = sum(sum((difference_matrix_2_3)))/((sum(sum(binned_image2))+sum(sum(binned_image3)))/2);
MoCo_3 = sum(sum((difference_matrix_3_4)))/((sum(sum(binned_image3))+sum(sum(binned_image4)))/2);
MoCo_4 = sum(sum((difference_matrix_4_5)))/((sum(sum(binned_image4))+sum(sum(binned_image5)))/2);
25
MoCo_5 = sum(sum((difference_matrix_5_6)))/((sum(sum(binned_image5))+sum(sum(binned_image6)))/2);
MoCo_6 = sum(sum((difference_matrix_6_7)))/((sum(sum(binned_image6))+sum(sum(binned_image7)))/2);
MoCo_7 = sum(sum((difference_matrix_7_8)))/((sum(sum(binned_image7))+sum(sum(binned_image8)))/2);
30
MoCo_8 = sum(sum((difference_matrix_8_9)))/((sum(sum(binned_image8))+sum(sum(binned_image9)))/2);
MoCo_9 = sum(sum((difference_matrix_9_10)))/((sum(sum(binned_image9))+sum(sum(binned_image10)))/2);
Average_MoCo = (MoCo_1 + MoCo_2 + MoCo_3 + MoCo_4 + MoCo_5 + MoCo_6 + MoCo_7 + MoCo_8 +
35
MoCo_9)/9;
MoCo_StdDev = std([MoCo_1 MoCo_2 MoCo_3 MoCo_4 MoCo_5 MoCo_6 MoCo_7 MoCo_8 MoCo_9]);

imagesc(difference_matrix_1_2);figure(gcf)

disp('Average MoCo:')
disp(Average_MoCo)
40

disp('MoCo Standard Deviation:')
disp(MoCo_StdDev)

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para tamizar y seleccionar al menos un compuesto de prueba que tiene un efecto sobre la vida útil cronológica de una población de organismos mediante la determinación de un cambio en la movilidad de la población de organismos en el tiempo, en donde los organismos se seleccionan del grupo que consiste en: *Caenorhabditis elegans* y *Danio rerio*; y en donde los organismos se marcan, dicho método que comprende aplicar al menos un compuesto de prueba a la población de organismos y:
 - a) obtener una primera imagen (11) de la población en un primer punto de tiempo (T1)
 - b) obtener una segunda imagen (12) de la población en un segundo punto de tiempo (T2)
 - c) calcular la diferencia absoluta entre 11 y 12 ($\Delta D1$)
 - d) obtener una tercera imagen (13) de la población en un tercer punto de tiempo (T3)
 - e) obtener una cuarta imagen (14) de la población en un cuarto punto de tiempo (T4)
 - f) calcular la diferencia absoluta entre 13 y 14 ($\Delta D2$).
 - g) calcular el cambio entre $\Delta D1$ y $\Delta D2$ para calcular un cambio en la movilidad de la población como un todo, y
 - h) determinar si el al menos un compuesto de prueba exhibe un efecto sobre la vida útil cronológica de la población en comparación con una población que no se ha expuesto a al menos un compuesto de prueba, en donde los compuestos de prueba que extienden la vida útil cronológica de la población de organismos son compuestos candidatos útiles para combatir los efectos del envejecimiento o para el tratamiento de un trastorno relacionado con la edad.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el período de tiempo entre 11 y 12 y el período de tiempo entre 13 y 14 es de 100 ms a 5 minutos, 140 ms a 3 minutos, 200 ms a 90 s, 300 ms a 1 minuto, 400 ms a 45 s, 500 ms a 30 s, 600 ms a 15 s, 700 ms a 10 s, 750 ms a 5 s, 800 ms a 3 s, 850 ms a 2 s, 900 ms a 1 s o 1 s a 2 s.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el período de tiempo entre 12 y 13 es de al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días o al menos 12 días.
4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde $\Delta D1$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 0, y/o en donde $\Delta D2$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 4, o en donde $\Delta D2$ se calcula a partir de imágenes obtenidas el día 6.
5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde:
 - i) los organismos se marcan con proteína verde fluorescente (GFP); y/o
 - ii) en donde el marcador se localiza en un área particular dentro de los organismos; o
 - iii) en donde un solo organismo tiene dos loci marcados con fluorescencia.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el término población se refiere a una pluralidad de organismos que pertenecen al mismo grupo o especie, y el organismo es cualquier organismo adecuado, ya sea un animal, un microorganismo o una forma de vida de una sola célula, que es capaz de moverse, o en donde el término población se refiere a una pluralidad de organismos que pertenecen al mismo grupo o especie, y el organismo es cualquier animal adecuado que es capaz de moverse.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde el término movimiento se refiere a locomoción.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los organismos son *Caenorhabditis elegans*, y la población de *Caenorhabditis elegans* se marca fluorescentemente mediante cualquier medio adecuado, o en donde los organismos son *Caenorhabditis elegans* que expresan la proteína verde fluorescente (GFP), en donde la expresión de GFP se localiza en un área particular dentro de los organismos marcados, o en donde los organismos son: gusanos *Caenorhabditis elegans* sensibles a los fármacos que expresan proteína verde fluorescente (GFP) en su faringe (*Caenorhabditis elegans MY02bus-5*), o *Caenorhabditis elegans* con expresión de GFP en su músculo de la pared del cuerpo.
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el al menos un compuesto de prueba comprende una molécula pequeña o composición biológica.
10. Uso del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el descubrimiento de fármacos y/o toxicología.
11. Un programa de computadora que comprende instrucciones operativas para configurar un aparato de procesamiento de datos para realizar un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

Figura 1

Día

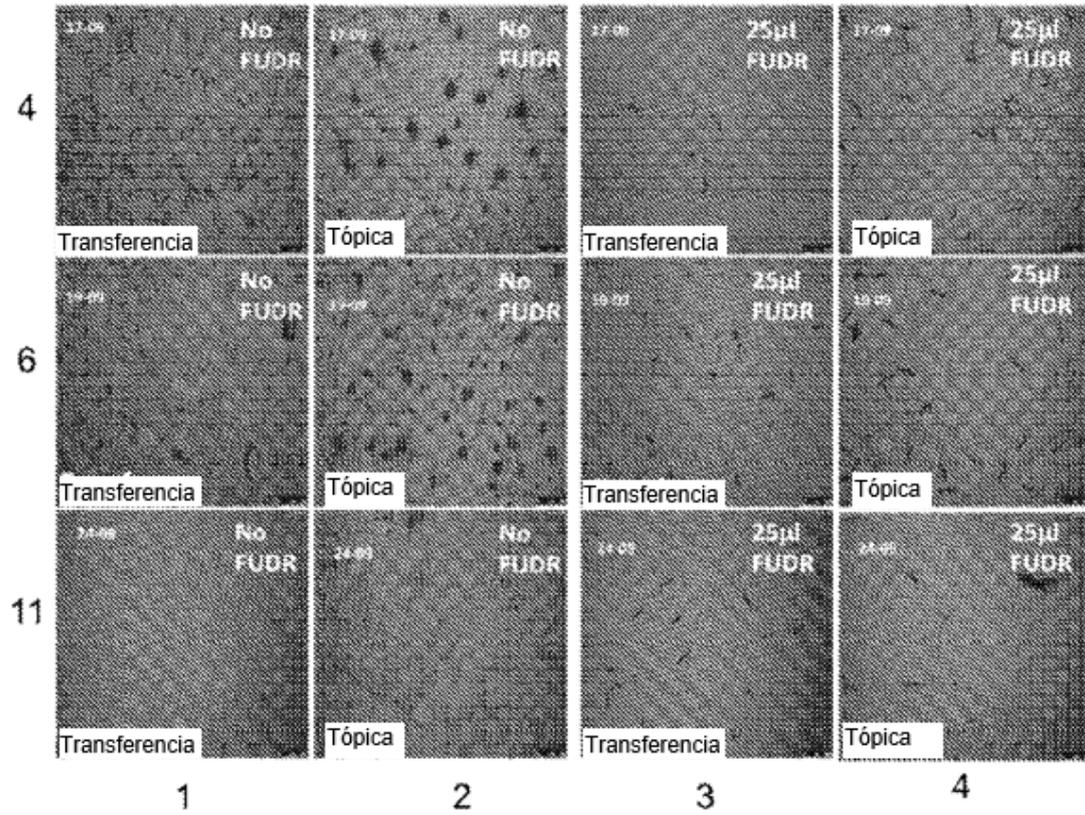


Figura 2

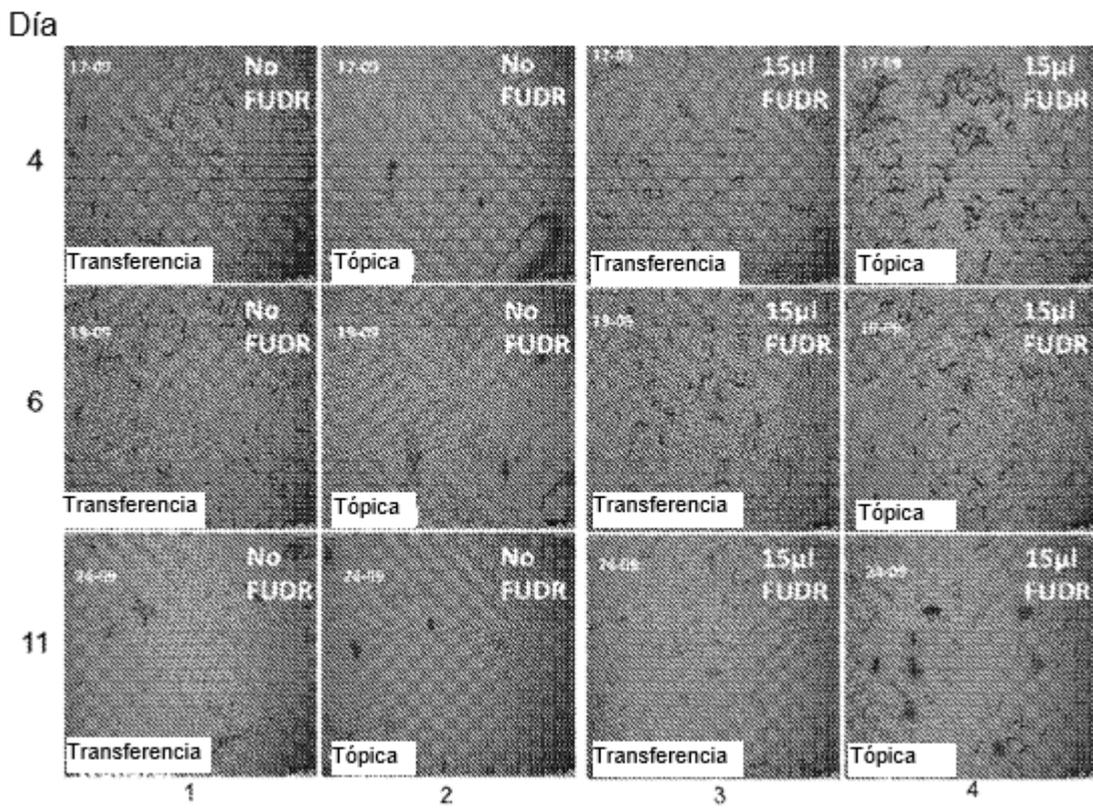


Figura 3

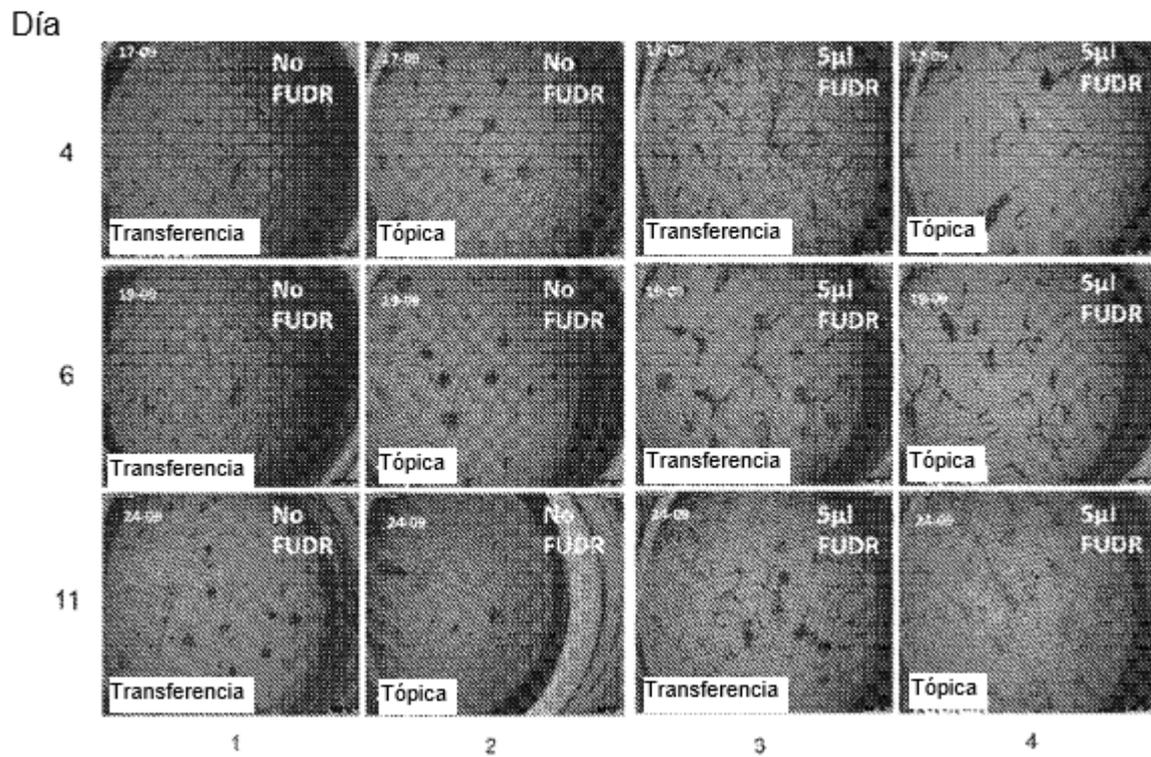


Figura 4

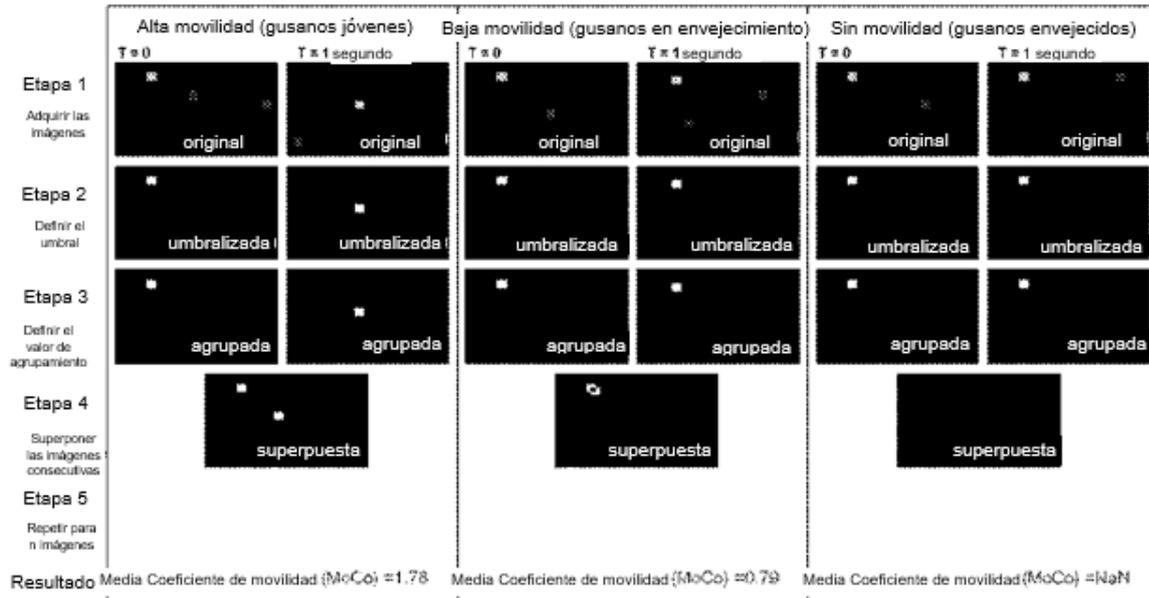


Figura 5

Análisis por MatLab del MoCo que compara intervalos de tiempo entre imágenes de AM134bus-5 a temperatura ambiente y después de un golpe de frío de 4 °C mediante el uso de un valor de BIN de 1

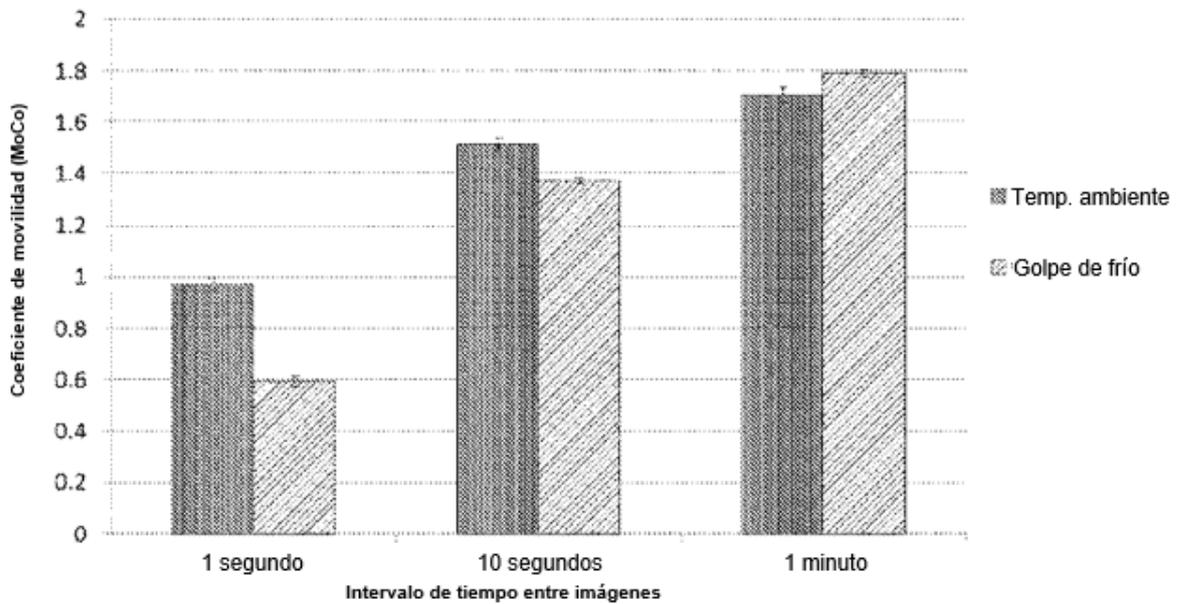


Figura 6

Análisis por MatLab del MoCo que compara el efecto del valor de BIN entre imágenes de *C. elegans AM134bus-5* a temperatura ambiente y después de un golpe de frío de 4 °C con un intervalo de tiempo de 1 segundo

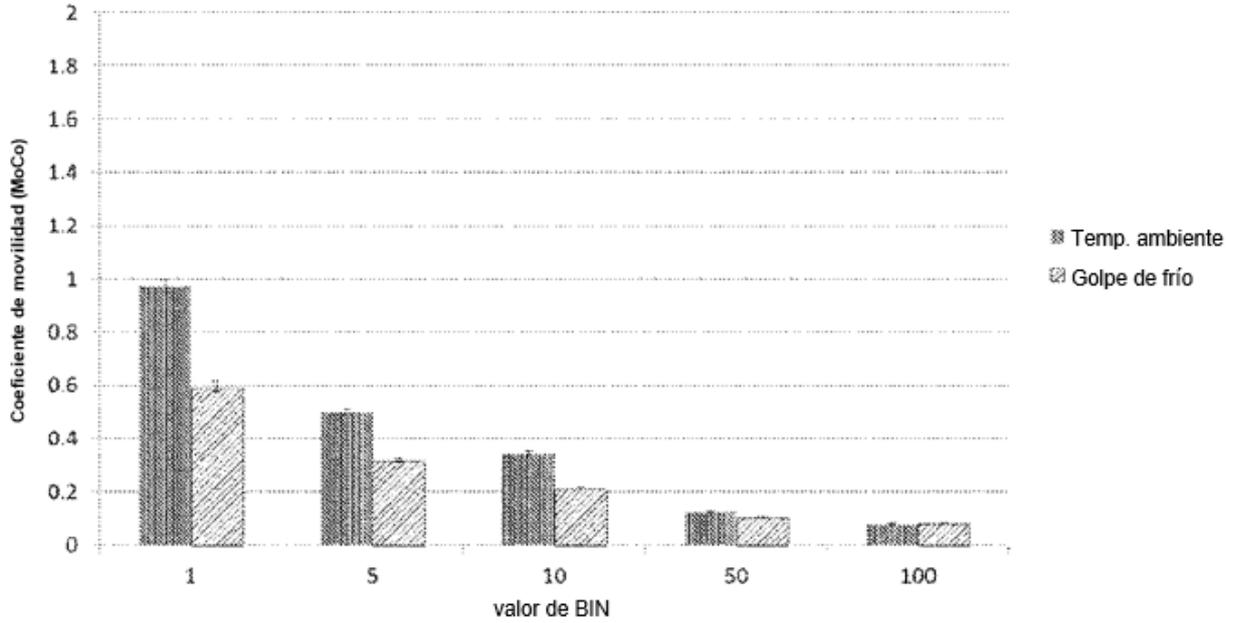


Figura 7

Ejemplos de *C. elegans* con GFP localizada en diferentes regiones

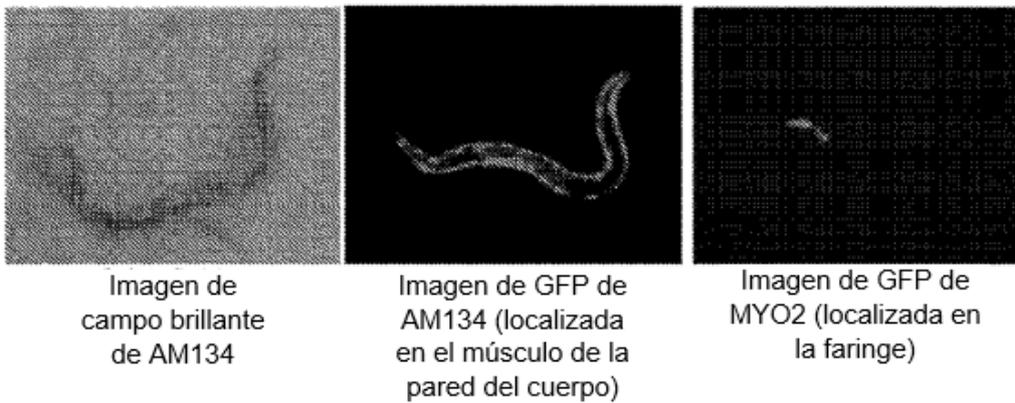


Figura 8

Análisis por MatLab del MoCo que compara intervalos de tiempo entre imágenes de MYO2bus-5 a temperatura ambiente y después de un golpe de frío de 4 °C mediante el uso de un valor de BIN de 1

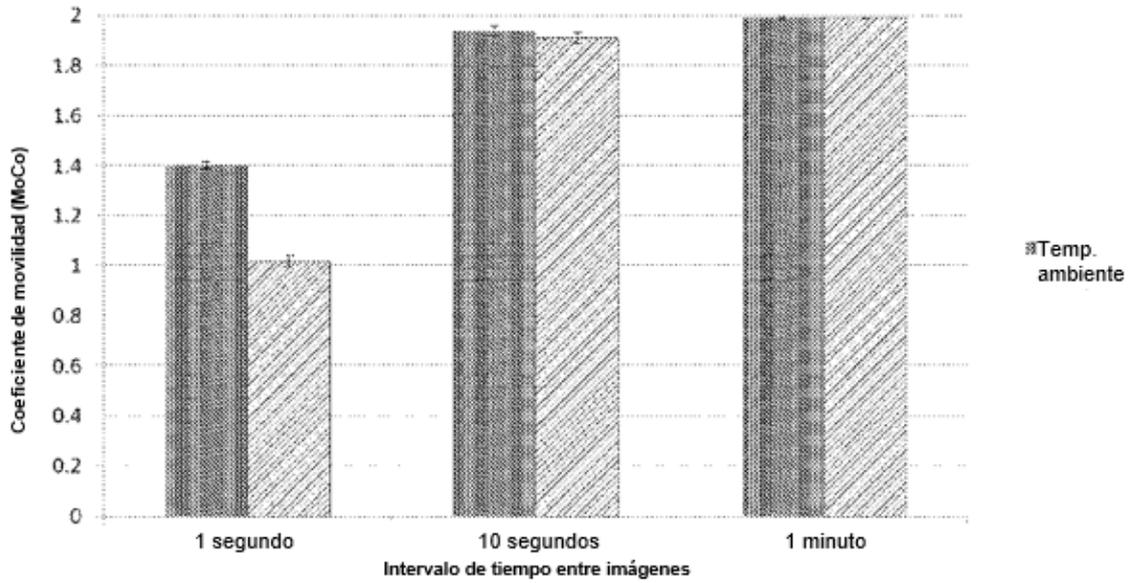


Figura 9

Análisis por MatLab del MoCo que compara el efecto del valor de BIN entre imágenes de MYO2bus-5 a temperatura ambiente y después de un golpe de frío de 4 °C con un intervalo de tiempo de 1 segundo

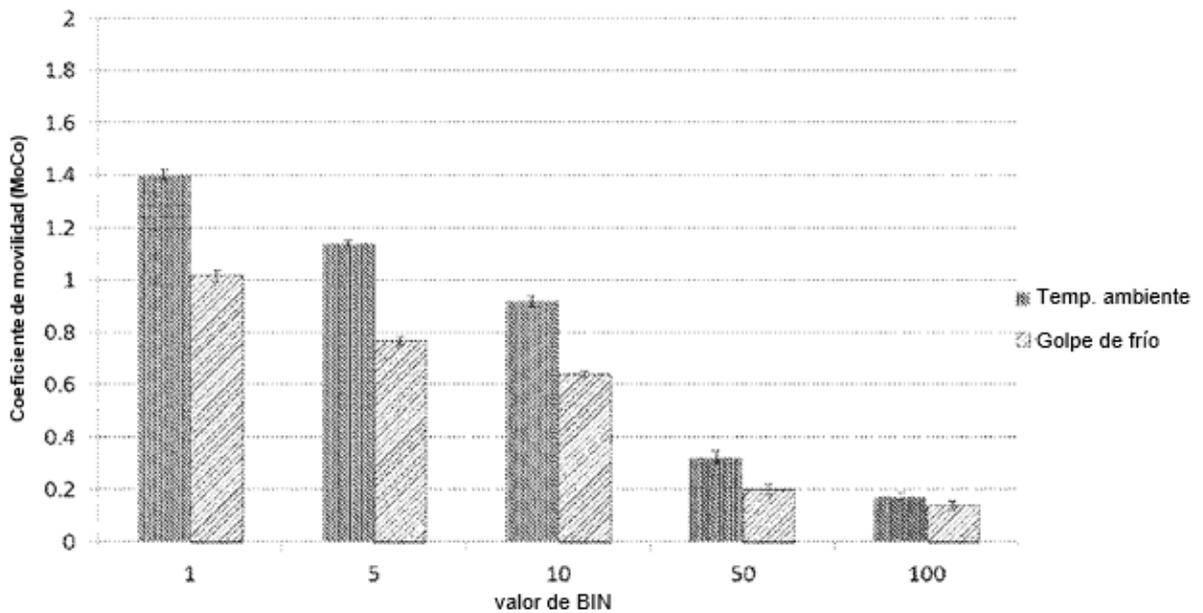


Figura 10

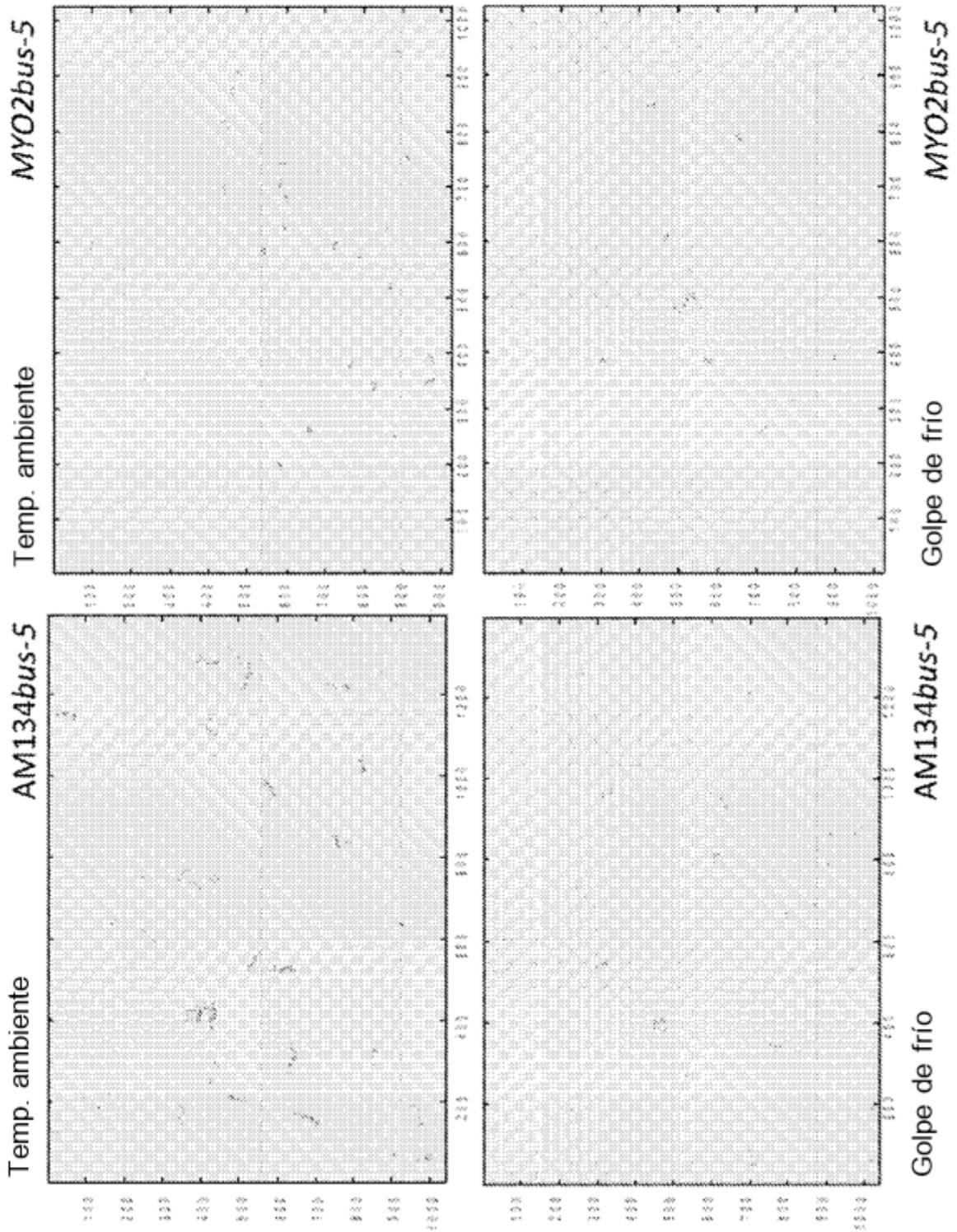


Figura 11

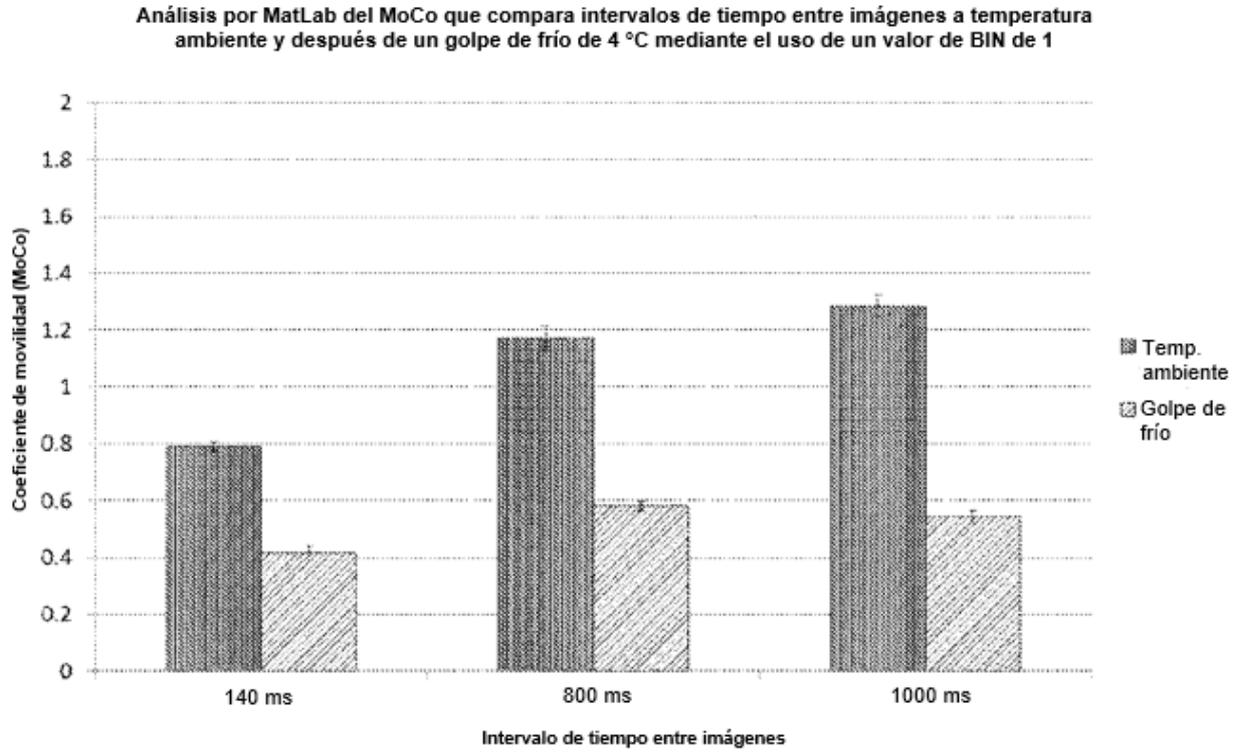


Figura 12

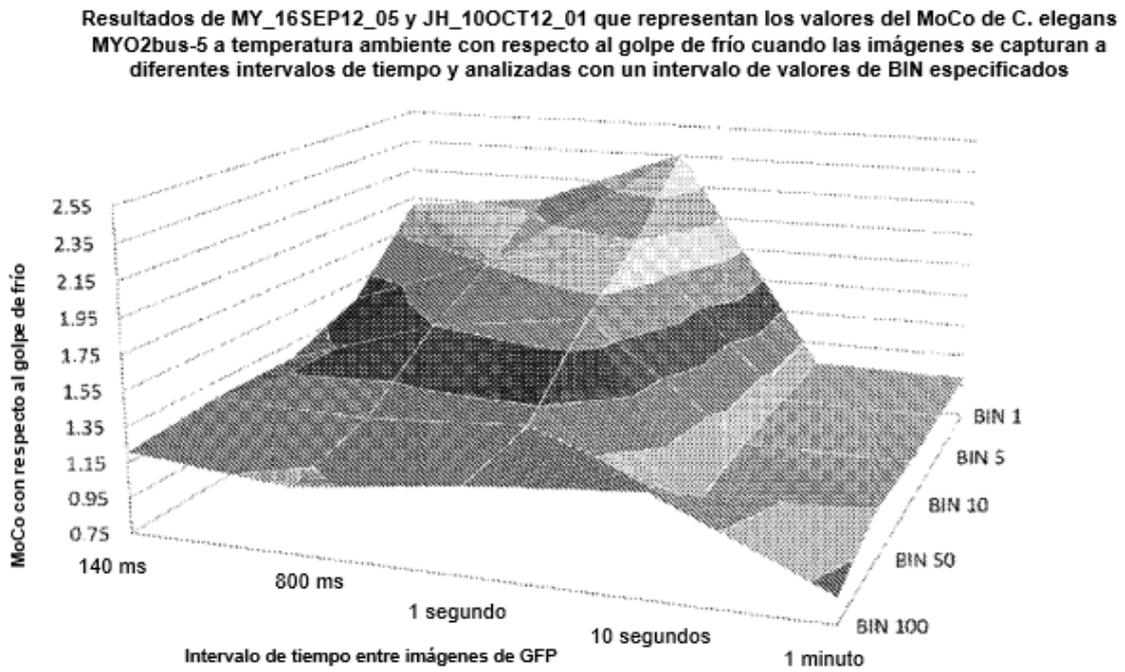


Figura 13

Comparación del coeficiente de movilidad de mutantes de *C. elegans* MYO2B5 en el tiempo cuando se trataron con FK506 o DMSO en una placa de 12 pocillos a una densidad inicial de aproximadamente 100 huevos

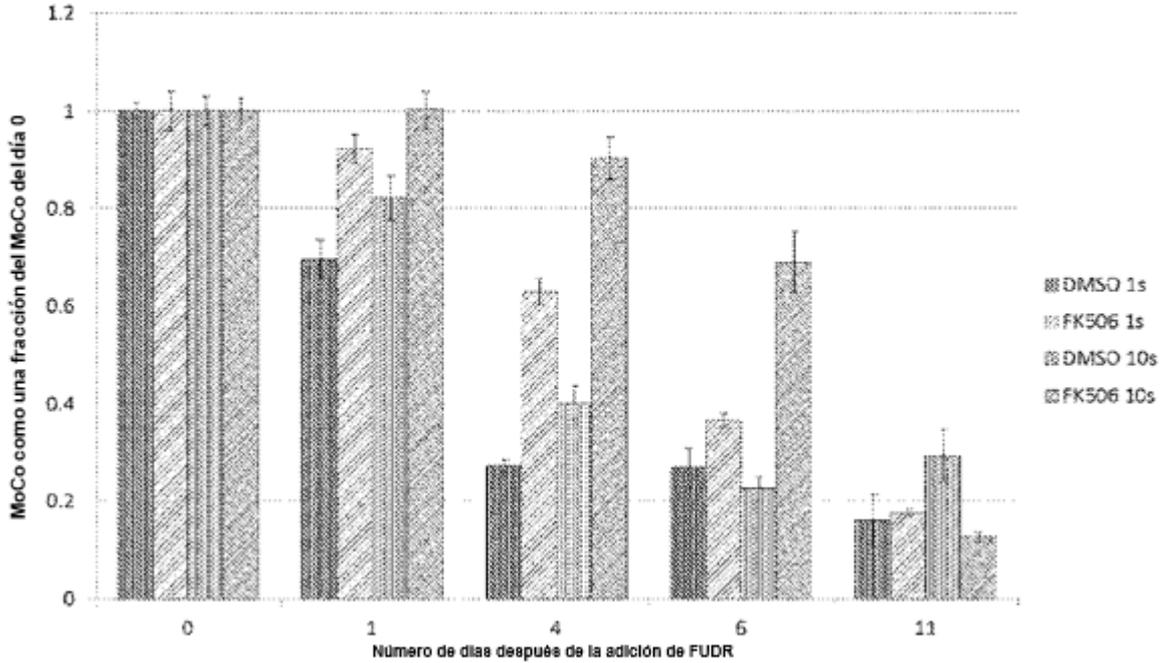
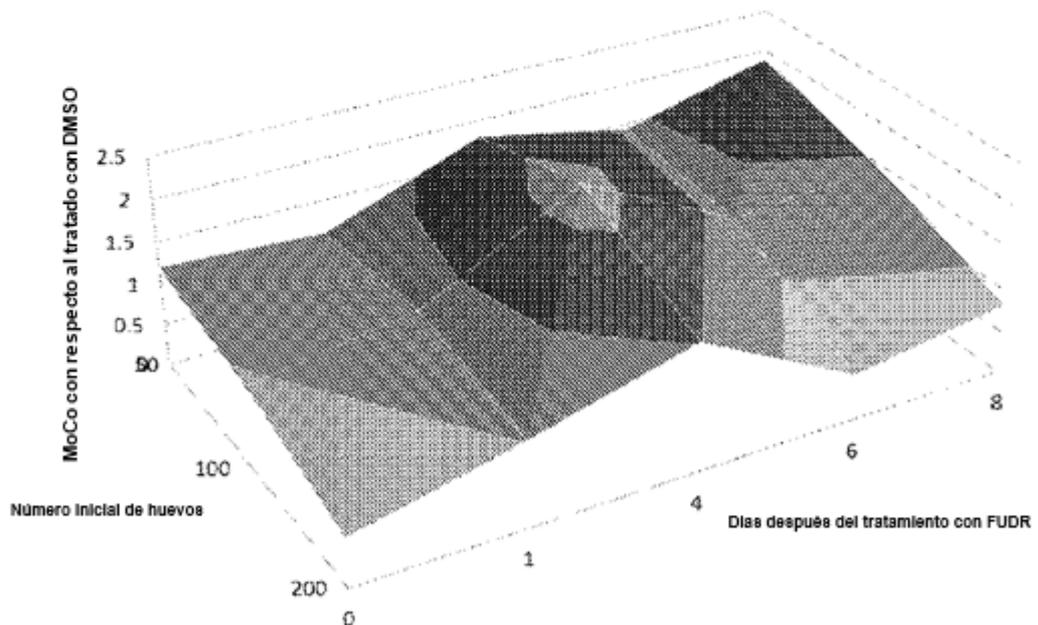


Figura 14

A

Resultados de JH_01OCT12_01 que representan el MoCo de *C. elegans* MYO2bus-5 tratados con FK506 con respecto al tratado simuladamente a varias densidades de gusanos durante un periodo de 8 días mediante el uso de un intervalo de tiempo de 1 segundo entre imágenes



B

Resultados de JH_01OCT12_01 que representan el MoCo de *C. elegans* MYO2bus-5 tratados con FK506 con respecto al tratado simuladamente a varias densidades de gusanos durante un periodo de 8 días mediante el uso de un intervalo de tiempo de 10 segundos entre imágenes

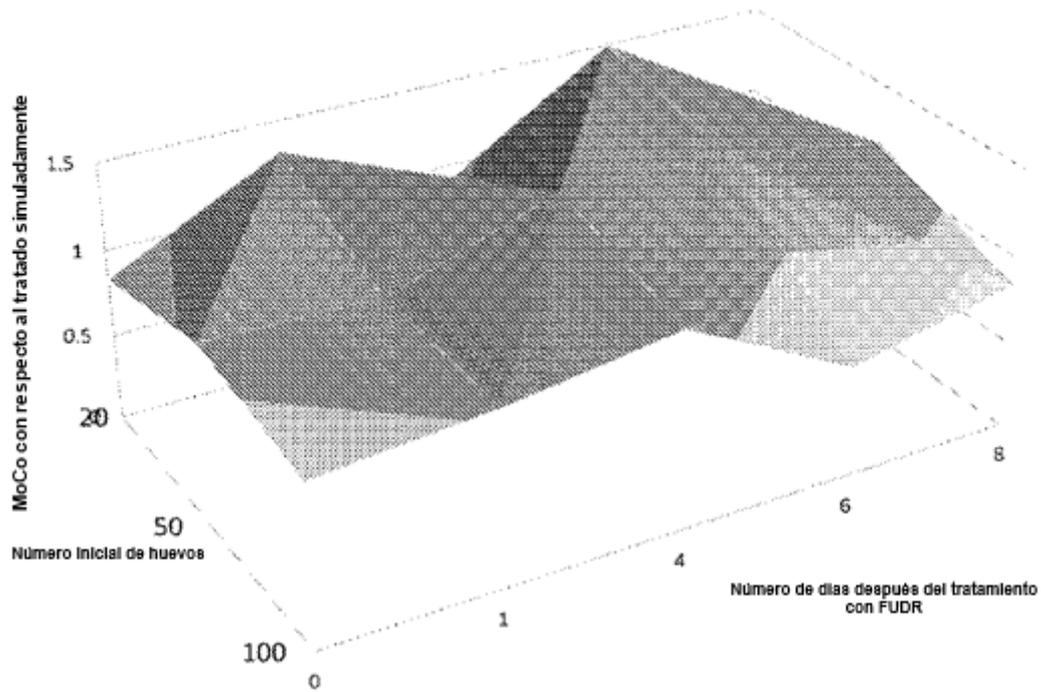


Figura 15

Una comparación del coeficiente de movilidad del mutante de *C. elegans* MYO2bus-5 tratado con FK506 y tratado simuladamente después del tratamiento con FUDR a un intervalo de tiempo de 1 segundo $p=0,01$

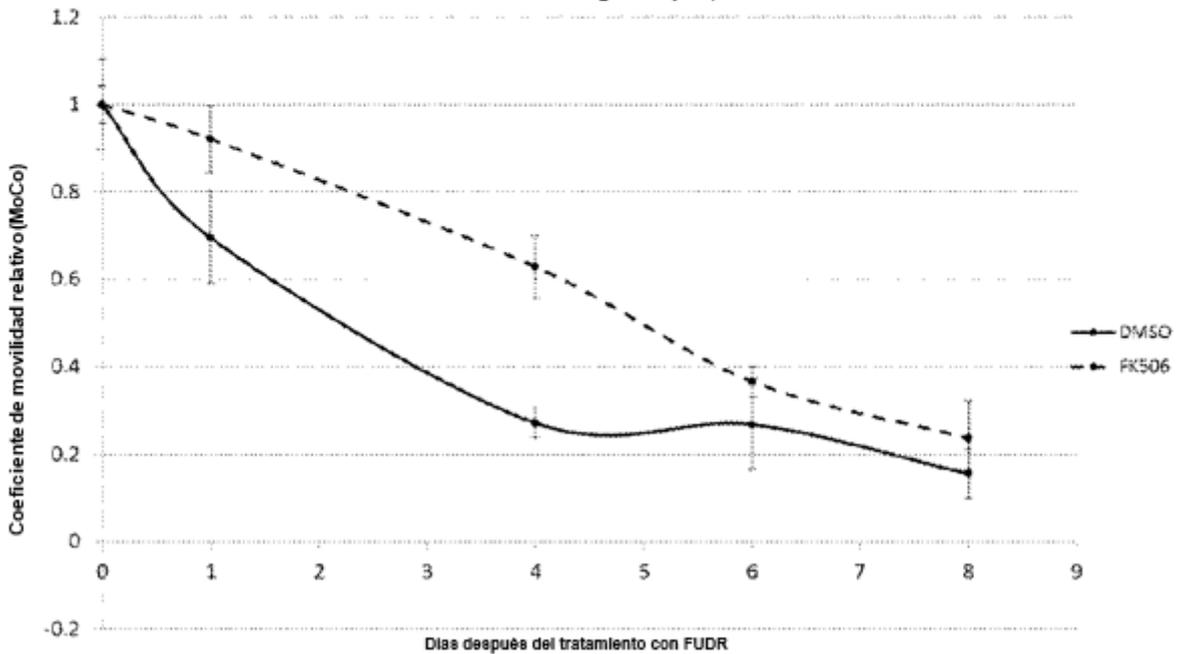


Figura 16

Una comparación del coeficiente de movilidad del mutante de *C. elegans* MYO2bus-5 tratado con FK506 y tratado simuladamente después del tratamiento con FUDR a un intervalo de tiempo de 10 segundos $p=0,01$

