



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**BOMBEO DE LA FARINGE DE *Caenorhabditis elegans*:
ESTUDIO PRELIMINAR DE SERIES DE TIEMPO A TRAVÉS
DE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES PARA
MODELAR LA FRAGILIDAD**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A:

IXCHEL GARDUÑO ALVARADO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. RUBEN YVAN MAARTEN FOSSION

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2016



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 esta 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.

SINODALES:

- Dr. Ruben Yvan Maarten Fossion (Instituto de Ciencias Nucleares, Centro de Ciencias de la Complejidad (C3), UNAM)
- Dr. Alejandro Frank Hoeflich (Instituto de Ciencias Nucleares, Centro de Ciencias de la Complejidad (C3),UNAM)
- Dr. Victor Manuel Velázquez Aguilar (Facultad de Ciencias, UNAM)
- Dra. Ana Leonor Rivera Lopez (Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM)
- Dr. Irving Omar Morales Agiss (Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM)
- Dr. Juan Miranda Ríos (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto Nacional de Pediatría, UNAM)

Dedicatoria

Dedico esta tesis a todas las personas que me ayudaron a completar esta etapa de mi vida. A mis padres, a mi hermana y a mis antepasados. A Ruben y Alejandro, por su conocimiento, ayuda, paciencia y comprensión. A Juan por sus consejos y por darme la libertad de explorar y practicar mi creatividad. A Miguel por su apoyo en momentos buenos y en momentos críticos. A Eloisa y a Silvia por ayudarme a pensar de una manera más serena y objetiva acerca de la vida. Y a todos aquellos que me ayudaron a salir adelante y me tendieron la mano en los momentos más difíciles: Padmabandhu, Benito, el Profe Carlos, la señora Clarita, Xchel, Iadira, Cach, Ale y Quetzalcóatl. Se la dedico a todas aquellas personas con las cuales he sonreído por los buenos momentos tan agradables (amigos y amigas, ustedes saben quienes son) y también a todas aquellas personas que me hicieron pasar momentos no tan agradables por enseñarme indirectamente la belleza de la vida. También me dedico esta tesis a mi misma para demostrarme que puedo completar cualquier meta que me proponga y por permitirme pensar de una manera diferente. Y al universo por existir y por ser yo y todo lo que me rodea parte de él.

A todos ustedes GRACIAS. Los quiero muchísimo.

Agradecimientos

Agradezco el soporte financiero recibido por parte del CONACYT en el marco de ayudante de investigador nacional Nivel III Dr Alejandro Frank Hoeflich. Agradezco también el apoyo financiero del PAPIIT en el marco del proyecto Caos Cuántico: Teoría y Experimento (PAPIIT:IN121809-2) aprobado por el Dr. Víctor Velázquez Aguilar.

Agradezco al Dr. Andres Bendesky por la elucubración de la idea de la cual partió todo este trabajo de investigación.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Rubén Fossion, por su paciencia al transmitirme su conocimiento, su apoyo y su comprensión.

Agradezco al Dr. Arturo Menchaca Rocha (Instituto de Física, UNAM) por brindar apoyo a este proyecto poniendo a nuestra disponibilidad equipo e instalaciones para la realización de los experimentos, así como al Fis. Roberto Núñez Cadena (Instituto de Física, UNAM) por la ayuda técnica que nos proporcionó en cuanto al uso de dichos equipos.

Agradezco al Prof. Enrique Salazar Leyva (Facultad de Ciencias, UNAM) por transmitirme sus conocimientos y despejar dudas para la teoría de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Rosa Navarro González (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) por brindar las instalaciones, equipo y material de laboratorio para la realización de los experimentos, así como a la valiosa ayuda especial del Técnico Académico Laura Silvia Salinas Velázquez (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Agradezco al Pasante en Ciencias de la Computación Miguel Ángel Carvajal Ramos (Facultad de Ciencias, UNAM) por su ayuda al automatizar los métodos necesarios para la elaboración de la presente tesis.

Agradezco al Dr. Takuya Nishigaki (Instituto de Biotecnología, UNAM), al Dr. Pedro Eduardo Miramontes Vidal (Facultad de Ciencias, UNAM) y al Dr. Juan Miranda Ríos (Instituto Nacional de Pediatría, UNAM) por aceptar ser sinodales en este trabajo así como por compartir su conocimiento, sus valiosas opiniones y puntos de vista.

A todos ustedes gracias por el apoyo, ayuda, facilitación y estímulo en la realización de este trabajo de investigación.

Resumen

La fragilidad se describe como una susceptibilidad no-específica con resultados negativos en la salud por factores múltiples y suele interpretarse como una acumulación con la edad de daños aleatorios que el cuerpo no logra reparar. Sin embargo, no existe todavía un consenso sobre cómo definir o medir la fragilidad. Por otra parte, muchos órganos tienen una estructura espacial que es fractal, es decir, que consiste de repeticiones de subestructuras similares a escalas cada vez más pequeñas. Se ha observado que los órganos pierden fractalidad con la edad, las enfermedades o los malos hábitos. Muchos órganos producen señales o series de tiempo que, bajo las mismas circunstancias, también pierden fractalidad temporal, lo que permite estimar su estado general a partir de un análisis detallado de las mismas.

Debido a que el hombre tiene una esperanza de vida de aproximadamente entre 70 y 80 años es difícil realizar un estudio longitudinal del desarrollo de la fragilidad. En cambio, *C. elegans* tiene un ciclo de vida menor a un mes, lo que facilita estudios longitudinales, y además es el organismo en el que más se han estudiado las causas extrínsecas e intrínsecas (genética) del envejecimiento para la obtención de un modelo del envejecimiento para el hombre.

Este organismo posee otras características que le hacen un buen modelo de estudio, ya que (i) la faringe de *C. elegans* es una bomba muscular rítmica igual que el corazón de los vertebrados; (ii) *ceh-22*, el gen de *C. elegans* homólogo al gen *homeobox Nk2x.5*, que juega un papel importante en el desarrollo del corazón en vertebrados, participa en el desarrollo de la faringe de *C. elegans*; (iii) las 3 regiones de la faringe exhiben actividad contráctil autónoma ya que están controladas por una neurona marcapasos; y (iiii) se ha encontrado que el ritmo promedio de bombeo de la faringe de *C. elegans* es indicativo de su edad.

En este trabajo, se establece una manera experimental y teórica para medir e interpretar las series de tiempo de bombeo de la faringe de un individuo de *C. elegans*, con resultados comparables a los observados en series de tiempo humanas. En un paso siguiente, nos proponemos hacer un estudio longitudinal con una cohorte de gusanos para establecer cómo la fractalidad temporal se pierde con la edad de los gusanos. Estos resultados nos permitirán modelar cómo cambia la fractalidad también en series de tiempo en el hombre, donde estudios longitudinales son difíciles de realizar, con el afán de establecer una definición y cuantificación de la fragilidad humana en términos de fractalidad en series de tiempo

Índice general

1. Introducción.....	1
1.1 Fractales en el espacio y en el tiempo.....	1
1.2 Hacia un modelo animal de la fragilidad.....	6
1.3 Hipótesis y objetivos.....	9
2. Material y método.....	12
2.1 Descripción.....	12
2.1.1 Tipos de mutantes.....	12
2.1.2 Tipos de cámara.....	14
2.1.3 Tipos de montaje del gusano.....	15
2.1.4 Toma de video.....	16
2.1.5 Tipos de Procesamiento Digital de Secuencias de Imágenes (PDSI).....	17
2.1.6 Tipos de análisis de las series de tiempo	17
2.2 Diseño experimental.....	18
2.2.1 Mantenimiento de <i>C. elegans</i> en el Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM.....	18
2.2.2 Montaje de los gusanos.....	19
2.2.3 Montaje de las cámaras.....	19
2.2.4 Procesamiento Digital de Series de Imágenes.....	19
2.2.4.1 Método 1: Segmentación de la imagen y medición del área (número de píxeles)del triturador	19
2.2.4.2 Método 2: Diferencias entre los valores de los píxeles de imágenes consecutivas.....	21
2.2.5 Análisis de las series de tiempo.....	24
2.2.5.1 Fast Fourier Transform (FFT).....	24
2.2.5.2 Singular Spectrum Analysis (SSA).....	24
3. Resultados.....	27
3.1. Gusano restringido en movimiento en la cámara de microfluidos (R)	27
3.2. Gusano que expresa <i>Green Fluorescent Protein</i> en la faringe (G).....	39
3.3. Gusano unc-119 (ed3) grabado en el Instituto de Física de la UNAM (U).....	47
3.4. Gusano unc-54 ed190 CB190 con posición horizontal (H)	52
3.5. Gusano unc-54 (ed 190) CB190 del que se puede apreciar solo la cabeza (C).....	58
4. Discusión.....	63
4.1 Discusión general	63
4.2 Discusión sobre especificaciones y características.....	68
4.2.1 Especificaciones de los gusanos.....	68
4.2.2 Especificaciones de cada video.....	71
4.2.3 Series de tiempo.....	75
4.2.4 Métodos de análisis de series de tiempo.....	79
4.3 Especificaciones metodológicas.....	81
5. Conclusiones.....	82
6. Anexos.....	84

7. Referencias.....	93
----------------------------	-----------

1. Introducción

1.1 Fractales en el espacio y en el tiempo

La fragilidad es un concepto reciente de la medicina y de la geriatría que pretende estimar el estado de salud de una persona mayor de una forma más completa que los indicadores actuales de mortalidad, morbilidad y discapacidad para realizar actividades cotidianas. No hay todavía un consenso en la literatura médica sobre una definición exacta de la fragilidad, y menos aun sobre cómo medirla y cuantificarla. Anteriormente se ha diagnosticado y cuantificado la fragilidad en un índice médico basándose parcialmente en el autorrelato del paciente, sin embargo esto puede resultar en resultados subjetivos. Es por esto que se describe la fragilidad aproximativamente como “la susceptibilidad no-específica por resultados negativos en la salud por factores múltiples como el envejecimiento, enfermedades y malos hábitos” (Rockwood, 2005; García González *et al.*, 2009) y suele interpretarse como una acumulación con la edad de daños aleatorios que el cuerpo no logra reparar (Mitniski *et al.*, 2002). Lo cual resulta en una pérdida de reservas funcionales y una mayor vulnerabilidad contra eventos adversos.

Muchos órganos tienen una estructura espacial que es fractal, es decir, que consiste de repeticiones de subestructuras similares a escalas cada vez más pequeñas (Goldberger *et al.*, 1990) (Fig. 1.1). La estructura espacial en forma de árbol que se observa en la figura 1.1 exhibe ramificaciones autosimilares de tal manera que cada subestructura es parecida a la forma global; tales estructuras se denominan fractales espaciales. Ejemplos de fractales espaciales son los pulmones y la red de conducción eléctrica His-Purkinje en el corazón. La función de los fractales espaciales en los organismos brinda mayor robustez, simplificación y optimización de los procesos metabólicos.

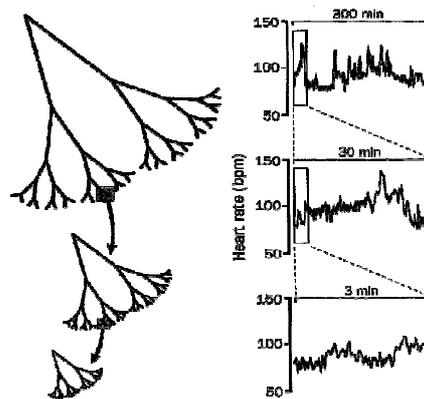


Figura 1.1. Representación esquemática de una estructura espacial autosimilar (izquierda) y una señal temporal autosimilar (derecha). Figura tomada de Goldberger, 1996.

Los órganos, tejidos, células o sistemas realizan funciones biológicas que cambian a través del tiempo. Al ser medidos experimentalmente repetidas veces, estos cambios pueden graficarse para obtener una señal o serie de tiempo. De esta manera las

fluctuaciones de la señal pueden estudiarse para obtener más información sobre el fenómeno observado. Ejemplos de observables fisiológicos son las magnitudes que pueden medirse para obtener señales son la temperatura corporal y el ritmo cardíaco.

El ritmo cardíaco se mide convencionalmente con el número promedio de latidos por minuto (bpm por sus siglas en inglés). Cada latido en un electrocardiograma corresponde con una función de onda PQRST (Fig.1.2.A). En la forma de dicha función onda se observa si hay algún problema con la contracción del corazón debido a que la función representa una serie de despolarizaciones y repolarizaciones de las células musculares de los ventrículos y las aurícula. Estas despolarizaciones y repolarizaciones son producto de la generación de pulsos eléctricos de las neuronas marcapasos del nódulo sinoauricular (también llamado sinoatrial) (Fig.1.2.B). Estos pulsos eléctricos son distribuidos a través de todo el corazón con el sistema de conducción de señales eléctricas His-Purkinje (Fig.1.2.B) (Morris et al., 2009). Los pulsos, despolarizaciones y repolarizaciones hacen que el corazón se contraiga y se relaje.

Del otro lado, se pueden estudiar también los intervalos RR (Fig.1.2.A), es decir los intervalos de tiempo entre dos ondas R sucesivas. Una onda R corresponde a la despolarización ventricular. La variabilidad de tiempo de los intervalos RR es un reflejo de como el ritmo cardíaco se adapta a condiciones cambiantes en el medio externo e interno.

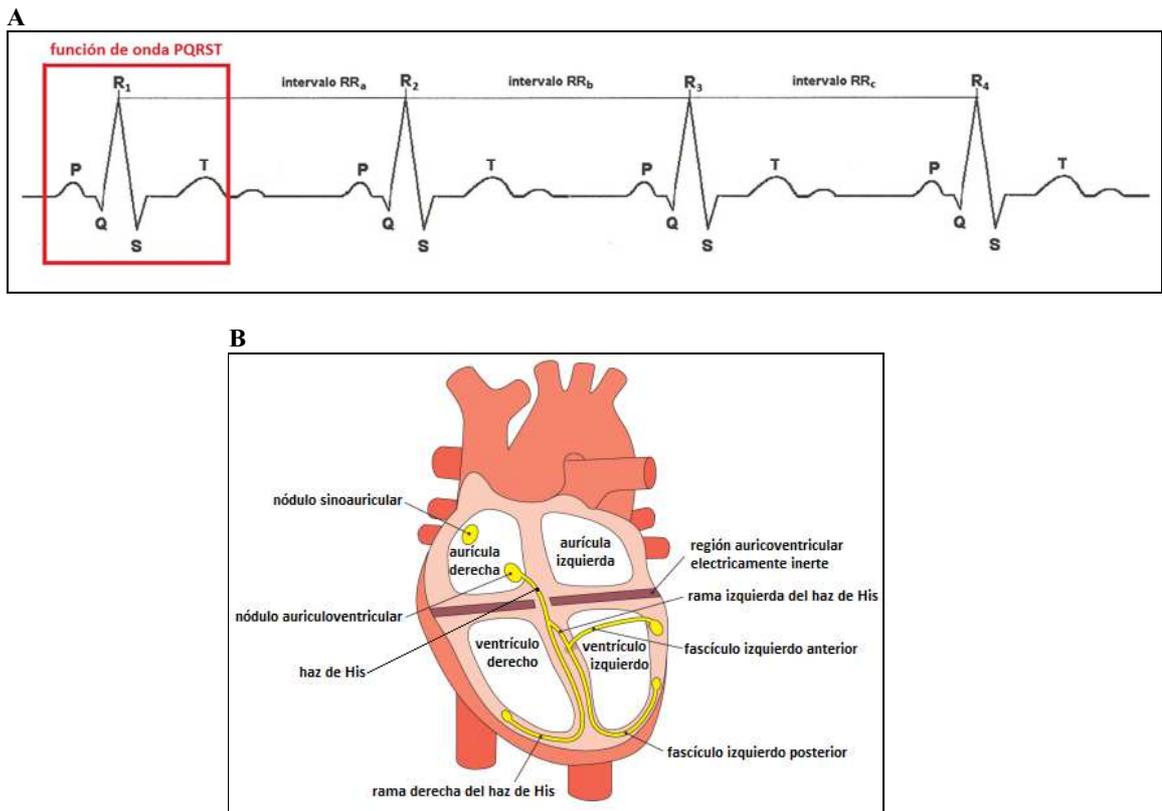


Figura 1.2. Anatomía del corazón y electrocardiograma. **A)** Esquema del corazón donde se muestran sus distintas regiones y el sistema de conducción de señales eléctricas His-Purkinje (en amarillo). Figura modificada tomada de Morris et al., 2009. **B)** Esquema que representa un electrocardiograma donde se pueden observar 4 ondas PQRST así como 3 intervalos RR.

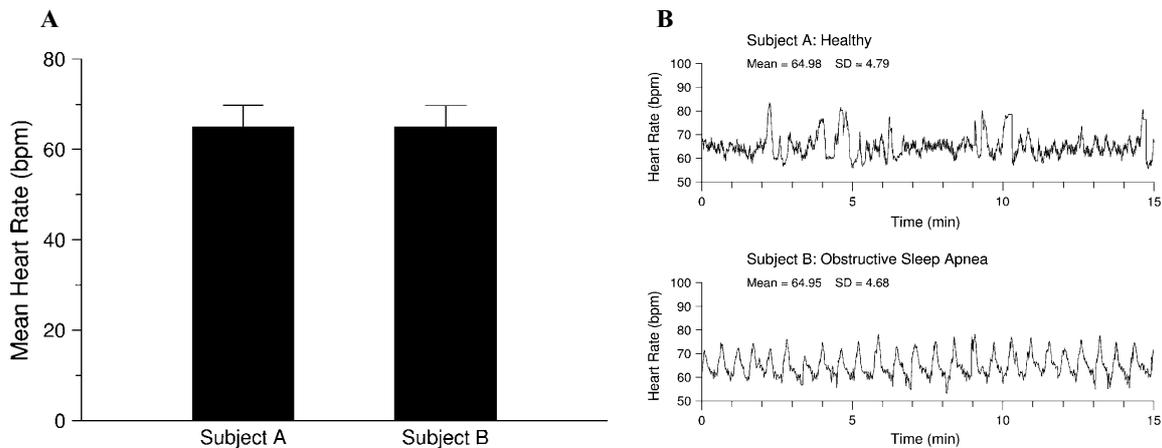


Figura 1.3. Promedio y series de tiempo del ritmo cardiaco de dos individuos. **A)** Promedio y error estándar casi idénticos de la dinámica del ritmo cardiaco en latidos por minuto (bpm por sus siglas en inglés) en 15 minutos un individuo sano y otro con episodios de severa apnea obstructiva del sueño. **B)** Series de tiempo originales de los dos sujetos de la figura 1.3.A. La dinámica de la serie de tiempo del individuo sano exhibe un patrón con mas variabilidad en contraste con la estructura relativamente periódica en el tiempo de la serie del individuo con apnea del sueño. Figura tomada de Golberger, 2006.

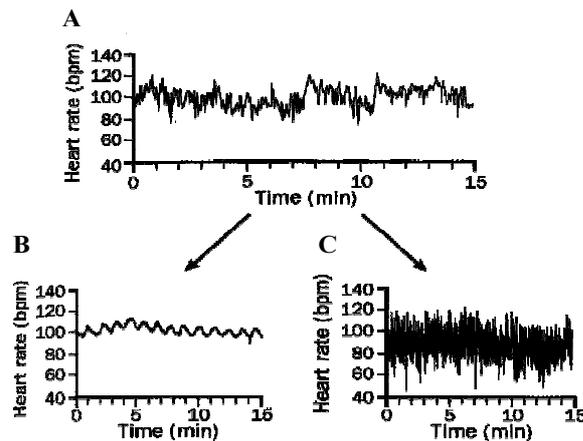


Figura 1.4. Análisis del ritmo cardiaco como serie de tiempo: registro de la variación del ritmo (en latidos por minuto) por 15 minutos. Los tres tipos diferentes de series de tiempo del ritmo cardiaco: (A) fractal, (B) rígida (constante o periódica) y (C) aleatoria. Figura tomada de Goldberger, 1996.

En la figura 1.3.A se aprecia el ritmo cardiaco de dos individuos medido convencionalmente. En este caso particular se puede advertir que los promedios tanto como las barras de error son casi idénticos. Observando las series de tiempo correspondientes a los mismos individuos en la figura 1.3.B puede notarse que a pesar de tener el mismo promedio y barra de error, las series de tiempo son distintas. El individuo A es un individuo sano, mientras que el individuo B sufre de episodios de severa apnea obstructiva del sueño.

Ciertos órganos del cuerpo generan señales fractales como el corazón, que genera un ritmo que tiene fluctuaciones a varias escalas de tiempo, y estas son estadísticamente autosimilares; tales señales se denominan fractales temporales (fig 1.1). Estos órganos bajo

circunstancias de estrés como es la apnea obstructiva del sueño, también pierden fractalidad temporal (Goldberger, 1996), y al analizar las señales obtenidas de ellos permite estimar su edad. Se ha observado que los órganos pierden fractalidad con la edad, las enfermedades o los malos hábitos, tanto en la estructura espacial de los órganos, como en las señales producidas por estos (Lipsitz y Goldberger, 1992). En la figura 1.4 se pueden observar tres tipos diferentes de series de tiempo del ritmo cardíaco. El primero (Fig. 1.4.A) es una serie de tiempo que es no-periódica de una persona sana, pero que es correlacionada y autosimilar y por lo tanto *fractal* (Fig. 1.1 señal autosimilar). El segundo (Fig. 1.4.B) es una serie de tiempo que exhibe demasiadas correlaciones y por consiguiente demasiado rígida, es decir *constante o periódica* como en un paciente con insuficiencia cardíaca. El tercer tipo (Fig. 1.4.C) es, por el otro lado, una serie de tiempo que puede perder todas sus correlaciones y volverse *aleatoria* como en un paciente con fibrilación auricular.

Para poder obtener información de estas señales o series de tiempo se aplica una transformada rápida de Fourier (FFT, *Fast Fourier Transform*) para obtener un espectro de potencias (EP). Un EP responde a la pregunta “¿Qué tanto de la señal está a una frecuencia ω ?” y nos da la respuesta para cada una de las frecuencias que compone la señal. El EP es la transformada de Fourier (F) al cuadrado de la serie de tiempo $f(t)$, i.e. $P(f) \sim |F(f(t))|^2$. En las figuras 1.5 a 1.8 se representa el espectro de potencias en escala log-log para mejor apreciación de las diferentes escalas que constituyen a la señal. En las mismas figuras observa que el EP de una señal aleatoria es *plano* sobre muchas escalas de frecuencias porque todas las frecuencias contribuyen con la misma importancia. La pendiente que se obtiene de la escala log-log del EP, en escala lin-lin lo que se representa es el exponente espectral (o exponente de densidad espectral) en una ley de potencias:

Ley de potencias

$$P(f) \sim f^\beta$$

pendiente

$$\log P(f) \sim \beta \log f$$

Donde β = exponente (de densidad) espectral con $-2 \leq \beta \leq 0$

En el EP log-log se pueden obtener varias pendientes que, utilizando la ley de potencias, se pueden denominar como diferentes tipos de ruidos (Fig. 1.5):

$$P(f) \sim 1/f^\beta$$

$\beta \approx 0$ ruido blanco

$\beta \approx -1$ ruido $1/f$

$\beta \approx -2$ ruido browniano

$\beta = -\infty$ señal periódica

En la figura 1.6 se presenta un EP log-log esquemático en donde se pueden apreciar los diferentes valores aproximados que puede adquirir β . Cuando $\beta = \infty$ corresponde en el EP log-log a una línea completamente vertical debido a que una señal periódica muestra *una sola frecuencia dominante* de la señal (Fig. 1.6).

Haciendo una correspondencia del EP log-log esquemático de la figura 1.6 a la figura 1.4, 1.4.A correspondería a $1/f$, 1.4.B a “Periódico” y 2C a “Aleatorio”. Sin embargo no solamente se pueden representar estos tres tipos de pendientes en el EP log-log, sino una infinidad entre los 3 casos aquí esquematizados debido a que todas las series de tiempo son distintas.

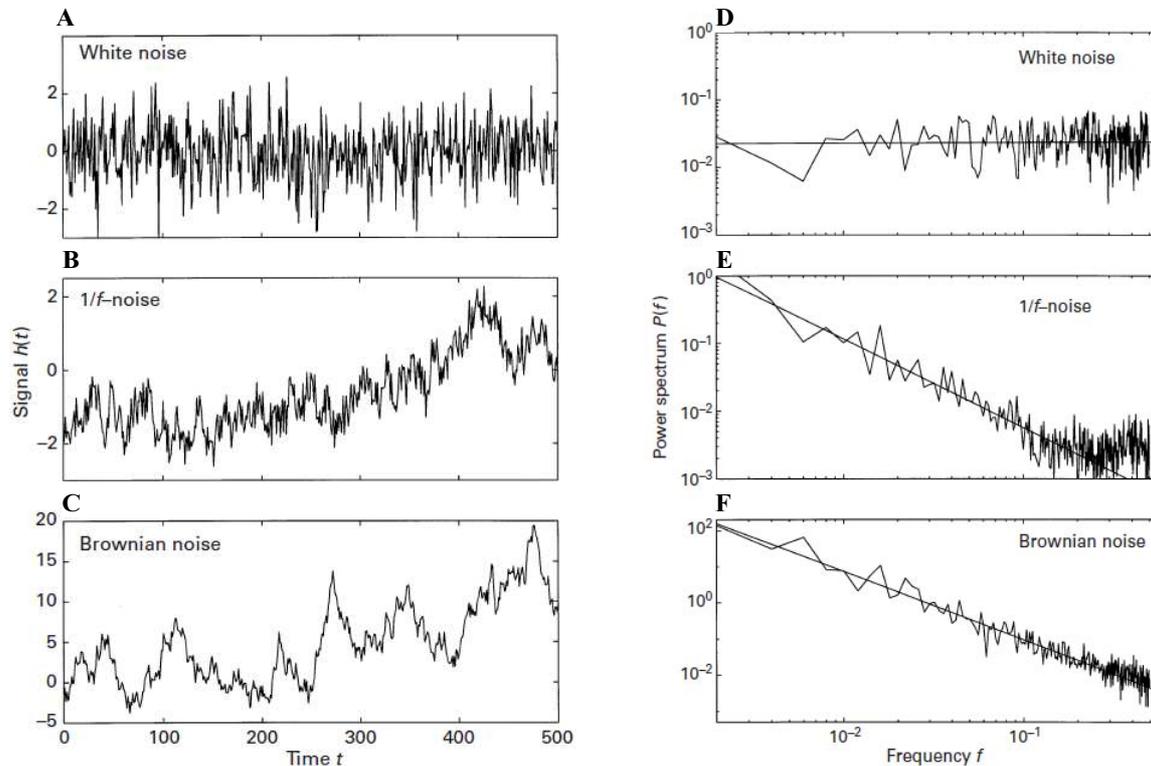


Figura 1.5. Señales $h(t)$ graficadas como funciones del tiempo t (columna A-B-C) con sus respectivos EP log-log (columna D-E-F). **A, D)** ruido blanco o señal aleatoria, EP log-log con $\beta = 0$. **B, E)** ruido $1/f$ o señal fractal, EP log-log con $\beta = -1$. **C, F)** ruido browniano, EP log-log con $\beta = -2$. Figura tomada de Gisiger, 2001.

Se ha sugerido que una serie fisiológica que corresponde con un buen estado de salud corresponde con la "justa mediana homeostática" entre los extremos de una serie aleatoria (ruido blanco con $\beta = 0$) y una serie rígida (serie browniana con $\beta = 2$), y corresponde con el llamado ruido rosa o ruido $1/f$ ($\beta = 1$) (Fig. 1.5 y 1.6). En términos físicos, esta justa medianía de la salud podría corresponder con un punto crítico entre el orden (periodicidad) y el desorden (aleatoriedad) (Fossion *et al.*, Diciembre 2010; Landa *et al.*, 2011).

Así, en un estudio realizado por Pikkujämsä en 1999, se observó que existía un cambio de la pendiente (β) del EP log-log del ritmo cardíaco en seres humanos con el envejecimiento. El EP log-log de niños y adultos jóvenes muestra un comportamiento $1/f$. Con el envejecimiento, la pendiente del EP log-log se vuelve más inclinada, lo que implica que la serie de tiempo se vuelve más correlacionada y regular (Fig. 1.7) (Pikkujämsä, 1999).

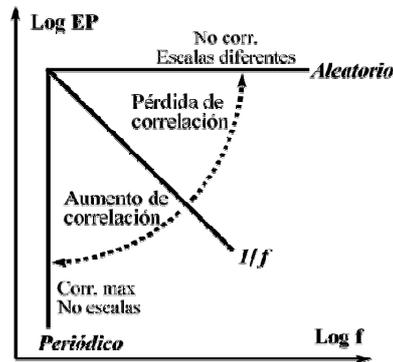


Figura 1.6. Espectro de Potencias en escala log-log esquemático. Figura tomada de Fossion, 2010.

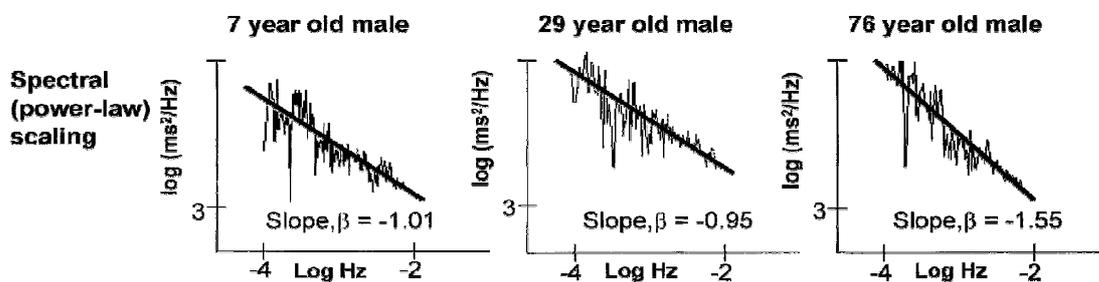


Figura 1.7. Cambio de la pendiente del Espectro de Potencias (EP log-log) del ritmo cardiaco con el envejecimiento. El EP log-log de niños y adultos jóvenes es de $1/f$. Con el envejecimiento, la pendiente del EP log log se vuelve más inclinada. Figura tomada de Pikkujämsä, 1999.

Asimismo Hayano en un estudio (1997) sobre la fibrilación arterial (FA) observó que el EP del ritmo cardiaco de pacientes con FA degeneraba hacia ruido blanco (Fig. 1.8.A) ya que la FA es un tipo de arritmia cardiaca que se caracteriza por latidos auriculares incoordinados y desorganizados. Esto provoca que al ser aleatoria la señal, la pendiente sea cercana a 0. La figura 1.8.B es el EP del ritmo cardiaco de un paciente control sano.

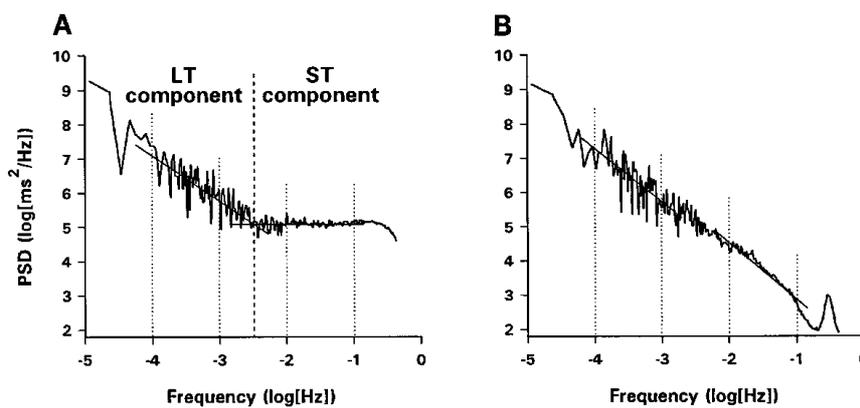


Figura 1.8. EP log-log del ritmo cardiaco de dos pacientes . A) EP log-log de ritmo cardiaco de paciente con fibrilación auricular (FA) que presenta punto de inflexión después del cual el espectro degenera hacia ruido blanco. B) EP log-log del ritmo cardiaco de paciente sano. Figura tomada de Hayano, 1997.

El cuerpo humano es una maquina compleja con varios órganos y procesos biológicos que se interrelacionan y colaboran sobre diferentes escalas de tiempo. El estudio de series de tiempo es una posible aproximación para mejor entender la dinámica compleja del cuerpo humano. Sin embargo, para términos prácticos de éste trabajo se utilizarán los términos complejidad y fractalidad indistintamente debido a la explicación de fractalidad dada anteriormente.

La teoría del caos, de los fractales y de la complejidad, que son logros recientes de las ciencias exactas y que apenas empiezan a encontrar sus aplicaciones en la medicina, permiten medir y cuantificar la complejidad espacial y temporal, y abren el paso a una nueva definición compleja de la fragilidad (Fossion, 2010). En particular permitirán cuantificar con un índice de complejidad el estado de salud a través del análisis de series de tiempo de observables fisiológicos. En contraste con un índice cualitativo del estado de fragilidad del paciente basado en el autorelato del mismo, un índice de complejidad cuantitativo podría ser un índice objetivo de la fragilidad.

1.3 Hacia un modelo animal de la fragilidad

Debido a que el hombre tiene una esperanza de vida de aproximadamente entre 70 y 80 años es difícil realizar un estudio longitudinal del desarrollo de la fragilidad ya que la fragilidad se comienza a acrecentarse en los individuos después de varios decenios de vida. Debido a esto se necesitaría realizar un estudio longitudinal a través de varios decenios para seguir la evolución de la fragilidad desde su inicio en un individuo, lo que es un estudio poco viable por la cantidad de tiempo que requiere. En cambio, el modelo animal *Caenorhabditis elegans* tiene un ciclo de vida menor a un mes, lo que facilita estudios longitudinales e incluso transversales.

C. elegans es un gusano redondo y transparente de 1mm de largo de la familia Rhabditidae. Es un nematodo de vida libre que habita en sedimentos con gran cantidad de agua en distintas partes del mundo. Se alimenta de microorganismos, principalmente bacterias que ingiere por bombeo muscular y peristalsis de la faringe (Collins *et al.* 2008; Altun y Hall, 2012). Posee una anatomía simple que consiste de un número invariable de 959 células en el adulto hermafrodita, de las cuales 302 son neuronas. A pesar de tener pocas células, las cuales poseen un linaje celular definido, *C. elegans* exhibe tejidos complejos como intestino, músculo, hipodermis, gónada y un sistema nervioso diferenciado (Pluskota *et al.*, 2009).

El estado adulto del hermafrodita dura de 2 a 3 semanas y es precedido por 4 estadios larvales (L1 a L4) que duran juntos aproximadamente 2 días bajo condiciones de crecimiento típicas. El hecho de que varios procesos fisiológicos y respuestas al estrés están conservados entre *C. elegans* y seres humanos, permite la comparación de los mecanismos moleculares. Homólogos de *C. elegans* han sido identificados para el 60 al 80% de genes humanos. 12 de 17 rutas de señales de transducción conocidas y marcas epigenéticas específicas están conservadas entre *C. elegans* y humanos (Pluskota *et al.*, 2009).

Entre las muchas ventajas para su estudio están su ciclo de vida corto, genoma compacto, desarrollo estereotipo, facilidad de propagación, tamaño pequeño (Hall y Altun, 2007) y su cuerpo transparente. Esto permite el estudio de esperanza de vida y producción

de progenie (Pluskota *et al.*, 2009). *C. elegans* es un sistema modelo para la investigación biológica en muchos campos incluyendo la genética, biología celular, neurociencia y las causas extrínsecas (ambientales) e intrínsecas (genéticas) del envejecimiento (Collins *et al.* 2008).

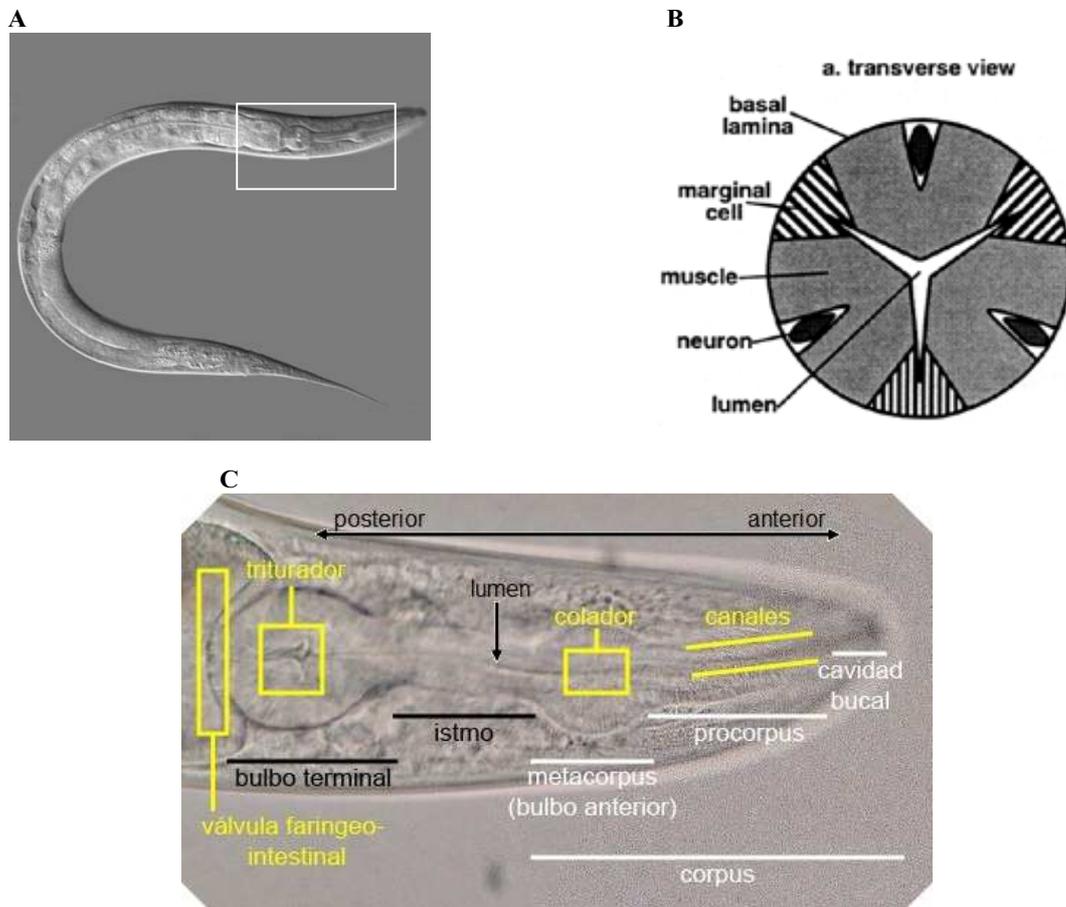


Figura 1.9. Fotografías de *C. elegans* tomadas con microscopio óptico. **A)** Individuo adulto completo, dentro del rectángulo se muestra la ubicación de la faringe de *C. elegans*. Fotografía Kimble J., 2002. **B)** Esquema de corte transversal de la faringe. Imagen tomada de Riddle *et al.*, 1997. **C)** Vista lateral de la faringe indicando las partes que la conforman. Fotografía tomada en el IFC, UNAM.

Existen dos géneros de *C. elegans*, hermafrodita que se autofecunda (XX) y macho (XO). El plan corporal típico de los nematodos se compone de un tubo exterior y un tubo interior separados por un espacio pseudocelómico. El tubo exterior consiste de la cutícula, hipodermis, sistema excretor, neuronas y músculos, mientras que el tubo interior compone la faringe, intestino y la gónada en los adultos (Altun y Hall, 2012).

La faringe de *C. elegans* es una bomba muscular rítmica similar al corazón de los vertebrados (Axäng *et al.*, 2007) y se divide en 3 regiones, corpus, istmo y bulbo terminal (Fig. 1.9) las cuales exhiben actividad contráctil autónoma ya que están controladas por neuronas marcapasos (Shimozono *et al.*, 2004). Además *ceh-22*, el gen de *C. elegans* homólogo al gen homeobox *Nk2x.5*, que juega un papel importante en el desarrollo del

corazón en vertebrados, participa en el desarrollo de la faringe de *C. elegans* (Axäng *et al.*, 2007).

También se ha encontrado que el ritmo promedio de bombeo de la faringe de *C. elegans* es indicativo de su edad (Huang *et al.*, 2004) como se observa en el histograma de la figura 1.10.

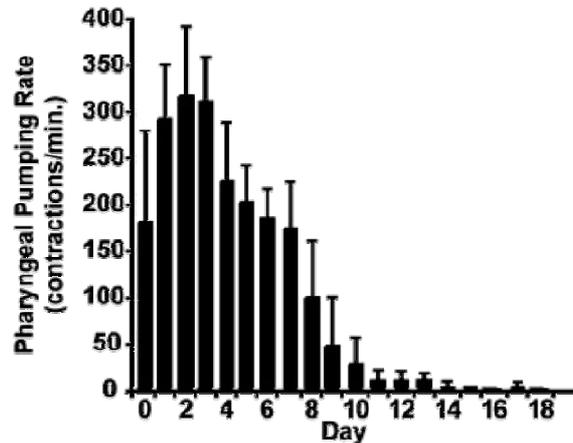


Figura 1.10. Cambio en la frecuencia promedio de bombeo de la faringe de *C. elegans* con su edad. Las barras verticales representan el número promedio de contracciones por minuto con su respectiva desviación estándar. Imagen tomada de Huang *et al.*, 2004.

Los músculos de la faringe de *Caenorhabditis elegans* se agrupan en tres componentes: el corpus, el istmo y el bulbo terminal. Estos constituyentes se excitan coordinadamente para facilitar la alimentación mediante el bombeo y la peristalsis, los cuales son los mayores elementos del comportamiento alimenticio de *C. elegans* (Fig. 1.11). Una neurona marcapasos, MC, excita el corpus y esta actividad es transmitida hacia el bulbo terminal a través del istmo (Shimozono *et al.*, 2004).

El bombeo es una contracción casi simultánea seguida de una relajación casi simultánea del corpus, el istmo anterior y bulbo terminal (Shimozono *et al.*, 2004). Las fibras contráctiles de los músculos de la faringe se encuentran orientados radialmente, así, la contracción en el bombeo hace que el lumen se abra en forma de triángulo dejando su estado de reposo en el que parece una Y (Fig. 1.9.B). Debido a que el istmo posterior permanece cerrado, el lumen abierto del corpus se llena de líquido que fluye con microorganismos hacia adentro de la cavidad bucal. La contracción de los músculos del bulbo terminal aplasta a los microorganismos dentro del triturador y pasa la masa de bacterias molidas hacia el intestino. En la relajación, el triturador regresa a su estado de reposo, lo que permite que el lumen del corpus se cierre, dejando salir el líquido pero reteniendo los microorganismos.

El segundo movimiento, la peristalsis, ocurre típicamente cada 4 contracciones de bombeo. Este movimiento lleva a los microorganismos atrapados en el istmo posterior hacia el triturador, ubicado en el bulbo terminal (Riddle *et al.*, 1997). *C. elegans* bombea a aproximadamente a 4 Hz (240 contracciones/minuto) al alimentarse (Shimozono *et al.*, 2004), pero cambia con la edad del nematodo (Fig. 1.10).

Debido a que *C. elegans* es un organismo transparente, el movimiento de la faringe puede ser captado en video a través una cámara montada en un microscopio óptico. Esto permite obtener series de tiempo mediante procesamiento digital de secuencias de imágenes (PDSI) para el análisis del movimiento tanto espacial como temporal de la faringe.

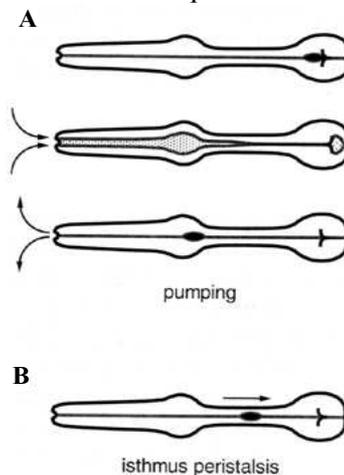


Figura 1.11. Los 2 tipos de movimiento de la faringe. **A)** Bombeo (pumping) y **B)** peristalsis. Imagen tomada de Riddle *et al*, 1997.

1.4 Hipótesis y objetivos

Para este trabajo se toma en cuenta la hipótesis de Goldberger y Lipsitz aplicada a *C. elegans* la cual propone que existe pérdida de la complejidad con la edad. Ésta plantea que la complejidad de las series de tiempo obtenidas de las contracciones del triturador de la faringe de *C. elegans* disminuye al ir aumentando la edad del gusano ya que en las series de tiempo existe mas información que solo en el promedio (Fig. 1.3). Además se supone que en seres humanos la complejidad disminuye porque las correlaciones aumentan demasiado (Pikkujämsä, 1999) (Fig. 1.7), es decir que podríamos decir que las contracciones van siendo más regulares partiendo de ruido $1/f$ en el gusano joven. Se supone también que de las series de tiempo obtenidas de individuos jóvenes hasta adultos jóvenes (hasta 3 o 4 días de edad) sanos se obtendrá ruido $1/f$. Además se infiere que en gusanos enfermos disminuirá la complejidad aunque no solamente ganando correlaciones (hacia ruido café) sino también perdiendo correlaciones (hacia ruido blanco) como sucede en series de tiempo dde corazón de seres humanos (Hayano, 1997).

El objetivo del presente trabajo es proponer varios métodos: 1) un método para el montaje del gusano para la toma de video así como proponer que mutantes son los más adecuados para el estudio; 2) un método para la toma de video proponiendo las especificaciones más apropiadas para poder extraer la información sobre el movimiento de la faringe; 3) un método de Procesamiento Digital de Secuencias de Imágenes para la obtención de series de tiempo y 4) un método para el análisis de dichas series de tiempo para obtener información sobre las contracciones de la faringe de *C. elegans*. A largo plazo, el objetivo es desarrollar un modelo de la fragilidad en el ser humano conforme avanza su edad a partir del análisis de la complejidad de las series de tiempo obtenidas de las contracciones del triturador en la faringe de *C. elegans*.

La hipótesis que se planteó fue la idea inicial cuando se comenzó este trabajo. Sin embargo la longitud de las series de tiempo no fue suficiente para poder hacer un análisis del escalamiento de la variabilidad del ritmo como ley de potencias. Sin embargo, hemos aprendido mucho sobre la fenomenología del ritmo, y esta tesis abre el paso para hacer uso de herramientas de análisis de series de tiempo innovadoras para enfrentar dichos obstáculos.

2. Material y método

2.1 Descripción

Se grabó la faringe de distintos individuos como de diferentes mutantes de *C. elegans* (N2 (*wildtype*), N2 expresando GFP, *unc-119* (ed3) y *unc-54* ed190 CB190) hermafroditas adultos de 3 o 4 días de edad con una cámara de alta velocidad (iXon3 897 Single Photon Detection EMCCD Camera ó Phantom v7.3). Asimismo el montaje del nemátodo se realizó de 3 maneras distintas (en cámara de microfluidos, en caja de Petri y en portaobjetos) y la toma de video de 5 formas diferentes (varían los cuadros por segundo, la duración en tiempo real, el aumento, la resolución, los bits por pixel y la iluminación) de las cuales se eligió un video por cada una (Fig. 2.1) para poder establecer las especificaciones de la toma de video. Se realizaron 2 tipos de Procesamiento Digital de Secuencias de Imágenes (PDSI) (Segmentación de la imagen y medición del área (número de pixeles) del triturador y diferencias entre los valores de los pixeles de imágenes subsiguientes). Para el análisis de las series de tiempo obtenidas del PDSI se utilizaron 2 métodos: Fast Fourier Transform (FFT) y Singular Spectrum Analysis (SSA). Los videos originales que se eligieron tanto como sus respectivos videos procesados, los códigos de PDSI y los de FFT y SSA se anexan en un DVD.

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
S	Serie
V	Video
O	Original
P	Procesado (PDSI)
M1	Método 1 (de PDSI)
M2	Método 2 (de PDSI)
E	Espectro de Potencias
β	pendiente (β = exponente de densidad espectral)
F	Fast Fourier Transform (análisis de serie de tiempo)
A	Singular Spectrum Analysis (análisis de serie de tiempo)
D	scree Diagram
T	componente (obtenido por SSA)
t	tendencia
v	varianza
p	parcial
f	frecuencia
r	promedio

Tabla 2.1. Abreviaturas de las series y los videos así como las de las características adquiridas a través del método. En la columna “DESCRIPCIÓN” se aprecian en negritas los caracteres que se tomaron para la abreviatura.

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
R	N2 con movimiento Restringido en la cámara de microfluidos
G	N2 expresando GFP
U	<i>unc-119</i> (ed3) grabado en el Instituto de Física de la UNAM
H	<i>unc-54</i> (e190) CB190 con posición Horizontal
C	<i>unc-54</i> (ed 190) CB190 en el que solamente se aprecia la Cabeza

Tabla 2.2. Abreviaturas que se utilizaron para cada cepa según su montaje. En la columna “DESCRIPCIÓN” se aprecian en negritas los caracteres que se tomaron para la abreviatura.

De la Universidad de Rockefeller se recibieron 40 videos que se clasificaron en 4 tipos diferentes de videos. De cada tipo de video se eligió el video que tuviera las mejores características de iluminación, de contraste y de resolución para que el PDSI pudiera ser más efectivo para recoger los datos para la serie de tiempo. Además de lo anterior, otro criterio para elegir los videos fue que tuvieran los datos del nemátodo y de la toma de video más completos ya que no toda la información acerca de todos los videos estuvo disponible.

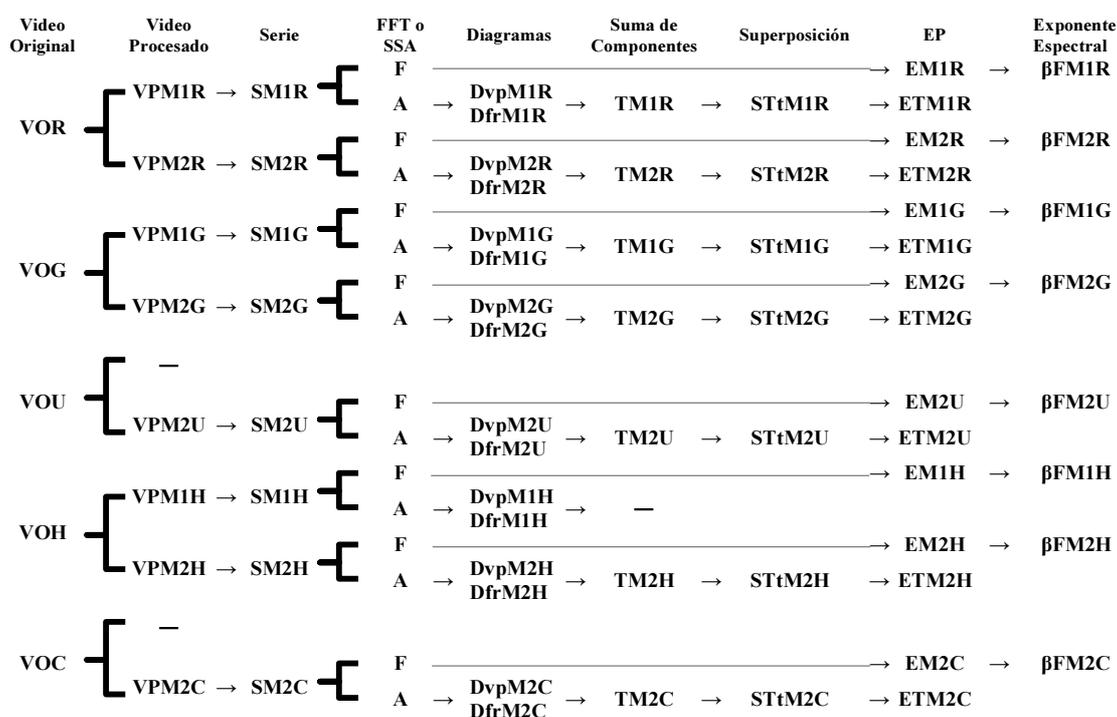


Tabla 2.3. Abreviaturas a partir de las tablas 2.1 y 2.2 de los videos y de las series obtenidos y como se derivan desde el video original los videos procesados con ambos métodos de procesamiento como las series obtenidas a través de los dos métodos de análisis de series de tiempo.

CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN				
Lugar de toma del video	Universidad de Rockefeller, NY*	Universidad de Rockefeller NY*	Instituto de Física UNAM	Universidad de Rockefeller, NY*	Universidad de Rockefeller, NY*
Cepa	N2	N2 GFP	unc-119 (ed3)	unc-54 ed190 CB190	unc-54ed 190 CB190
Edad del gusano	3 días	3 días	4 días	3 días	3 días
Montaje del gusano	Cámara de microfluidos	Caja de Petri	Portaobjetos m9 sellado	Caja de Petri	Caja de Petri
Cámara	iXon3 897	iXon3 897	Phantom v7.3	iXon3 897	iXon3 897
Cuadros por segundo	50 fps	30 fps	1000	**	**
Duración en tiempo real	40 seg	33.33 seg	**	**	**
Aumento	40x	~20X	100x	~20X	~20X
número de imágenes	2000	1000	702	3400	7200
Resolución	256 x 128	512 x 512	600 X 800	170 X 103	172 X 262
Bits por pixel	16	16	8	16	16
Nombre de video original a 8bpp	VOR	VOG	VOU	VOH	VOC

Tabla 2.4. Características de los 5 distintos videos originales que se eligieron. *Laboratory of Neural Circuits and Behavior. **Datos no disponibles.

Además se creó un código para nombrar los videos obtenidos y los videos procesados así como las series obtenidas de ambos métodos de análisis de las mismas. En la tabla 2.1 se despliegan las abreviaturas para las series y los videos según sus características. En la tabla 2.2 se presentan las abreviaturas que se utilizaron para cada cepa según su montaje. En la tabla 2.3 se muestra con las abreviaturas dadas en las tablas 2.1 y 2.2 como se derivan desde el video original los videos procesados con ambos métodos de procesamiento como las series obtenidas a través de los dos métodos de análisis de series de tiempo. En la tabla 2.4 se muestran las características de los 5 distintos videos originales que se eligieron además del nombre del video original según la tabla 2.3.

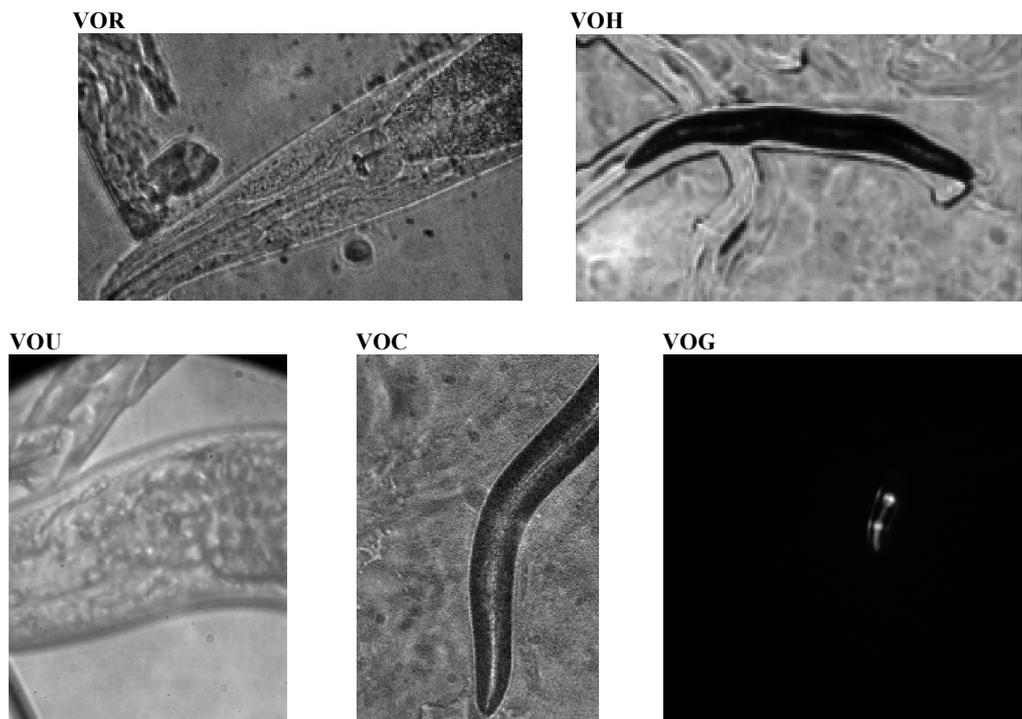


Figura 2.1. Primera imagen de cada uno de los 5 videos elegidos. Se observa que la intensidad de radiación y el aumento es diferente en cada uno, el resto de las características que son distintas entre los videos no se pueden apreciar con una sola imagen (ver tabla 2.4). **VOR)** Video Original del gusano **R**estringido, **VOH)** Video Original del gusano **H**orizontal, **VOU)** Video Original del gusano grabado en el Instituto de Física de la UNAM, **VOC)** Video Original del gusano donde se aprecia la **C**abeza en posición vertical, **VOG)** Video Original del gusano que expresa **GFP**.

A continuación se detallan las distintas características de los tipos de mutantes utilizados, de las cámaras, de los distintos montajes de los gusanos, de la toma de videos, del PSDI y de los análisis de series de tiempo.

2.1.1 Tipos de mutantes

- **N2**
Cepa de referencia. *Wildtype*.

- **N2 GFP**

Andrés Bendzky (Laboratorio de circuitos neurológicos y comportamiento, Universidad de Rockefeller, NY) transformó la cepa N2 para que expresara GFP (Green Fluorescent Protein) en la faringe.

- **unc-119 (ed3)**

Mutante propuesto para su filmación en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en el Laboratorio de la Dra. Rosa Navarro. Fue grabado en el Instituto de Física de la UNAM.

- **unc-54 ed190 CB190**

Mutante propuesto por Andrés Bendzky de la Universidad de Rockefeller, NY (hasta 2011) del Laboratorio de sistemas neurológicos y comportamiento.

2.1.2 Tipos de cámara

- **iXon3 897 Single Photon Detection EMCCD**

Cámara digital de ©Andor Technology plc. localizada en el Laboratorio de circuitos neurológicos y comportamiento de la Universidad de Rockefeller, NY. Esta cámara tiene 512 x 512 pixeles activos (sensores de luz) y toma de 35 a 549 cuadros por segundo. Es una cámara diseñada para su acoplamiento en microscopios ópticos. Toma de videos por Dr. Andrés Bendzky.

- **Phantom v7.3**

Cámara digital de Vision Research localizada en el Instituto de Física UNAM. Esta cámara tiene 800 x 600 pixeles activos y toma hasta 6688 cuadros por segundo con 800 x 600 pixeles¹. No es una cámara diseñada para su acoplamiento en microscopios ópticos. Responsable del laboratorio Dr. Arturo Menchaca Rocha. Toma del video por Fis. Roberto Cadena.

2.1.3 Tipos de montaje del gusano

- **Cámara de microfluidos**

Montaje realizado en la Universidad de Rockefeller, NY, como descrito en el artículo de Chronis *et al.*, 2007.

- **Caja de Petri**

Montaje realizado en La Universidad de Rockefeller, NY (NY). Los gusanos eran grabados directamente de la caja de Petri en donde se sembraban y realizaban todo su ciclo de vida.

¹ La relación entre la resolución (cantidad de pixeles) y la cantidad de imágenes que pueden ser capturadas por segundo (*frame rate*) es inversamente proporcional. Mientras el *frame rate* es mayor la resolución es menor. Esto se debe a que la cantidad de información a procesar y almacenar es menor y toma menos tiempo en imágenes con poca resolución. Esta cámara puede capturar y almacenar imágenes de 800 x 600 pixeles hasta a 6688 fps, a velocidades mayores como 190,476 fps solo puede capturar y almacenar imágenes de 32 x 32 pixeles.

- **Portaobjetos**

Montaje realizado en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM). (Detalles del procedimiento en la sección 2.2.2, Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

2.1.4 Toma de video

Las características de cada video son distintas debido a que se intentaba establecer un método de toma de video que facilitara el PDSI para poder obtener las series de tiempo.

- **Cuadros por segundo (fps por sus siglas en inglés)**

Un video digital es una secuencia de cuadros o fotografías en el que cada cuadro es una imagen sin movimiento. El número de fotografías o cuadros que se quiere obtener puede ser ajustado dependiendo de lo que se desee observar en el video. Los videos obtenidos fueron captados de entre 30 a 100 fps.

- **Duración en tiempo real**

Cada video varía entre 30 segundos y un minuto de duración en tiempo real.

- **Aumento**

Los videos de la Universidad de Rockefeller varían entre 20 y 40x. El video realizado en el Instituto de Física de la UNAM tiene un aumento de 100x. Esto se puede apreciar en la figura 2.1, comparando VOU y VOG.

- **Resolución**

La resolución es el número de píxeles que conforman una imagen. La resolución de los videos enviados de la Universidad de Rockefeller varía entre 17,510 píxeles y 262,144 píxeles. El video tomado en el Instituto de Física de la UNAM es de 480,000 píxeles.

- **Bits por pixel (bpp)**

Una imagen está guardada en bits. En un bit se pueden guardar dos estados: 1,0 (blanco o negro). En 2 bits se pueden guardar 4 combinaciones de 1 y 0 (1,1; 1,0; 0,1 y 0,0), es decir $2^2 = 4$, donde 0,0 es negro (0 intensidad de radiación) y 1,1 es blanco (toda la intensidad de radiación) y 1,0 y 0,1 son tonos intermedios entre el blanco y el negro. Si una imagen está a 2 bpp quiere decir que los píxeles (*picture elements*) de la imagen digital desplegada pueden adquirir cualquiera de los 4 tonos 1,1; 1,0; 0,1 ó 0,0. Así, una imagen a 8 bpp ($2^8 = 256$, blanco, negro y 254 tonos de grises) ocupa menos espacio de almacenamiento que una imagen a 32 bpp ($2^{32} = 4 294 967 296$), es decir que es mas “ligera”.

Los algoritmos de PDSI que se utilizaron operan en cada uno de los píxeles de cada una de las imágenes que conforman cada video obtenido, de los cuales varios se capturaron a 16 bpp (65 536 tonos de grises). La capacidad que se necesita para procesar esta cantidad de información no era soportada por los programas que se utilizaron para el PDSI (Image J y Wolfram Mathematica 7). Es por eso que se

pasaron todos los videos originales de 16 bpp a 8 bpp, lo cual no afecta en la visualización del movimiento de la faringe de *C. elegans* (Tabla 2.4).

▪ **Iluminación**

La iluminación varía de video a video. Es por ello que se eligieron los videos en los que mejor se apreciara la estructura de la faringe. En la mayoría de los videos, la intensidad de radiación del medio en donde se encuentra el gusano es mayor o igual a la intensidad de radiación a la que se observa el gusano en las imágenes. La iluminación es completamente distinta en el video del nematodo que expresa GFP ya que para poder visualizar las estructuras donde se expresa es necesario que se observe solamente con luz UV, lo que implica que lo que tiene la máxima intensidad de radiación en la imagen son las zonas donde se expresa GFP el resto de la imagen tiene valores de grises muy cercanos a 0 (Fig. 2.1).

2.1.5 Tipos de Procesamiento Digital de Secuencias de Imágenes (PDSI)

▪ **Método 1: Segmentación de la imagen y medición del área (número de píxeles) del triturador**

El PDSI y la obtención de las series de tiempo se realizaron en ImageJ 1.45.

▪ **Método 2: Diferencias entre los valores de los píxeles de imágenes subsiguientes**

Se programó la sistematización de la obtención de los datos con Wolfram Mathematica 7.0. Se utilizaron los videos originales sin ningún tipo de edición. La programación del método de PDSI y su automatización realizada por Miguel Ángel Carvajal Ramos (Facultad de Ciencias, UNAM). La obtención de los datos de valores de grises se realizó en ImageJ 1.45.

2.1.6 Tipos de análisis de las series de tiempo

▪ **Fast Fourier Transform (FFT)**

La periodicidad es la cualidad de recurrencia a un intervalo regular y es un tipo de estructura en una serie de tiempo. Una serie de tiempo puede incluir estructuras periódicas y no periódicas. Por ejemplo una serie de tiempo aleatoria no tiene periodicidad y una serie de tiempo caótica puede o no tener periodicidad. Una manera de detectar periodicidad en series de tiempo es corriendo un análisis de autocorrelación.

La autocorrelación es la relación de una señal consigo misma, es decir que tanto se parece a ella misma en diferentes tiempos. Informalmente es la similitud entre observaciones en función del tiempo que las separa. Un examen de autocorrelación es una herramienta matemática para encontrar patrones que se repitan (señales periódicas) en una serie de tiempo. Un examen de autocorrelación puede ser un análisis de Fourier.

Un análisis de Fourier describe una serie de tiempo únicamente en términos de sus constituyentes periódicos, es decir que describe la periodicidad en el contexto de ondas sinusoidales que se repiten, por lo tanto un análisis de Fourier no identificará estructuras no periódicas.

El resultado de un análisis de Fourier se despliega en un gráfico con la frecuencia en la abscisa y la varianza de la amplitud en la ordenada. Este gráfico es un Espectro de Potencias y da especial atención a las importancias relativas de sus constituyentes periódicos mostrando la distribución de la varianza total entre varios intervalos o bandas de frecuencias (Fig. 1.4 y 1.5).

Un Fast Fourier Transform es un algoritmo eficiente para calcular la Transformada Discreta de Fourier (DFT por sus siglas en inglés) y su inverso. Un DFT descompone una secuencia de valores, como una serie de tiempo, en componentes de diferentes frecuencias. Un FFT es una manera de calcular el mismo resultado de una manera rápida.

Se corrió en Wolfram Mathematica 7.

▪ **Singular Spectrum Analysis (SSA)**

SSA es un tipo de descomposición de series de tiempo que separa tendencia, periodicidades y ruidos, es decir componentes oscilatorios y ruido en una serie de tiempo, así como para predecir valores hacia el futuro de la serie. La tendencia es usualmente definida como un componente aditivo suave y no oscilante que contiene información acerca del cambio global de una serie de tiempo.

Para la descomposición, el SSA separa una señal en sus diferentes componentes oscilatorios a través de una matriz de covarianza de la serie de tiempo. La contribución de cada componente a la serie se puede observar en un Scree Diagram.

Para la suma adiciona los componentes para obtener la serie original o bien una serie filtrada, es decir que suma solo algunos de los componentes en los cuales se separó la serie original. La predicción de los valores futuros se hace extrapolando hacia el futuro según los descriptores estadísticos de la señal original o de la señal filtrada. En este trabajo se utilizó este método tanto para destendenciar las series como para su análisis y síntesis. Se programó en Wolfram Mathematica 7.

2.2 Diseño experimental

2.2.1 Mantenimiento de *C. elegans* en el Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM

Todos los procedimientos descritos en esta sección para el tratamiento de *C. elegans* en el IFC, se realizaron según los protocolos explicados en Hope, 1999.

Primero se prepararon los cultivos de *E. coli* OP50 para la alimentación de *C. elegans* como descrito en el protocolo 1. Después se prepararon los platos de agar NGM (Nematode Growth Medium) conforme al protocolo 2. Posteriormente se aplicaron aproximadamente 0.05 ml de cultivo líquido de *E. coli* OP50 en un plato de agar NGM usando una micropipeta y a continuación se esparció la gota por toda la superficie del plato usando una barra de vidrio sin romper el agar y se dejaron crecer las bacterias a 37°C por 8 horas. Luego se transfirieron aproximadamente 10 gusanos de un cultivo previo a un plato de agar NGM con el cultivo de *E. coli* OP50 con un asa de platino cada 3 o 4 días y en seguida se encubaron a 20°C. Se descongelaron los gliceroles de la cepa unc-119 (ed3) según el protocolo 10.

2.2.2 Montaje de los gusanos

▪ Universidad de Rockefeller

El método de montaje de gusanos en la cámara de microfluidos se describe en Chronis *et al.*, 2007. Los gusanos que se encontraban en caja de Petri fueron grabados directamente de la caja.

▪ Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Una vez preparado el portaobjetos con cama de agar (anexo 1), se colocó con una pipeta una gota de amortiguador M9 en el centro de la cama. Con un asa se recogieron nematodos adultos del cultivo de la caja de Petri y se colocaron en la gota de amortiguador. Se colocó un cubreobjetos sobre la gota y se verificó que todo el espacio entre el agar y el cubreobjetos tuviera amortiguador. Se selló con barniz alrededor del cubreobjetos para evitar que el amortiguador se evaporara y los gusanos se desecaran.

2.2.3 Montaje de las cámaras

▪ Universidad de Rockefeller

La cámara iXon3 897 Single Photon Detection EMCCD se encuentra acoplada a un microscopio óptico.

▪ Instituto de Física, UNAM

Debido a que la cámara Phantom v7.3 no es una cámara diseñada para su acoplamiento en microscopios ópticos se montó en una plataforma sobre la cual el lente de la cámara estuviera a la altura de los oculares del microscopio. Se removieron los oculares del microscopio y se colocó un tubo con un espejo tal que el lente de la cámara pudiera captar a través del espejo la imagen que se vería con los oculares.

En las secciones 2.2.1 y 2.2.2 se obtuvieron los videos VOR, VOG, VOU, VOH y VOC (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

2.2.4 Procesamiento Digital de Series de Imágenes

2.2.4.1 Método 1: Segmentación de la imagen y medición del área (número de píxeles) del triturador

a) *Segmentación de la imagen*

Los videos originales (Fig. 2.2.A) de cada video se convirtieron a 8bpp (bits por píxel) y se agudizaron (*sharpen*) para destacar los bordes de las estructuras en la imagen (Fig. 2.2.B). Posteriormente se aplicó un filtro espacial suavizante de mediana con radio de 0.5 píxeles para eliminar ruido de la imagen pero conservando los bordes de las estructuras (Fig. 2.2.C). En seguida se pasó sobre las imágenes un filtro pasobanda ajustado de entre 3 y 40 píxeles con tolerancia de dirección de 5% saturando la imagen al autoescalar cada una de las imágenes para desvanecer

estructuras pequeñas conservando las estructuras mas grandes y oscuras (Fig. 2.2.D). A continuación se agudizaron de nuevo todas las imágenes (Fig. 2.2.E). Luego se realizó el contraste con el 0.5% de pixeles saturados para realzar las estructuras mas oscuras (Fig. 2.2.F). Después se modificó el brillo y el contraste con un límite mínimo de entre aproximadamente 604 y un límite máximo de aproximadamente 684 según requirió cada video para hacer una diferencia mas grande en cuanto a la intensidad de radiación de estructuras oscuras y claras (Fig. 2.2.G). Seguido de esto se calibró el umbral del rango dinámico de las imágenes entre 518 y 626 para identificar las secciones mas oscuras de la imagen (Fig. 2.2.H) para poder finalmente segmentar la imagen (Fig. 2.2.I). Se realizó de esta manera ya que se tenía como objetivo analizar el movimiento del triturador ya que es la estructura en la que mas se puede notar el movimiento de contracción y para ello había que aislar esta estructura del resto de la imagen.

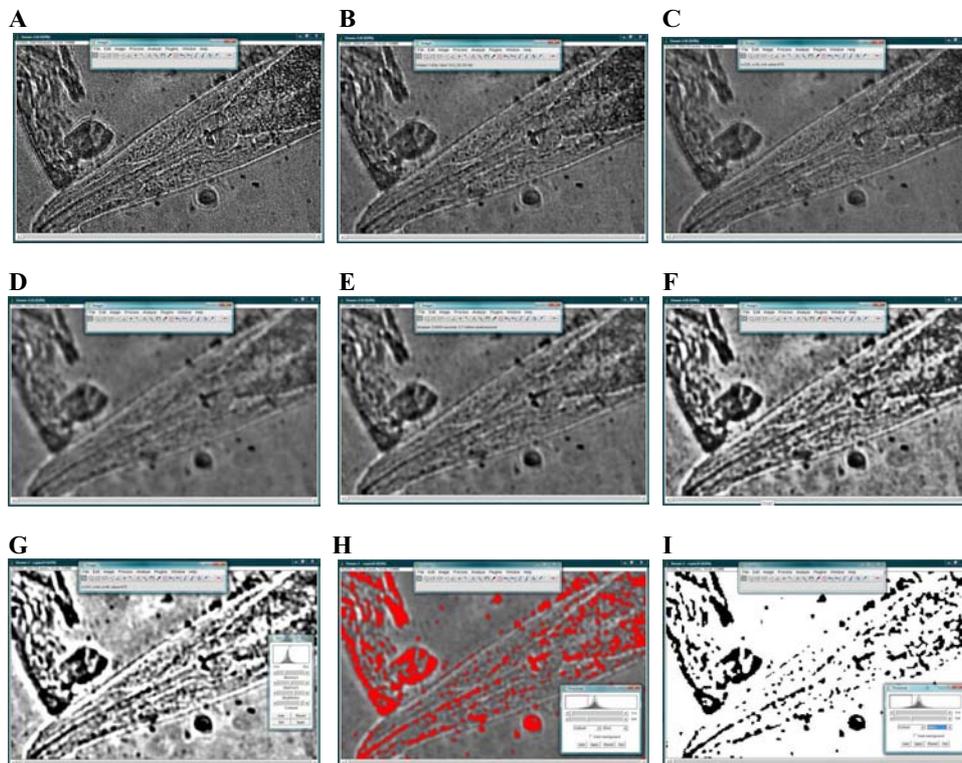


Figura 2.2. Método para la segmentación de las imágenes. **A)** imagen original. **B)** afilar la imagen. **C)** filtro de mediana . **D)** filtro pasobanda. **E)** afilar la imagen. **F)** realzar el contraste. **G)** modificar brillo y contraste. **H)** calibrar el umbral de las imágenes. **I)** segmentar la imagen.

b) Eliminación de ruido

Primero se aplicó un filtro espacial suavizante de mediana con radio de 1 pixel dos veces y con radio de 0.5 pixeles también dos veces (Fig. 2.3.A). Después se establecieron límites de movimiento superiores, inferiores y laterales para el triturador; las partes de la imagen fuera de este marco les aplicó un filtro de mínima de 20 pixeles (Fig. 2.3.B). Posteriormente se aplicó de nuevo un filtro espacial

suavizante de mediana con radio de 0.5 píxeles 4 veces (Fig. 2.3.C). Luego se seleccionaron las estructuras con mayor área diferentes del triturador y se aplicó por último un filtro espacial suavizante de mediana con radio de 0.5 píxeles 6 veces (Fig. 2.3.D).

c) Obtención de las series de tiempo

Se obtuvo el área, el perímetro, el alto y el ancho de todas las partículas presentes en cada imagen del video, y al ser el área del triturador en cada imagen mayor que el área de cada una de las demás partículas en todo el video, se eliminaron todos aquellos datos cuya área era menor que el límite inferior de área del triturador en todo el video. Después se verificó que existiera un solo valor de área por imagen y se graficó.

En esta sección se obtuvieron los videos VPM1R, VPM1G, VPM1U y VPM1H. También se obtuvieron las series SM1R, SM1G, SM1U y SM1H (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

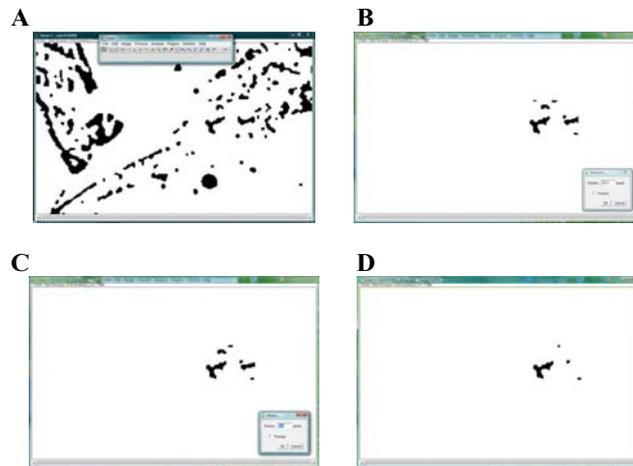


Figura 2.3. A) Filtro de mediana. B) Establecimiento de límites de movimiento y aplicación de un filtro de mínima para las partículas fuera del área de movimiento del triturador. C) Filtro de mediana. D) Selección estructuras con mayor área, eliminarlas y pasar filtro de mediana.

2.2.4.2 Método 2: Diferencias entre los valores de los píxeles de imágenes consecutivas

En esta sección se ilustra el método. El pseudocódigo de este PDSI se encuentra en el anexo 2.

a) Selección de la región del video en la que se mueve la estructura de interés.

Debido a la dificultad de la creación de un método automatizado para identificar y extraer del video original la región de la imagen donde se localiza el triturador, este paso se realizó a mano delimitando el área de movimiento del triturador en todo el video usando un filtro de mediana de 10 píxeles en el área que no era de interés obteniendo así el video filtro (Fig. 2.4).

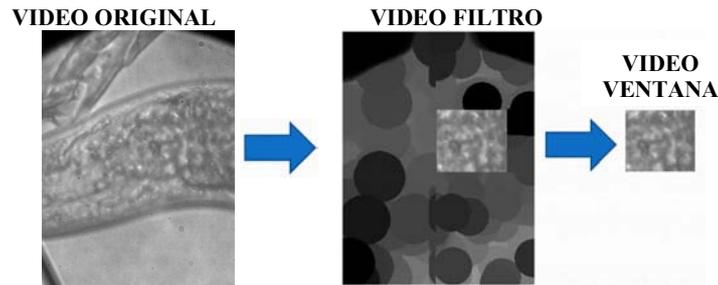


Figura 2.4. Selección y extracción del área de interés del video original. El video filtro ilustra la delimitación del área en la que se mueve el triturador durante todo el video. El área con los círculos es el área que no es de interés, se aprecian esos círculos debido a los filtros que se pasaron sobre la imagen. La extracción del área de interés a través de todo el video da como producto el video ventana.

b) Obtención de las diferencias entre imágenes consecutivas con la región seleccionada.

Se extrajo la ventana que contiene el área de interés en el video filtro creando el video ventana (Fig. 2.4) y posteriormente se obtuvo, del video ventana, el valor absoluto de la diferencia de valores de grises de imágenes consecutivas como se ilustra en la figura 2.5.

En la figura 2.5 se observan dos videos: el video ventana y el video procesado. Se esquematizan los videos de esta manera solamente para explicar el método de PDSI. Del video ventana se muestran dos imágenes consecutivas; del video procesado se muestra una imagen que es la imagen resultante de las diferencias de valores de grises de las dos imágenes del video ventana.

Para obtener el valor del pixel 1 de la imagen del video procesado se resta el valor del pixel 1 de la imagen 1 del video ventana al pixel 1 de la imagen 2 del video ventana. Se obtuvo el valor absoluto de la diferencia puesto que no existen intensidades de radiación negativas. A continuación al valor absoluto obtenido se le asignó un valor de gris de acuerdo con la magnitud del cambio. Es decir que, en el mismo ejemplo del primer pixel, la diferencia entre 0 y 255 es 255 mientras que en el segundo pixel la diferencia entre 150 y 150 es 0. Debido a que todos los videos que se utilizaron son de 8 bits, se decidió construir la escala de las diferencias también con 256 valores. De esta manera la diferencia mayor está representada con un valor de 255 (mayor intensidad de radiación) y la diferencia menor con 0 (menor intensidad de radiación).

Así, pixel por pixel, imagen por imagen se obtiene todo un video nuevo: el video procesado. En la figura 2.6 se observan 6 imágenes consecutivas del video ventana y 5 imágenes consecutivas del video procesado. Dichas imágenes son correspondientes a través del método apenas descrito.

En la figura 2.6 la diferencia entre las imágenes 1 y 2, 2 y 3 así como entre la 5 y 6 en el video ventana es casi imperceptible. Sin embargo en el video procesado se revelan las diferencias entre las imágenes 3 y 4 como entre la 4 y 5 del video ventana. Estas diferencias se pueden observar en las imágenes 3 y 4 del video procesado como una región más clara debido al método de PDSI que se acaba de exponer.

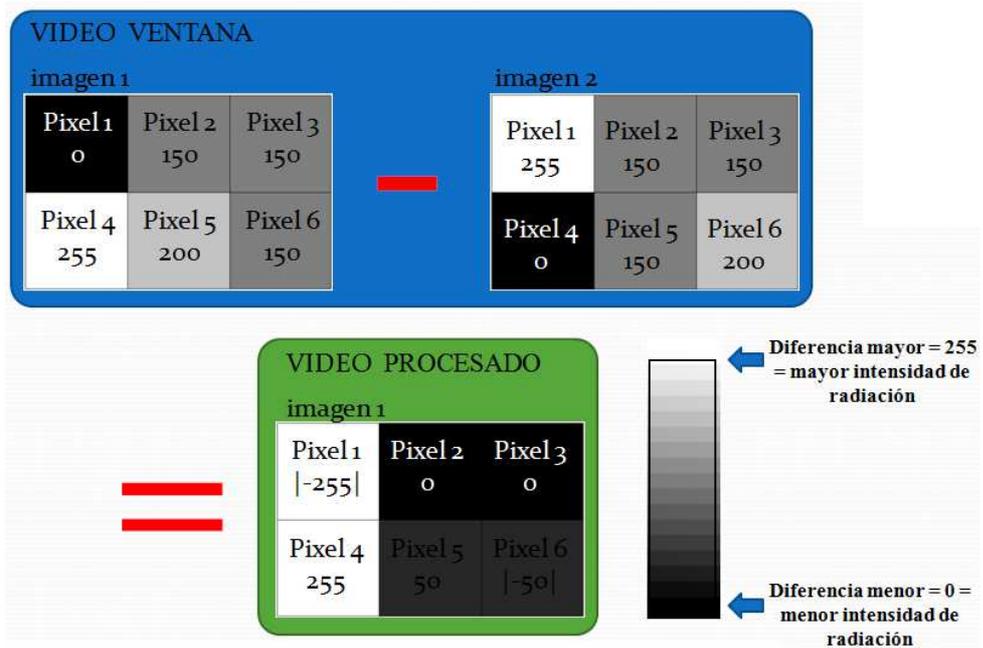


Figura 2.5. Esquema donde se explica la obtención de las diferencias entre imágenes consecutivas del video ventana para la obtención del video procesado.

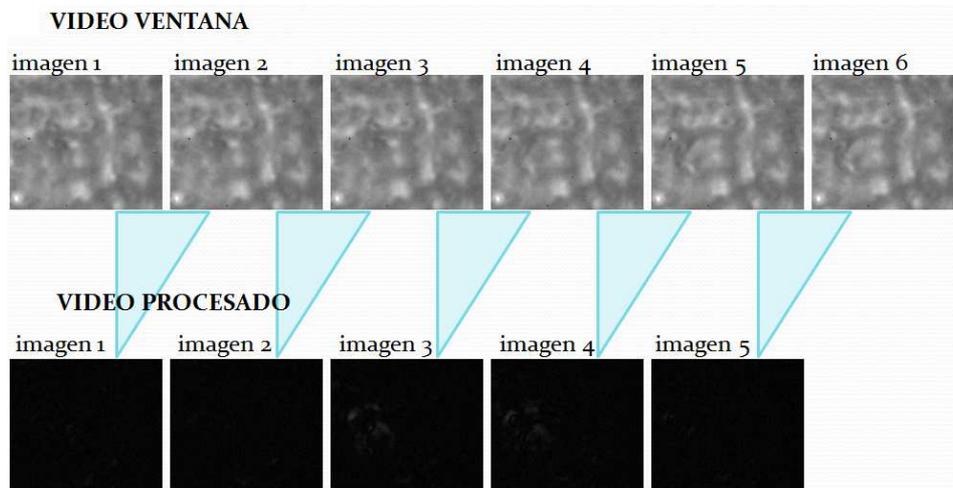


Figura 2.6. Resultado visual en el video procesado de la aplicación del método de PDSI “diferencias entre los valores de los pixeles de imágenes consecutivas” a partir del video ventana.

c) Obtención de los datos de valores de grises

De cada imagen del video procesado se obtuvieron los datos de promedio de valores de grises, desviación estándar de los promedios de valores de grises y el valor máximo de gris (el valor de gris más claro en cada imagen). Graficando estas 3 listas por separado se obtuvieron 3 distintas series de tiempo por cada video. Se

eligió la serie de tiempo de los datos de promedio de valores de grises ya que ésta daba lugar a una serie de tiempo mas clara.

En esta sección se obtuvieron los videos procesados VPM2R, VPM2G, VPM2U, VPM2H y VPM2C. También se obtuvieron las series SM2R, SM2G, SM2U, SM2H y SM2C (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

2.2.5 Análisis de las series de tiempo

2.2.5.1 Fast Fourier Transform (FFT) (pseudocódigo)

Fourier[list]//Computa el FFT de list, que es la lista de los valores de la serie de tiempo.

EPLog=Table[{Log10[i],Log10[EP[[i]]]}, {i,1,IntegerPart[Dim/2]}]// Calcula el Espectro de Potencias o EPlog en escala log-log que es el cuadrado del valor absoluto de FFT donde Dim es la dimensión de la serie de tiempo. Sólo nos interesa la primera mitad del espectro de potencias, ya que el espectro es simétrico.

Por este método se obtuvieron los Espectros de Potencias EM1R, ETM1R, EM2R, ETM2R, EM1G, ETM1G, EM2G, ETM2G, EM2U, ETM2U, EM1H, ETM1H, EM2H, ETM2H, EM2C y ETM2C (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

AjusteLineal = Fit[EPLog,{1,log10f},log10f]// Calcula el exponente espectral.

AjusteLinealA=AjusteLineal[[1]] (* offset *)// Ajusta el exponente espectral en diferentes segmentos del EP.

AjusteLinealB=AjusteLineal[[2,1]] (* slope *)// Mide el valor de la pendiente.

Plot[AjusteLinealA+AjusteLinealB*log10f,{log10f,0,Log10[IntegerPart[Dim/2]]}]/
/ Imprime el ajuste lineal sobre el EPlog.

Por este método se obtuvieron los exponentes espectrales β_{FM1R} , β_{FM2R} , β_{FM1G} , β_{FM2G} , β_{FM2U} , β_{FM1H} , β_{FM2H} , β_{FM2C} (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

2.2.5.2 Singular Spectrum Analysis (SSA) (resumen)

A partir de una serie de tiempo $h(t)$ se construye, a través del método de retraso, una matriz de covarianza Y , que es una matriz de Hankel (Fig. 2.7 I). El tamaño de la ventana para construir Y se eligió como múltiplo del periodo del pico dominante en el EP que se obtuvo a través un FFT de la serie original. Después se reconstruyó el espacio fase X de Y (Fig. 2.7 II) hankelizando, es decir promediando sobre las diagonales con un operador lineal adecuado.

Al ordenar los eigenvalores por varianza parcial obtenidos a partir de Y para la construcción de X se puede obtener un diagrama (Dvp) en el que se puede observar

una separación entre el ruido y los componentes que contribuyen a la formación de la señal en su totalidad.

En esta sección se obtuvieron los Diagramas DvpM1R, DvpM2R, DvpM1G, DvpM2G, DvpM2U, DvpM1H, DvpM2H, DvpM2C (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

Por otro lado, al ordenar los mismos eigenvalores por frecuencia promedio se puede obtener un diagrama (Dfr) cuya pendiente puede ser comparada al exponente espectral β obtenido a partir del método de FFT para la señal completa.

En esta sección se obtuvieron los Diagramas DfrM1R, DfrM2R, DfrM1G, DfrM2G, DfrM2U, DfrM1H, DfrM2H, DfrM2C (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

Se comienza con el método de Singular Value Decomposition (SVD), que a partir de Y descompone a X en subespacios fase independientes X_k , o alternativamente en un producto de tres matrices (Fig. 2.7 III) donde las columnas de la matriz U son filtros o wavelets obtenidos a partir de la serie de tiempo misma. Las columnas V son las nuevas coordenadas en esta nueva base de los filtros y $[\sigma]$ es una matriz diagonal donde los elementos diagonales son los pesos de cada filtro y cada set de coordenadas o de X_k .

Este método equivale a explorar desde diferentes planos el espacio fase para poder encontrar partes del mismo donde exista mayor variabilidad (fig 2.7 IV) para convertir un set de observaciones de variables posiblemente correlacionadas en un set de valores de variables linealmente no correlacionadas llamados componentes.

El número de componentes es menor o igual al número original de variables. Esta transformación es definida de tal manera que el primer componente tenga la mayor variabilidad posible, es decir la mayor variabilidad posible en los datos. Este primer componente es la tendencia y es un componente que no contiene oscilaciones. Cada componente sucesivo tiene la mayor variabilidad bajo la premisa de no estar relacionado con los componentes que lo preceden.

Posteriormente, a partir de las matrices que describen los X_k o componentes se realiza otra hankelización pero esta vez promediando sobre las antidiagonales para construir una subserie de tiempo $g_k(t)$ de la serie original correspondiente a cada subespacio fase (Fig. 2.7 V). De esta manera se puede definir la serie de tiempo como una suma de componentes reconstruidos o de $g_k(t)$ independientes (Fig. 2.7 VI).

Posteriormente se obtienen los EP de $g_k(t)$. Esto se hace con la finalidad de elegir, a partir de las frecuencias dominantes en cada $g_k(t)$, solamente los $g_k(t)$ que contribuyan a la formación del pico dominante en el EP de la serie original

Una vez elegidos estos $g_k(t)$ se prosigue a sumarlos para obtener una subserie (T) de la serie original que describa con más precisión la frecuencia del bombeo de la faringe, ya que esta es variable.

En esta sección se obtuvieron las sumas de componentes TM1R, TM2R, TM1G, TM2G, TM2U, TM1H, TM2H y TM2C (ver tablas 2.1, 2.2, y 2.3).

Posteriormente se superpusieron la tendencia y T sobre la serie de tiempo original (STt).

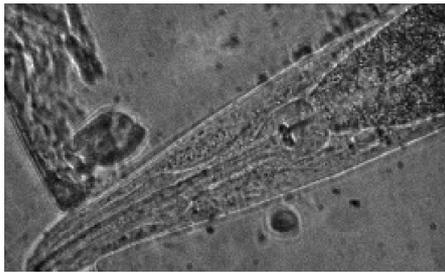
3. Resultados

Para la elección de ventana de resolución L para realización del SSA fue elegido un múltiplo de la frecuencia dominante mas conspicua del pico dominante en los EP obtenidos por FFT.

3.1. Gusano restringido en movimiento en la cámara de microfluidos (R)

Se obtuvo el video de un gusano N2 restringido en movimiento en una cámara de microfluidos (VOR) del cual se observa la primera imagen en la figura 3.1, y las características del mismo en la Tabla 3.1. Se puede observar el video VOR en el DVD anexo en la carpeta VO correspondiente a los videos originales.

En la Tabla 3.2 se puede observar un diagrama donde se presenta el orden de los resultados para la sección 4.1. Para el mejor seguimiento del diagrama se pueden consultar las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 en la sección 2.1 “Material y método”.



CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Lugar de toma del video	Universidad de Rockefeller, NY*
Cepa	N2
Edad del gusano	3 días
Montaje del gusano	Cámara de microfluidos
Cámara	iXon3 897
Cuadros por segundo	50 fps
Duración en tiempo real	40 seg
Aumento	40x
número de imágenes	2000
Resolución	256 x 128
Bits por pixel	16
Nombre de video original a 8bpp	VOR

Figura 3.1. VOR. Imagen del video original del gusano restringido en movimiento en la cámara de microfluidos. **Tabla 3.1.** Extracto de la tabla 2.4 donde se muestran las características de VOR. *Laboratory of Neural Circuits and Behavior.

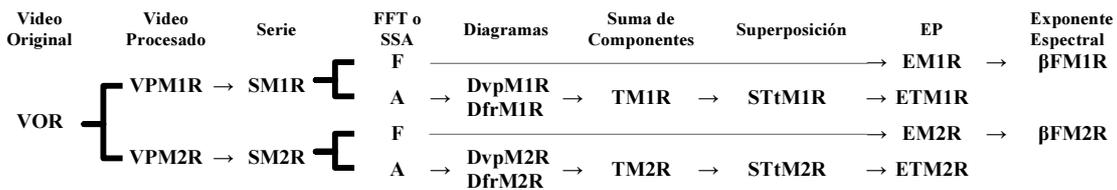


Tabla 3.2. Extracto de la tabla 2.3 donde se muestran en orden de seguimiento los resultados a partir del VOR con abreviaturas para la sección 3.1.

3.1.1. Método 1: Segmentación de la imagen y medición del área (número de pixeles) del triturador

A través del método 1 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.1) se obtuvo a partir de VOR el video VPM1R, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.2. La figura 3.2A corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se

encuentra en un estado de relajación. La figura 3.2B corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de contracción. Se puede observar que en el estado de contracción, la región de la imagen en número de pixeles que ocupa el triturador es menor al número de pixeles que ocupa el triturador en la imagen cuando se encuentra en un estado de relajación.

Se puede observar el video VPM1R en el DVD anexo en la carpeta VPM1 correspondiente a los videos procesados por el método 1 de PDSI.

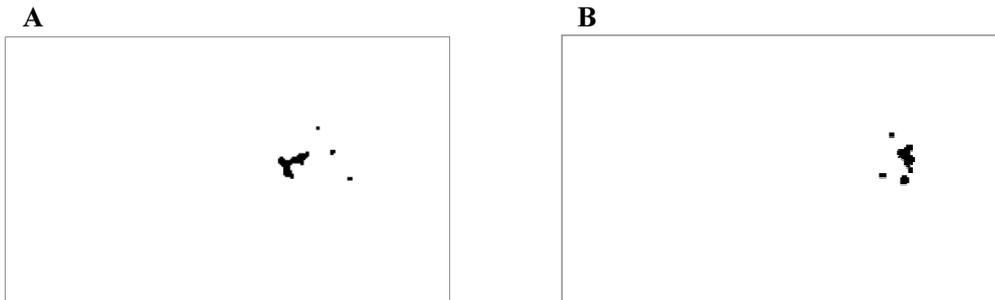


Figura 3.2. VPM1R. Imagen del video procesado por el método 1 de PDSI a partir de VOR. En ambas se observan partículas que son pixeles que son detalles no resueltos del video (ver sección 2.2.4.1 c). **A)** Relajación. **B)** Contracción.

A partir de VPM1R se obtuvo la serie de tiempo SM1R (Fig. 3.3). En SM1R se graficó el número de pixeles en cada imagen. Se puede observar que este número es variable a través de la serie haciendo que la serie varíe en periodicidad, intensidad y tendencia.

En SM1R se observan tres tipos de fluctuaciones. La primera fluctuación es muy lenta, su amplitud va de entre 80 y 120 pixeles y se lleva a cabo cada unos cientos de imágenes ($\tau_1 =$ cientos de imágenes). Esta fluctuación podría deberse al movimiento de vaivén del gusano. El segundo tipo de fluctuación es más rápido y varía en más de 20 pixeles además de presentarse aproximadamente entre cada 20 a 100 imágenes. Este segundo tipo de fluctuación corresponde a las contracciones del triturador. Cada contracción del triturador corresponde a una contracción de la faringe entera, por lo tanto se mide también con esto las contracciones de la faringe completa. El tiempo que transcurre entre cada imagen es de 20ms (milisegundos). Por lo tanto el tiempo que transcurre entre cada contracción varía entre 400ms y 2s (segundos) ($\tau_2 =$ decenas de imágenes). El tercer tipo de fluctuación es pequeño y rápido y se ubica por arriba de un área de 80 pixeles, varía de aproximadamente entre 5 y 15 pixeles y cambia en imágenes consecutivas. Este último tipo está probablemente influenciado por el tipo de procesamiento que se dio a las imágenes y por la resolución de las imágenes ($\tau_3 =$ de imagen a imagen), con lo que se puede considerar ruido aleatorio que se necesita distinguir de la señal. Estos tres tipos de fluctuaciones (Fig. 3.3) pueden estudiarse como tres escalas de tiempo distintas: escala grande de tiempo con una frecuencia de cada unos cientos de imágenes (τ_1), escala de tiempo mediana con una frecuencia de cada unas decenas de imágenes (τ_2) y una escala de tiempo pequeña en la que se observa un cambio en el área del triturador en imágenes consecutivas (τ_3).

La resolución del video y la eficiencia del PDSI son suficientes para poder apreciar la forma de onda de las contracciones individuales de la faringe. Es decir, cada pico de contracción está compuesto por más puntos, lo cual da confianza al método. Esta serie de tiempo podría compararse con la forma de onda PQRS de un electrocardiograma en el cual se basan los cardiólogos para evaluar la mecánica del corazón.

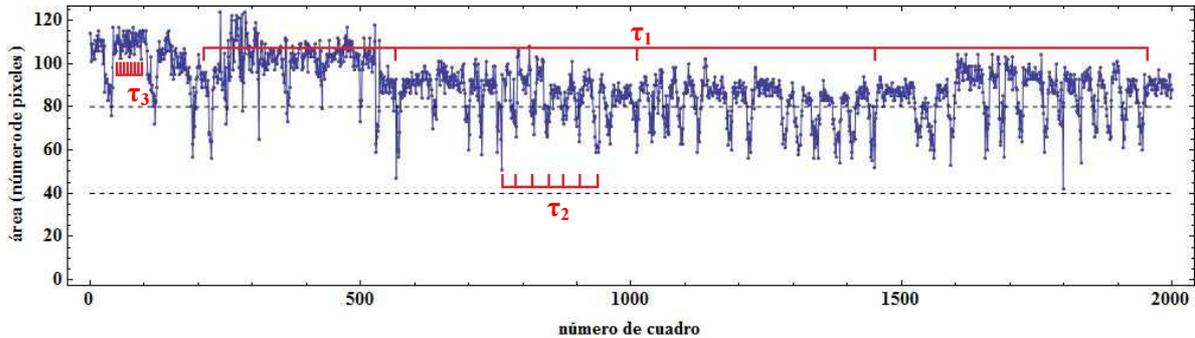


Figura 3.3. SM1R. Serie de tiempo obtenida de VPM1R. Se observa que existen tres escalas de tiempo en la señal. τ_1 que se mide en cientos de imágenes (movimiento del gusano), τ_2 que se mide en decenas de imágenes (bombeo de la faringe) y τ_3 que se observa en imágenes consecutivas.

En la literatura, se sabe que la frecuencia promedio de bombeo de la faringe de *C. elegans* es indicativo para su salud. En la figura 1.10 se observó que el ritmo máximo de contracción de la faringe de *C. elegans* adulto joven es de 300 contracciones por minuto, es decir 5 contracciones por segundo, una cada 200 ms. En VOR hay 2000 imágenes, con 1 imagen cada $\delta t=20\text{ms}$ (50fps), así que la duración completa de la secuencia es de $2000*20\text{ms}=40\text{s}$.

El ritmo mayor que observamos en nuestro individuo fue de 2 a 3 contracciones por segundo es decir de entre 120 a 180 por minuto, lo que ubica a nuestro sujeto de estudio en una edad de 0 a 1 día, es decir muy joven, o de 7 a 8 días, es decir un adulto, lo que se observa de la misma manera en el histograma de Huang en la figura 1.10. Se obtuvo un espectro de potencia de banda ancha con pico dominante en 95 contracciones por minuto. Sin embargo, nos fue informado por el Dr. Andrés Bendzky que la restricción del gusano hace que la frecuencia de bombeo de la faringe del nematodo disminuya probablemente debido a la falta de oxígeno dentro de la cámara (ver sección 3.1). La edad real del gusano fue de 3 días (tabla 3.1) y nuestra estimación a partir del ritmo promedio de bombeo fue incorrecta. Esto ilustra la necesidad de realizar experimentos lo menos invasivos posibles para el nematodo.

3.1.1.1. FFT

En el EP de la figura 3.4A se observa una frecuencia dominante en $\log_{10} 1.5 < \log_{10} f_0 < \log_{10} 2.0$, así que $10^{1.5} < f_0 < 10^{2.0}$ o $31 < f_0 < 100$, donde la frecuencia se mide en unidades absolutas, es decir, el número de ciclos durante toda la duración del video, así que la frecuencia dominante en Hertz se estima como

$0.80\text{Hz} < f_0 < 2.5\text{Hz}$, o en contracciones por minuto (*beats per minute, bpm*) $47\text{bpm} < f_0 < 150\text{ bpm}$.

Es difícil identificar leyes de potencia en contraste con la facilidad de reconocer picos dominantes en un EP. En lo que sigue, se darán dos interpretaciones diferentes, donde se subdivide el EP en tres regiones diferentes o como una única región. Es por eso que en una subsección más adelante, vamos a utilizar un método adaptativo a los datos, el SSA, para tratar de esa manera distinguir leyes de potencia y dinámicas diferentes. La primera interpretación del EMIR se realiza con tres regiones distintas en las que se observan posiblemente tres tipos de correlaciones distintas. En la región I ($\log_{10} f < 1.7$ ó $f < 1.25\text{ Hz}$) se observa que el EP es casi plano, es decir que tiene una pendiente que se aproxima a $\beta = 0$, lo que corresponde a ruido blanco. En la región II ($1.7 < \log_{10} f < 2.6$ ó $1.25\text{ Hz} < f < 10\text{ Hz}$) el EP tiene una pendiente de $\beta = -1.67$; esto corresponde a un ruido entre ruido $1/f$ y ruido browniano. Es decir, según el modelo de la fragilidad, una serie de tiempo demasiado correlacionada podría corresponder a un gusano ya envejecido. En la región III ($\log_{10} f > 2.6$ ó $f > 10\text{ Hz}$) se observa de nuevo un EP plano que indica nula correlación, es ruido blanco.

Estas tres regiones corresponden a las tres escalas de tiempo que se observan directamente sobre la serie de tiempo de la figura 3.3. A bajas frecuencias, escalas de tiempo τ_1 (región I) no existen correlaciones, Sin embargo, se encuentra poca correlación en el movimiento del gusano ya que no se trata de un ruido aleatorio. A frecuencias medias (región II) o escalas de tiempo medianas (τ_2) existen correlaciones entre ruido $1/f$ y ruido browniano. Y a altas frecuencias (región III) o escalas cortas de tiempo (τ_3) no existen tampoco correlaciones, Lo que podría confirmar nuestra interpretación inicial de las fluctuaciones más rápidas como un ruido aleatorio que se debe de separar de la señal que nos interesa.

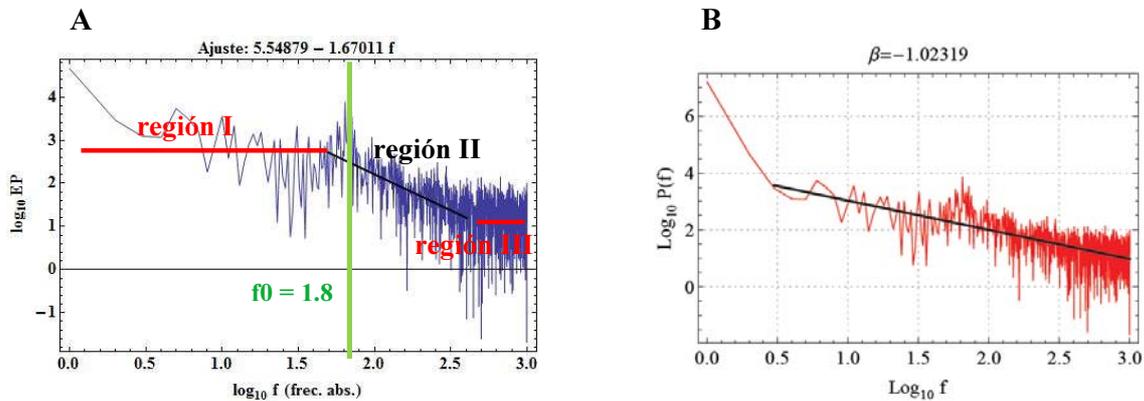


Figura 3.4. EMIR con βFMIR . Espectro de potencias de SMIR (EMIR) **A)** con exponente espectral $\beta\text{FMIR} = -1.67$ para la región II y **B)** con exponente espectral $\beta\text{FMIR} = -1.02$ para el espectro completo.

En la segunda interpretación, alternativa a la primera, EMIR se analiza como una sola región que sigue una ley de potencias con exponente espectral $\beta\text{FMIR} = -1.02$ al hacer el ajuste en todo el espectro pero sin tomar en cuenta el término DC

como se observa en la figura 3.4B. Se desea interpretar este exponente espectral como parecido a la variabilidad de un corazón sano (véase la discusión en la introducción), sin embargo, en la sección siguiente con el análisis con el SSA veremos que esta interpretación es incorrecta, porque solo las frecuencias que componen el pico dominante corresponden con el bombeo de la faringe, mientras las demás frecuencias corresponden con el movimiento del gusano o el ruido aleatorio de la grabación del video o del procesamiento digital de imágenes, lo cual no tiene nada con la variabilidad de bombeo.

3.1.1.2. SSA

El análisis espectral Fourier necesariamente descompone una serie de tiempo en componentes periódicos (senos y cosenos), también cuando esa base no es la más adecuada para representar la serie de tiempo. La ventaja del SSA es que descompone una serie de tiempo en componentes reconstruidos o modos normales, que generalmente no son periódicos así que tampoco no tienen una frecuencia bien determinada, pero de los cuales se espera que tengan una interpretación física.

Para la realización del SSA, se necesita un parámetro L , del cual se aconseja que sea un múltiplo del periodo de la serie de tiempo. En el espectro de potencias Fourier (EP) de la figura 3.4, EMIR tiene una frecuencia dominante de $10^{1.8} = 63$ ciclos durante toda la duración del video, lo cual corresponde con un evento que sucede 63 veces a través de las 2000 imágenes. Esto significa que un evento de oscilación dura aproximadamente 32 imágenes. Aquí, arbitrariamente, elegimos una ventana de resolución $L = 320$, es decir 10 veces el periodo. Esta frecuencia dominante, está superpuesta sobre un comportamiento global del EMIR (una ley de potencias $P(f) \sim 1/f^\beta$) con exponente espectral de escalamiento $\beta = 1.6$ (Fig. 4.4A) o $\beta = 1.0$ (Fig. 4.4B). Nótese que en el ajuste no se incluyó el término DC.

En el análisis SSA, el equivalente del espectro de potencias es el llamado “*scree diagram*” o diagrama de ordenamiento de eigenvalores de varianzas parciales ordenadas por magnitud, donde se muestran las varianzas parciales $\lambda_k = \sigma_k^2$ asociadas a los componentes reconstruidos en los cuales se descompuso la serie de tiempo. Se espera encontrar una misma ley de potencias en el *scree diagram* como en el EP. En el *scree diagram*, las varianzas parciales se pueden ordenar en función de magnitud $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3 \geq \dots$ (Fig. 3.5 A) o en función de la frecuencia promedio $\langle f \rangle$ de cada componente reconstruido $g[k]$ (Fig. 3.5 B).

Visto que los componentes reconstruidos del SSA no son periódicos, no tienen una “frecuencia instantánea”, sin embargo se puede estimar la frecuencia promedio $\langle f \rangle$ de un componente $g[k]$ se puede obtener tomando la frecuencia promedio del EP de ese componente $g[k]$, o contando el número de oscilaciones de ese modo (número de *zero-crossings*) dividiendo ese número por la dimensión de la serie de tiempo. En el caso del *scree diagram* de varianzas parciales λ_k ordenadas por frecuencia promedio (Fig. 3.5 B), se observa una ley de potencias muy similar a la encontrada para el EP, $\lambda_k \sim 1/k^\gamma$ con $\gamma = 1.11$, con superpuesta la misma frecuencia dominante. No se muestra el término DC que corresponde con un componente de tendencia que no oscila, así que su frecuencia promedio $\langle f \rangle = 0$ y el logaritmo se vuelve infinito. En el caso de *scree diagram* con varianzas parciales λ_k ordenadas

por magnitud (Fig. 3.5 A), se pierde parcialmente la ley de potencias, porque en este ordenamiento se mezclan las varianzas parciales del pico de la periodicidad dominante con las varianzas parciales grandes de los componentes con bajas frecuencias.

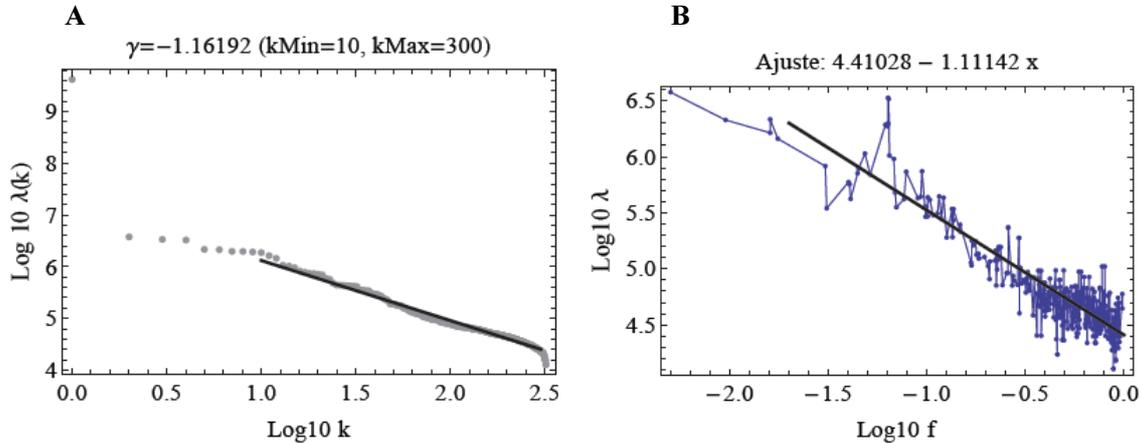


Figura 3.5. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de SM1R calculados con $L = 320$. **A)** DvpM1R. Por varianzas parciales ordenadas por magnitud con exponente -1.16192. **B)** DfrM1R. Por Varianzas parciales ordenadas por frecuencia promedio $\langle f \rangle$, con exponente -1.11, el pico dominante esta constituido por los componentes $g[3]$, $g[4]$, $g[7]$, $g[8]$, $g[9]$, $g[10]$ y $g[14]$.

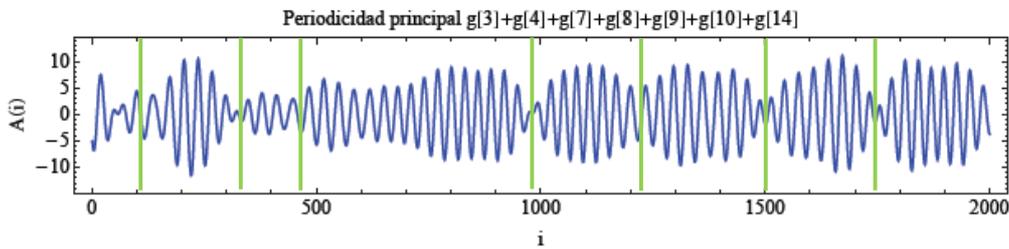


Figura 3.6. TM1R. Suma de los componentes que conforman el pico dominante en EM1R.

En la figura 3.4 B, observamos que el EP necesita de muchísimos componentes periódicos para representar el pico de la periodicidad dominante, mientras que en la figura 3.5 B, el *scree diagram* del SSA necesita solo de unos pocos componentes $g[k]$, mas en particular se trata de $g[3]$, $g[4]$, $g[7]$, $g[8]$, $g[9]$, $g[10]$ y $g[14]$. Visto que identificamos ese pico de la periodicidad dominante con el bombeo de la faringe del gusano en el *scree diagram* del SSA, podemos estudiar el comportamiento temporal de la subserie que corresponde con la suma de los componentes que identificamos que tienen que ver con el bombeo, $g[3]+g[4]+g[7]+g[8]+g[9]+g[10]+g[14]$, y que representamos en la figura 3.6. Por construcción, la subserie oscila con una frecuencia promedio $\langle f \rangle$ constante, pero también esta modulada. Comparando con la serie de tiempo original en la figura 3.7, muestra que la subserie reproduce muy bien el bombeo del gusano, y que la modulación (es decir: la disminución en la amplitud de las oscilaciones de la subserie) corresponden con los momentos cuando el gusano deja de bombear.

Entonces, la modulación de la subserie parece capturar la variabilidad del bombeo de la faringe del nematodo. En la figura 3.8, se muestra que el EP de la subserie $g[3]+g[4]+g[7]+g[8]+g[9]+g[10]+g[14]$ reproduce el pico de la periodicidad dominante en el EP de la serie de tiempo original. Parecería que la modulación y la variabilidad de bombeo parecen estar ligados al ancho del pico de la periodicidad.

Por el otro lado, se pueden estudiar también los componentes con una frecuencia promedio $\langle f \rangle$ mucho menor que la frecuencia dominante de bombeo, p.ej. el componente reconstruido $g[k]$, que se muestra en la figura 3.7. Estas oscilaciones parecen tener nada que ver con el bombeo, y probablemente corresponden solo con el movimiento global del gusano. Una posible conclusión es que la ley de potencias con el ruido $1/f$ que encontramos para el EP completo de la figura 3.4 B, o para el *scree diagram* completo de la figura 3.5 B, no tiene nada que ver con la variabilidad de bombeo.

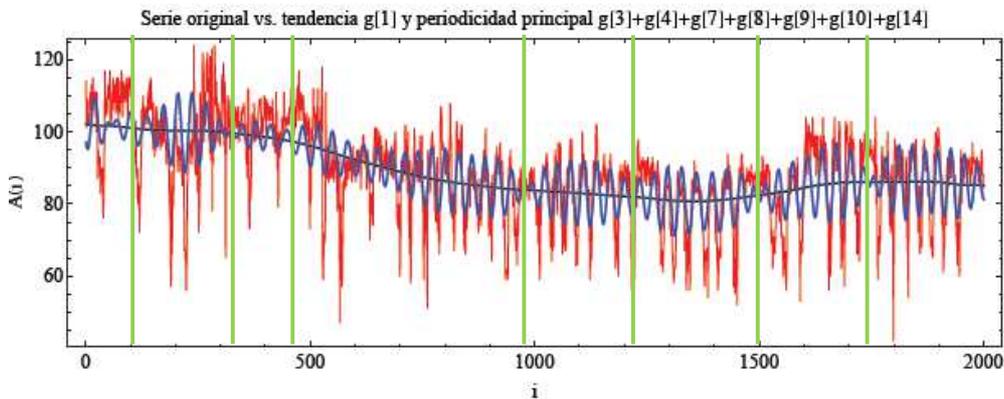


Figura 3.7. STtM1R. Superposición de la tendencia y de TM1 sobre SM1R.

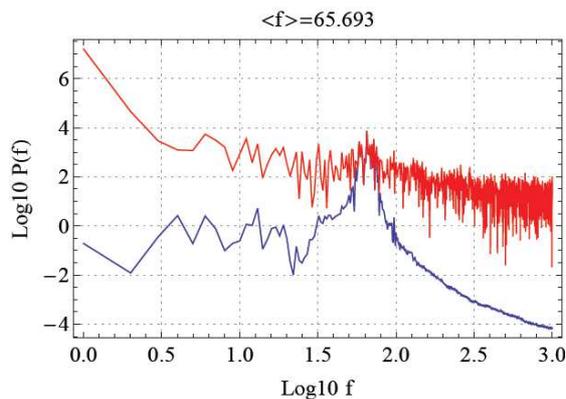


Figura 3.8. ETM1R. Espectro de Potencias de TM1.

3.1.2. Método 2: Diferencias entre los valores de los pixeles de imágenes subsiguientes

A través del método 2 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.2) se obtuvo a partir de VOR el video VPM2R, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.9.

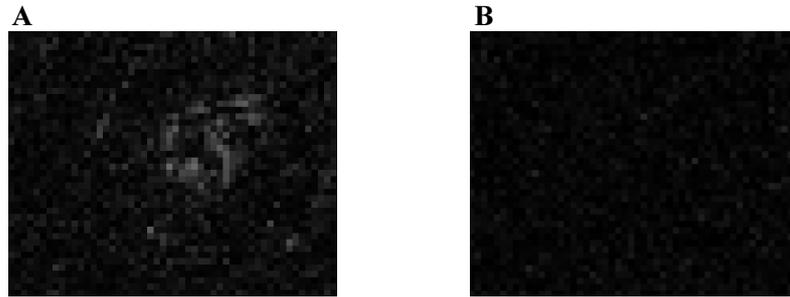


Figura 3.9. VPM2R. Imágenes del video procesado por el método 2 de PDSI a partir de VOR. **A)** Mayor cantidad de movimiento detectado ó contracción. **B)** Imagen en la que no se detectó movimiento ó relajación.

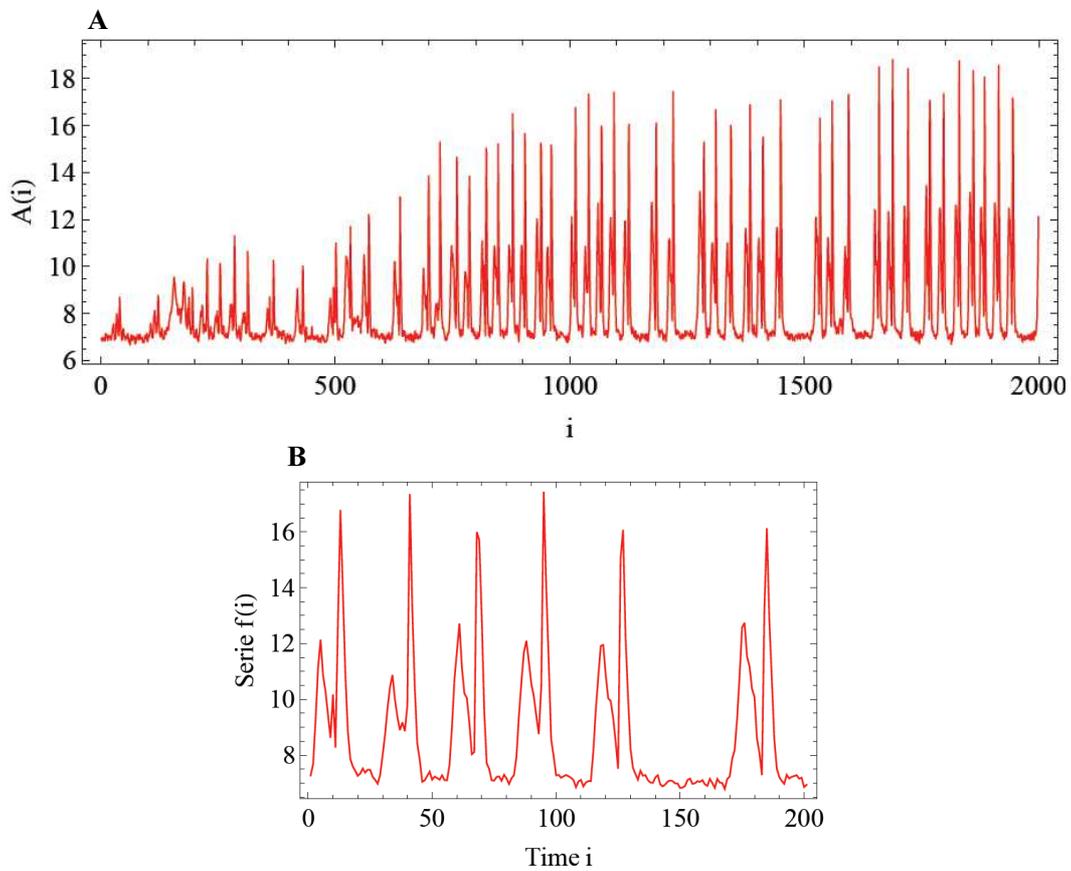


Figura 3.10. SM2R. A) Serie de tiempo obtenida de VPM2R. Número de imagen i . Valor promedio de gris en cada imagen $A(i)$. B) Detalle de SM2R. Notar que en la serie se observa un pico doble por contracción.

La figura 3.9A corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de contracción. La figura 3.9B corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de relajación ó de poco movimiento rápido. Se puede observar que en el estado de contracción, la región de la imagen que corresponde al bulbo terminal en el área del triturador presenta

una mayor intensidad de radiación que el resto de la imagen, lo que revela el movimiento rápido de la contracción. Se puede observar el video VPM2R en el DVD anexo en la carpeta VPM2 correspondiente a los videos procesados por el método 2 de PDSI.

En SM2R (Fig. 3.10), la serie de tiempo obtenida a través de este método de PDSI, se observa que no tiene tendencia, que las contracciones van aumentando de intensidad y que éstas no están compuestas de un solo movimiento sino de dos, un movimiento de menor intensidad acompañado de uno de mayor intensidad. El hecho de que cada contracción esté conformada por dos picos (Fig. 3.10) podría significar que la contracción es un movimiento compuesto como se observa en la figura 1.10. Nótese que en la figura 3.10 la resolución temporal del video y la precisión del método II son suficientes para poder estudiar la forma de onda de las contracciones individuales, muy parecido a como los cardiólogos estudian la forma de onda PQRST de una contracción cardiaca en un electrocardiograma (Fig. 1.2.A).

3.1.2.1. FFT

En la serie de tiempo SM2R se nota que cada evento de contracción es doble. En EM2R (Fig. 3.11), el espectro de potencias de la serie SM2R, tiene también dos frecuencias dominantes o regiones de escalamiento que corresponden a estos dos eventos en cada contracción.

Se puede observar que EM2R tiene dos regiones, separadas por una cuenca. A bajas frecuencias, hay poca correlación, su exponente espectral es $\beta=-0.2$ (Fig. 3.11A). A altas frecuencias hay más correlación, su exponente espectral es $\beta=-2.5$ (Fig. 3.11B).

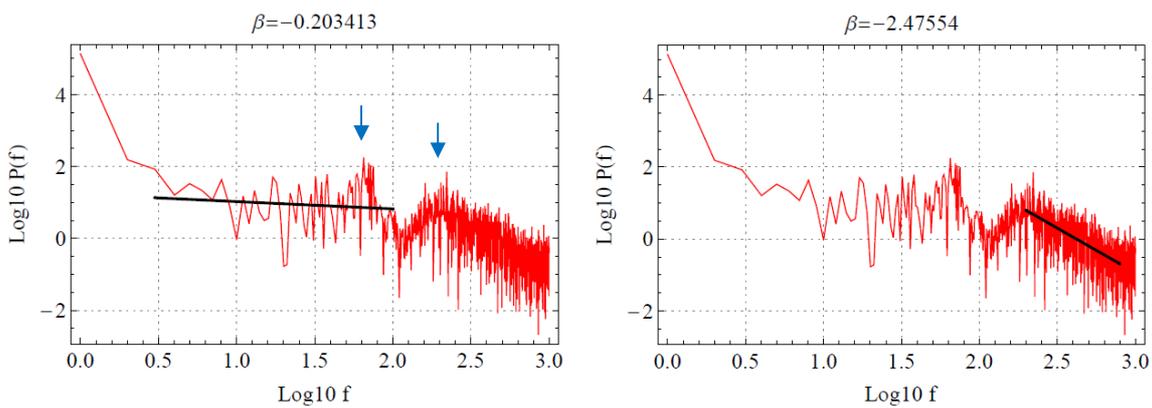


Figura 3.11. EM2R con β_{FM2R} . Espectro de potencias de SM2R (EM2R) con su respectivo exponente espectral $\beta_{FM2R} = -0.2$ ó -2.5 dependiendo de la región de ajuste. Notese que EM2R consiste posiblemente de 2 diferentes regiones de escalamiento.

Se observa un pico de periodicidad a la frecuencia $f_1=10^{1.8} = 63$, la cual corresponde con algo que pasa 63 veces durante toda la duración de la serie de

tiempo de $\text{dim}=1999$, así que es un evento que se repite con un período de 32 imágenes en correspondencia con lo que encontramos en la sección anterior para el método 1 (Fig. 3.4).

Se observa otro pico de periodicidad en la frecuencia $f_2=10^{2.3} = 200$, la cual corresponde con un evento que se repite 200 veces durante toda la duración de la serie de tiempo de $\text{dim}=1999$, es decir que este evento se repite con un período de 10 imágenes. La serie de tiempo parece compuesta por picos dobles con una duración de 2×10 imágenes. Este pico de periodicidad parece estar relacionado con el movimiento doble de cada bombeo, y no se aprecia con el método 1. (Fig. 3.10.B).

3.1.2.2. SSA

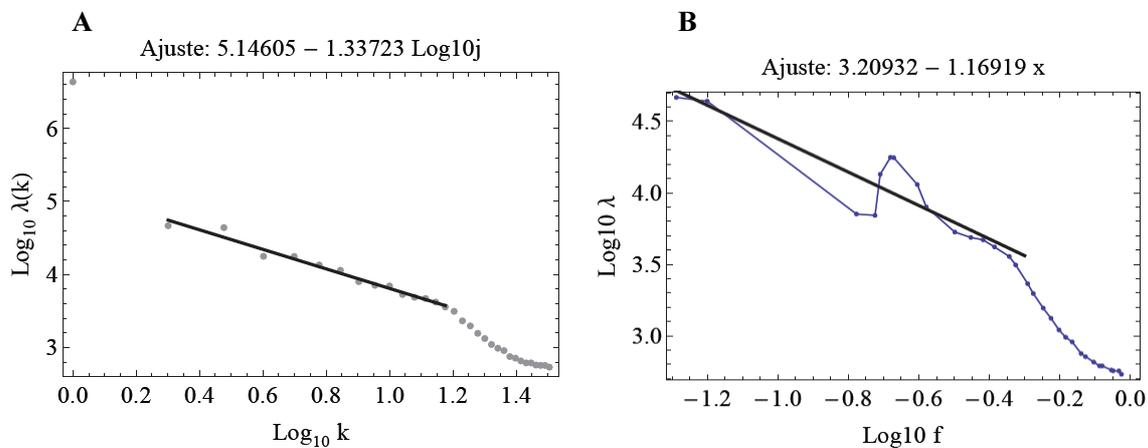


Figura 3.12. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de SM2R calculados con $L = 32$. **A)** DvpM2R. Varianzas parciales ordenadas por magnitud con pendiente de -1.33723. **B)** DfrM2R. Varianzas parciales ordenadas por frecuencia promedio $\langle f \rangle$. El ajuste mostrado en la figura tiene un exponente de 1.69. El pico dominante está constituida en primer lugar por los componentes $g[2]$ y $g[3]$ y también por los componentes $g[4]$ y $g[5]$.

Para la realización de este análisis se eligió un múltiplo de la frecuencia dominante $L = 1 \times 32$. En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores por varianza parcial DvpM2R (Fig. 3.12A) se observa que los eigenvalores no siguen una clara ley de potencias. Se consideró para el ajuste la zona del diagrama que corresponde con frecuencias no muy altas ni muy bajas, con lo que se obtuvo una pendiente de -1.33723. En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores por frecuencia promedio DfrM2R (Fig. 3.12B) se realizó un ajuste para el valor actual de la ventana de SSA, $L=32$, se descompone la serie de tiempo original en 32 modos normales, y en el scree diagram con varianzas parciales ordenadas por frecuencia promedio $\langle f \rangle$ se obtiene un solo pico. Para valores mucho mayores para L , donde se descompone la serie en un número mayor de componentes, es posible recuperar los dos picos dominantes en el scree diagram como observados en el espectro de potencias Fourier de la figura 3.11. Sin embargo, veremos que una descomposición en 32 modos es suficiente para describir la dinámica y la

modulación del bombeo. El pico dominante del scree diagram de la Fig. 3.12 (panel B) esta compuesto sobre todo por los modos $g[2]$ y $g[3]$ (parte central del pico), y en segundo lugar también por los modos $g[4]$ y $g[5]$ (partes laterales del pico).

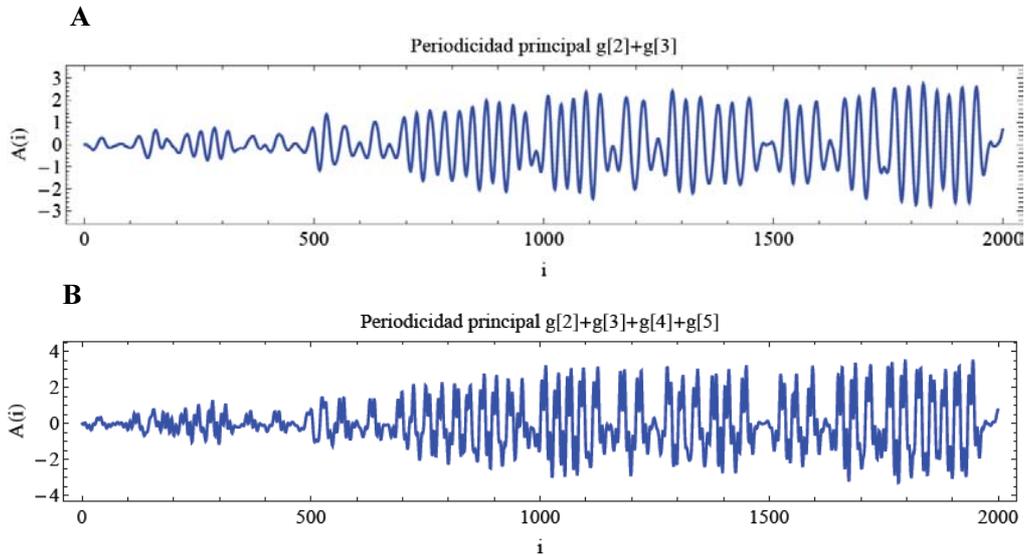


Figura 3.13. TM2R. Suma de los componentes que conforman el pico dominante en EM2R.

Investigamos ahora en más detalle los componentes reconstruidos mencionados. En la Fig. 3.13, se muestra la suma $g[2]+g[3]$ que corresponde con una subserie con cierta frecuencia promedio y una modulación importante (Fig. 3.13 A), mientras que en la suma $g[2]+g[3]+g[4]+g[5]$ cada oscilación se desdobra (Fig. 3.13 B). En la Fig. 3.14, donde se compara con la serie de tiempo original, se puede apreciar que la primera suma corresponde con la parte de contracción más fuerte del bombeo (panel A), mientras que la segunda suma describe las dos fases del bombeo (panel B).

Al obtener el FFT de esta suma de componentes reconstruidos ETM2R y comparándola con EM2R (Fig. 3.15A) se nota que corresponden al pico de periodicidad con frecuencia $f_1=10^{1.8} = 63$ que se observa en EM2R. De hecho es a partir del FFT de los componentes reconstruidos que se eligen para hacer una suma y obtener así una subserie de tiempo con solamente algunas frecuencias específicas de interés incluidas en la serie de tiempo original.

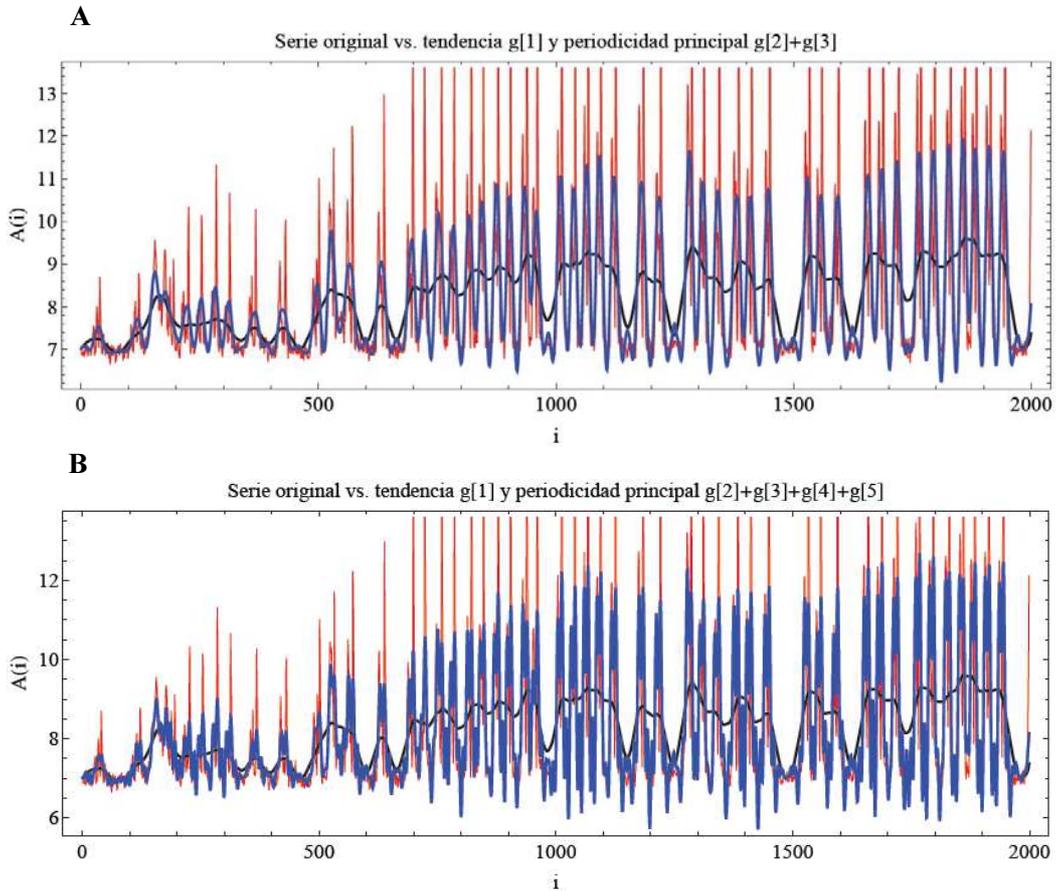


Figura 3.14. STtM2R. Comparación entre la serie original SM2R con la tendencia $g[1]$, y las subseries de la Fig. 3.13 TM2R $g[2]+g[3]$ (panel A) y $g[2]+g[3]+g[4]+g[5]$ (panel B). Se puede apreciar que las subseries describen las dos fases de contracción del bombeo.

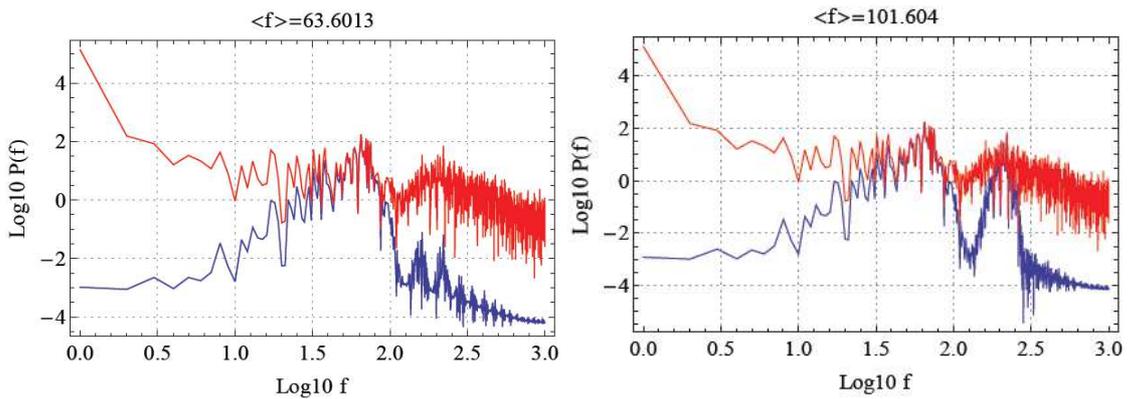


Figura 3.15. ETM2R. Espectro de Potencias de TM2R de subserie $g[2]+g[3]$ (panel izquierdo), y de subserie $g[2]+g[3]+g[4]+g[5]$.

3.2. Gusano que expresa *Green Fluorescent Protein* en la faringe (G)



CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Lugar de toma del video	Universidad de Rockefeller NY*
Cepa	N2 GFP
Edad del gusano	3 días
Montaje del gusano	Caja de Petri
Cámara	iXon3 897
Cuadros por segundo	30 fps
Duración en tiempo real	33.33 seg
Aumento	~20X
número de imágenes	1000
Resolución	512 x 512
Bits por pixel	16
Nombre de video original a 8bpp	VOG

Figura 3.16. VOG. Imagen del video original del gusano que expresa GFP en la faringe. **Tabla 3.3.** Extracto de la tabla 2.4 donde se muestran las características de VOG. *Laboratory of Neural Circuits and Behavior.

Se obtuvo el video de un gusano N2 que expresa *Green Fluorescent Protein* en la faringe (VOG) del cual se observa la primera imagen en la figura 3.16, y las características del mismo en la Tabla 3.3. Se puede observar el video VOG en el DVD anexo en la carpeta VO correspondiente a los videos originales.

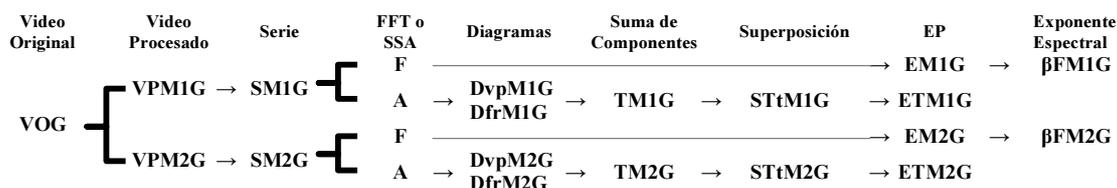


Tabla 3.4. Extracto de la tabla 2.3 donde se muestran en orden de seguimiento los resultados a partir del VOG con abreviaturas para la sección 4.2.

En la Tabla 3.4 se puede observar un diagrama donde se presenta el orden de los resultados para la sección 4.2. Para el mejor seguimiento del diagrama se pueden consultar las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 en la sección 2.1 “Material y método”.

3.2.1. Método 1: Segmentación de la imagen y medición del área (número de píxeles) del triturador

A través del método 1 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.1) se obtuvo el video VPM1G a partir de VOG, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.17. En la figura 3.17A se observan dos secciones separadas, por lo que se supone que dicha imagen corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de relajación (sección 4.1, Fig. 4.1). En la figura 3.17B se observa que las dos secciones antes separadas ahora conforman una sola partícula en la imagen, es por esto que se supone que la imagen, por lo que se supone que dicha imagen corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en

un estado de contracción (sección 4.1, Fig. 4.1). Se puede observar que en el estado de contracción, la región de la imagen en número de pixeles que ocupa el triturador es mayor al número de pixeles que ocupa el triturador en la imagen cuando se encuentra en un estado de relajación.

Se puede observar el video VPM1G en el DVD anexo en la carpeta VPM1 correspondiente a los videos procesados por el método 1 de PDSI.

A partir de VPM1G se obtuvo la serie de tiempo SM1G (Fig. 3.18), en la que se puede apreciar una frecuencia recurrente de picos largos correspondientes a una disminución del número de pixeles, es decir a la contracción. Además se puede advertir que SM1G tiene una tendencia que no posee un patrón claro.

Se puede ver también que existen partes de la serie en donde no se percibe ninguna contracción. Lo anterior se atribuye al PDSI que se realizó a partir de los videos originales que tienen poco detalle. Es decir que el área que corresponde al bulbo terminal en el video procesado VPM1G es muy poca debido al poco detalle en el video original VOG. Lo anterior quiere decir que debido a los pocos pixeles que conforman la faringe en VOG puede haber un margen de error grande en número de pixeles al momento de realizar el PDSI.

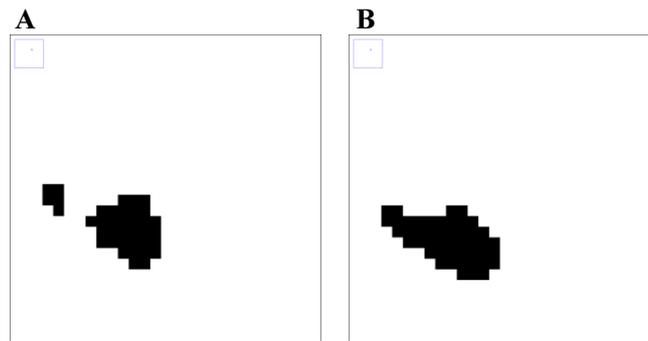


Figura 3.17. VPM1G. Imagen del video procesado por el método 1 de PDSI a partir de VOG. A) Separación de las secciones ó relajación. B) Conjunción de las secciones ó contracción.

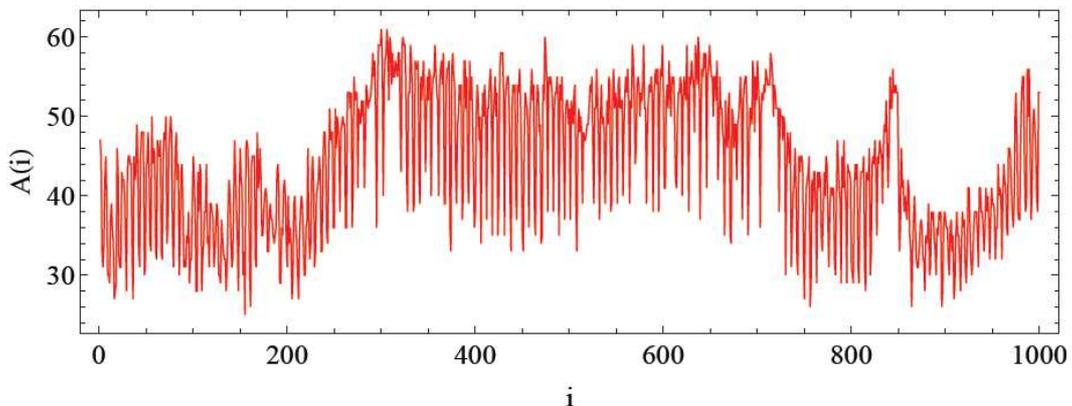


Figura 3.18. SM1G. Serie de tiempo obtenida de VPM1G. (i) Número de imagen. A(i) Cantidad de pixeles.

3.2.1.1. FFT

En el espectro de potencias EM1G (Fig. 3.19) que se obtuvo a partir de SM1G, se observan dos frecuencias dominantes. La primera a una frecuencia $f_1=10^{2.2}=158$ oscilaciones durante toda la duración del video que consta de 1000 imágenes, es decir, una oscilación cada $6=1000/160$ imágenes. La segunda frecuencia dominante se ubica en una frecuencia $f_2=10^{2.5}=316$ oscilaciones durante 1000 imágenes o una oscilación cada 3 imágenes. En el detalle de la serie de tiempo, vemos que hay picos con una duración de alrededor de 5 o 6 imágenes, lo cual claramente corresponde con la frecuencia f_1 . Además, en la parte superior de la serie, es decir de donde se proyectan los picos más largos se puede observar otra frecuencia de oscilaciones que fluctúan entre 0 y 10 píxeles. Esta estructura de fluctuaciones más pequeñas posiblemente corresponde con f_2 . Observamos que los dos picos dominantes, $f_1=10^{2.2}$ y $f_2=10^{2.5}$ se superponen en un comportamiento global bastante plano del espectro de potencias donde $\beta=0$ o ruido blanco a frecuencias mas altas, o $\beta_{FM1G}=-0.56$ a frecuencias medianas y altas), mientras que el espectro parece estar mas correlacionado a frecuencias bajas del EM1G donde $\beta_{FM1G}=-1.303$.

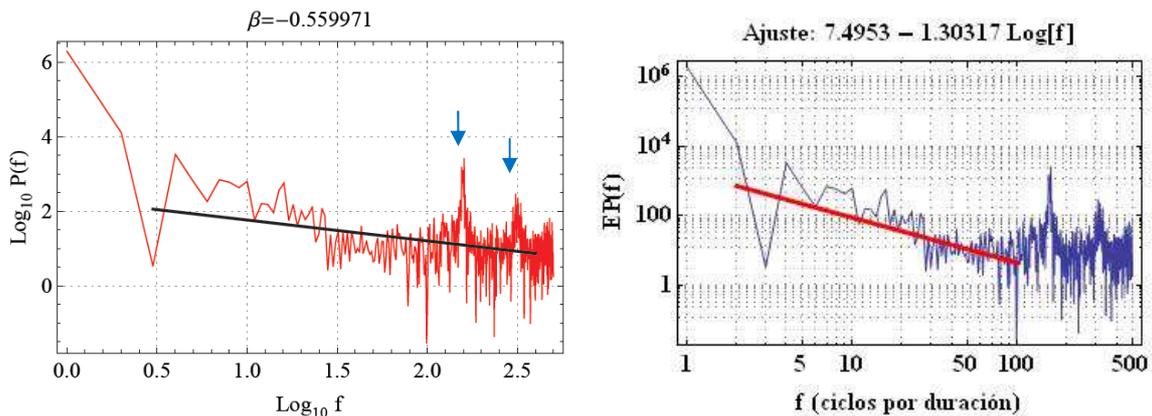


Figura 3.19. EM1G con β_{FM1G} . Espectro de potencias de SM1G (EM1G) con su respectivo exponente espectral $\beta_{FM1G} = -0.56$ ó -1.303 dependiendo de la región de ajuste .

3.2.1.2. SSA

Para la realización de este análisis se eligió un múltiplo de la frecuencia dominante $L = 10 \times 6 = 60$. En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores con varianzas parciales ordenadas por magnitud DvpM1G (Fig. 3.20A) no se observa una clara ley de potencias sino que se observa una pendiente escalonada o con mesetas que localmente se comportan de una manera distinta al comportamiento global. Estas mesetas significan que existen “bloques” de correlación de grupos de ciertos componentes reconstruidos. Para tener una idea del escalamiento de las varianzas parciales de DvpM1G, se realizo un ajuste de la ley de potencias en una region arbitraria.

Del otro lado, cuando se ordenan las varianzas parciales de DvpM1G (Fig. 3.20B) por frecuencia promedio, se encuentran dos partes importantes. A bajas

frecuencias $\langle f \rangle$ hay un comportamiento global correlacionado con exponente -1.5. A altas frecuencias, el espectro parece plano, con las dos frecuencias dominantes superpuestas.

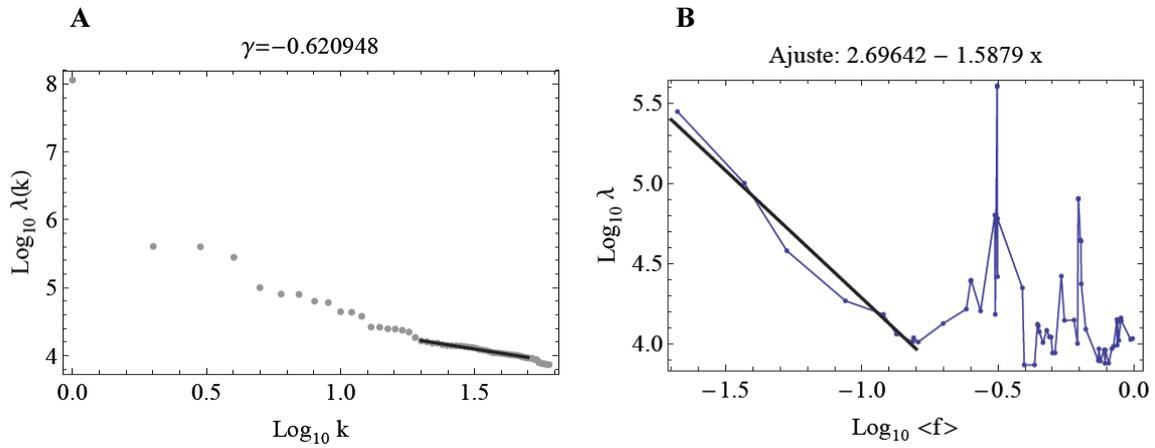


Figura 3.20. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de SMIG calculados con $L = 60$. **A)** DvpM1G. Por magnitud con pendiente -0.620948. **B)** DfrM1G. Por frecuencia promedio con pendiente -1.5879.

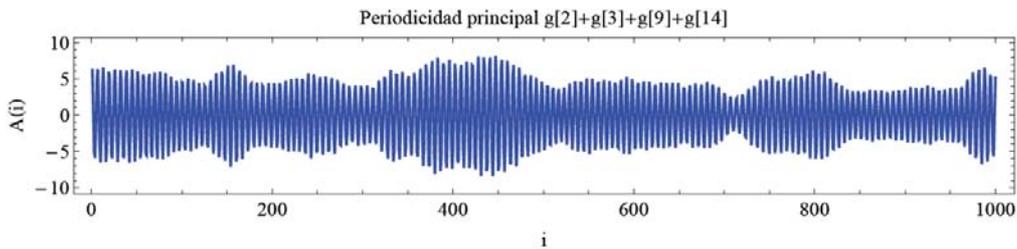


Figura 3.21. TM1G. Suma de los componentes que conforman el pico dominante en EM1G.

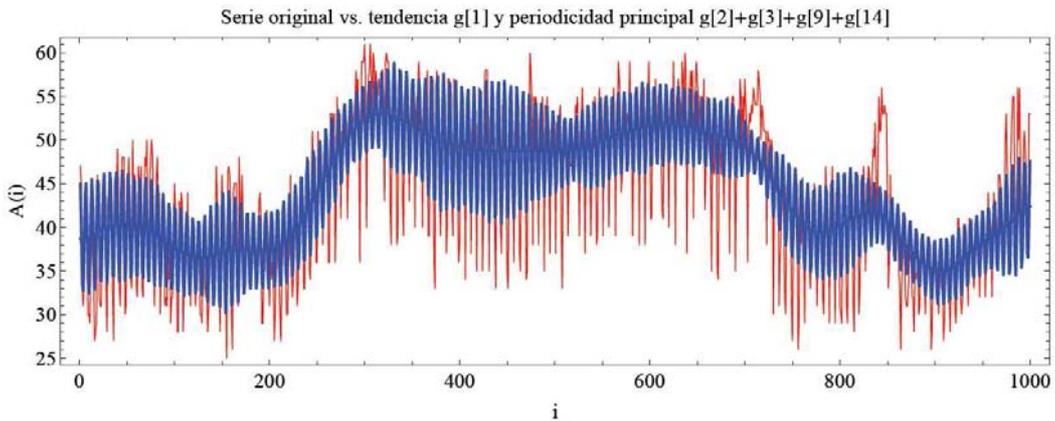


Figura 3.22. STtM1G. Superposición de la tendencia $g_1[t]$ y de TM1G sobre SM1G.

En la figura 3.21 se observa la suma de los componentes reconstruidos $g[k]$ o una subserie TM1G de la serie original SM1G. Se eligieron para este caso unicamente los componentes $g_2[t]$, $g_3[t]$, $g_9[t]$, $g_{14}[t]$, relacionados con el primer

pico de DfrM1G (Fig. 3.14 B). Posteriormente se sumó TM1G con la tendencia $g[1]$ y se sobrepuso sobre SM1G (Fig. 4.22). Se observa que la subserie corresponde únicamente con los eventos de contracción de la serie original, además, la modulación de la subserie parece estar relacionado con la intensidad de actividad de bombeo del nematodo.

En el espectro de potencias ETM1G (Fig. 3.23) que se obtuvo de TM1G se observa que reproduce solamente el pico de la frecuencia dominante en el espectro de potencias de la serie SM1G.

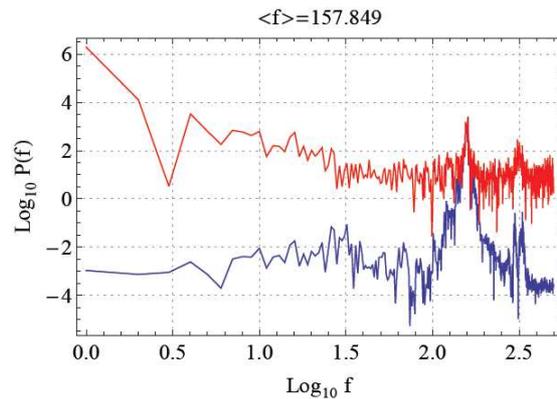


Figura 3.23. ETM1G. Espectro de Potencias de TM1G.

3.2.2. Método 2: Diferencias entre los valores de los píxeles de imágenes subsiguientes

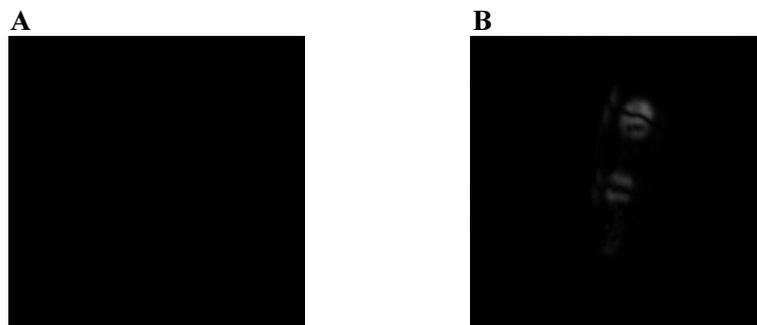


Figura 3.24. VPM2G. Imagen del video procesado por el método 2 de PDSI a partir de VOG. A) Imagen en la que no se detectó movimiento ó relajación. B) Mayor cantidad de movimiento detectado ó contracción.

A través del método 2 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.2) se obtuvo a partir de VOG el video VPM2G, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.24. La figura 3.24A corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de relajación o de poco movimiento rápido. La figura 3.24B corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de contracción. Se puede observar que en el estado de contracción, la región de la imagen que corresponde al bulbo terminal y metacarpus presenta una mayor intensidad de radiación que el resto de la imagen, lo que revela el movimiento rápido de la contracción.

Se puede observar el video VPM2G en el DVD anexo en la carpeta VPM2 correspondiente a los videos procesados por el método 2 de PDSI.

La serie de tiempo SM2G (Fig. 3.25) consiste de pulsaciones rápidas que corresponden con el bombeo de la faringe. Además, hay una oscilación lenta o tendencia, que probablemente corresponde con el movimiento del gusano.

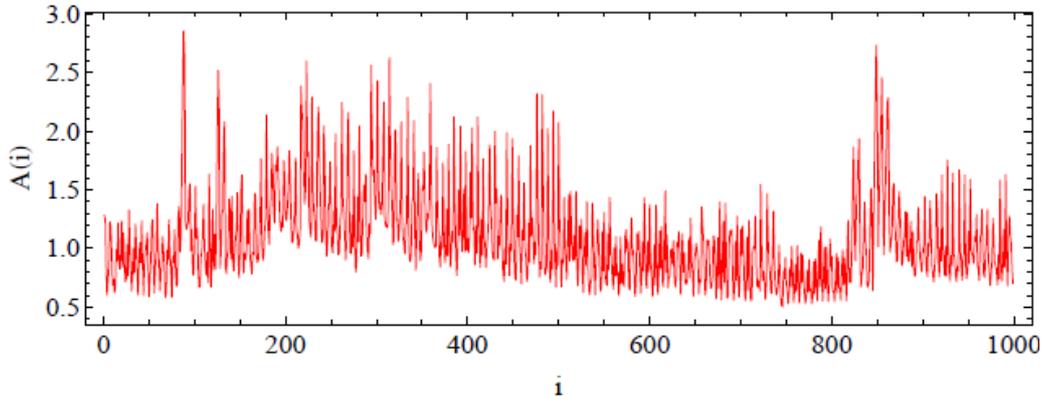


Figura 3.25. SM2G. Serie de tiempo obtenida de VPM2G. **(i)** Número de imagen. **A(i)** Valor promedio de gris en cada imagen.

3.2.2.1. FFT

En el espectro de potencias EM2G (Fig. 3.26) correspondiente a SM2G, hay una bajada lenta y global con dos frecuencias dominantes a altas frecuencias. El pico de la frecuencia dominante más alta, $f_2=10^{2.5} = 316$, es un armónico del pico a la frecuencia más baja, $f_1=10^{2.2} = 158$

La frecuencia f_1 , indica que hay 160 pulsaciones en la duración completa del video, que cuenta con 999 marcos, lo cual significa una pulsación cada 6 marcos. Si la velocidad de grabación del video es de 30 marcos por segundo (30fps), esto significa que hay un marco cada 33 ms, y que el gusano bombea una vez cada 200ms, es decir 316 veces por minuto. Según la literatura, esto corresponde con un gusano de alrededor de 2 días de edad.

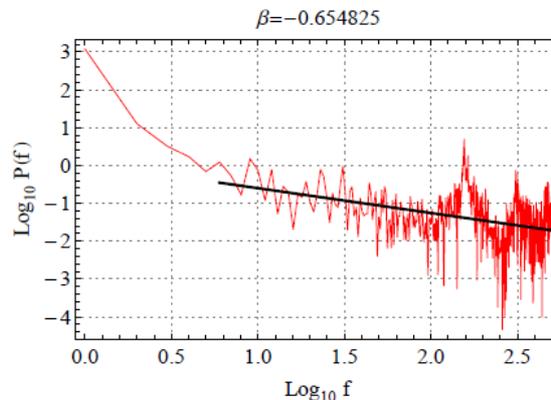


Figura 3.26. EM2G con β FM2G. Espectro de potencias de SM2G (EM2G) con su respectivo exponente espectral β FM2G = -0.6548.

La frecuencia f_2 indica que hay 320 pulsaciones en la duración completa del video, lo cual significa una pulsación cada 3 marcos. Esta frecuencia es un armónico de la frecuencia dominante anterior. En la serie de tiempo hay una pulsación aproximadamente cada 6 marcos en la secuencia. No hay pulsaciones de duración más corta, así que la frecuencia f_2 parece ser un resultado artificial del análisis espectral Fourier, y este armónico no representa alguna frecuencia de contracción en la serie SM2G.

3.2.2.2. SSA

Para la realización de este análisis se eligió un múltiplo de la frecuencia dominante $L = 10 \times 6 = 60$. Según el SSA, hay un eigenvalor (y un eigenmodo correspondiente) que es ordenes de magnitud mayor que los demas y que se destaca claramente, y que corresponde con una tendencia $g[1]$ (probablemente el movimiento del gusano), mientras que los demás eigenvalores (y eigenmodos o componentes correspondientes) describen las fluctuaciones menores alrededor de esta tendencia.

En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores por varianza parcial $DvpM2G$ (Fig. 3.27A), las fluctuaciones parecen ser invariantes de escala, por lo que se observa que obedece una ley de potencias con exponente - 1. Sin embargo, este exponente no corresponde con la ley de potencias a la cual obedece aparentemente EM2G, para el cual encontramos un exponente espectral $\beta_{FM2G} = -0.6548$.

La razón de la diferencia en los exponentes espectrales es el diferente ordenamiento de las varianzas parciales, donde en el primer caso las varianzas parciales de la tendencia y del pico de la periodicidad se mezclan. Cuando en el diagrama de ordenamiento de eigenvalores se ordenan las varianzas parciales por frecuencia promedio $\langle f \rangle$ de los componentes asociados (Fig. 3.27 B), se recuperan el pico de la frecuencia dominante alrededor de la frecuencia $f_1=10^{2.2}$ y su armónico en la frecuencia $f_2=2.5$, que están superpuestos sobre un comportamiento global de una ley de potencias con un exponente espectral $\beta=-0.57$ como el encontrado para el espectro de potencias Fourier EM2G. Para que se conservara un mismo comportamiento entre los diagramas de ordenamiento de eigenvalores de varianzas parciales ordenadas por magnitud y ordenadas por frecuencia promedio $\langle f \rangle$ de sus componentes asociados, se necesitaría una relación lineal entre el numero de orden k y la frecuencia promedio $\langle f \rangle$, lo cual no es válido en caso como el presente donde se observan picos con frecuencias dominantes en el diagrama de ordenamiento de eigenvalores.

En la figura 3.28 se observa la suma de los componentes reconstruidos $g[k]$ o una subserie TM2G de la serie original SM2G. Se eligieron para este caso unicamente los componentes $g[2]$, $g[3]$, $g[5]$, $g[6]$, $g[9]$ y $g[10]$.

Se seleccionaron estos componentes porque tienen una frecuencia de zero-crossings muy cercana a la frecuencia dominante $f=10^{2.2}$ del espectro de potencias Fourier que interpretamos como la frecuencia de bombeo del nematodo, son los componentes que constituyen el pico dominante en el Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de varianzas parciales (Fig. 3.27 B). Cuando se suman y se grafican tales componentes más $g[1]$, se reproducen únicamente las contracciones que se

observan en SM2G (Fig. 3.29). Conviene elegir cuidadosamente los componentes a incluir ya que en ocasiones la faringe del nematodo deja de contraerse y estos saltos en la serie se reconocen como una disminución en la amplitud de las oscilaciones, es decir, la modulación observada en la figura 3.28.

Del otro lado, se pueden graficar también los componentes con una frecuencia de zero - crossings f_0 mucho menor que la frecuencia dominante de bombeo. Estas oscilaciones parecen no tener nada que ver con el bombeo, y probablemente correspondan entonces sólo con el movimiento del gusano.

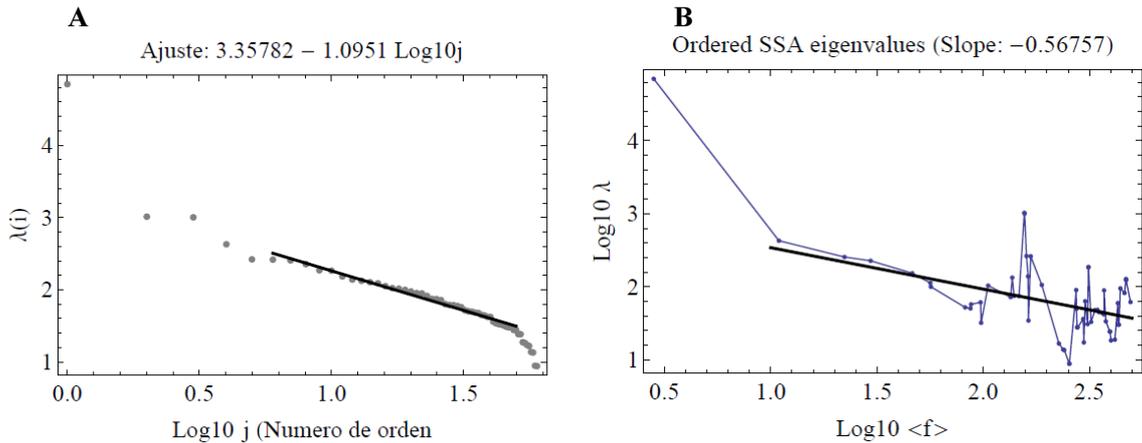


Figura 3.27. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de varianzas parciales ordenadas del SSA de SM2G calculados con $L = 60$. **A)** DvpM2G. Ordenadas por magnitud con pendiente -1.1 . **B)** DfrM2G. Ordenadas por frecuencia promedio con pendiente -0.57 .

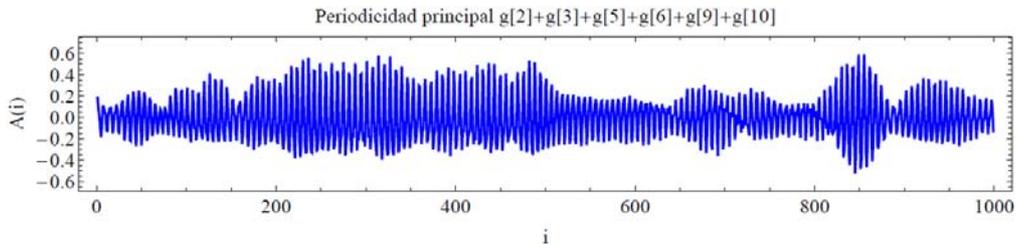


Figura 3.28. TM2G. Suma de los componentes que conforman el pico dominante en EM2G.

Posteriormente se sumó TM2G con la tendencia conformada por los componentes $g[1]$ y $g[4]$ y posteriormente se sobrepuso sobre SM2G (Fig. 4.22). Se observa que la subserie corresponde únicamente con los eventos de contracción de la serie original (fig 3.29).

En el espectro de potencias ETM2G (Fig. 3.30) que se obtuvo de TM2G se observa que reproduce solamente los picos de las frecuencias dominantes en el espectro de potencias EM2G de la serie SM2G.

Los componentes $g[2]$ y $g[3]$ contribuyen casi a una sola frecuencia, i.e. $f_1=10^{2.2}$. Por el resto su espectro es muy plano. Los componentes $g[9]$ y $g[10]$

contribuyen también a una sola frecuencia, pero en este caso se trata de $f_2=10^{2.5}$, la cual es un armónico de la frecuencia f_1 .

Los componentes $g[5]$ y $g[6]$ tienen un comportamiento bastante similar, y también contribuyen a la frecuencia $f_1=10^{2.2}$. Pero, aparte, contribuyen también a un intervalo más amplio de frecuencias $[10^{1.0}, 10^{1.5}]$. Luego, los modos $g[7]$ y $g[8]$ contribuyen sobre todo a este mismo rango amplio, y en menor medida a la frecuencia f_1 .

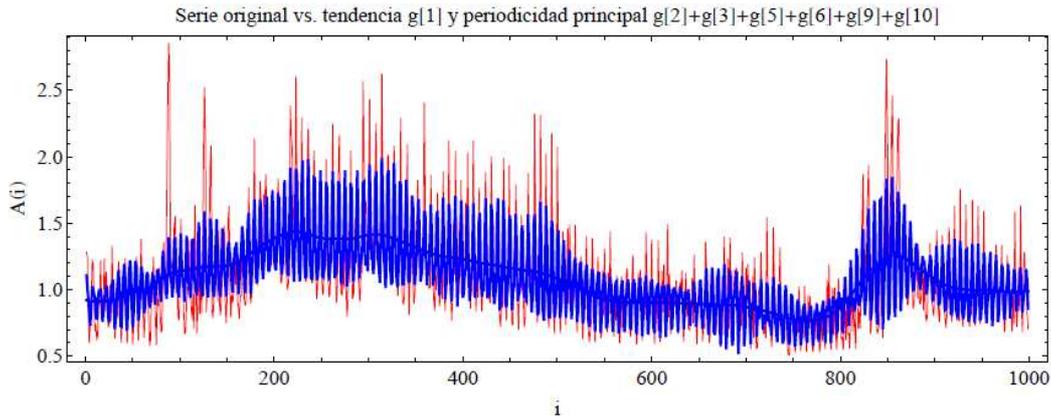


Figura 3.29. STtM2G. Superposición de la tendencia y de TM2G sobre SM2G.

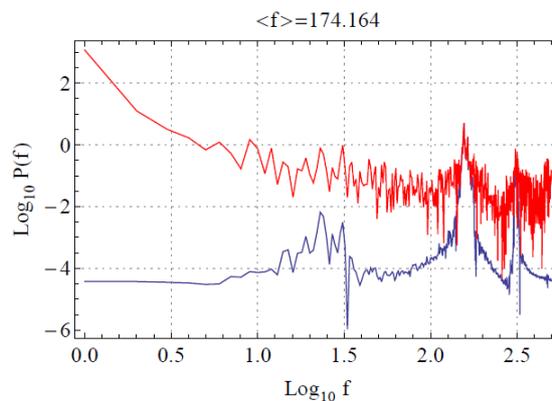
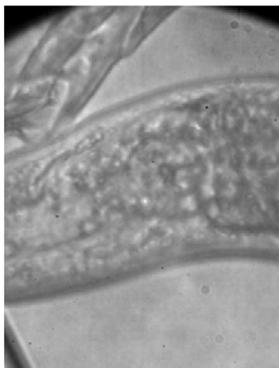


Figura 3.30. ETM2G. Espectro de Potencias de TM2G.

3.3. Gusano unc-119 (ed3) grabado en el Instituto de Física de la UNAM (U)

Se obtuvo el video de un gusano unc-119 (ed3) grabado en el Instituto de Física de la UNAM (VOU) del cual se observa la primera imagen en la figura 3.31, y las características del mismo en la Tabla 3.5. Se puede observar el video VOU en el DVD anexo en la carpeta VO correspondiente a los videos originales.

En la Tabla 3.6 se puede observar un diagrama donde se presenta el orden de los resultados para la sección 4.3. Para el mejor seguimiento del diagrama se pueden consultar las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 en la sección 2.1 “Material y método”.



CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Lugar de toma del video	Instituto de Física UNAM
Cepa	unc-119 (ed3)
Edad del gusano	4 días
Montaje del gusano	Portaobjetos m9 sellado
Cámara	Phantom v7.3
Cuadros por segundo	**
Duración en tiempo real	**
Aumento	100x
número de imágenes	702
Resolución	600 X 800
Bits por pixel	8
Nombre de video original a 8bpp	VOU

Figura 3.31. VOU. Imagen del video original del gusano unc-119 (ed3) grabado en el Instituto de Física de la UNAM. **Tabla 3.5.** Extracto de la tabla 2.4 donde se muestran las características de VOU. **Datos no disponibles.

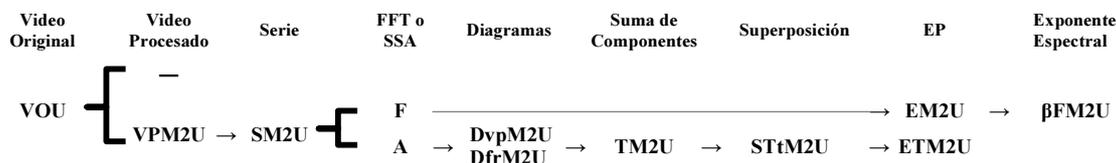


Tabla 3.6. Extracto de la tabla 2.3 donde se muestran en orden de seguimiento los resultados a partir del VOU con abreviaturas para la sección 4.3.

3.3.1. Método 2: Diferencias entre los valores de los pixeles de imágenes subsiguientes

A través del método 2 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.2) se obtuvo a partir de VOU el video VPM2U, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.39. La figura 3.39A corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de contracción. La figura 3.2B corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de relajación ó de poco movimiento rápido. Se puede observar que en el estado de contracción, la región de la imagen que corresponde al bulbo terminal presenta una mayor intensidad de radiación, lo que revela el movimiento rápido de la contracción.

Se puede observar el video VPM2U en el DVD anexo en la carpeta VPM2 correspondiente a los videos procesados por el método 2 de PDSI.

A partir de VPM2U se obtuvo la serie de tiempo SM2U (Fig. 3.40), en la que se pueden apreciar eventos de contracción en los que se nota un claro aumento en la intensidad de radiación promedio de las imágenes. A pesar de que SM2U cuenta con únicamente 700 imágenes, se puede apreciar que las contracciones se llevan a cabo con cierta periodicidad

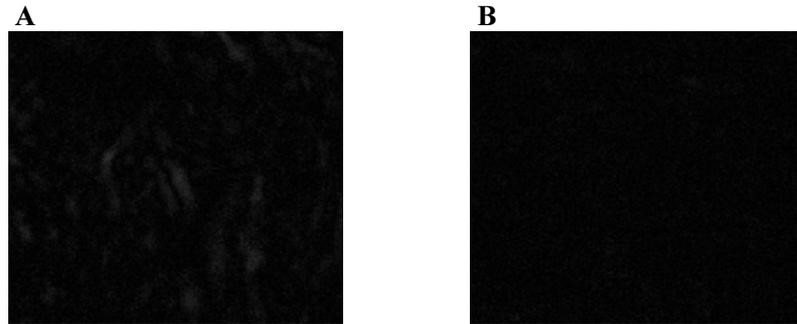


Figura 3.39. VPM2U. Imagen del video procesado por el método 2 de PDSI a partir de VOU. **A)** Mayor cantidad de movimiento detectado ó contracción. **B)** Imagen en la que no se detectó movimiento ó relajación.

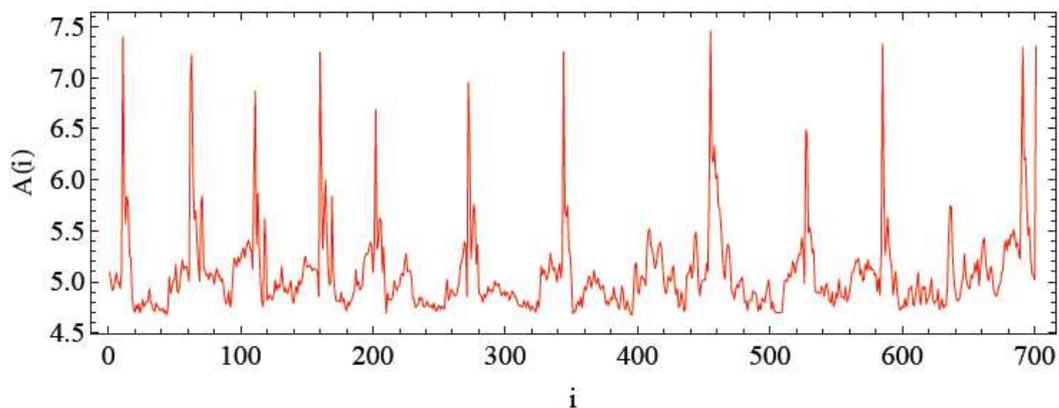


Figura 3.40. SM2U. Serie de tiempo obtenida de VPM2U. **(i)** Número de imagen. **A(i)** Valor promedio de gris en cada imagen.

3.3.1.1. FFT

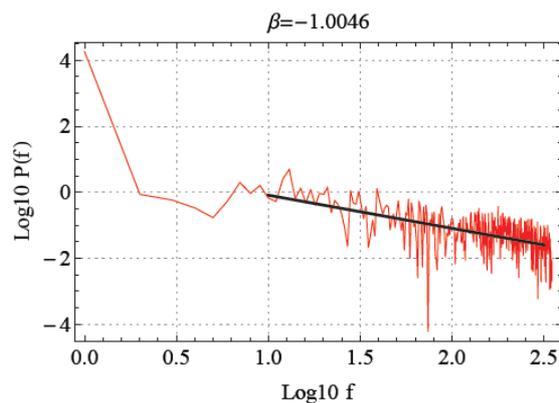


Figura 3.41. EM2U con β_{FM2U} . Espectro de potencias de SM2U (EM2U) con su respectivo exponente espectral $\beta_{FM2U} = -1.004$.

En el espectro de potencias EM2U (Fig. 3.41) que se obtuvo de la serie SM2U se puede notar que no existe una frecuencia dominante y que el diagrama en su totalidad sigue claramente una ley de potencias. Se realizó el ajuste en las

frecuencias medias y altas ya que al ser muy corta la serie de tiempo, no se pueden observar ni estudiar con detalle las frecuencias bajas como la tendencia. Con lo anterior se obtuvo un exponente espectral $\beta_{FM2U} = -1.004$.

3.3.1.2. SSA

Al no detectarse ninguna frecuencia dominante en EM2U, para la realización de este análisis se decidió dividir la dimensión total del video, es decir el número total de imágenes, se dividió entre dos y se tomó este valor como el tamaño de ventana de resolución $L = Dim/2$.

En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores de varianzas parciales ordenadas por magnitud $DvpM2U$ (Fig. 3.42A) se observa una clara ley de potencias como comportamiento global. Se realizó el ajuste a frecuencias medias sin tomar el término DC ya que la serie es muy corta para estudiar las frecuencias bajas y las frecuencias muy altas ya que el término DC corresponde con la tendencia y no oscila. Se obtuvo una pendiente de -1.08 para este diagrama.

Se realizó un ajuste en todas las frecuencias en el diagrama de ordenamiento de eigenvalores de varianzas parciales ordenadas por frecuencia promedio $DfrM2U$ (Fig. 3.42B). Dicho ajuste se realizó de esta manera para observar el comportamiento global de las frecuencias, y de esta manera se obtuvo una pendiente de -1.386.

En la figura 3.43 se observa la suma de los componentes reconstruidos $g[k]$ o una subserie TM2U de la serie original SM2U. Se eligieron para este caso únicamente los componentes $g[2]$, $g[3]$, $g[6]$, $g[7]$, $g[8]$, $g[9]$, $g[15]$, $g[19]$ y $g[43]$. Posteriormente se sumó TM2U con la tendencia $g[1]$ y se sobrepuso sobre SM1G (Fig. 4.44). Se observa que la subserie corresponde únicamente con la frecuencia de los eventos de contracción de la serie original, no así con la amplitud exacta del pico que describe cada evento en SM2U. Sin embargo se puede notar que cada evento de contracción en TM2U recrea la amplitud de cada pico de contracción en SM2U pero a otra escala.

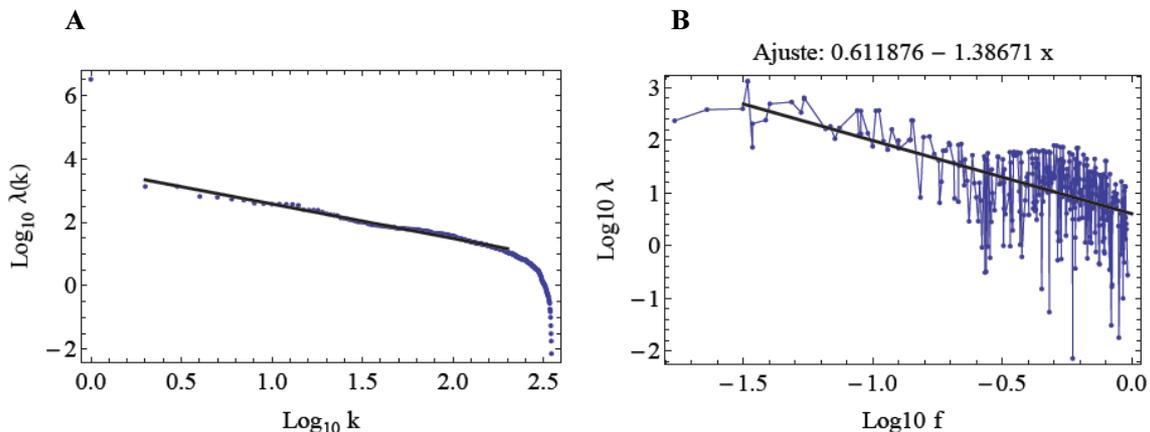


Figura 3.42. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de SM2U calculados con $L = 350$. **A)** $DvpM2U$. Por varianza parcial con pendiente -1.08. **B)** $DfrM2U$. Por frecuencia promedio con pendiente -1.39.

En el espectro de potencias ETM2U (Fig. 3.45) que se obtuvo de TM2U se observa que se reproduce un fragmento de EM2U en las frecuencias bajas. Las frecuencias más altas en el espectro de potencias corresponderán con las fluctuaciones muy rápidas y muy pequeñas que se aprecian en la serie de tiempo entre los picos de contracción. Probablemente tienen que ver solamente con el ruido del video y del procesamiento de las imágenes y no con la variabilidad de bombeo del gusano. Esto puede ser debido a que, dada la corta longitud de la serie SM2U, se registren los picos de contracción como frecuencias bajas y por consiguiente que nos sean tan conspicuas debido a la forma inclinada de la ley de potencias.

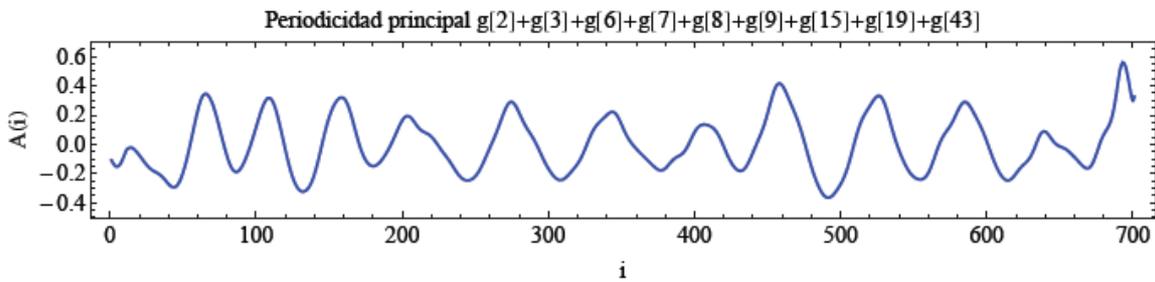


Figura 3.43. TM2U. Suma de los componentes que conforman el pico dominante en EM2U.

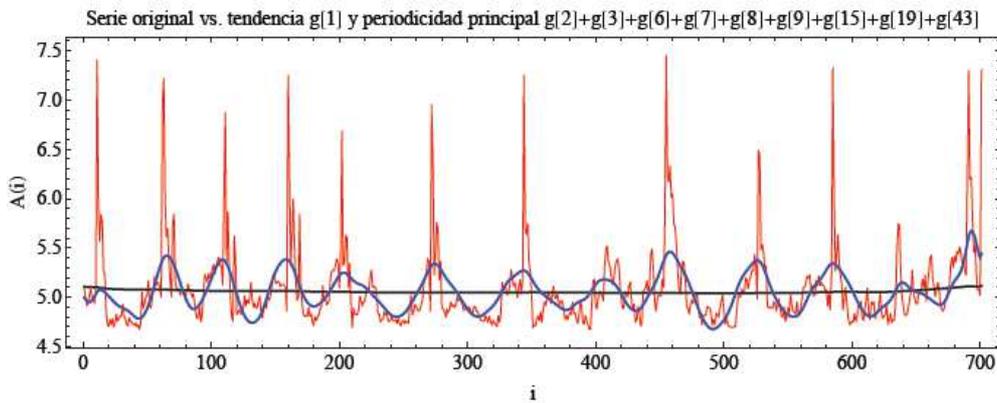


Figura 3.44. STtM2U. Superposición de la tendencia y de TM2U sobre SM2U.

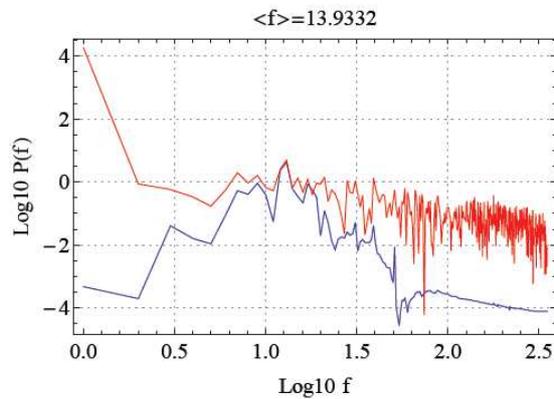


Figura 3.45. ETM2U. Espectro de Potencias de TM2U.

3.4. Gusano *unc-54 ed190 CB190* con posición horizontal (H)

Se obtuvo el video de un gusano ***unc-54 ed190 CB190*** con **posición horizontal** (VOH) del cual se observa la primera imagen en la figura 3.46, y las características del mismo en la Tabla 3.7. Se puede observar el video VOH en el DVD anexo en la carpeta VO correspondiente a los videos originales.



CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Lugar de toma del video	Universidad de Rockefeller, NY*
Cepa	<i>unc-54 ed190 CB190</i>
Edad del gusano	3 días
Montaje del gusano	Caja de Petri
Cámara	iXon3 897
Cuadros por segundo	**
Duración en tiempo real	**
Aumento	~20X
número de imágenes	3400
Resolución	170 X 103
Bits por pixel	16
Nombre de video original a 8bpp	VOH

Figura 3.46. VOH. Imagen del video original del gusano *unc-54 ed190 CB190* con posición horizontal.

Tabla 3.7. Extracto de la tabla 2.4 donde se muestran las características de VOH. *Laboratory of Neural Circuits and Behavior. **Datos no disponibles.

En la Tabla 3.8 se puede observar un diagrama donde se presenta el orden de los resultados para la sección 4.4. Para el mejor seguimiento del diagrama se pueden consultar las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 en la sección 2.1 “Material y método”.

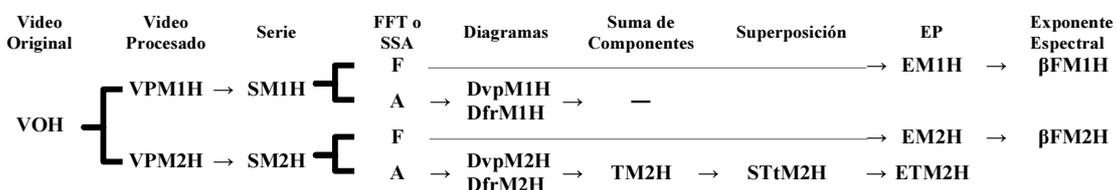


Tabla 3.8. Extracto de la tabla 2.3 donde se muestran en orden de seguimiento los resultados a partir del VOH con abreviaturas para la sección 4.4.

3.4.1. Método 1: Segmentación de la imagen y medición del área (número de píxeles) del triturador

A través del método 1 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.1) se obtuvo el video VPM1H a partir de VOH, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.47. En la imagen 3.47A se observa una sección de píxeles, que corresponde al corpus, con máxima intensidad de radiación. Al contraerse los músculos del corpus para dejar pasar el agua con las bacterias hacia el triturador, se produce una cavidad en esta área (Fig. 1.11), por lo que se supone que dicha imagen corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de contracción. La imagen 3.47B es un fondo con intensidad de radiación 0. Al

relajarse los músculos del corpus se cierra la cavidad, no así dejando pasar la luz a través de la lámpara del microscopio por esa región (Fig. 1.11), por lo que se supone que dicha imagen corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de relajación.

Se puede observar el video VPM1H en el DVD anexo en la carpeta VPM1 correspondiente a los videos procesados por el método 1 de PDSI.

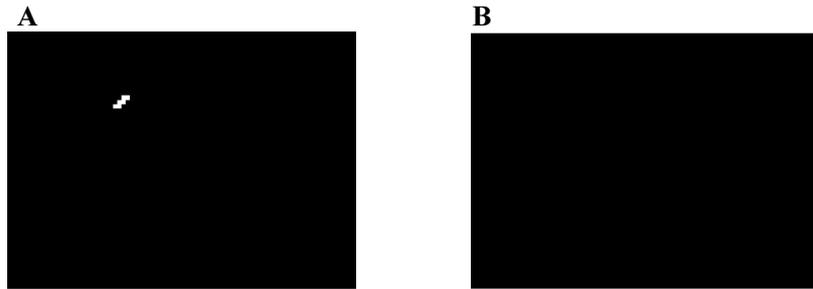


Figura 3.47. VPM1H. Imagen del video procesado por el método 1 de PDSI a partir de VOH. **A)** Contracción. **B)** Relajación.

A partir de VPM1H se obtuvo la serie de tiempo SM1H (Fig. 4.48) en la que se graficó la cantidad de pixeles en cada imagen. En SM1H se pueden observar picos conspicuos en los que el número de pixeles es mayor. Se puede notar que la escala $A(i)$ está comprendida por pocos valores, lo que representa un cambio muy grande en la serie si se cuenta 1 o 2 pixeles de mas o de menos.

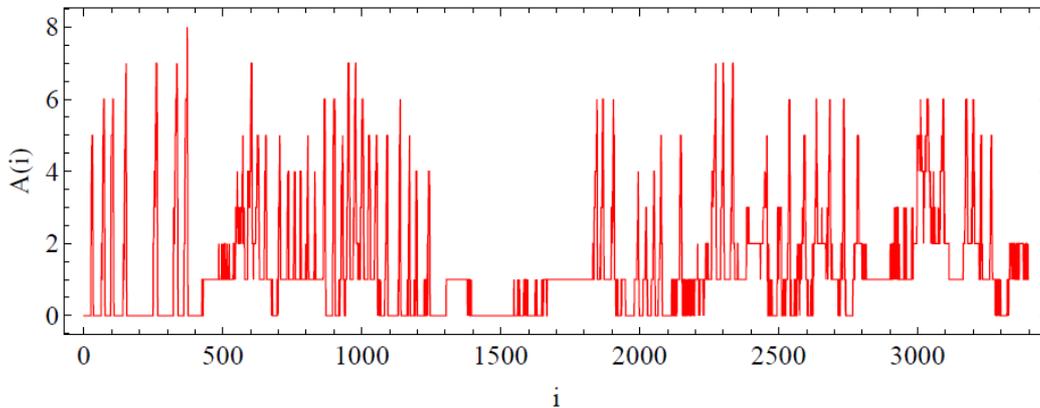


Figura 3.48. SM1H. Serie de tiempo obtenida de VPM1H. **(i)** Número de imagen. **A(i)** Cantidad de pixeles.

3.4.1.1. FFT

El espectro de potencias EM1H (Fig. 3.49) correspondiente a SM1H consiste de dos regiones, con una frecuencia de *cross-over* $f_1=10^{2.0}=100$, es decir una oscilación que sucede 100 veces durante toda la duración del video de 3397 imágenes, lo que significa un periodo de 34 imágenes. Se puede realizar un posible ajuste en cada una de estas regiones, con lo que obtenemos un exponente espectral $\beta_{FM1H} = -$

0.401919 a frecuencias altas a medias, y un exponente espectral $\beta_{FM1H} = -2.2553$ a frecuencias medias a bajas.

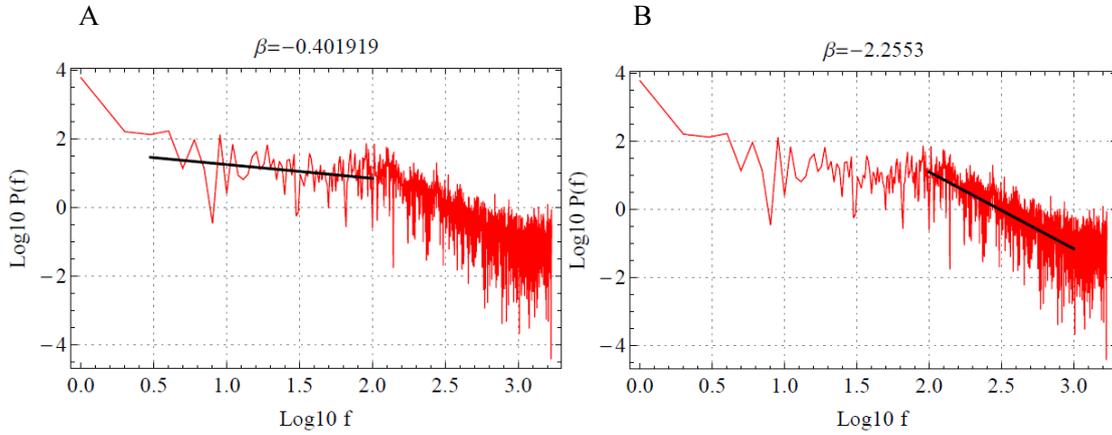


Figura 3.49. EM1H con β_{FM1H} . Espectro de potencias de SM1H (EM1H) con dos posibles regiones de escalamiento con A) $\beta_{FM1H} = -0.401919$ y B) $\beta_{FM1H} = -2.2553$

3.4.1.2. SSA

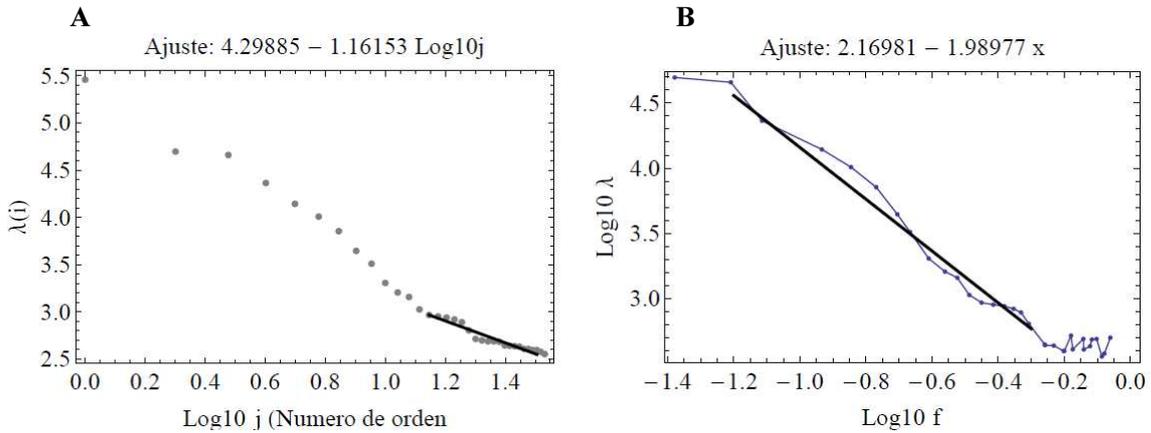


Figura 3.50. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de SM1R calculados con $L = 34$. **A)** DvpM1H. Por varianza parcial con pendiente -1.16153 . **B)** DfrM1H. Por frecuencia promedio con pendiente -1.98977 .

Para la realización de este análisis se eligió un múltiplo de la frecuencia de *zero-crossings* y se obtuvo un tamaño de ventana de resolución $L = 34$. En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores por varianza parcial DvpM1H (Fig. 3.50A) no se observa una clara ley de potencias. Los eigenvalores que podrían ser tomados para el ajuste se encuentran a frecuencias bajas, con los que se obtuvo una pendiente de -1.16 .

El diagrama de ordenamiento de eigenvalores por frecuencia promedio DfrM1H (Fig. 3.50B) exhibe una forma mas parecida a una ley de potencias, por lo

que la región del ajuste puede ser mas amplia, obteniéndose así una pendiente de -1.989.

La suma de los componentes que conforman el pico de frecuencia dominante en EM1H (TM1H), la superposición de la tendencia y de TM1H sobre SM1H (STtM1H) y el espectro de potencias de TM1H (ETM1H) no se muestran debido a que la serie de tiempo obtenida de VPM1H (SM1H) tiene muy pocos datos (Fig. 3.48). Es por ello que no tiene sentido hacer los análisis de esta serie de tiempo ya que esta no lo permite. No hay tantas oscilaciones para tratar de describir

3.4.2. Método 2: Diferencias entre los valores de los pixeles de imágenes subsiguientes

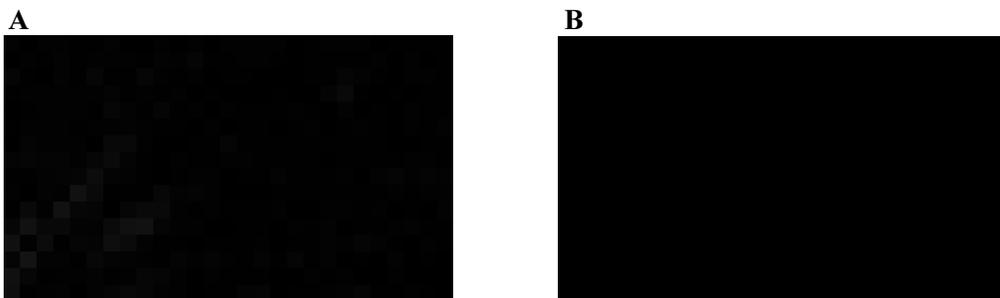


Figura 3.54. VPM2H. Imagen del video procesado por el método 2 de PDSI a partir de VOH.

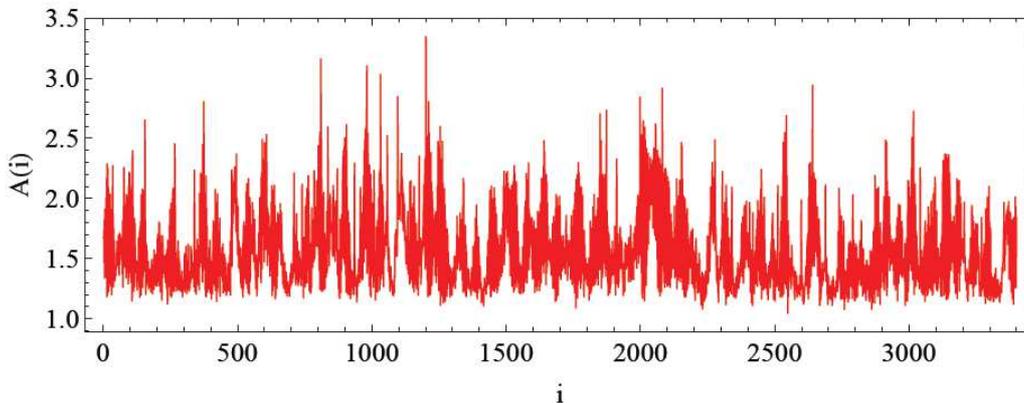


Figura 3.55. SM2H. Serie de tiempo obtenida de VPM2H.

A través del método 2 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.2) se obtuvo a partir de VOH el video VPM2H, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.54. La figura 3.54A corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de contracción. La figura 3.54B corresponde al momento en el que la faringe del nematodo se encuentra en un estado de relajación ó de poco movimiento rápido. Se puede observar que en el estado de contracción, la región de la imagen que corresponde al corpus presenta una intensidad de radiación mayor que el resto de la imagen, lo que revela el movimiento rápido de la contracción.

Se puede observar el video VPM2H en el DVD anexo en la carpeta VPM2 correspondiente a los videos procesados por el método 2 de PDSI.

A partir de VPM2H se obtuvo la serie de tiempo SM2H (Fig. 4.55). Se puede observar que las contracciones de la faringe en esta serie no son tan claramente indetificables a comparación con las series anteriores.

3.4.2.1. FFT

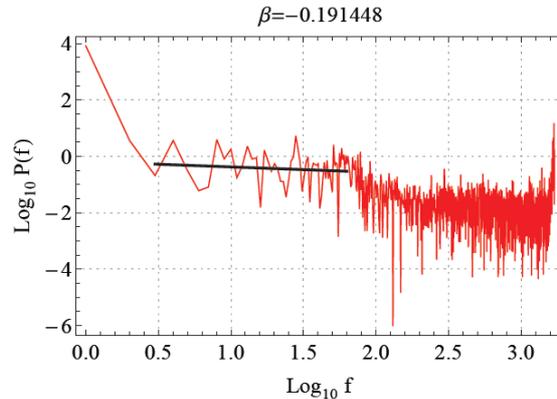


Figura 3.56. EM2H con β FM2H. Espectro de potencias de SM2H (EM2H) con su respectivo exponente espectral β FM2H = -0.191448.

En el espectro de potencias EM2H (Fig. 3.56) que se obtuvo de la serie SM2U se puede notar que no se observa una frecuencia dominante. Se puede notar también que EM2H podría estar conformado por dos partes que se notan como ruido blanco. Debido a esto no hacía mucha diferencia en que parte del espectro se hacía el ajuste. Por consiguiente, el exponente espectral que se obtuvo es β FM2H = -0.191448.

El espectro de potencias consiste de dos regiones, con una frecuencia de *cross-over* $f=f_1=10^2=100$, i.e. una oscilación que pasa 100 veces durante toda la duración del video de 3397 imágenes, osea con un período 34 imágenes.

3.4.2.2. SSA

Para la realización de este análisis se multiplicó por dos la frecuencia de *zero crossings* a falta de una frecuencia dominante en EM2H, por lo que se trabajó con un tamaño de ventana de resolución $L = 2 \times 34 = 68$. En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores por varianza parcial $D_{vp}M2H$ (Fig. 3.57A) aparentemente hay dos regiones de escalamiento de los eigenvalores $l(k)$ del SSA vs. el número de orden (cuantificación de la varianza de los modos principales): la primera región con modos $k=2$ a $k=20$ con un exponente -1.5. Y una segunda región con modos $k=21$ a $k=50$ con un exponente -0.5. Con esto, se hizo el ajuste a frecuencias mas bien altas, obteniéndose una pendiente de -0.64.

El diagrama de ordenamiento de eigenvalores por frecuencia promedio $D_{fr}M2H$ (Fig. 3.57B) parece seguir una ley de potencias conformada por mas eigenvalores que en $D_{vp}M2H$. tiene dos partes importantes. Al realizar el ajuste añadiendo mas eigenvalores se obtuvo una pendiente de -0.515.

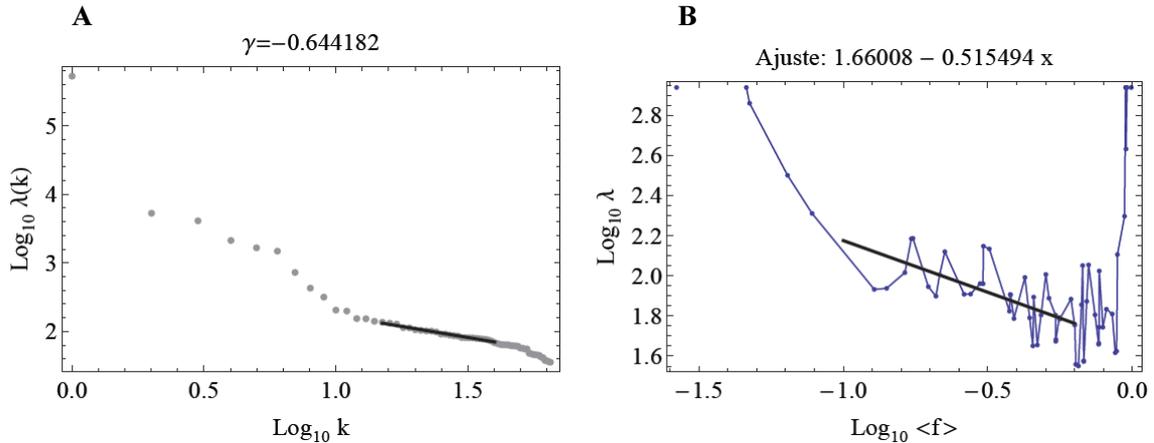


Figura 3.57. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de SM2H calculados con $L = 65$. **A)** DvpM2H. Por varianza parcial con pendiente -0.644182 . **B)** DfrM1R. Por frecuencia promedio con pendiente -0.515494 .

En la figura 3.58 se observa la suma de los componentes reconstruidos $g[k]$ o una subserie TM2H de la serie SM2H. Se eligieron para este caso únicamente los componentes $g[4]$, $g[5]$, $g[7]$ y $g[9]$.

Posteriormente se sumó TM2H con la tendencia $g_1[t]$ y se superpuso sobre SM2H (Fig. 4.59). Se observa que la subserie corresponde con los posibles eventos identificables de contracción de la serie original.

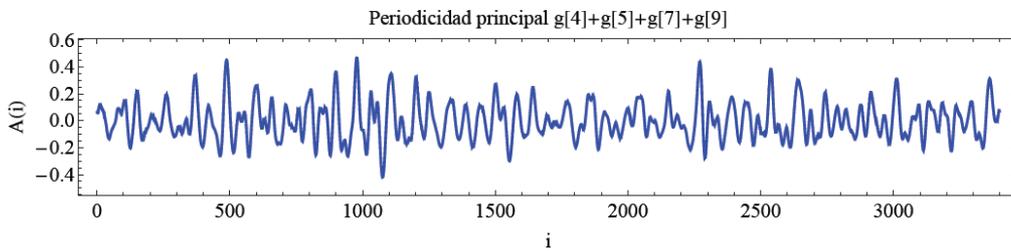


Figura 3.58. TM2H. Suma de los componentes que conforman el pico dominante en EM2H.

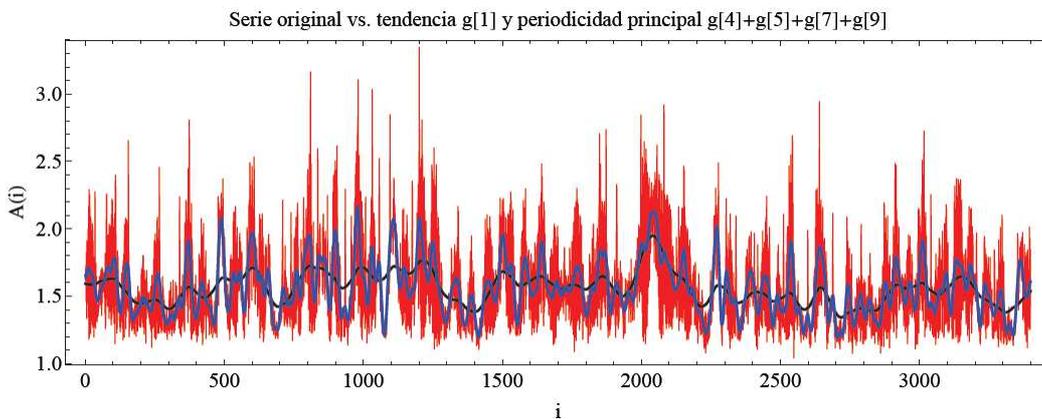


Figura 3.59. STtM2H. Superposición de la tendencia y de TM2H sobre SM2H.

En el espectro de potencias ETM1G (Fig. 3.60) que se obtuvo de TM2H se observa que los componentes que la conforman contribuyen en el espectro de potencia en un rango característico de frecuencias entre $10^{1.5}$ y $10^{2.2}$. Debido a la gran cantidad de ruido en la serie SM2H se detecta un intervalo amplio de frecuencias altas. Pudiera ser que debido a esto las frecuencias de contracción se detectaran a frecuencias medias-bajas y que por consiguiente la frecuencia dominante de contracción en EM2H no sea tan conspicua debido a la forma inclinada de la ley de potencias. Otra vez, la variabilidad de bombeo del nematodo podría estar contenida en la modulación de esta subserie con frecuencia promedio bastante constante.

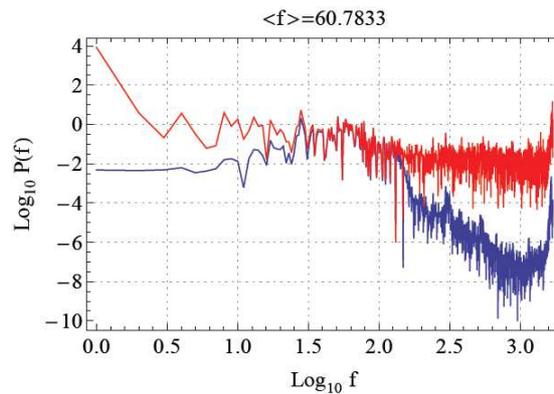
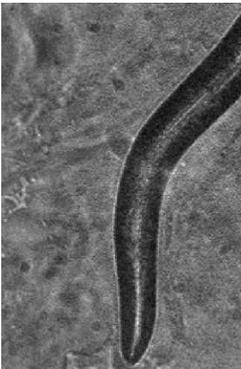


Figura 3.60. ETM2H. Espectro de Potencias de TM2H.

3.5. Gusano unc-54 (ed 190) CB190 del que se puede apreciar solo la cabeza (C)



CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Lugar de toma del video	Universidad de Rockefeller, NY*
Cepa	unc-54ed 190 CB190
Edad del gusano	3 días
Montaje del gusano	Caja de Petri
Cámara	iXon3 897
Cuadros por segundo	**
Duración en tiempo real	**
Aumento	~20X
número de imágenes	7200
Resolución	172 X 262
Bits por pixel	16
Nombre de video original a 8bpp	VOC

Figura 3.61. VOC. Imagen del video original del gusano unc-54ed 190 CB190 del que se puede apreciar solo la cabeza en posición vertical.

Tabla 3.9. Extracto de la tabla 2.4 donde se muestran las características de VOC. *Laboratory of Neural Circuits and Behavior. **Datos no disponibles.

Se obtuvo el video de un gusano unc-54ed 190 CB190 del que se puede apreciar solo la cabeza en posición vertical (VOC) del cual se observa la primera imagen en la figura 3.61,

y las características del mismo en la Tabla 3.9. Se puede observar el video VOC en el DVD anexo en la carpeta VO correspondiente a los videos originales.

En la Tabla 3.10 se puede observar un diagrama donde se presenta el orden de los resultados para la sección 4.5. Para el mejor seguimiento del diagrama se pueden consultar las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 en la sección 2.1 “Material y método”.

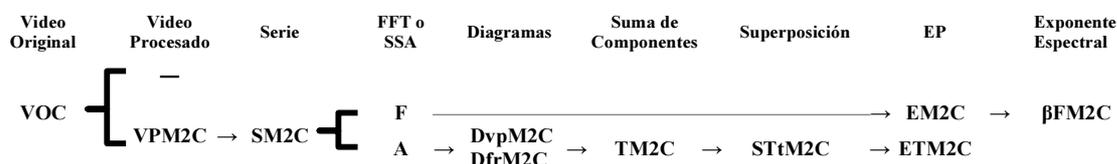


Tabla 3.10. Extracto de la tabla 2.3 donde se muestran en orden de seguimiento los resultados a partir del VOC con abreviaturas para la sección 4.5.

3.5.1. Método 2: Diferencias entre los valores de los píxeles de imágenes subsiguientes

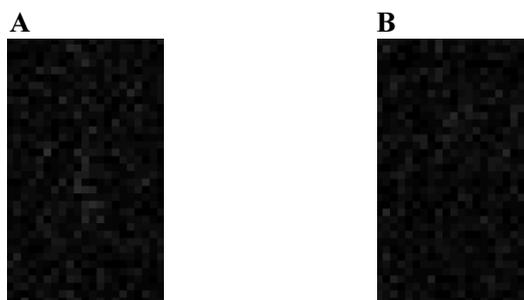


Figura 3.69. VPM2C. Imagen del video procesado por el método 2 de PDSI a partir de VOC.

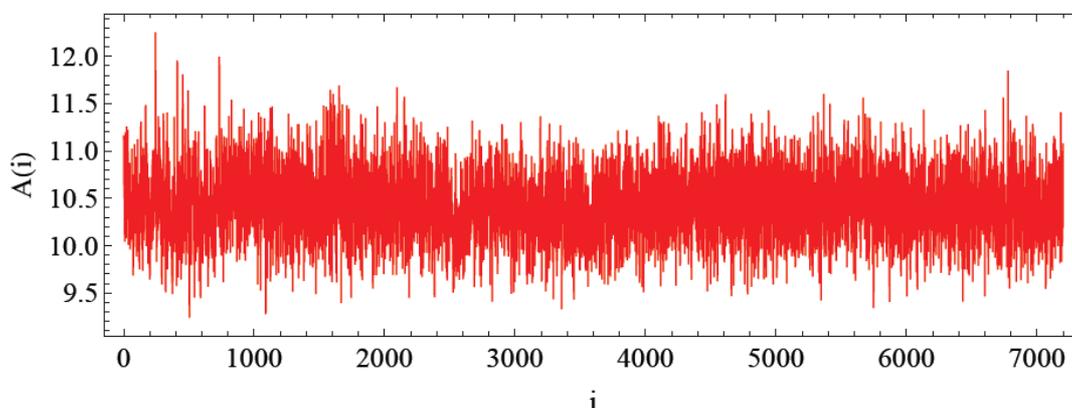


Figura 3.70. SM2C. Serie de tiempo obtenida de VPM2C.

A través del método 2 de PDSI (descrito en la sección 2.2.4.2) se obtuvo a partir de VOC el video VPM2C, del cual se observan dos imágenes en la figura 3.69. Debido a que VOC es un video con mucho ruido, al momento de realizar el PDSI se perdieron las regiones que se notaba que cambiaban sutilmente en el video original. Es por esto que entre las imágenes 4.69A y 4.69B no se observa una diferencia sustancial. Debido al gran ruido y al poco detalle de las imágenes en el

video hubo dificultad identificando que momento correspondía a la contracción y cual a la relajación.

Se puede observar el video VPM2C en el DVD anexo en la carpeta VPM2 correspondiente a los videos procesados por el método 2 de PDSI.

A partir de VPM2C se obtuvo la serie de tiempo SM2C (Fig. 4.70). La serie de tiempo se ve bastante aleatoria, sin claras características debido a la gran cantidad de ruido que contiene. Sin embargo, es posible que en el ruido se encuentre algún patrón que revele las frecuencias de contracción de la faringe. Es por ello que decidimos estudiar esta serie.

3.5.1.1. FFT

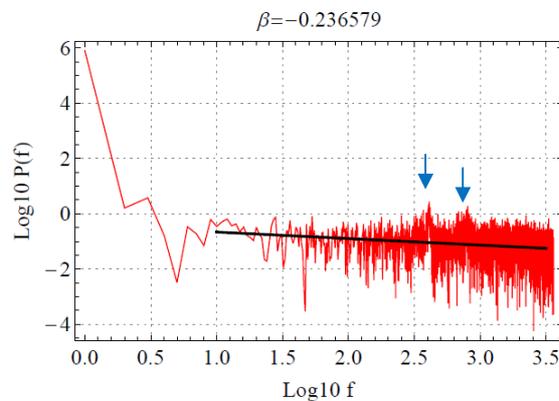


Figura 3.71. EM2C con β FM2C. Espectro de potencias de SM2C (EM2C) con su respectivo exponente espectral β FM2C = -0.236579.

En el espectro de potencias EM2C (Fig. 3.41) que se obtuvo de la serie SM2C se puede notar que el espectro sigue una ley de potencias casi perfecta y que globalmente se nota plano o como ruido blanco. Éste tiene un exponente espectral β FM2C = -0.236579 cuando se incluye casi todo el rango de frecuencias, y β FM2C = -0.5 cuando se ajusta al rango de las frecuencias más altas. Hay frecuencias dominantes muy pequeñas superpuestas sobre el comportamiento global del espectro, a $f_1=10^{2.6}=400$ y $f_2=10^{2.9}= 800$. Se trata entonces de un evento con un periodo de 18 imágenes y otro con un período de 9 imágenes

3.5.1.2. SSA

Para la realización de este análisis se eligió un múltiplo de la frecuencia dominante para obtener una ventana de resolución de $L = 10 \times 8 = 180$. En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores por varianza parcial DvpM2C (Fig. 3.72A), la función $\square(k)$ parece no seguir una obvia ley de potencias. El exponente varía entre -0.5 y -1.0, dependiendo de la región a la cual se hace el ajuste.

En el diagrama de ordenamiento de eigenvalores por frecuencia promedio DfrM2C (Fig. 3.72B) se realizó el ajuste con mas eigenvalores a frecuencias bajas y media obteniéndose de esa manera una pendiente de -0.201511.

En la figura 3.73 se observa la suma de los componentes reconstruidos $g[k]$ o la subserie TM2C de la serie SM2C. Se eligieron para este caso únicamente los componentes $g[2]$, $g[3]$, $g[4]$, $g[5]$, $g[6]$ y $g[7]$. Posteriormente se sumó TM2C con la tendencia $g[1]$ y se sobrepuso sobre SM2C (Fig. 4.74). Se observa que la subserie contiene también mucho ruido que no puede notarse una clara frecuencia de bombeo. Sin embargo, otra vez se observa una importante modulación de la subserie. Es posible que esta modulación contenga la información sobre la variabilidad de bombeo de la faringe de *C. elegans*.

En el espectro de potencias ETM2C (Fig. 3.75) que se obtuvo de TM2C se observa que se reproduce solamente los picos de las frecuencias dominantes en el espectro de potencias de la serie SM2C. Los componentes $g[2]$ y $g[3]$ son responsables para la frecuencia dominante f_1 . Los componentes $g[4]$, $g[5]$, $g[6]$ y $g[7]$ son responsables para la frecuencia dominante f_2 .

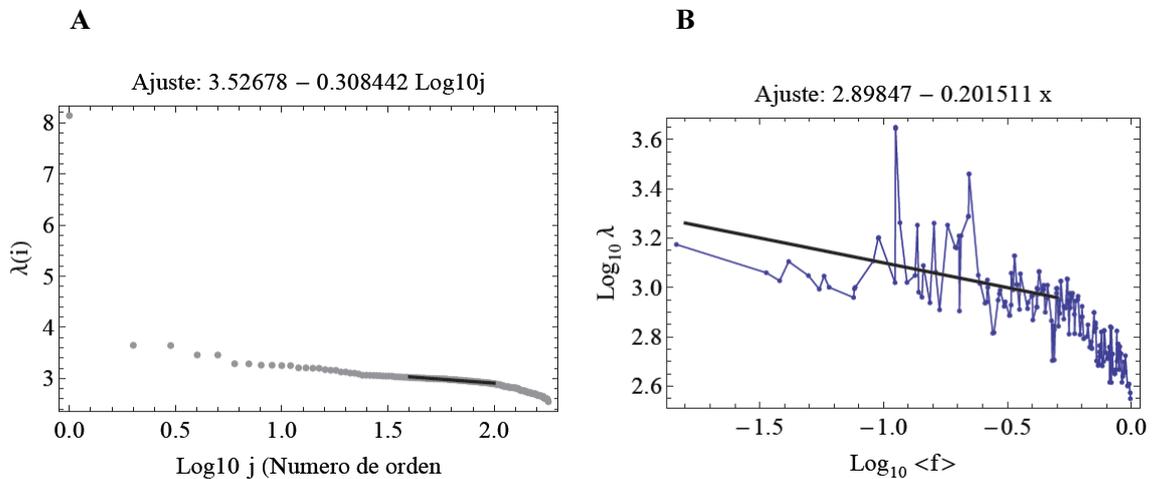


Figura 3.72. Diagramas de ordenamiento de eigenvalores de SM2C calculados con $L = 180$. **A)** DvpM2C. Por varianza parcial con pendiente -0.308442 . **B)** DfrM2C. Por frecuencia promedio con pendiente -0.201511 .

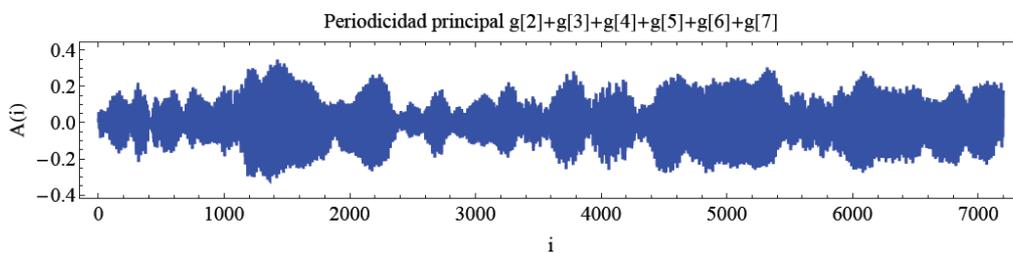


Figura 3.73. TM2C. Suma de los componentes que conforman el pico dominante en EM2C.

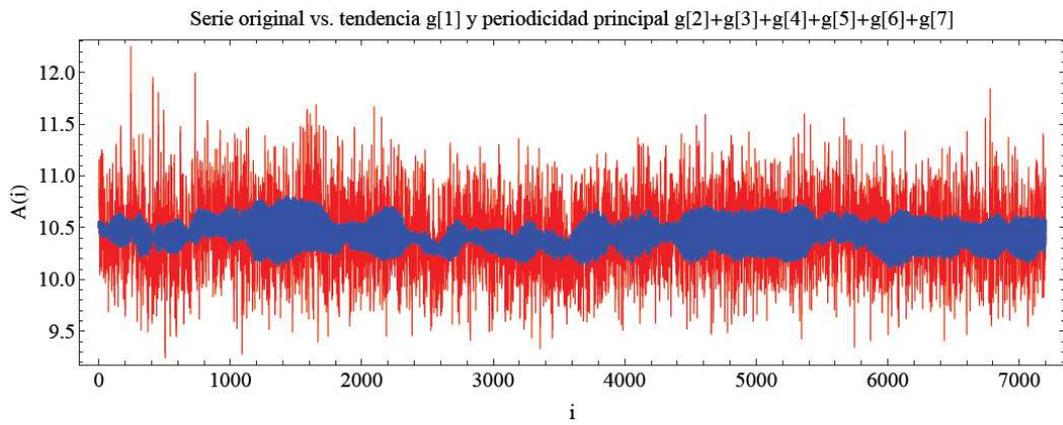


Figura 3.74. STtM2C. Superposición de la tendencia y de TM2C sobre SM2C.

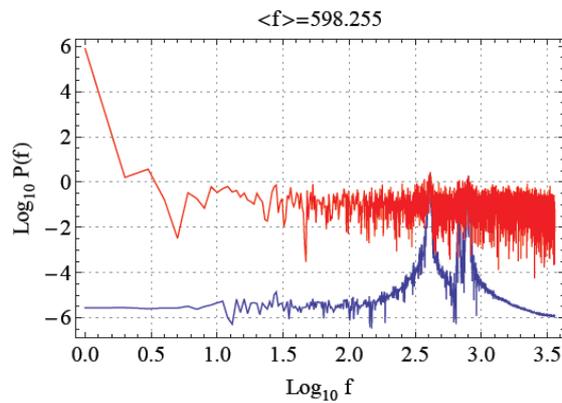


Figura 3.75. ETM2C. Espectro de Potencias de TM2C.

4. Discusión

Esta sección se divide en tres partes. En el apartado 4.1 se discute relatando la secuencia de problemas y las soluciones que se les dieron como una sucesión de eventos. En el apartado 4.2 se discuten en secciones por separado cada una de las especificaciones para la toma de video. Al final de cada una de estas secciones se proponen las especificaciones más adecuadas según la discusión. Finalmente, en el apartado 4.3 se propone una estandarización de las especificaciones metodológicas a seguir para la realización de experimentos subsiguientes.

4.1 Discusión general

Sería ideal realizar los experimentos en la cepa N2 (*wildtype*) ya que estos no tienen ningún tipo de modificación intrínseca en su sistema que pudiera afectar directa o indirectamente el ritmo faríngeo. Sin embargo debido a que los gusanos N2 se mueven excesivamente escapan del campo de visión del objetivo del microscopio para su grabación. Esto impide obtener un video en el que la faringe del gusano sea observable en todo momento. Dando solución a este problema se restringió el movimiento de estos gusanos en una cámara de microfluidos en la Universidad de Rockefeller, de lo que se obtuvo el VOR (tablas 2.1, 2.2, 2.3, 2.4. Fig. 2.1). Simultáneamente se fabricó un canal de restricción del movimiento de los gusanos en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para filmarlos (anexo 3). Sin embargo se observó que la faringe se contraía menos frecuentemente en los gusanos restringidos (Bendesky, 2010, comunicación interna). Suponemos que esto sucedió dado que al ser la cámara de microfluidos una cámara sellada, la cantidad de oxígeno disminuyó por debajo del requerimiento de oxígeno del gusano, haciendo que las contracciones fueran menos frecuentes. La hipoxia en *C. elegans* produce movimientos espasmódicos del cuerpo, muerte celular por necrosis y eventualmente la muerte del gusano (Samara *et al.*, 2008). Se analizó este video con el método 1 de PDSI y se obtuvieron VPM1R y SM1R.

Para poder realizar las grabaciones sin que el gusano saliera de la toma y sin que sufriera hipoxia se grabó a un gusano N2 que expresaba GFP en la faringe directamente de la caja de Petri (VOG, tabla 2.4, Fig.2.1) haciendo el campo de visión más amplio reduciendo el aumento de 40x, como se utilizó en VOR, a 20x. VOG se grabó con más resolución que VOR (tabla 2.4) ya que el nivel de detalle que requeríamos era mayor al estar la cámara más alejada de la preparación. Se analizó este video con el método 1 de PDSI y se obtuvieron VPM1G y SM1G (Fig. X.18) (ver VOR y VPM1R en DVD).

Al procesar VOG por el método 1 se encontraron dos problemas. El primero fue con respecto al PDSI y el segundo con respecto a la interpretación de las contracciones. El problema que se presentó al momento de procesar las imágenes fue que debido a la fluorescencia no se distinguen bien los contornos de las distintas estructuras (fig 4.1A y 4.1B). Lo que se aprecia en los videos de gusanos con fluorescencia es que el área que corresponde al bulbo terminal se separa por la mitad y se vuelve a unir (Fig. 4.1A y 4.1B). Además debido a que el objetivo del microscopio estaba muy alejado de la faringe del gusano, ésta estaba conformada por muy pocos pixeles (Fig. 4.1C).

El método 1 de PDSI que se aplicó en VOG fue un poco distinto ya que se posterizaron y se segmentaron las imágenes para poder delimitar claramente las dos distintas partes que se observan del bulbo terminal (Fig. 4.1D y 4.1E). Ya que se observaba una de esas dos partes más grande que la otra en todas las imágenes y que cuando éstas se unían formaban una sola partícula más grande que cualquiera de las dos por separado, se obtuvo una serie de tiempo midiendo el área en número de píxeles de la partícula más grande en cada imagen (Fig. 4.1D y 4.1E).

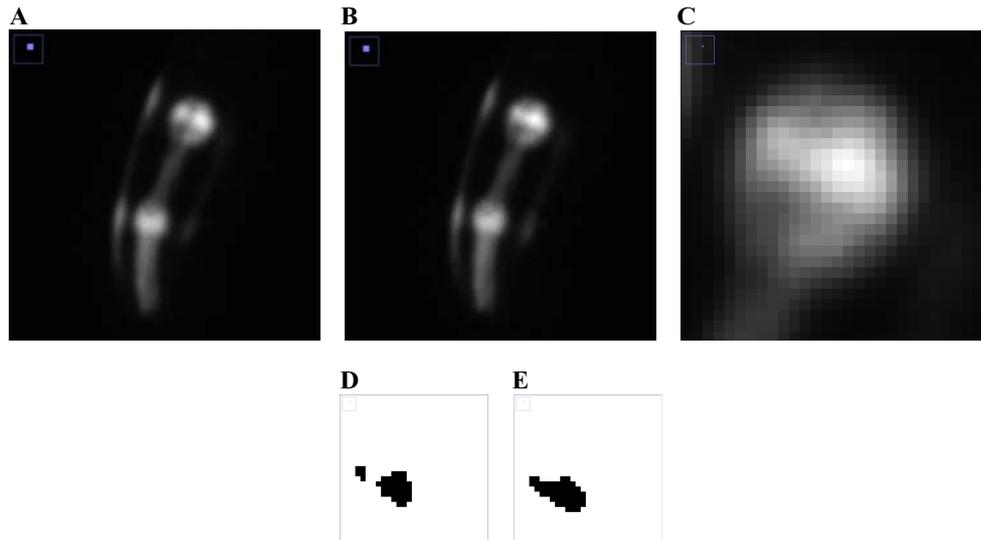


Figura 4.1. Problemática con la resolución de las imágenes del video del gusano fluorescente. **A)** Área del bulbo terminal separado en dos por la mitad. **B)** Área del bulbo terminal donde se observan unidas las dos partes que se notan separadas en A. **C)** Detalle de B, se observa que pocos píxeles conforman el bulbo terminal. **D)** Resultado del procesamiento digital de imágenes para A. **E)** Resultado del procesamiento digital de imágenes para B.

El problema que se presentó al momento de interpretar lo que se estaba observando en este video fue que no se podía decir en qué momento del video el triturador se encontraba en estado de relajación o de contracción. En parte esto se debió a que no sabíamos cuáles eran las estructuras de la faringe que estaban expresando GFP. En la figura 4.2 se presentan dos de los diferentes sistemas que conforman a la faringe, el glandular y el muscular, y como se observan esos dos sistemas con GFP. La figura 4.2F es una de las fotografías de uno de los videos de gusanos con fluorescencia obtenida por Andrés Bendesky.

En la figura 4.2A se observa el sistema glandular de la faringe y en la Figura 4.2B se observa este sistema cuando expresa GFP. Comparando estas dos imágenes con 4.2F se puede notar que la parte del bulbo terminal es parecida, no siendo así con el resto de la faringe.

En la figura 4.2C se observa el sistema muscular de la faringe. En la Figura 4.2D se observan varios músculos faríngeos (pm, pharyngeal muscle) expresando GFP, el pm1, en el corpus, y pm6 a pm8, estos últimos conformando en su totalidad al el bulbo terminal. La figura 4.2E es un acercamiento de la figura 4.2D donde es más visible el metacarpus. Haciendo una comparación con 4.2F se observa que en 4.2E hay más fluorescencia en el

metacarpus, como sucede en 4.2F. se puede observar también en 4.2F que hay mas fluorescencia en torno al sistema glandular del bulbo terminal como en 4.2B. En 4.2F se observa un patrón de expresión de GFP que incluye estos dos sistemas. Sin embargo también se puede observar que también se ve expresada GFP en la cutícula del gusano.

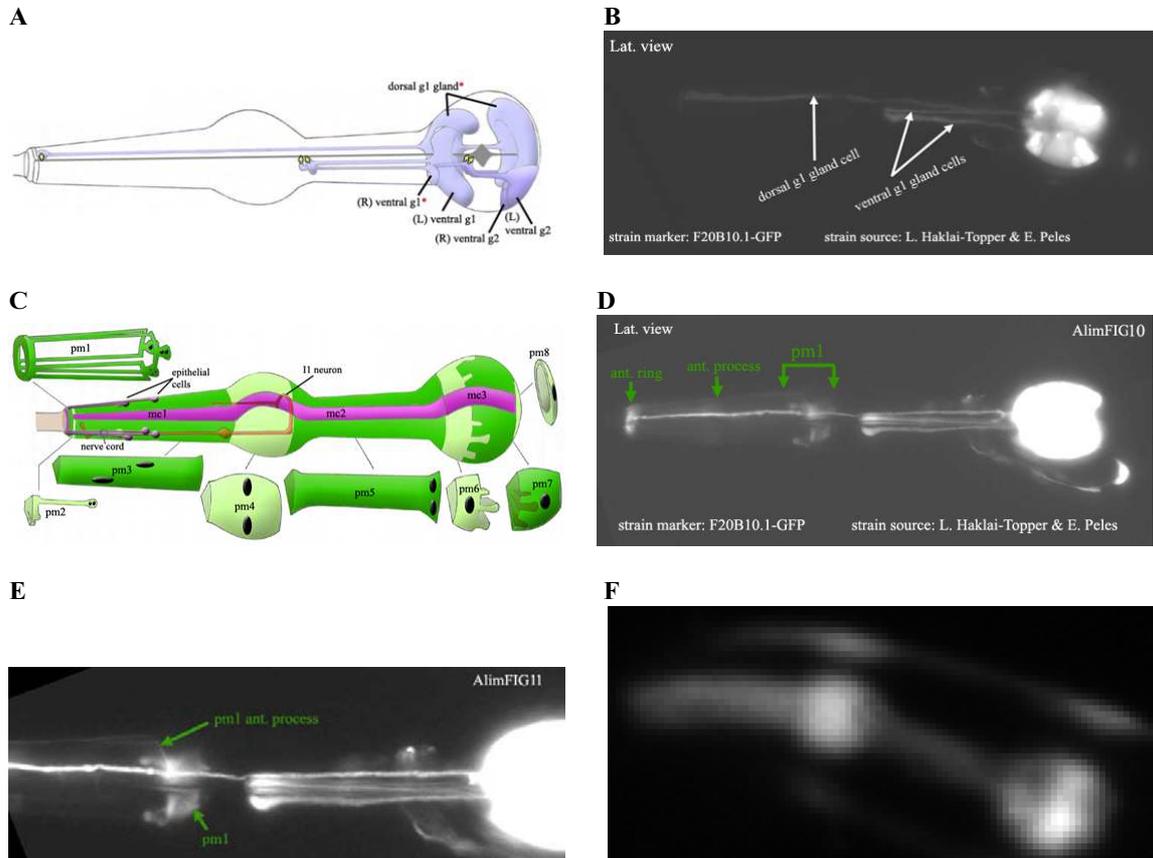


Figura 4.2. Esquemas y fotografías con fluorescencia de dos de los diferentes sistemas que conforman a la faringe: el muscular y el glandular. **A)** Esquema del sistema glandular de la faringe. **B)** Fotografía de un gusano expresando GFP en el sistema glandular de la faringe. **C)** Esquema del sistema muscular de la faringe. **D)** Fotografía de un gusano expresando GFP en el sistema muscular de la faringe. **E)** Acercamiento de D en donde es más visible la fluorescencia en el metacarpus. **F)** Fotografía de uno de los gusanos que expresan GFP en la faringe obtenida por Andrés Bendesky.

Concluimos que la expresión de GFP en el gusano del VOG no es muy específica y que la estructura que queremos estudiar no es muy visible. Aun cuando la GFP fuera muy específica para músculo no se podría ver la cavidad del triturador ya que esta cavidad está completamente rodeada por músculo, y si la GFP fuera específica para las glándulas, el problema de interpretación de las contracciones persistiría. Sin embargo sí se observa un movimiento en la parte del bulbo terminal en VOG.

La serie de tiempo que se obtuvo de este video por este método, SM1G (Fig. X.18), exhibe una tendencia pronunciada que suponemos se debe al movimiento del gusano libre, exclusivamente a la trayectoria en forma de u que describe ese gusano en VOG (ver VOG y

VPM1G en DVD). Para poder obtener la información del VOG para construir una serie de tiempo con menos variación en la tendencia (Fig. X.18) a través del método 1 se necesitaría que el video tuviera más nivel de detalle (Fig. 4.2F) y que las estructuras se observaran bien delimitadas. Otra manera de resolver este problema en la serie de tiempo sería empleando un método de análisis de series de tiempo para separar la tendencia de las fluctuaciones.

Para resolver el problema del movimiento de los gusanos y el problema de la interpretación del movimiento y la dificultad de obtención de las series de tiempo con el gusano que expresaba GFP se decidió trabajar con mutantes que tuvieran la locomoción del cuerpo reducida para poder grabarlos con luz visible y sin que salieran del campo de visión. Se decidió trabajar con mutantes *unc*. En el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM se propuso la utilización del mutante *unc-119* (ed3) y simultáneamente se propuso el mutante *unc-54* (e190) CB190 en la Universidad de Rockefeller. En la Universidad de Rockefeller se obtuvieron los videos VOH y VOC. En el Instituto de Física de la UNAM se obtuvo el video VOU (tabla 2.4).

Los mutantes *unc* presentan movimientos no coordinados (*uncoordinated*). Estos movimientos anormales, comparados con los gusanos *wildtype*, se observan como espasmódicos o pausados, bruscos con cese repentino y enroscamiento, además presentan encogimiento y expansión del cuerpo longitudinalmente sin avance del cuerpo y parálisis parcial intensa o sutil. El fenotipo *uncoordinated* es un fenotipo muy común entre distintos mutantes de *C. elegans* pero solo algunos mutantes en los que se aprecia este fenotipo están clasificados como mutantes *unc*. Esto se debe a que los genes involucrados para dar producto a dicho fenotipo son variados y pueden ser genes que se expresen en neuronas, músculos o incluso en otros tejidos que afectan estructuras requeridas para el movimiento coordinado, como por ejemplo en la cutícula en los mutantes Rol (WormAtlas, u-glossary, 2012).

Se aplicó el método 1 de PDSI al VOH. Lo que se puede observar en el VOH es que tiene muy poca resolución, por consiguiente es muy escaso el detalle de la faringe, es decir que muy pocos pixeles conforman la faringe. No se ve el triturador, solo se puede notar una parte más clara que cambia de intensidad de radiación intermitentemente a la altura del corpus. Por ello se segmentó y para la SM1H se midió el número de pixeles con mayor intensidad de radiación que aparece intermitentemente (ver VOH y VPM1H en DVD).

El VOC tiene demasiado ruido, es decir que todos los pixeles cambian de intensidad de radiación independientemente (ver VOH en DVD). Es común que exista mucho ruido en un video cuando este se graba con muy poca luz debido a que en tales condiciones se aumenta la sensibilidad de los sensores a la luz para poder obtener una imagen no tan oscura. El problema que esto conlleva es que se que no solamente se aumenta la sensibilidad del sensor sino que también se amplifica la señal obtenida por estos y los errores producidos por los ajustes de sensibilidad se amplifican también. Esta amplificación se le conoce como ganancia. Para eliminar el ruido se aplicó un filtro de desenfoque gaussiano (*gaussian blur*), sin embargo el detalle del triturador, que era muy pobre en VOC, en el video procesado se perdía, incluso también si el valor del filtro fue tan bajo como 0.5. En VOC lo que se observa es que a la altura del bulbo terminal cambian de intensidad de radiación algunos pixeles horizontales que se mueven de arriba abajo. El Método 1 no podía utilizarse para este caso (tabla 2.4).

El VOU es un video que no está un poco fuera de foco, además de que el triturador no pudo separarse del resto de la imagen debido a que las características en cuanto a intensidad

de radiación, tamaño y bordes eran bastante homogéneos en toda la imagen (ver VOU en DVD), lo que dificulta el reconocimiento de estructuras y de sus límites. Por ello, el Método 1 no podía utilizarse tampoco para este caso (tabla 2.4).

El método 1 de PDSI se basa en el conteo de número de píxeles que conforman una estructura en una imagen segmentada. Debido a esto no se pudo aplicar en todos los videos ya que en algunos la región del triturador no está conformada por un área que aumenta o disminuye en número de píxeles en la relajación y contracción respectivamente.

Para resolver estos problemas sobre el PDSI se realizó un segundo método de procesamiento con el que se pudieran medir las contracciones en todos los tipos de video y que las series de tiempo fueran claras.

Para la realización del método 2 se tomó en consideración que el factor común de todos los videos es que las imágenes consecutivas cambian y que las contracciones son más rápidas que cualquier otro movimiento del gusano en la imagen y que este cambio en el movimiento del triturador se puede observar en imágenes consecutivas. Además, se supone que los cambios rápidos en la faringe son consistentes para todos los píxeles que componen la faringe, así que sumando las diferencias produce un efecto grande, mientras que los cambios en el fondo por el ruido son aleatorios y se cancelan.

Es por eso que se decidió medir la diferencia entre imágenes consecutivas. Lo que hace este método es eliminar las partes de las imágenes consecutivas que no cambian o que cambian aleatoriamente, eliminando así movimientos muy lentos que no sean perceptibles de una imagen a la subsiguiente. Debido a lo anterior a través de este método se pudieron obtener series de tiempo de todos los videos sin importar sus diferentes características.

Una vez obtenidas las series de tiempo se prosiguió al análisis de las mismas. Se comenzó con el FFT, con el que no fue posible extraer las frecuencias que corresponden a las contracciones de la faringe. Ya que nuestro objetivo es medir el cambio de la complejidad en las contracciones del triturador se decidió adoptar otro método de análisis de series de tiempo. Se utilizó el método SSA para resolver esta problemática (ver sección 4.2.4).

Por otro lado para la obtención de los videos se tiene que tomar en cuenta que existen varios factores que hacen que el ritmo faríngeo varíe. El comportamiento en *C. elegans* refleja la actividad del sistema nervioso y es dependiente de factores múltiples incluyendo estímulos externos, experiencia, estructura neuronal y cambios en el medio interno de los animales. El comportamiento de *C. elegans* puede ser afectado dramáticamente por pequeños cambios o variaciones en condiciones del cultivo o del experimento. *C. elegans* se crece generalmente en una capa de cultivo de *E. coli* OP50 sobre agar NGM, si se cambia el tamaño de la capa de cultivo de *E. coli*, el tipo de bacteria, el agar o los compuestos en el NGM, el comportamiento puede ser modificado. Las condiciones ambientales en la cuales se llevan a cabo los experimentos tales como humedad, temperatura, vibración y corrientes de aire también pueden cambiar el comportamiento de *C. elegans*. También el género y la edad son factores importantes en el comportamiento del gusano (Hart, 2006).

El comportamiento alimentario de *C. elegans*, es decir su ritmo faríngeo, puede ser afectado por razones varias como la cantidad de alimento presente, el estado nutricional del gusano y por neurotransmisores como la serotonina (Avery y You, 2012). Por ejemplo, cuando hay alimento presente causa bombeo rápido y en la ausencia de comida el bombeo es normalmente lento (Avery y Horvitz, 1989). Esto se debe a que en su ambiente natural,

C. elegans habita cerca de materia orgánica en descomposición donde es expuesto a un entorno de agua y aire con rápidas y substanciales fluctuaciones locales de gases como O₂ (0-21%) y CO₂ (Altun, 2011) debido al consumo de oxígeno por actividad metabólica de bacterias descomponedoras (Bargman, 2006). El oxígeno disponible en el ambiente entonces debe ser percibido por el gusano como un indicador de presencia de comida (Bargman, 2006). Es decir que la cantidad de oxígeno también modifica el ritmo faríngeo del gusano, sin embargo no se conocen los mecanismos por los cuales cambios crónicos o finos de la concentración de O₂ modifican el comportamiento en *C. elegans* (Cheung et al., 2005). No obstante se ha descubierto que *C. elegans* tiene una fuerte preferencia por niveles intermedios de oxígeno molecular de entre 7% y 14% con una concentración preferente del 8% y evade concentraciones tanto altas (>12%) como bajas (<4%) en gradientes lineales de oxígeno, sin embargo esta respuesta puede ser modificada por el ambiente y por la experiencia (Altun, 2011; Bargman, 2006).

Otros experimentos han revelado que tocar los gusanos con un cabello detrás de la faringe para medir la respuesta al contacto en la parte anterior del gusano hace que el ritmo faríngeo disminuya (Hart, 2006) y tocar al gusano en la parte posterior inhibe el bombeo faríngeo (Keane y Avery, 2003). Además la faringe de los gusanos que se han saciado de comer deja de bombear, a esto se le llama quiescencia en la saciedad (*satiety quiescence*) (You et al, 2008).

Es por esto que se tienen que establecer especificaciones metodológicas tanto para el montaje como para el cultivo del nematodo.

4.2 Discusión sobre especificaciones y características

En esta sección se discuten en secciones por separado cada una de las especificaciones para la obtención de resultados. En la sección 4.2.1 se discuten las características de los gusanos a utilizar. En la sección 4.2.2 se discuten las características de los videos. En la sección 4.2.3 se discuten los métodos de PDSI. Y finalmente en la sección 4.2.4 se discuten los métodos de análisis de series de tiempo. Al final de cada una de estas secciones se proponen las especificaciones más adecuadas según la discusión.

4.2.1 Especificaciones de los gusanos

▪ Cepa

unc-119 codifica una proteína de 27 kDa que se encuentra altamente conservada entre metazoarios. En *C. elegans* la actividad de *unc-119* es requerida para el correcto crecimiento del sistema nervioso durante el desarrollo, incluyendo la ramificación y fasciculación axonal, y para estabilizar la arquitectura diferenciada del sistema nervioso en adultos, mediando de esta manera la locomoción normal, quimiosensibilidad y alimentación. Los mutantes *unc-119* además de presentar afectaciones en locomoción, quimiosensibilidad y comportamiento alimenticio, también presentan ramificaciones supernumerarias de las comisuras de motoneuronas, fibras nerviosas defasciculadas, errores en *choice points* e inhabilidad de formar larva dauer (Zhang et al., 2011; Materi y Pilgrim, 2005).

unc-119 en *C. elegans* se expresa pan-neuronalmente empezando desde el embrión (~60 células) y continúa expresándose hasta la etapa adulta. Se ha

reportado que UNC119 funciona como un activador asociado a un receptor en la transducción de señales, por ello UNC119 podría ser parte de la transducción de señales que medía la formación de patrones axonales como respuesta a estímulos externos en el desarrollo (WormBase, WBGene00006843, 2012). UNC119 se localiza en el soma y axones y actúa autónomamente en cada célula para inhibir la formación de ramificaciones axonales y mantener la arquitectura de la estructura axonal después de que la migración del cono se finaliza (Knobel et al., 2001).

ed3 es un alelo del gen *unc-119*. Se encuentra una sustitución de una citosina (C) por una timina (T) en el alelo modificado (*ed3*) comparado con el alelo original (*ed3 wildtype*) en un exón (WormBase, WBVar00145093, 2012). Los mutantes *unc-119 (ed3)* exhiben el fenotipo *locomotion reduced*. Los nematodos con este fenotipo se caracterizan por presentar un decremento en todos los parámetros utilizados para medir la locomoción en comparación con nematodos controles (WormBase, WBPhenotype, 2012).

Cuatro tipos de genes en *C. elegans* codifican isoformas de miosina de cadena pesada (MHC por sus siglas en inglés) específicas de músculo: *myo-1*, *myo-2*, *unc-54* y *myo-3*. *myo-1* y *myo-2* se expresan exclusivamente en los músculos de la faringe, que son utilizados por el nematodo para alimentarse. *unc-54* y *myo-3* se expresan en todas las células musculares que no pertenecen a la faringe y que se utilizan para la locomoción, ovoposición (en hermafrodita), defecación y reproducción (en macho). De los cuatro genes que codifican para MHC, *unc-54* es el que se expresa más abundantemente (Okkema et al., 1993; WormBase, WBGene00006789, 2012). *unc-54 (e190)* es un mutante nulo que produce adultos viables pero paralizados en los que MHC no es detectada (Ao y Pilgrim, 2000). En el laboratorio del Instituto de Fisiología Celular se propuso el mutante *unc-119 (ed3)* debido a que estos exhiben el fenotipo *locomotion reduced*, que era lo que se necesitaba para que los gusanos no salieran del cuadro de visión del microscopio. Se realizaron fotografías cada 30 segundos de distintos individuos adultos de *unc-119 (ed3)* en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para verificar que estos no salieran de la toma (anexo 4).

Sin embargo, debido a que el funcionamiento adecuado de UNC119 en *C. elegans* es necesario para el correcto crecimiento del sistema nervioso durante el desarrollo, su expresión pan-neuronal, el hecho de que el funcionamiento de los músculos de la faringe está controlado por neuronas, que los mutantes presentan alteraciones en la alimentación y debido a que *unc-54* no se expresa en los músculos de la faringe pero sí afecta la movilidad del resto del cuerpo, se concluye que el mutante que se acopla más a los requerimientos del experimento es el mutante *unc-54 ed190 CB190* ya que los gusanos no se salen de la toma y al mismo tiempo su actividad faríngea no está afectada.

▪ Género

Existen dos géneros de *C. elegans*, hermafrodita que se autofecunda (XX) y macho (XO). La frecuencia de nacimiento de los machos por la no disociación espontánea de la línea germinal en hermafroditas *wildtype* de *C. elegans* se presenta a una frecuencia del 0.1%, alrededor de 1 en 500 (Hodgkin et al., 1979) y a una frecuencia

de hasta un 50% a través de apareamiento (Altun y Hall, 2012). Al ser una proporción muy pequeña de la población, los machos se utilizan en el laboratorio exclusivamente para la valoración de comportamientos específicos del macho (Hart, 2006). Probablemente si exista una diferencia en la frecuencia de bombeo entre machos y hermafroditas, pero es más conveniente estadísticamente enfocarse a la población mayoritaria más que a la minoritaria para obtener resultados globales. Además se puede observar que los machos tienden a desplazarse más rápido que los hermafroditas (Salinas, comunicación interna), lo que representaría un problema a la hora de tomar los videos.

▪ Estadio de vida

El objetivo de este estudio es registrar el cambio en la complejidad de las series de tiempo obtenidas de las contracciones de la faringe de *C. elegans*. La Figura 4.3 representa el cambio de frecuencia de las contracciones de la faringe de *C. elegans* a través de su vida iniciando a partir de L4. En la tabla 4.1 se observa que *C. elegans* tiene diferentes tiempos de desarrollo a diferentes temperaturas. La temperatura a la que se maneja regularmente a *C. elegans* en los protocolos de laboratorio es de 20°C, además la temperatura que se utilizó para cultivar a los gusanos en Huang et al. 2004 fue de 20°C. Se necesitan las series de tiempo de varios individuos de *C. elegans* en diferentes estadios de vida para poder modelar la frecuencia faríngea en cada etapa.

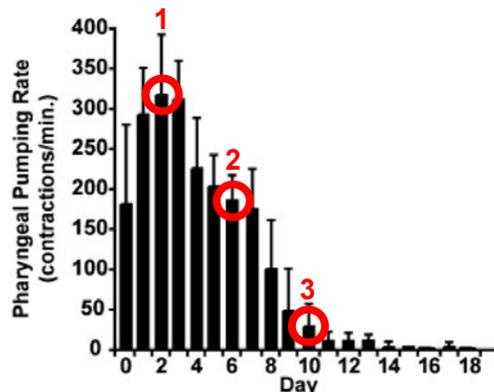


Figura 4.3. Cambio en la frecuencia de bombeo de la faringe de *C. elegans* con su edad. Las barras verticales representan el número promedio de contracciones por minuto con su respectiva desviación estándar. Se proponen tres puntos definidos en el cambio de la frecuencia faríngea para la toma de datos. Imagen tomada de Huang *et al* , 2004.

De acuerdo con la Figura 4.3 proponemos que la toma de video se realice primeramente en tres puntos definidos en el cambio de la frecuencia faríngea: a las 96 horas de vida, que coincide con la etapa de reproducción máxima (Fig. 4.3 número 1), a las 192 horas de vida (Fig. 4.3 número 2) y a las 288 horas de vida (Fig. 4.3 número 3) cada video en individuos distintos. Además no se ha registrado un cambio en el horario de desarrollo a 20°C de *unc-119(ed3)* y *unc-54 (e190)* CB190 con respecto del de N2.

Los gusanos que se grabaron en la Universidad de Rockefeller se cultivaron a una temperatura de 22°C, lo que hace que la lectura de la edad del gusano en el histograma de la figura 1.9 se mueva un poco (de entre 4 a 10 horas según el estadio de vida), es decir que los gusanos maduran más rápidamente a mayor temperatura como se observa en la tabla 4.1.

DEVELOPMENT AT DIFFERENT TEMPERATURES			
	"16°C" (16.0± 0.3°C)	"20°C" (19.5± 0.5°C)	"25°C" (25.0± 0.2°C)
Egg laid	0 hr	0 hr	0 hr
Egg hatches	16-18 hr	10-12 hr	8-9 hr
First-molt lethargus	36.5 hr	26 hr	18.0 hr
Second-molt lethargus	48 hr	34.5 hr	25.5 hr
Third-molt lethargus	60.0 hr	43.5 hr	31 hr
Fourth-molt lethargus	75 hr	56 hr	39 hr
Egg-laying begins	-90 hr	-65 hr	-47 hr
Egg-laying maximal	-140 hr	-96 hr	-62 hr
Egg-laying ends	-180 hr	-128 hr	-88 hr
Length at first molt	360 µm	370 µm	380 µm
Length at second molt	490 µm	480 µm	510 µm
Length at third molt	650 µm	640 µm	620 µm
Length at fourth molt	900 µm	850 µm	940 µm
Length at egg- laying onset	1150 µm	1060 µm	1110 µm
Maximal egg- laying rate	5.4/hr	9.1/hr	8.1/hr
Total eggs laid	275	280	170

Tabla 4.1. Desarrollo de *C. elegans* a diferentes temperaturas de cultivo. Imagen tomada de Worm Atlas.

4.2.2 Especificaciones de cada video

Para un PDSI óptimo y para la obtención de una serie de tiempo más precisa proponemos y argumentamos a continuación los motivos de las características requeridas en los videos.

Resolución de cada imagen

La resolución se refiere a la cantidad de píxeles en la imagen. Normalmente se le llama también tamaño de imagen ya que se representa multiplicando el alto por el ancho en número de píxeles (p. ej. 256 x 158 = 40448 píxeles). Mientras más píxeles tenga una imagen y mientras estos sean de menor tamaño, la imagen se verá más nítida ya que el nivel de detalle será mayor.

Para la obtención de las series de tiempo necesitamos observar las contracciones de la faringe de *C. elegans*. Sin embargo no necesitamos observar toda la faringe, sino solamente el triturador ya que es esta parte de la faringe en donde las contracciones se observan más claramente. El triturador dentro de la imagen es solamente un pequeño segmento de la misma (Fig. 4.4 A).

Para el método 1 se realizaron las series de tiempo calculando el área del triturador en cada imagen. Al no tener tanta resolución estas imágenes, hay un margen de error entre el tamaño del área del triturador en las imágenes segmentadas comparada con el área del triturador en las imágenes originales (Fig. 4.4 B y C) que se traduce en la serie de tiempo como fluctuaciones pequeñas en número de píxeles que conforman el triturador.

Proponemos una resolución de 512 x 512 para tener más píxeles por unidad de área en la imagen y poder obtener datos con menor margen de error.

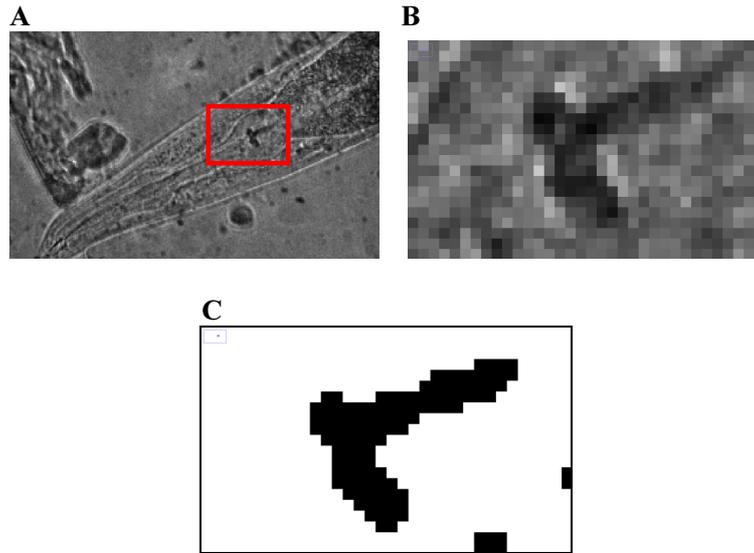


Figura 4.4. Imágenes del triturador de *C. elegans*. **A)** Imagen original a un aumento de 40X y una resolución espacial de 256 x 218 píxeles. **B)** Detalle del triturador en A. Observar que el triturador se conforma de pocos píxeles, además no se nota un contorno definido. **C)** Imagen segmentada de B. Observar que existe un margen de error entre la cantidad de píxeles que conforman al triturador en B de los que lo conforman en C.

Cuadros por Segundo

Los videos que se obtuvieron de la Universidad de Rockefeller se tomaron con un máximo de 50 fps, como es el caso de VOR. En la figura 4.5 se puede observar SM1R (Fig. 4.5A) y un detalle de la misma (Fig. 4.5B). En la figura 4.5 B se puede observar que cada contracción se conforma de varios puntos, es decir que cada evento de contracción dura unas cuantas imágenes formando en cada contracción un pico con cierta anchura. Debido a que estas contracciones no suceden uniformemente, se podrían estudiar también los intervalos entre bombeos sucesivos similar a los intervalos RR en un electrocardiograma de humano (Fig. 1.2.A).

Ya que para cumplir nuestro objetivo necesitamos comprender el movimiento de contracción, mientras más imágenes se obtengan de cada evento de contracción más información se podrá obtener del fenómeno y mejor se entenderá el cambio en la complejidad de estas series de tiempo.

En el histograma de la figura 4.3 se observa que el bombeo maximal es aproximadamente de 360 contracciones por minuto, es decir 60 contracciones por segundo. Si se quiere que cada pico de contracción este compuesto por varios

puntos de datos, se necesitarían videos con mas cuadros por segundo En el caso de un gusano con edad de máxima frecuencia de bombeo se necesitaría un video de 3600 cuadros por segundo aproximadamente. Para gusanos de mayor edad, la frecuencia máxima de bombeo será menor y se necesitarían menos cuadros por segundo. De esta manera podríamos observar mas a detalle las contracciones y de esta manera se podrían estudiar y comparar otros fenómenos en la serie de tiempo, justo como se estudian las arritmias en un ECG.

De esta manera se puede ajustar el *frame rate* entre 60 y 3600 fps a partir del ritmo maximal de contracciones que se espera dependiendo de la edad del gusano según la figura 4.3. También se puede ajustar el *frame rate* dependiendo de lo que se busca sin perder de vista cuál será el resultado.

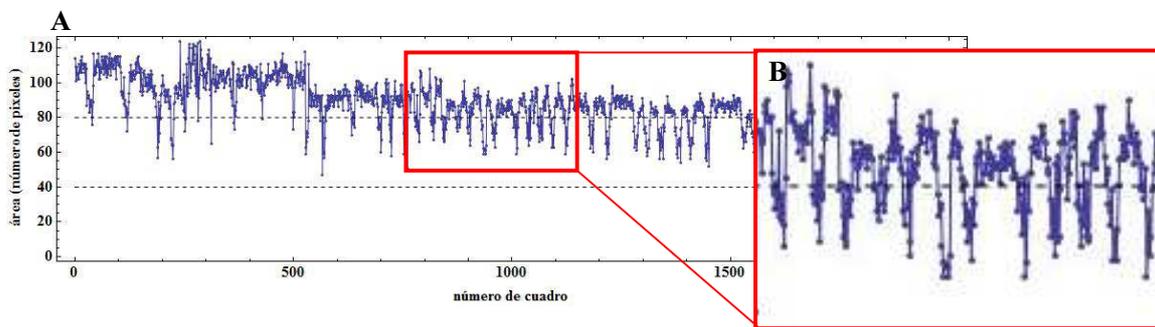


Figura 4.5. Serie de tiempo obtenida con el área del triturador. **A)** Serie de tiempo completa. **B)** Detalle de la serie de tiempo. Se observa que los eventos de contracción son periódicos y cada evento de contracción esta compuesto por varios puntos de datos.

Tipo de cámara

STANDARD MODE	
RESOLUTION	RATE
800 x 600	6,688
640 x 480	10,101
320 x 240	33,057
512 x 512	11,527
512 x 384	15,151
512 x 256	21,978
512 x 128	40,000
512 x 64	67,796
256 x 512	20,000
256 x 256	36,697
256 x 128	63,492
256 x 64	100,000
128 x 128	88,888
128 x 64	129,032
64 x 64	148,148
32 x 32	190,476

Tabla 4.2. Cambio en la resolución dependiendo del número de imágenes por segundo o frame rate de la cámara Phantom v7.3. Tabla tomada de la hoja de información de la cámara en http://www.visionresearch.com/uploads/Docs/Products/DS_v73.pdf.

Frame Rates (Standard Mode) ^{*6}

Binning	Array size						
	512 x 512	256 x 256	128 x 128	64 x 64	512 x 100	512 x 32	512 x 1
1 x 1	35	68	132	251	168	456	2128
2 x 2	68	132	248	452	313	757	-
4 x 4	131	246	439	735	549	1111	-
8 x 8	231	426	699	1031	833	1351	-

Tabla 4.3. Cambio en la resolución y frame rate dependiendo del número de la ventana con la que se realiza el *binning* de la cámara iXon3 897. Tabla tomada de la hoja de información de la cámara en http://www.andor.com/pdfs/specifications/Andor_iXon_897_Specifications.pdf

En la sección 2.1.2 se introdujo la problemática entre el *frame rate* y la resolución. En la tabla 4.2 se puede observar que la cámara Phantom v7.3 soporta un *frame rate* alto (6,688fps) con buena resolución (800 x 600 pixeles). Por otro lado en la tabla 4.3 se observa que la cámara iXon3 897 soporta una buena resolución (512 x 512) pero que al ir aumentando el *frame rate*, el *binning* es mayor. El *binning* es una técnica que consiste en colocar el contenido de varios pixels en un solo pixel de la imagen final. Es decir que con un *binning* de ventana 8 x 8 se coloca la información de 64 pixeles en uno sólo promediando o sumando los valores. Con esto la imagen pierde resolución o número de pixeles. Esta pérdida de resolución conlleva a una pérdida en el nivel de detalle de las formas y estructuras en la imagen. Esta técnica se realiza ya que comprime las imágenes haciéndolas más ligeras y por lo tanto el almacenamiento de las mismas es más rápido permitiendo tener un *frame rate* mayor, pero con imágenes con menor detalle.

Es por esto que se recomienda utilizar una cámara de alta velocidad que no utilice *binning* y en la que la resolución siga siendo alta a los *frame rates* necesarios dependiendo de la edad del gusano.

Duración en tiempo real

Consideramos que para la comprensión global del fenómeno y para la obtención de series de tiempo que nos permitan obtener una frecuencia promedio de contracción con menor margen de error necesitaremos que la duración en tiempo real de los videos sea mayor. Es importante obtener la variabilidad del ritmo, y para ello se necesita una serie de intervalos entre contracciones diferentes. Se necesita una serie de 1000 datos como mínimo para realizar un análisis Fourier y para obtener un EP representativo. Es por lo anterior que se necesitan videos de aproximadamente 15 minutos.

Bits por pixel

Antes de procesar las imágenes se convirtieron todas a 8bpp (bits por pixel). 16 bpp hacen que la imagen ocupe más espacio en memoria y requieren más capacidad de procesamiento de la computadora, por lo que es más tardada la obtención de los resultados. Con 8 bpp es suficiente para el análisis de las imágenes.

Formato

Los videos que se obtuvieron están en formato TIFF (*Tag Image File Format*). Este tipo de formato genera imágenes no comprimidas, es decir que pesan más pero tienen mayor calidad. Existen modalidades de TIFF con compresión, pero utilizan algoritmos de compresión con los que no se pierde información o calidad de la imagen si la compresión no es tan grande.

Otros algoritmos más sofisticados de compresión como JPG permiten tamaños de archivo realmente reducidos que eliminan información de la imagen. Debido a esto cada vez que se guarda una copia, ésta sufre un proceso de transformación/reducción. Es por esto que proponemos que los videos obtenidos sean formato TIFF.

Aumento

Se obtuvieron fotografías con diferentes aumentos (Fig. 4.6). Debido a que solamente se necesita visualizar la faringe del gusano para obtener nuestros resultados, un aumento de 40x directo a la faringe es una buena estrategia de obtención de los videos.

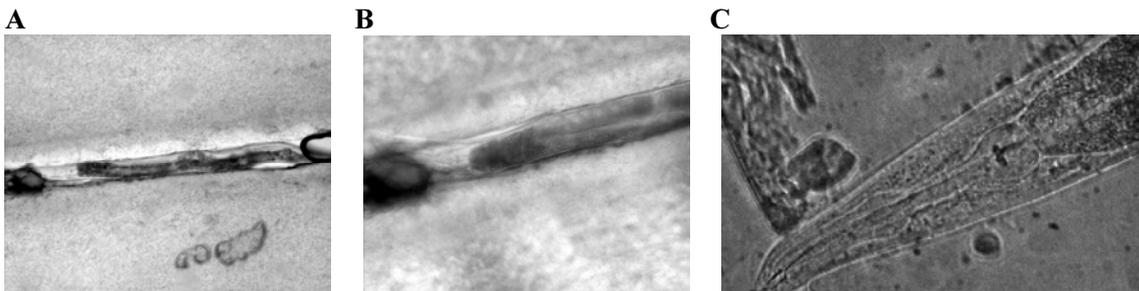


Figura 4.6 Tres fotografías a diferentes aumentos de adulto de *C. elegans*. **A)** Aumento a 10X, tomada en el laboratorio de la Dra. Rosa Navarro en el IFC. **B)** Aumento a 20X, tomada en el laboratorio de la Dra. Rosa Navarro en el IFC. **C)** Aumento a 40x, tomada en Howard Hughes Medical Institute, Laboratory of Neural Circuits and Behaviour, Rockefeller University.

¿Cuántos videos?

Se necesita obtener una muestra representativa de series de tiempo para lograr una estadística fidedigna del fenómeno en la población. Proponemos que para cada punto se obtengan 100 videos por cada una de las tres etapas de vida marcadas en el histograma de la figura 4.7.

4.2.3 Series de tiempo

N2 restringido en la cámara de microfluidos

En la serie de tiempo SM1R (Fig. 3.3) se observa que cada una de las contracciones se encuentra marcada por picos que indican una disminución del número de pixeles que ocupa el triturador en la imagen. Se puede observar en un detalle de esta serie de tiempo (Fig. 4.7.A) que cada pico está conformado por varios valores y que son aproximadamente periódicos. En la serie de tiempo SM2R

(Fig. 3.10.A) así como en el detalle de la misma serie (Fig. 3.10.B) se puede observar que cada contracción es un evento compuesto por dos picos. Esto puede revelar que las contracciones del triturador se llevan a cabo en dos fases. En la primera fase de contracción (en el pico pequeño) se observa un aclaramiento de las imágenes del video en la región que comprende todo el bulbo terminal. Esto podría deberse a la ocurrencia de la última fase de la peristalsis de la faringe que pasa las bacterias al triturador y la segunda fase, que conforma al pico grande, puede indicar solamente cuando el triturador se contrae triturando las bacterias.

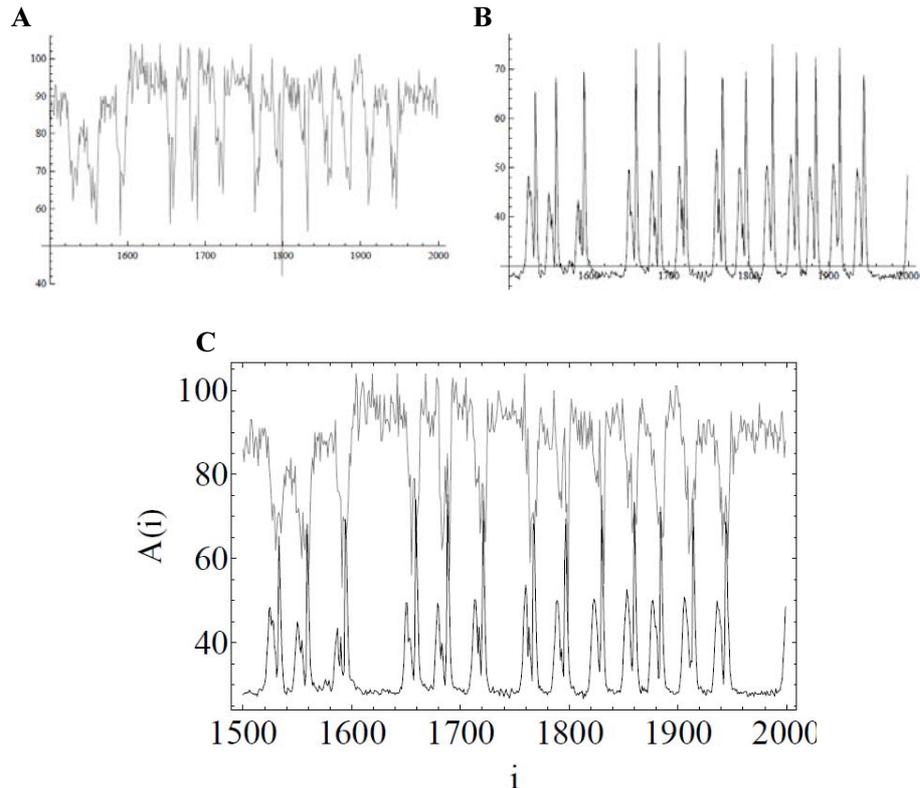


Figura 4.7 Comparación de las series de tiempo obtenidas por ambos métodos de PDSI del gusano restringido en la cámara de microfluidos. **A)** Segmento de la serie de tiempo obtenida a través del método 1. **B)** Segmento de la serie de tiempo obtenida a través del método 2. **C)** Superposición de A y B.

También puede observarse en SM2R que la intensidad de las contracciones, y por lo tanto la intensidad de radiación con la que se perciben, va aumentando conforme avanza el video, lo que no se observa en SM1R. El aumento de intensidad de radiación puede ser debido a que para el VPM2R se utilizó una ventana en la que se puede observar el bulbo terminal del gusano a través del todo el video. Sin embargo al moverse el gusano durante el video se puede observar una mayor superficie del istmo de la faringe, la que también se ilumina, pero más tenuemente, la contraerse el triturador. Esto hace que el promedio de intensidad de radiación de las imágenes en las que se observa una mayor región del istmo sea más alto, es decir que tienen una mayor intensidad de radiación. Se pueden observar también con el segundo método

de PDSI más claramente los eventos de contracción y relajación eliminando al mismo tiempo ruido y tendencia.

Para hallar si es que ambas series de tiempo indican los eventos de contracción que se advierten en el video, se obtuvieron detalles de ambas series de tiempo en el mismo intervalo imágenes (Fig. 4.7.A y B) y se superpusieron (Fig. 4.7.C). Se puede observar que los eventos de contracción coinciden en ambas series a pesar de las diferencias en ambos métodos de PDSI. Esto apunta a que ambos métodos de PDSI identifican adecuadamente los eventos de contracción y relajación.

N2 expresando GFP

Se obtuvieron series de tiempo con ambos métodos de PDSI y pesar de que pareciera que en SM1G no son muy claros los picos de contracción, para ambas series de tiempo se encontraron en sus respectivos EP obtenidos con FFT que ambas series de tiempo poseen las mismas frecuencias dominantes, una en 2.2 y la otra en 2.5.

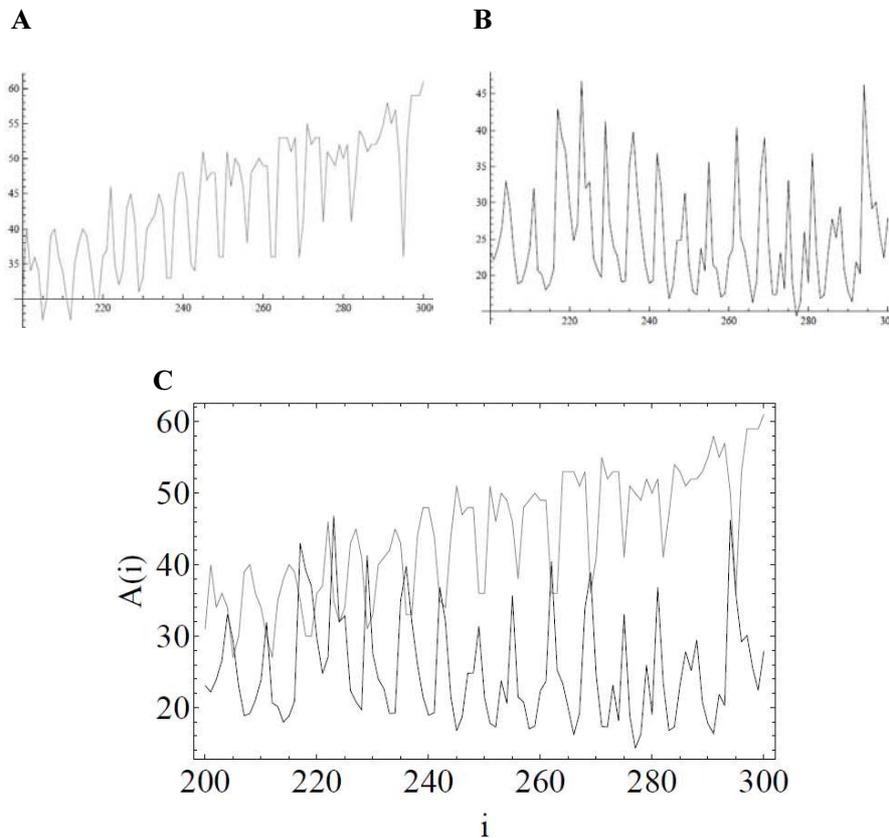


Figura 4.8 Comparación de las series de tiempo obtenidas por ambos métodos de PDSI del gusano que expresa GFP en la faringe. **A)** Segmento de la serie de tiempo obtenida a través del método 1. **B)** Segmento de la serie de tiempo obtenida a través del método 2. **C)** Superposición de A y B.

Se obtuvieron detalles de cada serie de tiempo (Fig. 4.8 A y B) en el mismo intervalo de imágenes y se superpusieron para su comparación (Fig. 4.8.C). Se puede ver que los picos de cada serie coinciden, sugiriendo así que a pesar de que

las series de tiempo no son muy claras, las contracciones sí son identificadas. De esta manera los resultados de ambos métodos se confirman mutuamente.

unc-119 (ed3) grabado en el Instituto de Física de la UNAM

Para este caso no fue posible aplicar el método 1 de PDSI debido a que este método se basa en el aumento y disminución del área que ocupa el triturador en la imagen. El video VOU no presenta tales características en el área que ocupa el triturador sino que se observa una estructura con las mismas características que el resto de la imagen en cuanto a intensidad de radiación (ver VOU en DVD). Es por lo anterior que no fue posible separarlo del resto de la imagen para aplicar el método.

Sin embargo al aplicar el método 2 de PDSI se obtuvo SM2U (Fig. 3.40) donde se observan los picos que indican la contracción del triturador. Aunque en SM2U se pueden apreciar claramente las contracciones, la serie no es lo suficientemente larga como para realizar representativamente los análisis de FFT y SSA. No obstante, con SSA se pudo obtener una descripción cercana a los picos de contracción con los componentes reconstruidos (Fig. 3.44).

unc-54 (e190) CB190 con posición Horizontal

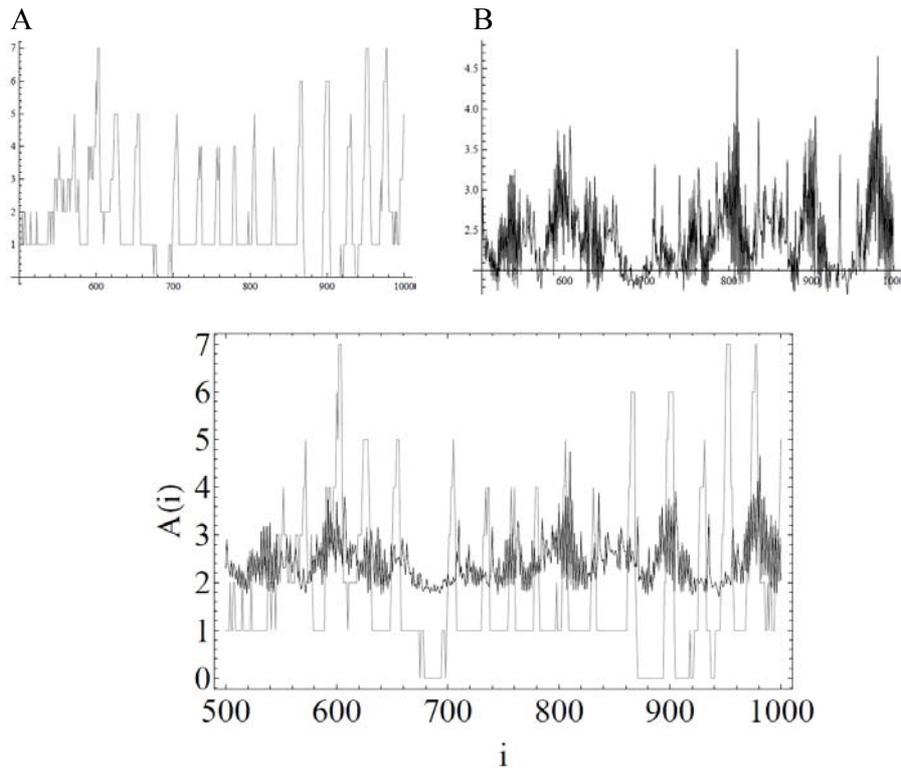


Figura 4.9 Comparación de las series de tiempo obtenidas por ambos métodos de PDSI del gusano unc-54 ed190 CB190 en posición horizontal. **A)** Segmento de la serie de tiempo obtenida a través del método 1. **B)** Segmento de la serie de tiempo obtenida a través del método 2. **C)** Superposición de A y B.

Al tener poco detalle, pocos pixeles formaban la faringe cuando se aplicó el método 1 de PDSI y en consecuencia de ello un cambio en un pixel representa un cambio muy grande en SM1H (Fig. 3.48). Además cuando los videos tienen poca resolución, el PDSI puede ser menos específico para los resultados que se quieren obtener. A pesar de lo anterior, se pueden apreciar los eventos de contracción como picos sobresalientes que coinciden con las contracciones en el video original VOH.

En la SM2H (Fig. 3.55) no se identifican tan claramente las contracciones. Esto se debe a la baja resolución del video VOH. Además de esto, debido a la naturaleza del PDSI que se utilizó, variaban los valores de los pixeles de una imagen a otra en donde no se detectaba mucho movimiento en el video original VOH, incrementando así el ruido en la serie SM2H. Al momento de realizar la suma de componentes reconstruidos con SSA (Fig. 3.59) no se observa una descripción consistente de la serie de tiempo.

Se obtuvieron detalles de cada serie de tiempo (Fig. 4.9 A y B) en el mismo intervalo de imágenes y se superpusieron para su comparación (Fig. 4.9 C). En la última figura se puede notar que existen coincidencias entre ambas series de tiempo, sin embargo no son muy notorias. Es probable que otro método de PDSI pudiera funcionar para la identificación de los cambios que se observan en el video.

unc-54 (e190) CB190 en el que solamente se aprecia la cabeza

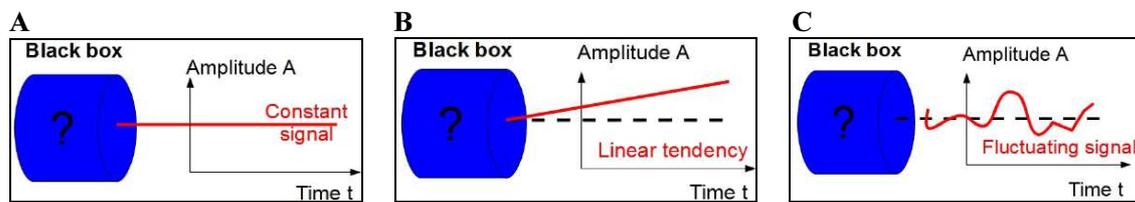
Para este caso tampoco fue posible aplicar el método 1 de PDSI debido a que este método se basa en el aumento y disminución del área que ocupa el triturador en la imagen y el video VOC no presenta tales características en el área que ocupa el triturador sino que se observa una estructura que sube y baja. En este video se puede observar muy poco detalle. El número de pixeles que conforman el triturador son muy pocos además de que el video tiene mucho ruido (ver VOC en DVD).

En la serie de tiempo que se obtuvo a través del método 2, SM2C (Fig. 3.70) no se pudo detectar una tendencia y las frecuencias dominantes que se encontraron en su espectro de potencias son muy pequeñas (Fig. 3.71). Se percibe a través de un FFT la serie como ruido blanco, es decir que no se encuentran correlaciones en la serie. A sí mismo en la suma de los componentes reconstruidos (Fig. 3.73) se agregaron solo aquellos componentes que describían las frecuencias dominantes, sin embargo no se encontró alguna periodicidad significativa.

4.2.4 Métodos de análisis de series de tiempo

El FFT es un método estándar de análisis de series de tiempo muy conocido y utilizado que se encuentra en cualquier paquete de software para el análisis en el dominio de la frecuencia que además es un cálculo rápido. Sin embargo este método no se puede aplicar a series que son no estacionarias, es decir series cuyas propiedades estadísticas promedio y varianza cambien en el tiempo. La tendencia y las contracciones de la faringe en la serie de tiempo tienen estas características. Al ser el FFT un método que descompone series en componentes que son necesariamente periódicos (senos y cosenos), no es posible separar la tendencia de las fluctuaciones. En las series de tiempo la tendencia es el comportamiento global de sistema, las fluctuaciones son el ruido y las oscilaciones periódicas y no periódicas.

Nos interesan las fluctuaciones porque describen las interacciones dentro de un sistema dinámico. En la figura 4.10 se observan tres tipos de sistemas. En la 4.10A se observa un sistema estático, ya que la señal que se obtiene de él es constante. En la 4.10B se observa un sistema dinámico trivial ya que la serie de tiempo no fluctúa y sigue una tendencia lineal. En la figura 4.10C se observa un sistema complejo dinámico ya que la serie de tiempo fluctúa y contiene componentes periódicos y aleatorios, puede ser caótica y compleja. Esto refleja que este último sistema consiste de elementos diferentes que interactúan entre sí. De esta manera siguiendo a través del tiempo el comportamiento de alguna variable característica de un sistema dinámico y realizando estudios estadísticos se puede obtener información sobre la dinámica subyacente del sistema.



4.10. Representación esquemática de tres sistemas de los que no se sabe qué elementos contienen ni cómo interactúan (black box) de los que se obtiene una serie de tiempo. **A)** Sistema estático cuya serie de tiempo es constante. **B)** Sistema dinámico trivial cuya serie de tiempo sigue una tendencia lineal. **C)** Sistema dinámico cuya serie de tiempo fluctúa y que puede contener componentes periódicos y aleatorios, es caótica y compleja. Figura tomada de la presentación “Estudio de sistemas complejos y señales de alerta temprana. Adaptabilidad vs. Colapso” de Fossion.

Si en la serie de tiempo la tendencia es dominante y su variabilidad es mucho mayor que la de las fluctuaciones entonces con el FFT no se podrán apreciar las fluctuaciones, solo la tendencia ya que en la serie de tiempo predomina la contribución de la tendencia.

Ya que nuestro objetivo es medir el cambio de la complejidad en las contracciones del triturador se decidió adoptar otro método de análisis de series de tiempo. Se utilizó el método SSA para separar tendencia de fluctuaciones que conforman las contracciones.

A diferencia del FFT donde la base puede ser establecida y es fija pues solo se utilizan senos y cosenos de diferentes frecuencias, el SSA separa de una manera autoconsistente y adaptiva componentes, tendencia, oscilaciones periódicas, fluctuaciones no periódicas y ruido despreciable. Con este método son los datos mismos que muestran en qué componentes descomponer la serie.

El SSA es comparable al método *Empirical Mode Decomposition* (EMD) (Zhaohua *et al.*, 2007), sin embargo el EMD es empírico mientras que el SSA se basa en teoremas matemáticos rigurosos como el *Singular Value Decomposition* (SVD) que realiza las descomposiciones de una manera exacta y probada teóricamente (Fig. 2.7). Una de las desventajas de cualquier método adaptativo a los datos como el SSA o el EMD es que son computacionalmente intensivos, es decir que se requiere mucho tiempo de cómputo y cuando se tienen millones de datos en la serie de tiempo, cálculos pueden ser imposibles. Otra desventaja del SSA es que es un método lineal y ortogonal que busca una nueva base para reexpresar los datos o espacio fase de una manera más significativa pero la nueva base por fuerza será una combinación lineal y ortogonal de la base original (Shlens 2009).

Existen otros métodos similares al SSA que tienen las mismas ventajas y que pueden incorporar no linealidades y no ortogonalidades por ejemplo el *Independent Component Analysis* (ICA) (Hyvärinen, Karhunen y Oja, 2001)

4.3 Especificaciones metodológicas

En la tabla 4.4 se resumen las especificaciones que requerimos para la realización de futuros videos. En la tabla 4.5 se resumen las especificaciones metodológicas para la realización de los videos de acuerdo con la información del histograma en la figura 4.3. En esta última tabla se proponen dichos fps para poder estudiar a detalle los picos de contracciones individuales, además de que dichas duraciones de los videos son propuestas para poder calcular FFT de series con aproximadamente 1000 imágenes entre contracciones sucesivas.

Criterio		Estado
Cepa		unc-54
Género		Hemafrodita
Restringido		no
Estadio de vida (horas a las cuales realizar los videos) 100 videos por cada uno de estos estadios (Fig. 1.9)	Adulto reproductivo	96 hrs de vida
	Adulto edad media	192 hrs de vida
	Adulto mayor	288 hrs de vida
Fluorescencia		No
Diferente gusano por video		Si
Cultivo de los gusanos		20°C
Tamaño de cada imagen (pixeles)		512 X 512
Cuadros por segundo		360
Duración en tiempo real (minutos)		15
Bits por pixel		8
Aumento		40x
Análisis de series de tiempo		SSA

Tabla 4.4. Resumen de las especificaciones metodológicas para la realización de los videos.

	Ritmo promedio de bombeo*		Video	
	x/min	x/s	fps	duracion
Adulto mayor	60	1	10	1000s = 15 min
Adulto reproductivo	30	6	60	180 = 3 min

Tabla 4.5. Resumen de las especificaciones metodológicas para la realización de los videos de acuerdo con la información del histograma en la figura 4.3.

5. Conclusiones

Conclusiones generales

Los estudios de pérdida de complejidad y variabilidad en series de tiempo del ritmo cardiaco en el hombre, se basan en datos holter (ECG) de 24 horas. También tomando en cuenta que el ritmo de bombeo de la faringe de *C. elegans* (hasta 6 bombeos por segundo) es mucho mas rápido que el ritmo cardiaco en el hombre (del orden de un latido por segundo en jóvenes adultos en reposo), necesitaríamos series de varias horas para lograr un estudio comparable. Está claro que en este estudio preliminar estamos muy lejos de realizar este objetivo, visto que hasta el video de mas duración que estudiamos en este trabajo no llegó ni a un minuto de duración. Sin embargo, encontramos evidencia de que el ritmo de bombeo de *C. elegans* se modula en el tiempo, y desarrollamos las bases técnicas y estadísticas para estudiar en una etapa más avanzada la variabilidad del bombeo a escalas de tiempo mayor.

Conclusiones específicas

Es conveniente realizar videos con las especificaciones metodológicas descritas en la sección 4.2 para procesar los videos y obtener series de tiempo de los que se pueda obtener información puntual.

De los métodos de PDSI que se realizaron, el método 1 no fue efectivo para procesar todos los videos, sin embargo el con el método 2 se pudieron obtener resultados de todos los videos sin importar sus características haciendo de este método el método más efectivo de PDSI para los videos en este trabajo. Sin embargo, en los casos donde se podían aplicar los dos métodos, ambos llevaron a resultados similares.

Se separaron las partes de la serie de tiempo que corresponden únicamente a las contracciones de la faringe a través de la eliminación de la tendencia y las fluctuaciones mas pequeñas con el método estadístico avanzado de reconstrucción de componentes de series de tiempo *Singular Spectrum Analysis* (SSA). Este método es aplicable a cualquier serie de tiempo, por lo que se puede utilizar en series tanto de seres humanos como de modelos animales. El FFT puede ser utilizado como un método auxiliar para el SSA.

Futuras direcciones

En un paso siguiente, nos proponemos hacer un estudio longitudinal con una cohorte de gusanos para establecer una trayectoria de la fragilidad en los gusanos para a partir de esos resultados modelar y establecer una definición y cuantificación de la fragilidad humana en términos del alejamiento de una justa medianía homeostática (ruido $1/f$) de las series de tiempo.

En particular el modelo permitirá cuantificar con un índice de complejidad el estado de salud de un individuo a través del análisis de series de tiempo de fenómenos fisiológicos además de ser un predictor sintomático, es decir que se puede observar con la trayectoria un riesgo futuro, es decir hacer predicciones sobre el estado de salud.

En contraste con un índice cualitativo del estado de fragilidad del paciente basado en el autorelato del mismo, un índice de complejidad cuantitativo podría ser un índice objetivo de la fragilidad en seres humanos.

Además se podrían ligar las fallas en los procesos fisiológicos, los daños celulares y estructurales y la pérdida de la movilidad como analiza Kirkwood (2002).

ANEXO 1

MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS SELLADOS PARA LA OBSERVACIÓN DE *Caenorhabditis elegans* EN EL INSTITUTO DE FÍSICA (MONTAJE DE LOS GUSANOS EN EL PORTAOBJETOS REALIZADO EN EL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR)

Descripción

Se realizaron portaobjetos sellados conteniendo aproximadamente 10 gusanos en el laboratorio de la Dra. Navarro del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con la ayuda del Técnico Académico Laura Silvia Salinas Velázquez para su grabación en el laboratorio del Gotatrón del Dr. Arturo Menchaca Rocha del Instituto de Física de la UNAM con la ayuda de Técnico Académico Roberto Núñez Cadena.

Material y método

Primero se pegó cinta adhesiva para etiquetar sobre un lado de dos portaobjetos que se colocaron paralelamente situando entre ambos un portaobjetos sin cinta adhesiva con una ligera separación entre cada uno. Los dos portaobjetos que tienen cinta adhesiva se pegaron en la mesa con el mismo trozo de cinta que pasa por una de sus caras (Fig. A4.A).

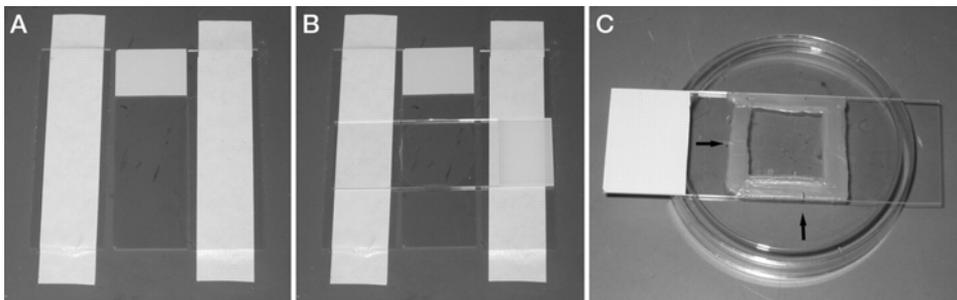


Figura A4. Fotografías que describen el método para la preparación de los portaobjetos sellados. **A)** Posicionamiento de los portaobjetos. **B)** Elaboración de la cama de agar. **C)** Sellado de los bordes.

Luego se prepara agar al 5% y todavía líquido se coloca una gota grande sobre el portaobjetos central aproximadamente al centro del mismo y se coloca rápidamente un portaobjetos perpendicular a los otros dos portaobjetos sobre la gota para que se forme una placa (Fig. A4.B).

Una vez que se polimerizó el agar se retiró el portaobjetos que cubría el agar con cuidado para no romper la capa de agar. Después se cortó el excedente presionando con la parte afilada de una navaja. Se colocó una gota de buffer M9 al centro de la capa de agar y en ella se colocaron aproximadamente 10 gusanos. Finalmente se colocó un cubreobjetos sobre la capa de agar cuidando que no quedaran burbujas y se sellaron con barniz los bordes (Fig. A4.C).

ANEXO 2

PSEUDOCÓDIGO DEL MÉTODO 2 DE PDI “DIFERENCIAS ENTRE LOS VALORES DE LOS PÍXELES DE IMÁGENES CONSECUTIVAS

****PSEUDOCÓDIGO 01****

Algoritmo usado para obtener, a partir de un stream dado, uno nuevo que sólo contempla una región específica.

entrada: stream a recortar

salida: nuevo stream

ruta_stream => /ruta_de_streams/

set dir [ruta_stream]

stream => obten_streams[ruta_stream]

importa_stream[stream] // el stream se maneja como un arreglo

set coordenadas [[x1;;x2,y1;;y2]] // región a recortar en cada imagen del stream

longitud => length(stream)

ruta_ventanas => /ruta_ventanas_a_generar/

set dir [ruta_ventanas] // En esta ruta se almacenan las ventanas generadas

****COMIENZA CICLO****

**** Este ciclo toma cada imagen de un stream, y obtiene sólo un marco de cada imagen, con una longitud predefinida. ****

Desde $i=0$, incrementar $i+1$ hasta que i sea menor o igual a longitud

$x \Rightarrow \text{stream}[[i]]$ // se obtiene la imagen 'i' del arreglo - stream

$x \Rightarrow x[[1]]$ // se obtiene la escala de grises, como una matriz

ventana => Image[coordenadas, "Byte"] // Se genera una nueva imagen, a partir de la matriz de escala de grises.

set Nombre_img => "Stream_n" <> IntegerString[i,10,4] <> ".tif" // Concatena Stream_n.num_imagen.tif, con num_imagen de la forma 0000

Export [Nombre,ventana] // Genera una nueva imagen

****TERMINA CICLO****

**** Usando 'ruta_ventanas' se procede a unir todas las ventanas generadas en un sólo video, de extensión *.tif****

```
set dir [ruta_ventanas]
archivos_a_unir => Filenames[] // Dada la ruta de trabajo, se almacena en un arreglo el nombre de todos los archivos presentes en el directorio.
```

```
ventanas => Map[Import, archivos_a_unir] // Mediante la función 'Map', se hace el import de todas las imágenes presentes en el directorio de trabajo.
```

```
ListAnimate[ventanas] // Se hace una animación a partir de todas las imágenes recientemente agregadas.
```

```
ruta_stream => /ruta_a_almacenar_nuevo_stream/
nombre_stream => nombre_nuevo_stream.extension (tiff)
```

```
set dir [ruta_stream]
```

```
Export[nombre_stream,ventanas] // Queda guardado el nuevo stream en la ruta proporcionada con el nombre dado.
```

**** PSEUDOCÓDIGO 02****

Algoritmo que, a partir de un stream, toma cada imagen y viéndola como una matriz hace una diferencia de la imagen actual con su consecutiva, esto con el fin de disminuir las entradas de la matriz que sean similares de imagen a imagen.

entrada: stream sin diferencias
salida: stream con las diferencias

```
ruta_stream => /ruta_con_stream/
set dir [ruta_stream]
```

```
stream => obten_streams[ruta_stream]
```

```
importa_stream[stream] // el stream se maneja como un arreglo
```

```
longitud => length(stream)
```

```
ruta_diferencias => /ruta_diferencias_a_generar/
set dir [ruta_diferencias] // En esta ruta se almacenan las diferencias generadas
```

****COMIENZA CICLO****

****En este ciclo, se toma una imagen, y su consecutiva, viendo ambas como una matriz, para obtener la diferencia entre M1 y M2, almacenando después su valor absoluto, para finalmente generar una nueva imagen.****

Desde i=0, incrementar i+1 hasta que i sea menor o igual a longitud

```
x1 => stream[[i]] // se obtiene la imagen 'i' del arreglo - stream  
escala1 => x1[[1]] // se obtiene la escala de grises, como una matriz
```

```
x2 => stream[[i+1]] // se obtiene la imagen consecutiva 'i+1' del arreglo - stream  
escala2 => x2[[1]] // se obtiene la escala de grises, como una matriz
```

```
matriz => Abs[escala1-escala2] // Se obtiene el valor absoluto de la diferencia de  
las matrices, como una nueva matriz.
```

```
nueva_Imagen => Image[matriz,"Byte"] // Se genera una nueva imagen, a partir de  
la matriz de escala de grises.
```

```
set Nombre_img => "Stream_n" <> IntegerString[i,10,4] <> ".tif" // Concatena  
Stream_n.num_imagen.tif, con num_imagen de la forma 0000
```

```
Export [Nombre_img,nueva_Imagen] // Genera una nueva imagen y se guarda en la  
ruta.
```

****TERMINA CICLO****

****Usando 'ruta_diferencias' se procede a unir todas las ventanas generadas en un sólo video, de extensión *.tif****

```
set dir [ruta_diferencias]
```

```
archivos_a_unir => Filenames[] // Dada la ruta de trabajo, se almacena en un arreglo el  
nombre de todos los archivos presentes en el directorio.
```

```
diferencias => Map[Import, archivos_a_unir] // Mediante la función 'Map', se hace el  
import de todas las imágenes presentes en el directorio de trabajo.
```

```
ListAnimate[diferencias] // Se hace una animación a partir de todas las imágenes  
recientemente agregadas.
```

```
ruta_stream => /ruta_a_almacenar_nuevo_stream/  
nombre_stream => nombre_nuevo_stream.extension (tiff)
```

```
set dir [ruta_stream]
```

```
Export[nombre_stream,diferencias] // Queda guardado el nuevo stream en la ruta  
proporcionada con el nombre dado.
```

ANEXO 3

FABRICACIÓN DE UN CANAL INMOVILIZADOR DE *C. elegans* PARA SU TOMA DE FOTOGRAFÍAS

Descripción

Se obtuvieron fotografías con 10x y 20x de aumento con una cámara AxioCam MRc de Carl Zeiss y capturadas con el programa AxioVision Rel. 4.6 de un gusano adulto de 2 días a temperatura ambiente en buffer M9 e inmovilizado dentro de un canal que se fabricó bajo un microscopio óptico en el laboratorio de la Dra. Navarro del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Material y método

Creación del canal para inmovilizar al gusano

En un portaobjetos se aplicó una capa de pegamento transparente instantáneo de viscosidad media (KRAZY® KOLA LOKA® INDUSTRIAL BROCHA®) con una brocha a lo largo del portaobjetos. Después, a lo largo y encima de dicha capa se aplicó una tira de cinta adhesiva (3M Scotch® Magic™ Tape) por un extremo y se fue pegando la tira con ayuda de una espátula de plástico para evitar la formación de burbujas en el pegamento.

El grosor de la capa que forma la tira de cinta adhesiva con el pegamento líquido es de aproximadamente 0.078 a 0.068 mm, que es aproximadamente el ancho del cuerpo de adultos hermafroditas de 2 a 3 días de edad. Se requiere que la capa tenga este grosor para evitar que el gusano tenga movilidad vertical y así prevenir la formación de profundidad de campo a la hora de tomar las fotografías.

Luego se colocaron estos portaobjetos en una bolsa de cerrado hermético y se refrigeraron a -20°C durante 10 minutos para aumentar la viscosidad del pegamento y así evitar que quedaran residuos de pegamento a la hora de retirar la parte de la cinta para crear el canal. En un paso siguiente se retiraron los portaobjetos del refrigerador y se transportaron, aún dentro de la bolsa, en una cubeta con hielos.

Posteriormente, con un plumón indeleble del lado del portaobjetos donde no había cinta se marcaron los vértices de un triángulo de 1 mm de base y 5 cm de altura. A continuación se calentó al fuego una navaja súper delgada de acero inoxidable (Gillette® super thin mejorada de Procter & Gamble) y se cortó en la cinta el triángulo marcado anteriormente. Seguidamente, del vértice con menor ángulo del triángulo se cortó con la navaja un canal de 1 cm de largo lo más delgado posible, y posteriormente se cortó un triángulo rectángulo cuyo vértice con el ángulo recto se ubique al final de este canal (Fig. A1.1).

Una vez hechos los cortes, se introdujeron los portaobjetos en el refrigerador a -20°C en una bolsa de cerrado hermético durante 5 minutos. Se retiraron los portaobjetos del refrigerador y se transportaron, aún dentro de la bolsa, en una cubeta con hielos. En seguida, con el extremo de una navaja se retiró un extremo de la base del triángulo y se tiró rápidamente esa parte de la cinta para crear el canal. Se hizo lo mismo con el otro triángulo.

Por último se dejaron los portaobjetos a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se pasaron los portaobjetos por una flama para que el pegamento se adhiera firmemente al portaobjetos.

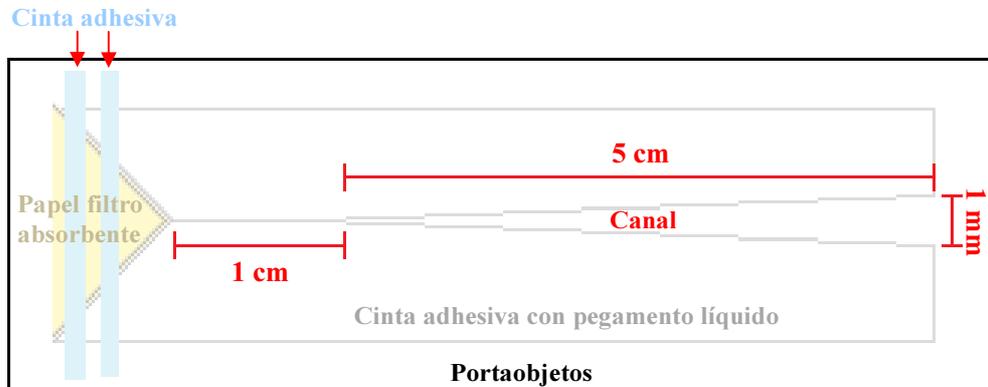


Figura A1.1 Esquema de las medidas y disposición de las partes que conforman el canal fabricado para la toma de las fotografías.

Montaje del gusano en el canal

Primeramente se cortó un triángulo rectángulo de papel filtro de 2 cm de base y se fijó con cinta adhesiva al portaobjetos sobre el triángulo rectángulo cortado en la capa del portaobjetos cerciorándose de que el vértice del ángulo recto del triángulo no estuviera levantado (Fig. A1.1).

Después se tomó amortiguador M9 con una micropipeta y se colocaron aproximadamente 0.3 ml sobre la parte más ancha del canal (fig A2.A). en seguida se tomó un cubreobjetos largo que se deslizó sobre el canal y sobre el amortiguador hasta la mitad del triángulo del canal (fig A2.B) cerciorándose de que no quedara ninguna burbuja dentro del canal. Posteriormente se colocó buffer en el resto del canal sin que el buffer tocara el papel.

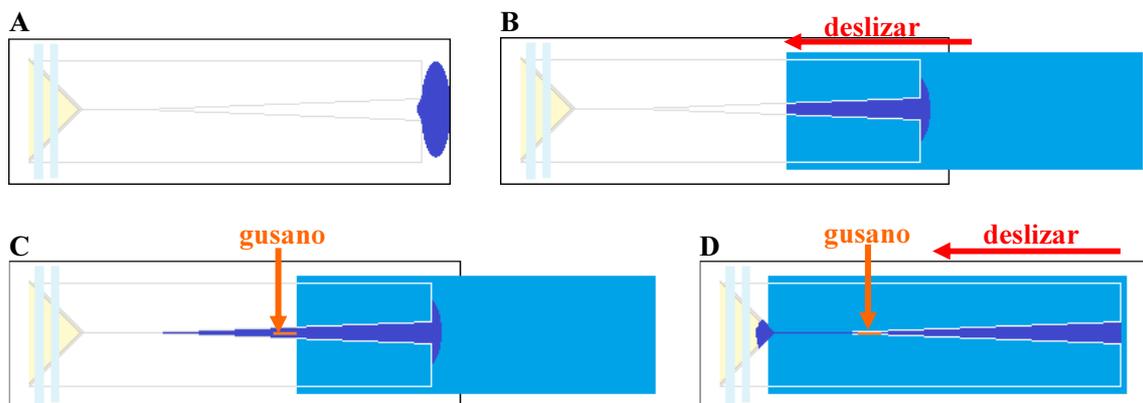


Figura A1.2. Esquema de los pasos a seguir para el montaje del gusano en el canal. Cada paso se explica en el texto. **A)** Colocación del buffer M9. **B)** Deslizamiento del cubreobjetos. **C)** Disposición del gusano en el canal. **D)** Deslizamiento final del cubreobjetos con absorción del buffer por el papel.

Acto seguido, se tomó un gusano de la caja de Petri y se depositó cuidadosamente en la parte más ancha expuesta del canal y más próxima al cubreobjetos (fig A2.C). después se deslizó el cubreobjetos sobre todo el canal hasta que tocara el papel. El papel absorbe el buffer creando así una corriente dentro del canal hacia la parte más angosta del mismo llevándose consigo al gusano (fig A2.D). El gusano se atora en el espacio más angosto de la cámara y por consiguiente se quedará quieto para poder tomar las fotografías.

Obtención de las fotografías

Se obtuvo una serie de fotografías a 10x y 20x disparando la cámara manualmente (Fig. A1.3)

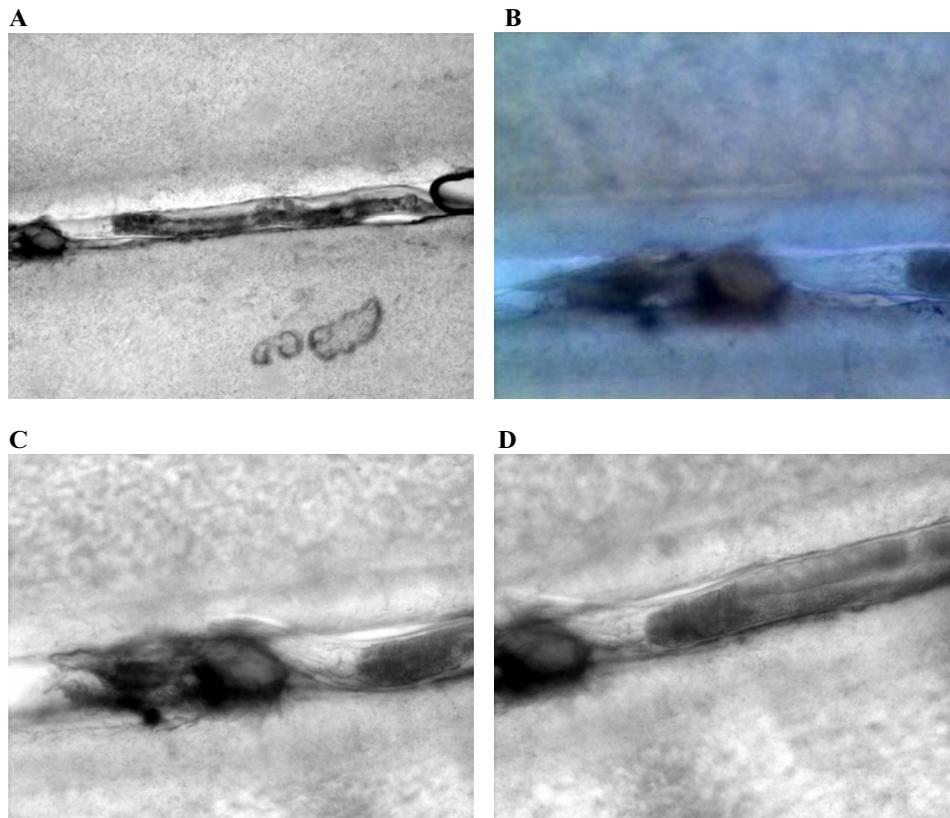


Figura A1.3 Fotografías obtenidas de un gusano en el canal que se fabricó en el IFC, UNAM. **A)** 10x. **B-D)** 20x.

ANEXO 4

TOMA DE FOTOGRAFÍAS DE MUTANTES *unc-119* (ed3)

Descripción

Se obtuvieron fotografías con 40x de aumento con una cámara AxioCam MRc de Carl Zeiss y capturadas con el programa AxioVision Rel. 4.6 de distintos individuos adultos de *unc-119* (ed3) a temperatura ambiente en buffer M9 en un portaobjetos montado como se indica en el anexo 4 en el laboratorio de la Dra. Navarro del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

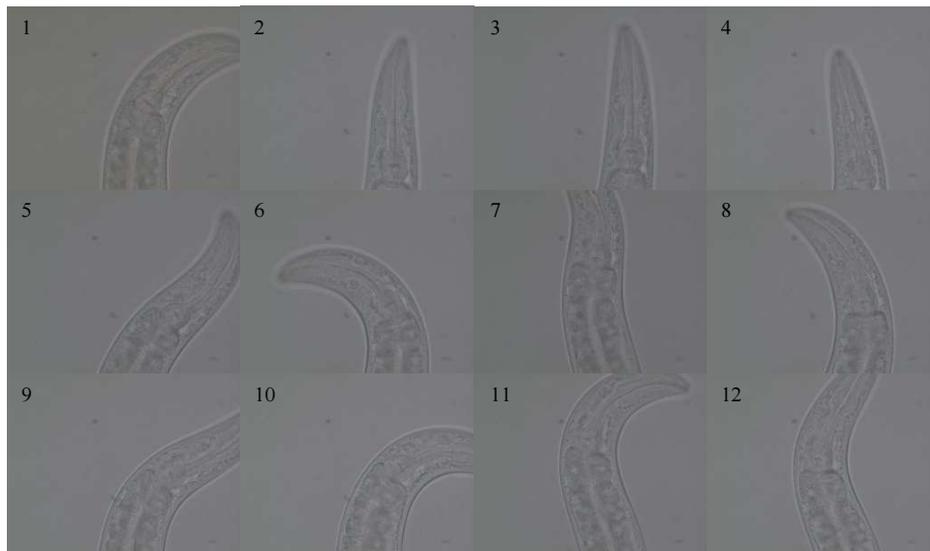
Material y método

Se obtuvieron tres series de fotografías cada 30 segundos de 3 individuos diferentes para verificar si este mutante salía del cuadro de visión del microscopio.

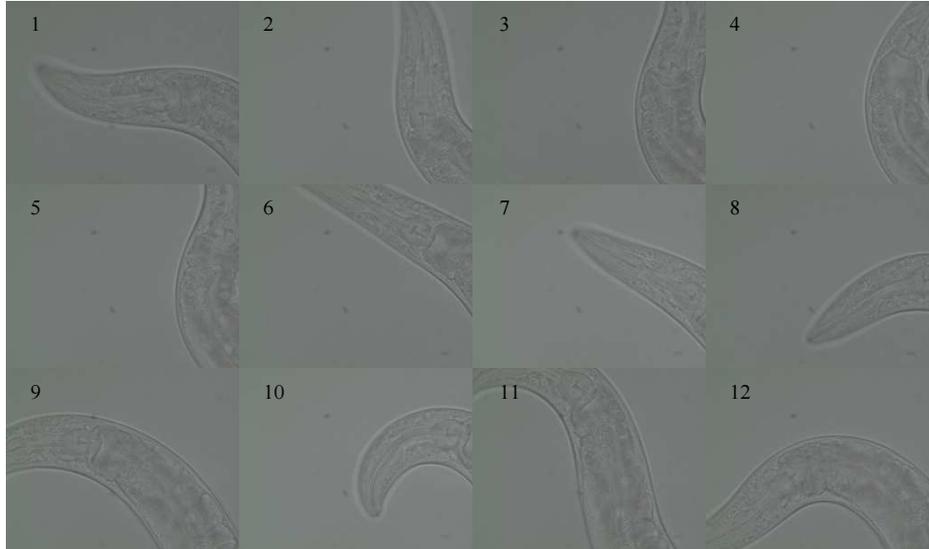
Conclusiones

El mutante *unc-119* (ed3) es un modelo que puede utilizarse para la toma de fotografías sin necesidad del uso de algún anestésico. Se observó que el área de la faringe podía permanecer dentro del campo de visión del microscopio durante máximo 3 minutos, de lo que se obtendría un video lo suficientemente largo como para obtener una serie de tiempo con suficientes contracciones. Sin embargo los mutantes *unc-119* (ed3) presentan características que no son ideales para la toma óptima de los observables fisiológicos que deseamos medir para este trabajo (leer sección 4.2.1 “especificaciones de los gusanos”, subsección “cepa”)

unc-119 (ed3) A



unc-119 (ed3) B



unc-119 (ed3) C

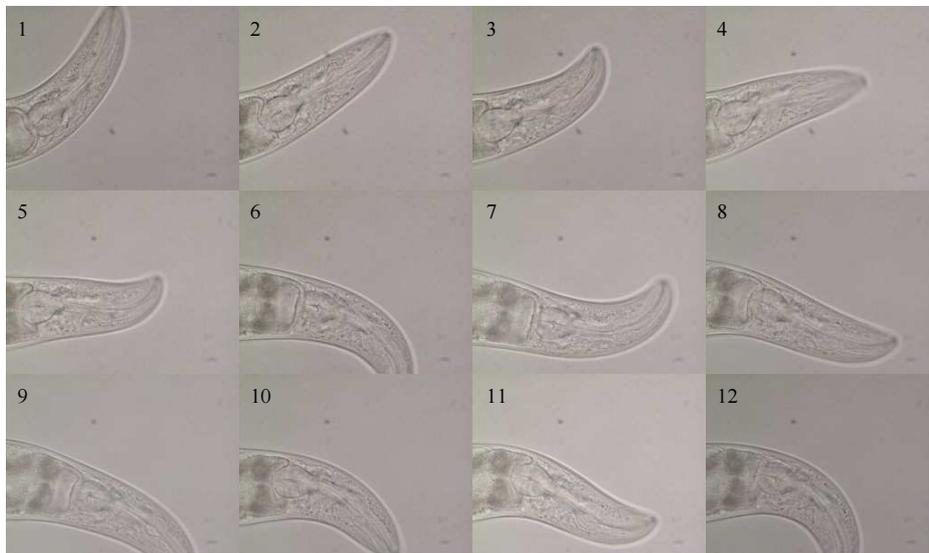


Figura A3. Tres series de fotografías tomadas cada 30 segundos a un aumento de 40x de tres adultos *unc-119 (ed3)* de tres días de edad en el laboratorio de la Dra. Navarro en el IFC, UNAM. El tiempo total en cada serie de fotografías es de 6 minutos. Observar que el triturador de la faringe del gusano nunca se encuentra fuera del campo de visión del microscopio.

7. Referencias

- Altun, Z. F. and Hall, D. H. 2005. ALIMENTARY SYSTEM - (Part Ia) The Pharynx.. Consultado en *WormAtlas* el 3 de Junio de 2010. <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/alimentary/alimentary1.htm>
- Altun, Z. F. and Hall, D. H. 2005. INTRODUCTION TO *C. elegans* ANATOMY el 25 de Noviembre de 2010 en *WormAtlas* <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2012. Handbook of *C. elegans* Anatomy. In *WormAtlas*. <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2011. Nervous system, general description. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.18
- Ao W., Pilgrim D. Caenorhabditis elegans UNC-45 is a component of muscle thick filaments and colocalizes with myosin heavy chain B, but not myosin heavy chain A. J. Cell Biol. 2000;148:375–384.
- Avery, L. and You, Y.J. *C. elegans* feeding (May 21, 2012), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.150.1, <http://www.wormbook.org>
- Avery L, Horvitz HR (1989) Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. *Neuron* 3: 473-485
- Axäng Claes, Rauthan Manish, Hall David H., y Marc Pilon. The twisted pharynx phenotype in *C. elegans*. *BMC Developmental Biology* 2007, 7:61doi:10.1186/1471-213X-7-6
- Axäng C, Rauthan M, Pilon M: Developmental genetics of the *C. elegans* pharyngeal neuron NSM and NSMR. *BMC Dev Biol* 2008, 8:38.
- Bargmann, C.I. Chemosensation in *C. elegans* (October 25, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.123.1, <http://www.wormbook.org>.
- Bendesky A, comunicación interna. Universidad de Rockefeller
- Chase, D.L. and Koelle, M.R. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans* (February 20, 2007), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.132.1, consultado en <http://www.wormbook.org> el 3 de junio de 2010.
- Cheung BH, Cohen M, Rogers C, Albayram O, de Bono M (2005) Experience-dependent modulation of *C. elegans* behavior by ambient oxygen. *Curr Biol* 15: 905–917.
- Chronis N., Zimmer M., Bargmann C. Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Methods* 10/2007; 4(9):727-31.
- Claessen, D. y Groth A. **A beginner's guide to SSA (Singular Spectrum Analysis)**. CERES-ERTI, Ecole Normale Superieure, Paris, www.environnement.ens.fr
- Collins, J.J., et al. The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans* (January 24, 2008), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.137.1, <http://www.wormbook.org>.
- Fossion, R., 2010. Una definición “compleja” de la fragilidad: Caos, fractales y complejidad en series de tiempo biológicas. Capítulo en el libro “Una visión transdisciplinaria sobre el envejecimiento”, Instituto de Geriatria & Red Nacional Sobre Envejecimiento, Salud y Desarrollo Social.
- Fossion R., Landa E., Stránský P., Velázquez V., López Vieyra J. C., Garduño I., García D. y A. Frank, 2010. Scale invariance as a symmetry in physical and biological systems: listening to photons, bubbles and heartbeats. AIP Conf. Proc. SYMMETRIES IN NATURE:

- SYMPOSIUM IN MEMORIAM MARCOS MOSHINSKY Volume 1323, pp. 74-90.
DOI:10.1063/1.3537868
- García-González JJ, García-Peña C, Franco-Marina F, et al. 2009. A frailty index to predict the mortality risk in a population of senior Mexican adults. *BMC Geriatr*;9:47.
- Gisiger, T., 2001. Scale invariance in biology: coincidence or footprint of a universal mechanism?. *Biol. Rev.* 76, pp. Cambridge Philosophical Society
- Goldberger, A. L., Rigney, D. R., & West, B. J. (1990, February). Chaos and fractals in human physiology. *Scientific American*, 262, 42–49
- Goldberger, A. L., 2006. Complex Systems, *Proc Am Thorac Soc* Vol 3. pp 467–472. DOI: 10.1513/pats.200603-028MS
- Goldberger, A. L., 1996. “Non-linear Dynamics for Clinicians. Chaos Theory, Fractals and Complexity at the Bedside”, *The Lancet*, 347; 1312:1314.
- Hall, D., and Altun, Z.F. (2007). *C. elegans Atlas* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hart, Anne C., ed. Behavior (July 3, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <http://www.wormbook.org>
- Hayano J., Yamasaki F., Sakata S., Okada A., Mukai S., and Fujinami T. Spectral characteristics of ventricular response to atrial fibrillation *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 273, 2811–2816 (1997)
- Hyvärinen A., Karhunen J. y Oja E., Independent Component Analysis. 2001. Ed Joh Wiley & Sons. NY.
- Hodgkin J, Horvitz HR, Brenner S. Nondisjunction Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1979;91:67–94
- Hope Ian A., *C. elegans: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford. 1999. Pp. 281. ISBN 0 19 963738 5.
- Huang Cheng, Xiong Chengjie y Kornfeld Kerry. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. PNAS, Mayo 25, 2004, vol. 101, no. 21.
- Keane J, Avery L (2003) Mechanosensory inputs influence *Caenorhabditis elegans* pharyngeal activity via ivermectin sensitivity genes. *Genetics* 164: 153–162.
- Kimble Judith, University of Wisconsin-Madison, 2002. Tomada de <http://www.news.wisc.edu/17523> el 1 de septiembre de 2012. (Fotografía de *C. elegans*)
- Kirkwood T. y Finch C., The old worm turns more slowly. *Nature* vol 419 24 de Octubre de 2002.
- Knobel K. M., Davis W. S., Jorgensen E. M., Bastiani M. J., 2001. UNC-119 suppresses axon branching in *C. elegans*. *Development* 128: 4079–4092
- Landa E., Morales I. O., Fossion R., P. Stransky, Velázquez V., López Vieyra J. C. y A. Frank, 2011. Criticality and long-range correlations in time series in classical and quantum systems. *PHYSICAL REVIEW E* 84, 016224 (2011). PACS number(s): 05.45.Tp, 02.50.-r, 05.40.Ca. DOI: 10.1103/PhysRevE.84.016224. 2011 American Physical Society. 1539-3755/2011/84(1)/016224(5)
- Lipsitz, L.A. & Goldberger, A.L., 1992. Loss of 'complexity' and aging: potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *The Journal of the American Medical Association*, 267(13), pp.1806-1809.
- Materi W., Pilgrim D., 2005. Novel *Caenorhabditis elegans unc-119* axon outgrowth defects correlate with behavioral phenotypes that are partially rescued by nonneural *unc-119*. *Genesis* 42: 104–116
- Mitnitski, A.B., Graham, J.E., Mogilner, A.J., Rockwood, K., 2002. Frailty and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatrics* 2, 1
- Morris F., Brady W. J., Camm J. ABC of Clinical Electrocardiography, 2nd Edition. ISBN: 978-1-4443-1249-2. 112 pages. April 2009, BMJ Books.

- Munné, F. 2005. ¿Que es la complejidad? *Encuentros de Psicología Socia : La complejidad en la Psicología social y de las Organizaciones*, 3, (2), 6-17.
- Okkema PG, Harrison SW, Plunger V, Aryana A, Fire A (1993) Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 135: 385-404
- Pikkujamsa SM, Makikallio TH, Sourander LB, Raiha IJ, Puukka P, Skytta J, Peng CK, Goldberger AL, Huikuri HV: Cardiac interbeat interval dynamics from childhood to senescence : comparison of conventional and new measures based on fractals and chaos theory. *Circulation* 1999, 100:393-399.
- Pluskota A, Horzowski E, Bossinger O, von Mikecz A (2009) In *Caenorhabditis elegans* Nanoparticle-Bio-Interactions Become Transparent: Silica-Nanoparticles Induce Reproductive Senescence. *PLoS ONE* 4(8): e6622. doi:10.1371/journal.pone.0006622).
- Riddle L. Donald, Thomas Blumenthal, Barbara J Meyer, James R Priess, Fred Hutchinson. *C. elegans* II, segunda edición. Cold Spring Harbor Mongoraph Series Laboratory Press, 1997. Vol. 33. ISBN-10: 0-87969-532-3.
- Rockwood K, Song X, MacKnight C, Bergman H, Hogan DB, McDowell I, et al. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ* 2005 Aug 30;173(5):489-495 [doi: 10.1503/cmaj.050051].
- Samara, C., Syntichaki P. y Tavernarakis N. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 105–112 y 2008 Nature Publishing Group 1350-9047/08.
- Servín S, comunicación interna, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Shimozono Satoshi, Fukano Takashi, Kimura Koutarou D., Mori Ikue, Kirino Yutaka y Miyawaki Atsushi. Slow Ca²⁺ dynamics in pharyngeal muscles in *Caenorhabditis elegans* during fast pumping. *EMBO reports* (2004) 5, 521–526. doi:10.1038/sj.embor.7400142
- Shlens, J., A Tutorial on Principal Component Analysis, www.sn1.salk.edu/~shlens/pca.pdf (2009).
- WormBase. Gene Details for unc-119 el 23 de Noviembre de 2010 en <http://www.wormbase.org/db/gene/gene?name=WBGene00006843;details=1>)
- Wageningen University and Research Centre, 29 de mayo de 2010. Genetic research shows degeneration in aging worm. *ScienceDaily*. Retrieved August 20, 2010, from <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/05/100527213901.htm>
- WormBase. Gene Details for unc-54 el 24 de Septiembre de 2012 <http://legacy.wormbase.org/db/gene/gene?name=WBGene00006789;details=1>
- Wormbase. WBPheotype:0001213 Locomotion reduced en <http://legacy.wormbase.org/db/misc/phenotype?name=WBPheotype%3A0001213;class=Phenotype>
- You Y-j, Kim J, Raizen DM, Avery L (2008) Insulin, cGMP, and TGF- β signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety. *Cell Metabolism* 7: 249–257.
- Zhang H., Constantine R., Vorobiev S., Chen Y., Seetharaman J., et al. , 2011. UNC119 is required for G protein trafficking in sensory neurons. *Nat. Neurosci.* 14: 874–880.
- Zhaohua Wu, Norden E. Huang, Steven R. Long y Chung-Kang Peng. On the trend, detrending, and variability of nonlinear and nonstationary time series *PNAS* Septiembre 18, 2007 vol. 104 no. 38 14889–14894