

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 689**

51 Int. Cl.:

**G06T 7/20** (2006.01)

**G06T 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06850118 .8**

96 Fecha de presentación: **08.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1946270**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **ANÁLISIS DE LAPROS TEMPORALES DEL CICLO CELULAR DE NÚCLEOS NO  
TINCIONADOS.**

30 Prioridad:  
**12.11.2005 US 736345 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.02.2012**

73 Titular/es:  
**GENERAL ELECTRIC COMPANY  
ONE RESEARCH CIRCLE  
NISKAYUNA, NY 12309, US**

72 Inventor/es:  
**RITTSCHER, Jens;  
PADFIELD, Dirk R.;  
SEBASTIAN, Thomas y  
THOMAS, Nicholas**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 373 689 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Análisis de lapsos temporales del ciclo celular de núcleos no tincionados

**Antecedentes de la invención**

5 La presente técnica versa, en general, acerca de un análisis de imágenes diseñada para determinar la fase del ciclo celular de una célula particular. Más específicamente, la presente técnica versa acerca de la segmentación automática de una célula en una fase del ciclo celular usando una segmentación tridimensional de imágenes bidimensionales de lapsos temporales.

10 Cuando las células eucariotas se replican, pasan a través de una serie estrechamente regulada de eventos conocidos como ciclo celular. Generalmente, el ciclo celular incluye cuatro fases: G1, S, G2 y M. Cada fase del ciclo celular está marcada por características distintivas en la morfología celular y en el contenido total de ADN a medida que el ADN se replica y la célula se escinde en dos células hijas.

15 En labores de investigación básica y de descubrimiento de fármacos, puede obtenerse información valiosa entendiendo cómo un agente afecta al crecimiento y la división de las células. A menudo, esta información da alguna indicación del mecanismo de acción asociado con el compuesto. Por ejemplo, una clase particular de fármacos o de manipulaciones genéticas puede detener el crecimiento celular en la etapa G2 (segunda fase de intervalo) y puede actuar por medio de un conjunto particular de mecanismos o acciones. Otra clase de fármacos o de manipulaciones genéticas puede detener las células mientras realizan la mitosis y, así, pueden actuar por medio de un mecanismo diferente. La capacidad de determinar con rapidez si una población de células está bloqueada o detenida en la G2 o en la mitosis (o en alguna otra etapa) proporciona un instrumento valioso para evaluar el mecanismo de acción de un compuesto no caracterizado que haya sido sometido a ensayo en la población de células. Esto resulta particularmente útil en el estudio y el tratamiento del cáncer, dado que es deseable identificar compuestos que bloqueen la replicación de las células cancerosas de proliferación rápida sin perturbar a las células normales. Además, también es útil determinar si un compuesto no caracterizado tiene el efecto de aumentar el avance en el ciclo celular, porque tal compuesto puede ser potencialmente carcinogénico.

25 Típicamente, el avance del ciclo celular es evaluado por medio de un análisis de imágenes celulares fluorescentes. Tal análisis puede implicar tensionar células con una tinción nuclear, generalmente una tinción fluorescente, para identificar núcleos de células para proporcionar un punto de referencia para la segmentación celular y otros procedimientos de análisis de imágenes. El uso común de las tinciones fluorescentes presenta barreras para una formación de imágenes celulares a largo plazo. Por ejemplo, las tinciones nucleares dependen del ADN de una u otra forma para tincionar debidamente las células. Aunque tales tinciones pueden ser adecuadas para ensayos con células fijadas o para ensayos *in vivo* de corta duración (por ejemplo, varias horas), las tinciones fluorescentes tienen efectos secundarios tóxicos que impiden los estudios a largo plazo. Si las células son tincionadas con una tinción celular y son cultivadas durante periodos prolongados, mueren, ya sea porque no pueden replicar su ADN cuando es objeto de intercalación con la tinción, o porque la tinción interfiere en la segregación de los cromosomas durante la mitosis.

40 Un procedimiento alternativo para tincionar núcleos y mantener las células con vida durante más de un ciclo celular es diseñar la célula para que exprese una proteína fluorescente como la Proteína Verde Fluorescente (GFP) que se acopla a una secuencia de localización nuclear para que la proteína actúe como una tinción nuclear. Aunque la tinción con GFP no interfiere en la replicación del ADN de la misma manera que la intercalación de tinciones fluorescentes, este enfoque implica la manipulación genética de las células. Además, este enfoque no distingue entre las diversas fases del ciclo celular. Más específicamente, un marcador de proteínas GFP puede tincionar células de forma diferencial en diversas fases de la mitosis (por ejemplo, profase, metafase, anafase y telofase), pero el marcador no distingue entre las tres fases de la interfase: G1, S y G2.

45 Acton, S. T. et al.: "Data acceptance for Automated Leukocyte Tracking through Segmentation of Spatio-temporal Images", IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol. 52, n° 10, octubre de 2005, describe un procedimiento para efectuar el seguimiento de una fase del ciclo celular de una célula que incluye el uso de segmentación espacio-temporal para efectuar un seguimiento de los leucocitos y para extraer datos de velocidad de imágenes microscópicas de vídeo. El documento WO-A-2004/088573 describe un procedimiento de determinación de datos de la fase del ciclo celular que incluye la clasificación de las células en subpoblaciones, cada una de las cuales tiene células en diferentes fases del ciclo celular.

55 Además de procedimientos de tinción que no interfieran en el avance a largo plazo en el ciclo celular, existe la necesidad de una evaluación rápida y automática de tales células tincionadas. Dado que se realizan muchas investigaciones básicas y muchos descubrimientos de fármacos con un rendimiento elevado, es inviable la evaluación manual de imágenes de células tincionadas para los estudios a largo plazo. Por ejemplo, un ensayo celular puede tener varios cientos de células que pueden ser monitorizadas varias veces por hora durante varios días. Además, para cada agente o compuesto terapéutico potencial estudiado, pueden prepararse varios pocillos para proporcionar resultados estadísticamente significativos. Por lo tanto, existe la necesidad de técnicas que permitan una determinación fiable, precisa y automática del avance del ciclo celular.

**Breve descripción**

- 5 En general, la presente invención versa acerca de técnicas de análisis de imágenes y de dispositivos que facilitan en análisis de imágenes. También versa acerca de medios legibles por máquina en los que se le proporcionan instrucciones, estructuras de datos, etc., para llevar a cabo los procedimientos de la invención. Según las presentes técnicas, pueden evaluarse imágenes de células mediante el uso de algoritmos específicos. Usando esas imágenes analizadas, los dispositivos de la presente invención pueden extraer conclusiones automáticamente en cuanto a la fase del ciclo celular de una célula en el transcurso del tiempo. Las presentes técnicas también pueden ser usadas para generar resultados de las imágenes procesadas, como árboles u otras visualizaciones apropiadas, que puedan representar gráficamente el avance de una o más células en el ciclo celular con el transcurso del tiempo.
- 10 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para hacer un seguimiento automáticamente de una fase del ciclo celular de una célula, comprendiendo el procedimiento las etapas de: generar un volumen tridimensional espacio-temporal a partir de una serie de imágenes bidimensionales de una o más células tomadas en el transcurso del tiempo; y llevar a cabo un análisis por segmentación del volumen tridimensional para clasificar las una o más células en una fase G1, S, G2 o M del ciclo celular en el transcurso del tiempo, en el que la
- 15 realización del análisis por segmentación comprende las etapas de: identificar tubos claros y oscuros dentro del volumen tridimensional; llevar a cabo una segmentación tridimensional usando conjuntos de nivel en los tubos oscuros para clasificar las células en una fase G2 del ciclo celular; y clasificar los tubos claros en fases G1, M o S del ciclo celular usando un análisis de enlace.
- 20 Según otro un aspecto de la presente invención, se proporciona un medio legible por ordenador para hacer un seguimiento automáticamente de una fase del ciclo celular de una célula que comprende: código para generar un volumen tridimensional espacio-temporal a partir de una serie de imágenes bidimensionales de una o más células tomadas en el transcurso del tiempo; y código para llevar a cabo un análisis por segmentación del volumen tridimensional para clasificar las una o más células en una fase G1, S, G2 o M del ciclo celular en el transcurso del tiempo, en el que el código para llevar a cabo el análisis por segmentación comprende: código para identificar tubos
- 25 claros y oscuros dentro del volumen tridimensional; código llevar a cabo una segmentación tridimensional usando conjuntos de nivel en los tubos oscuros para clasificar las células en una fase G2 del ciclo celular; y código para clasificar los tubos claros en fases G1, M o S del ciclo celular usando un análisis de enlace.

**Dibujos**

- 30 Estos y otros aspectos, características y ventajas de la presente invención se entenderán mejor cuando sea lea la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos, en los que los caracteres semejantes representan partes semejantes de principio a fin de los dibujos, en los que:
- la FIG. 1 es una vista esquemática de un sistema ejemplar para su uso en la adquisición de datos de imagen de células según aspectos de la presente técnica;
  - 35 la FIG. 2 es un diagrama de flujo que representa un procedimiento que segmenta imágenes de células según la presente técnica;
  - la FIG. 3 es una imagen bidimensional ejemplar de una célula según la presente técnica;
  - la FIG. 4 es un diagrama de flujo que representa un procedimiento para generar un volumen de imagen tridimensional según la presente técnica;
  - la FIG. 5 es un volumen ejemplar de imagen tridimensional de una célula según la presente técnica;
  - 40 la FIG. 6 es una visualización ejemplar en árbol que indica en qué punto durante el avance del ciclo celular se llevan a cabo las etapas de segmentación y enlace;
  - la FIG. 7 es un diagrama de flujo que representa un procedimiento para llevar a cabo una técnica de marcha rápida en las imágenes de las células;
  - 45 la FIG. 8 es una visualización ejemplar codificada en árbol que ilustra el avance de una célula precursora y de células hijas en el ciclo celular en el transcurso del tiempo; y
  - la FIG. 9 es una visualización alternativa en árbol que muestra el avance de una célula precursora y de células hijas en el ciclo celular en el transcurso del tiempo.

**Descripción detallada**

- 50 En el campo de la medicina es a menudo deseable poder hacer un seguimiento del avance de una célula por las diferentes fases del ciclo celular. En general, el ciclo celular puede ser dividido en cuatro fases diferenciadas. El ADN en el núcleo celular es replicado durante la fase "S" del ciclo celular (por "síntesis"). Toda la fase de división celular se denota como fase "M" (por "mitosis"). Esto deja el periodo entre la fase M y el comienzo de la síntesis del

ADN (la fase S), que es denominado fase "G1" (primera fase de intervalo) y el periodo entre la terminación de la síntesis del ADN y la fase M siguiente, que se denomina fase "G2". Interfase es un término para las fases no mitóticas del ciclo celular, e incluye las fases G1, S y G2. En una célula típica, la interfase puede comprender un 90% o más del tiempo total del ciclo celular. Sin embargo, en células que han sido tratadas con uno o más compuestos o agentes alteradores del ciclo celular y/o con un estímulo alterador del ciclo celular (por ejemplo, irradiación, ultrasonidos), el avance normal en el ciclo celular puede ser bloqueado, de modo que el tiempo relativo pasado en una fase particular del ciclo celular sea mucho mayor en relación con las células no tratadas. Así, un procedimiento de evaluación del efecto de un agente o compuesto conocido o putativo alterador del ciclo celular es examinar el avance del ciclo celular en busca de una población de células que hayan sido tratadas con el compuesto. El avance del ciclo celular en las células vivas puede ser evaluado automáticamente por medio de técnicas y dispositivos de formación de imágenes proporcionados en el presente documento.

Para generar información sobre el avance de una célula en el ciclo celular, las presentes técnicas hace un seguimiento de los cambios celulares en el transcurso del tiempo. Los enfoques estándar de seguimiento generalmente suponen o bien que el aspecto de los objetos o la trayectoria no están cambiando. Sin embargo, durante el ciclo celular tanto el aspecto como la trayectoria de las células cambian con el tiempo. Por lo tanto, resulta difícil acercarse al problema usando técnicas estándar de seguimiento. Las presentes técnicas consideran rebanadas de imágenes bidimensionales tomadas en el transcurso del tiempo como un volumen espacio-temporal y luego segmentan los núcleos de este volumen para clasificar las células dentro de las diversas fases del ciclo celular.

En la Fig. 1 se representa un sistema ejemplar 10 de formación de imágenes capaz de operar según la presente técnica. En general, el sistema 10 de formación de imágenes incluye un generador 12 de imágenes que detecta señales y convierte las señales en datos que pueden ser procesados por procesadores corriente abajo. Según se describe más plenamente en lo que sigue, el generador 12 de imágenes puede operar según diversos principios físicos para crear los datos de la imagen. Sin embargo, en general, el generador 12 de imágenes crea datos de imágenes indicativos de una población de células 14, mostradas aquí cultivadas en una placa de cultivo de múltiples pocillos, ya sea en un medio convencional, como una película fotográfica, o en un medio digital.

El generador 12 de imágenes opera bajo el control de la circuitería 16 de control del sistema. La circuitería 16 de control del sistema puede incluir una amplia gama de circuitos, como circuitos de control de fuentes de radiación, circuitos temporizadores, circuitos para coordinar la adquisición de datos en conjunción con movimientos de la muestra, circuitos para controlar la posición de fuentes y detectores de radiación, etcétera. En el presente contexto, la circuitería 16 de control del sistema también puede incluir elementos de memoria, como medios de almacenamiento magnético u óptico, para almacenar programas y rutinas ejecutados por la circuitería 16 de control del sistema o por componentes asociados del sistema 10. Los programas o las rutinas almacenados pueden incluir programas o rutinas para llevar a cabo la totalidad o parte de la presente técnica.

Los datos de imagen adquiridos por el generador 12 de imágenes pueden ser procesados por el generador 12 de imágenes con una variedad de fines; por ejemplo, para convertir los datos o la señal adquiridos en valores digitales, y ser proporcionados a la circuitería 18 de adquisición de datos. La circuitería 18 de adquisición de datos puede llevar a cabo una amplia gama de funciones de procesamiento, como el calibrado de los intervalos dinámicos digitales, la suavización o el perfilado de los datos, así como la compilación de corrientes y ficheros de datos, cuando se desee.

La circuitería 18 de adquisición de datos también puede transferir datos de imágenes de adquisición a la circuitería 20 de procesamiento cuando puedan llevarse a cabo un procesamiento y análisis adicionales. Así, la circuitería 20 de procesamiento puede llevar a cabo análisis sustanciales de los datos de imagen, incluyendo la ordenación, el perfilado, el reconocimiento de características, etcétera. Además, la circuitería 20 de procesamiento puede recibir datos para una o más fuentes de muestras (por ejemplo, múltiples pocillos de una placa de pocillos múltiples). Los datos de imagen procesados pueden ser almacenados en dispositivos de almacenamiento de corto o largo plazo, como sistemas de comunicaciones de archivo de imágenes, que pueden estar situados dentro del sistema 10 de formación de imágenes o alejados del mismo y/o reconstruidos y mostrados para un operador, como en la estación 22 de trabajo del operador.

Además de mostrar la imagen reconstruida, la estación 22 de trabajo del operador puede controlar las operaciones y las funciones anteriormente descritas del sistema 10 de formación de imágenes, típicamente por medio de una interfaz con la circuitería 16 de control del sistema. La estación 22 de trabajo del operador puede incluir uno o más componentes basados en procesadores, como ordenadores 24 de uso general o específicos a una aplicación. Además de los componentes basados en los procesadores, la estación 22 de trabajo del operador puede incluir diversos componentes de memoria y/o almacenamiento, incluyen dispositivos de almacenamiento masivo magnético y óptico, como chips de RAM. Los componentes de almacenamiento a memoria y/o almacenamiento pueden ser usados para almacenar programas y rutinas para llevar a cabo las técnicas descritas en el presente documento, que son ejecutadas por la estación 22 de trabajo del operador o por los componentes asociados del sistema 10. De manera alternativa, los programas y las rutinas pueden ser almacenados en un almacenamiento accesible de

ordenador y/o en una memoria remota con respecto a la estación 22 de trabajo del operador pero accesible por la red y/o por interfaces de comunicaciones presentes en la estación 22 de trabajo del operador.

La estación 22 de trabajo del operador puede también comprender diversas interfaces de entrada/salida (E/S), así como diversas interfaces de red o comunicaciones. Las diversas interfaces de E/S pueden permitir la comunicación con dispositivos de interfaz de usuario, como una pantalla 26, un teclado 28, un ratón 30 y una impresora 32, que pueden ser usados para ver e introducir información de configuración y/o para operar el sistema 10 de formación de imágenes. Las diversas interfaces de red y comunicaciones pueden permitir la conexión tanto a intranets locales y de área amplia como a redes de almacenamiento, así como a Internet. Las diversas interfaces de E/S y de comunicaciones puede utilizar cables, líneas o interfaces inalámbricas adecuadas, según sea apropiado o se desee.

Para un sistema 10 de formación de imágenes puede proporcionarse más de una sola estación 22 de trabajo de operador. Por ejemplo, un escáner o una estación de formación de imágenes pueden incluir una estación 22 de trabajo del operador que permita la regulación de los parámetros implicados en el procedimiento de adquisición de datos de imagen, mientras que puede proporcionarse una estación 22 de trabajo de operador diferente para manipular, mejorar y ver los resultados y las imágenes reconstruidas.

Pueden detectarse imágenes de células vivas y puede evaluarse de varias maneras el avance de las células a través de las diversas fases del ciclo celular. El generador 12 de imágenes puede ser cualquier dispositivo adecuado de formación de imágenes, incluyendo un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal de fluorescencia, un microscopio confocal láser de barrido o un microscopio de fluorescencia por reflexión interna total. En una realización específica, el sistema 10 de formación de imágenes puede incluir un IN Cell Analyzer 1000 o un IN Cell Analyzer 3000 (GE Healthcare) usando excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 535 nm para células cultivadas en placas de 96 pocillos y mantenidas sobre el instrumento durante toda la duración de la formación de imágenes en condiciones estándar de cultivo (37°C/5 % CO<sub>2</sub>).

Las células 14 puede ser de cualquier tipo apropiado de célula. Las células de las que se puede formar imágenes incluyen células de mamífero, células humanas, líneas celulares inmortalizadas, células hiperproliferativas, células cancerosas, células de músculo liso vascular, células endoteliales, células madre, gametos, etc. Tal como se ha hecho notar más arriba, las células 14 pueden ser cultivadas en cualquier medio de cultivo celular apropiado. Además, las células 14 pueden ser cultivadas en distintas condiciones. Pueden procesarse en paralelo partes alícuotas de células procedentes de una única fuente o células de múltiples fuentes, estando sometidas las células a los mismos estímulos o a distintos estímulos (por ejemplo, exposición a un agente químico). Así, pueden procesarse múltiples muestras celulares en una placa de múltiples pocillos, incluyendo algunos pocillos compuestos, como compuestos terapéuticos putativos, mientras que otros pocillos no contienen ningún compuesto (es decir, células de control). En algunas realizaciones, las células pueden ser tratadas con bloqueadores conocidos del ciclo celular, como la Roscovitina o el Nocodazol. Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "compuesto de ensayo", "fármaco candidato" o "modulador", o equivalentes gramaticales, describen cualquier molécula, con independencia de que ocurra de forma natural o sea sintética, por ejemplo una proteína, un oligopéptido (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud), una molécula orgánica pequeña, un polisacárido, un lípido, un ácido graso, un polinucleótido, un oligonucleótido, etc., que deba ser sometida a ensayo para verificar su capacidad de afectar directa o indirectamente al ciclo celular. El compuesto de ensayo puede estar en la forma de una biblioteca de compuestos de ensayo, como una biblioteca combinatoria o aleatorizada que proporcione una gama suficiente de diversidad estructural de compuestos. Además, en algunas realizaciones, las células pueden estar alteradas genéticamente "bloqueando" o silenciando genes específicos. También puede resultar apropiado evaluar el efecto de la eliminación o la alteración de genes particulares en el avance del ciclo celular.

En algunas realizaciones puede resultar útil formar imágenes de una línea celular que exprese de forma estable un marcador de fase del ciclo celular ligado a un gen analíticamente relevante. Así, por ejemplo, los procedimientos presentados en el presente documento pueden ser empleados para estudiar una línea celular que haya sido transformado para expresar una proteína de fusión que comprenda GFP fusionada al dominio PSLD C terminal de la Helicasa B de ADN (disponible en GE Healthcare, anteriormente Amersham Biosciences, según se describe en la publicación de patente internacional número WO 2006/008542). Un marcador de fase de ciclo celular es un sensor basado en una proteína fluorescente que proporciona una indicación del estado del ciclo celular de células individuales en una población asíncrona. El dominio de helicasa B de la proteína de fusión se mueve entre el núcleo y el citoplasma durante el avance del ciclo celular, creando así diferentes patrones de fluorescencia a medida que la célula se mueve a través del ciclo celular. En las células G1, la fluorescencia nuclear es mayor que la fluorescencia citoplasmática (N>C), mientras que las células en fase S tienen una fluorescencia distribuida por igual (N=C) y las células G2 tienen un citoplasma claro con núcleos oscuros (C>N). Las presentes técnicas emplean algoritmos de análisis por ordenador para segmentar núcleos automáticamente en base a este efecto diferencial de tinción y generar representaciones simples y significativas de los resultados.

En la Fig. 2 se muestra el procedimiento 40 de análisis por ordenador usado para clasificar células en diversas etapas del ciclo celular. En la etapa 42, el sistema 10 de formación de imágenes obtiene imágenes bidimensionales 44 (véase la Fig. 3) de células tincionadas con un marcador apropiado de tinción en el transcurso del tiempo. aunque

el número de las imágenes y el tamaño de las imágenes pueden variar, el sistema 10 de formación de imágenes puede obtener generalmente un número suficiente de imágenes en una cantidad de tiempo suficientemente prolongada para generar un volumen 48 de imagen tridimensional en la etapa 46. Por ejemplo, un sistema de formación de imágenes puede obtener aproximadamente 100 imágenes de 1280\*1280 píxeles de tamaño, cada una tomada con una separación de aproximadamente 30 minutos. En la etapa 50, el volumen de imagen tridimensional es segmentado en núcleos oscuros 51 y núcleos claros 52. Los núcleos oscuros 51 son segmentados usando una implementación tridimensional de conjuntos de nivel limitada con una elevada curvatura y una fuerte atracción hacia los bordes para evitar que la superficie en evolución escape de los núcleos hacia el segundo plano. El paradigma del conjunto de nivel es que sea un procedimiento numérico para seguir la evolución de contornos y superficies. En vez de manipular el contorno directamente, el contorno está embebido como conjunto de nivel cero de una función dimensional superior denominada función del conjunto de nivel,  $\psi(X,t)$ . Se hace entonces que la función del conjunto de nivel evolucione bajo el control de una ecuación diferencial. En cualquier momento, el contorno en evolución puede ser obtenido extrayendo de la salida el conjunto de nivel cero  $\Gamma((X), t) = \{\psi(X, t) = 0\}$ . Las principales ventajas del uso de conjuntos de nivel es que pueden modelarse formas arbitrariamente complejas y pueden manipularse implícitamente cambios topológicos, como la fusión y la escisión.

Una ecuación ejemplar de conjunto de nivel está dada por:

$$\left( \frac{d}{dt} \right) \psi = \alpha A(x) \cdot \nabla \psi - \beta P(x) |\nabla \psi| + \gamma Z(x) \kappa |\nabla \psi|$$

siendo A un término de advección, siendo P un término de propagación (expansión) y siendo Z un término modificador espacial para la curvatura media  $\kappa$ . Las constantes escalares  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ponderan la influencia relativa de cada uno de los términos en el movimiento de la interfaz.

En una realización alternativa, la ecuación del conjunto de nivel puede ser expresada como:

$$\left( \frac{d}{dt} \right) \psi = \alpha \nabla g \cdot \nabla \psi - \beta (\lambda g + (1 - \lambda) s(D)) |\nabla \psi| + \gamma g \kappa |\nabla \psi|$$

Aquí, g es una función decreciente del gradiente de imagen,  $\lambda$  es un parámetro de ponderación y s(D) se describe más abajo. Esta función g da como resultado una imagen de velocidad que es cercana a 1 en áreas de gradiente reducido y cercana a 0 en áreas de gradiente elevado, de modo que el conjunto de nivel se ralentiza en los bordes. La función g puede configurarse en base a una función sigmoide. Si el conjunto de nivel tiene fugas, avanzará rápidamente en el segundo plano y, si se le permite propagarse, el conjunto de nivel de estos núcleos de borde débil acaban uniéndose con otros núcleos y den como resultado segmentaciones no utilizables. En las presentes técnicas, puede incrementarse la fuerza de advección, lo que atrae el conjunto de nivel a los bordes, y la fuga disminuye sustancialmente. El perfil de intensidad siempre cambiante del sensor dinámico del ciclo celular produce frecuentemente gradientes dentro del núcleo; por lo tanto, una fuerza de advección intensa puede hacer que el conjunto de nivel quede fijada en mínimos locales dentro del núcleo. En realizaciones en las que no hay presente borde alguno en el límite del núcleo, y la fuerza de advección puede no limitar el conjunto de nivel, puede implementarse una limitación de tamaño, o el conjunto de nivel puede incorporar un conocimiento previo de las ubicaciones de los núcleos.

Puede usarse un conjunto de puntos de semilla para inicializar la evolución tridimensional del conjunto de nivel. Una etapa de colocación de semillas que emplea una correlación cruzada normalizada con una plantilla a múltiples escalas en combinación con un conjunto de características de bajo nivel sitúa puntos de semilla cerca del eje medial de una célula. En base a esta observación, puede construirse un modelo de la ubicación del borde nuclear a partir de una correspondencia de la función de distancia desde las semillas que afectará a la velocidad de la función del conjunto de nivel. Puede usarse una función sigmoide para la función de correspondencia, porque da como resultado una variación suave de los valores de velocidad y los parámetros pueden ser fijados para que el paso por cero de la función de velocidad ocurra en el tamaño nuclear esperado. La función sigmoide usada puede ser:

$$s(D) = (2 * 1 / (1 + \exp(-(D - \beta) / \alpha))) - 1$$

en la que s(D) es la velocidad que depende de la distancia D,  $\beta$  está fijada al tamaño esperado de la célula y  $\alpha$  controla la pendiente de la curva. La multiplicación escalar y los factores de resta llevan a una función que produce velocidades entre 1 y -1. Así, en vez de actualizar el modo en cada iteración, como hacen algunos otros procedimientos, solo precisa ser calculado al comienzo, lo que lleva a un aumento en la eficiencia del cálculo. La función sigmoide descrita en lo que antecede puede ser aplicada al término de propagación de la ecuación del conjunto de nivel para ralentizar este término a medida que se expande el conjunto de nivel. Para incorporar esta limitación en la ecuación del conjunto de nivel, la ecuación puede ser equilibrada contra la función de borde g que ya está multiplicada por el término de propagación. Una variable  $\lambda$  puede controlar el peso relativo de estas fuerzas de borde y distancia. A medida que aumenta  $\lambda$ , más peso se da a la función de borde y menos a la función de distancia.

Dado que los términos de curvatura y advección no han sido afectados por la función sigmoide, estos términos pueden seguir regulando la curva y atrayéndola a los bordes, respectivamente. Así, en presencia de gradientes intensos, la fuerza de advección cobrará preeminencia a medida que el conjunto de nivel evolucione y se fije a los bordes como antes. Sin embargo, en presencia de bordes débiles, la limitación de forma/tamaño evitará que el conjunto de nivel crezca sin límite.

Los núcleos claros 52 son segmentados usando una técnica de crecimiento de regiones. A medida que las células avanzan en el ciclo celular, la intensidad del núcleo pasa de claro a oscuro y luego otra vez a claro cuando las células se escinden en células hijas. Aunque los núcleos oscuros 51 son segmentados usando una implementación de conjuntos de nivel, los núcleos claros 52 en las fases M y G1 se caracterizan por una intensidad de imagen muy clara, y estos núcleos claros 52 pueden ser segmentados un procedimiento de crecimiento de regiones partiendo de un umbral conservador. Las células en la fase S restante se mezclan con el segundo plano y, así, es preciso que sean puenteadas usando limitaciones espaciales tridimensionales.

Las pistas tridimensionales de los núcleos segmentados en las diferentes fases se combinan entonces usando un algoritmo de enlace en la etapa 54, descrita con más detalle en lo que sigue. Para combinar y puentear todas estas fases, los procedimientos de enlace dan como resultado "árboles" de núcleos tridimensionales plenamente conectados que describen la evolución de las células a través de sus ciclos celulares. Así, el procedimiento permite el seguimiento digital del movimiento y la división de las células, así como del estado del ciclo celular, produciendo "árboles" codificados por color (o codificados visualmente de otra manera) en la etapa 56. A partir de esta imagen 58 de salida, pueden determinarse la ubicación espacial, el tamaño nuclear (representado por la forma de la sección transversal del árbol) y la posición de la célula en el ciclo. El algoritmo permite el usuario seguir la historia de las células en el espacio y el tiempo en conjunción con la medición de la salida de cualquier marcador celular dinámico (por ejemplo, un marcador basado en GFP u otro marcador dinámico) en el tiempo entre una población de células, proviniendo cada "rebanada" tridimensional de datos de una trama separada de un lapso de tiempo. El intervalo de la trama puede ser segundos, minutos u horas, dependiendo de las características temporales del sensor y del proceso celular que se esté estudiando. Estas realizaciones de las técnicas dadas a conocer emplean estructuras informadoras autofluorescentes introducidas genéticamente que permiten así el análisis automático por ordenador del ciclo celular a lo largo de periodos de tiempo prolongados sin necesidad de tincionar el núcleo. Además, los procedimientos generales de seguimiento proporcionados en el presente documento permiten la segmentación y la representación tridimensionales de las diversas etapas del ciclo celular. Tal representación tridimensional del ciclo celular puede permitir que se extraiga una conclusión biológicamente relevante a partir de los datos de la formación de imágenes. Por ejemplo, la representación tridimensional puede permitir la visualización de perturbaciones del ciclo celular, lo que puede permitir que se extraigan conclusiones relativas a la efectividad de un agente terapéutico particular de bloqueo del ciclo celular. Tal visualización puede ser en el ámbito de una población de células o en el ámbito de una sola célula dentro de la población.

La Fig. 3 es una imagen bidimensional ejemplar 44 de una célula tincionada que puede ser obtenida con el sistema 10 de formación de imágenes usando las presentes técnicas. El análisis de imágenes para lograr el seguimiento de las células y el análisis del ciclo celular en ausencia de un marcador nuclear no dinámico separado dan como resultado un cambio en la distribución de la fluorescencia a través del ciclo celular. El procedimiento de análisis es capaz de registrar núcleos claros en células G1 y de inferir la posición nuclear a partir de los "agujeros" dejados en el citoplasma en las células G2, mostradas como puntos oscuros dentro de un citoplasma tincionado de forma clara.

Después de que se haya obtenido una serie de imágenes bidimensionales 44 de lapsos de tiempo, las imágenes 44 pueden ser preprocesadas para eliminar ruido e identificar semillas de núcleos. La Fig. 4 muestra una técnica ejemplar 60 de preprocesamiento. En primer lugar, las imágenes se suavizan usando un algoritmo de suavización de conjuntos de nivel en la etapa 62. A continuación, las semillas son detectadas automáticamente en la etapa 64 usando un modelo normalizado de correlación cruzada de los núcleos, seguido por una etapa 66 de clasificación de semillas. En la etapa 68 el segundo plano es enmascarado usando una combinación de restricciones de umbral, basadas en los bordes y de curvatura para segmentar la mayoría del segundo plano mientras que se evitan los núcleos oscuros. Los núcleos oscuros en las imágenes bidimensionales de lapsos de tiempo son entonces segmentadas (véase la Fig. 2) como un volumen tridimensional 48 usando procedimientos de conjunto de nivel.

Las imágenes son suavizadas en primer lugar en el espacio bidimensional en la etapa 62 usando un enfoque de conjuntos de nivel basado en la curvatura para eliminar el ruido espurio mientras se mantienen los bordes de los núcleos. El procedimiento escogido para la suavización es la ecuación de difusión modificada de curvatura, que es un conjunto de nivel análogo de la ecuación de difusión anisotrópica. La ecuación para este tipo de suavización está dada por:

$$f_t = |\nabla f| \nabla \cdot c(|\nabla f|) \frac{\nabla f}{|\nabla f|}$$

en la que el término de la curvatura modificada por la conductancia es:

$$k = \nabla \cdot \frac{\nabla f}{|\nabla f|}$$

Para hacer evolucionar un conjunto de nivel, pueden definirse semillas iniciales en la etapa 64. Puede emplearse un enfoque en dos etapas para una creación de semillas bidimensionales: la correlación cruzada con un núcleo anular seguida por la clasificación de puntos. La correlación cruzada normalizada con un núcleo anular que es positiva dentro de la banda del anillo, negativa dentro y cero fuera produce valores de correlación elevados para los núcleos, que son estructuras oscuras rodeadas por citoplasma claro. Dar un valor umbral a la imagen de correlación puede así detectar los núcleos de forma eficaz. Sin embargo, la etapa 64 puede también producir varias detecciones en el segundo plano, dado que los segmentos en segundo plano rodeados por el citoplasma de células cercanas tienen un aspecto similar al de los núcleos. Para paliar este problema, la etapa de la detección de puntos puede ser seguida por una etapa 66 de clasificación de puntos de semilla que use medidas de la curvatura del borde. En primer lugar se lleva a cabo una etapa de detección de bordes basada en Canny. Los bordes resultantes son separados en los que tienen curvatura positiva, curvatura negativa y curvatura cero. A continuación un conjunto de puntos de semilla de entrenamiento es clasificado manualmente en las categorías de núcleos fuertes, núcleos débiles y segundo plano a partir de una imagen de entrenamiento. Para cada uno de los puntos de entrenamiento, se evalúa una región de interés alrededor del punto, y se mide el número de bordes con curvatura positiva, así como la magnitud de esos bordes. Los núcleos son clasificados con dos medidas, porque los bordes alrededor de los núcleos generalmente tienen curvatura positiva porque los núcleos comprenden estructuras oscuras rodeadas por estructuras claras. Típicamente, los bordes con curvatura positiva alrededor del segundo plano son generalmente menores en número y magnitud y, así, pueden no afectar significativamente la clasificación de los núcleos con curvatura positiva alrededor de los bordes.

Puede usarse un clasificador discriminante lineal de Fisher para separar el diagrama de dispersión de puntos de semilla en núcleos en contraposición con el segundo plano. Cada punto de entrenamiento está representado como un punto en este diagrama de dispersión de clasificación. El eje x representa la suma del número de bordes de curvatura positiva debajo de la máscara, y el eje y representa la suma de la magnitud de estos bordes. Usando esta línea de clasificación, se clasifican entonces los puntos generados automáticamente a partir de la etapa de correlación cruzada normalizada para el ensayo de imágenes.

En la etapa 68 se usa un algoritmo de enmascaramiento del segundo plano que captura la mayor parte del segundo plano para eliminar más semillas candidatas y evitar que el conjunto de nivel "túnel" tridimensional tenga fugas hacia el segundo plano. En base a las características de intensidad de la imagen, este algoritmo da a la imagen un valor umbral conservador para extraer partes que están en el segundo plano, pero no en los núcleos oscuros. El algoritmo hace crecer entonces estas regiones con un conjunto de nivel usando una combinación de un umbral superior con una medida y una curvatura de gradiente. Con las imágenes suaves, las semillas y el segundo plano enmascarado en vigor, puede entonces llevarse a cabo la segmentación del conjunto de nivel tridimensional en el volumen 48 de imagen tridimensional descrita en la Fig. 2.

La Fig. 5 muestra un volumen 48 de imagen tridimensional. Los núcleos en la fase G2 pueden verse como túneles oscuros que se abren paso a través del volumen. Dado que una célula que se propague normalmente pasa la mayor parte de su tiempo en esta fase, la segmentación de estos túneles oscuros facilita la clasificación de las células dentro del ciclo celular. Se contempla que un operador pueda seleccionar secciones o vistas individuales del volumen 48 de imagen tridimensional para un análisis más detallado. Por ejemplo, dado que el volumen 48 de imagen tridimensional se forma a partir de una serie de imágenes bidimensionales de lapsos temporales, un operador puede ser capaz de seleccionar imágenes bidimensionales 44 individuales del volumen 48 de imagen tridimensional para ver una población de células en una etapa temporal particular. El operador puede entonces hacer avanzar o retroceder las imágenes bidimensionales individuales 44 moviéndose por el espacio en el volumen 48 de imagen tridimensional. De manera alternativa, un operador puede ver una célula individual en el transcurso del tiempo en el volumen 48 de imagen tridimensional. Tal vista puede ser un árbol codificado visualmente (véase la Fig. 6), enlazando la célula individual con sus células hijas. Un operador puede entonces pasar de vistas de árbol de células individuales al volumen 48 de imagen tridimensional o a una serie de imágenes bidimensionales 44. Además, un operador puede también pasar de una vista representativa de un volumen 48 de imagen tridimensional, un árbol codificado visualmente o una imagen bidimensional 44 para obtener datos que se relacionan ya sea con una célula individual o con una población de células. Por ejemplo, un operador puede pasar de una vista de árbol a un fichero de datos que incluya datos relativos a las células precursora e hijas representadas en el árbol. El volumen 48 de imagen tridimensional puede permitir que un operador vea múltiples representación visuales de los datos de formación de imágenes para facilitar el análisis y el seguimiento del avance del ciclo celular. Además, el volumen 48 de imagen tridimensional puede también permitir que un operador acceda directamente a los datos no tratados obtenidos de las imágenes para un procesamiento adicional.

La Fig. 6 es una representación de las fases del ciclo celular como un árbol codificado visualmente. Según se representa, las presentes técnicas pueden seguir el avance de una célula individual con un volumen 48 de imagen tridimensional. Se muestran los árboles codificados de tres células precursoras y de sus correspondientes células hijas. Los algoritmos segmentan en primer lugar la fase G2, que es la que más dura, y luego se enlazan a lo largo de



las otras fases para localizar las correspondientes células hijas. Para obtener una estructura en árbol tridimensional completo, una etapa subsiguiente conecta entre sí las correspondientes segmentaciones de la fase G2 haciendo un seguimiento a lo largo de las otras fases. En una realización, las células precursoras e hijas fueron asociadas minimizando una distancia euclídea.

- 5 En otra realización, puede usarse un procedimiento de marcha rápida para asociar las células precursora e hijas. La Fig. 7 es un diagrama de flujo que describe tal procedimiento 70. Para implementar este modelo, se elige un punto de inicio al final de la fase G2 de una célula precursora. En el inicio 72, el control se pasa a la etapa 74, en la cual un procesador encuentra la imagen de velocidad para todo el dominio desde la célula precursora. El algoritmo de marcha rápida se realiza en la imagen de velocidad en la etapa 76, permitiendo que un procesador escoja las dos células hijas más cercanas para asociarlas con la precursora en la etapa 76. En la etapa 80, el algoritmo puede extraer las rutas a las células hijas usando la caída de gradiente desde las hijas a la precursora. Después de la etapa final 82, este algoritmo da como resultado una correlación cruzada de tiempo para cada punto de la imagen, y las células hijas de la precursora pueden ser determinadas encontrando las dos fases G2 segmentadas cuyos puntos de inicio tengan los tiempos menores.
- 10
- 15 En el proceso de resolución de la ecuación de la eikonal, también los gradientes pueden ser generados. Usando estos gradientes, puede determinarse entonces la ruta mínima desde la precursora a las dos hijas ejecutando un procedimiento de caída de gradiente desde las hijas a la precursora, según se ha descrito más arriba. Más específicamente, el procedimiento de marcha rápida es un procedimiento para resolver una ecuación de tiempo de llegada descrito por la ecuación de la eikonal:

$$|\nabla T| F = \sqrt{\left(\frac{\partial T}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial T}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial T}{\partial z}\right)^2} F(x, y, z) = 1$$

- 20 en tres dimensiones, en la que  $F(x,y,z)$  es la correlación de velocidad o función de costos y  $T$  es la correlación cruzada de tiempo para cada punto del dominio. Dado un punto de inicio, el procedimiento de marcha rápida construye la solución hacia el exterior desde la condición límite escogiendo el tiempo menor en cada etapa de su evolución. Dado que solo se permite que la curva en evolución pase por cada punto una sola vez, puede ser resuelta sin iteración, lo que la hace muy rápida. El dominio en el que viaja el objeto también puede tener una métrica ponderada para que el primer plano pueda evolucionar más rápido en algunas áreas que en otras. Este procedimiento puede ser usado para resolver problemas de planificación en los que la meta es encontrar la ruta más corta entre una posición inicial y una posición final. El procedimiento de marcha rápida se usa para encontrar la correlación cruzada de tiempo para la evolución de la curva desde un punto A de inicio. A continuación, dado cualquier punto Z en el dominio, se construye la ruta más corta propagándose de Z a A usando la caída de gradiente resolviendo la ecuación diferencial ordinaria  $dx/dt = -\nabla T$  dada la condición inicial  $x(0)=Z$ . Se ha usado este procedimiento para aplicaciones tales como encontrar la ruta óptima para objetos en movimiento a través de laberintos en los que se define que la función de costos (binarios en este caso) es cero en las paredes y la unidad en los demás sitios. En el problema de planificación de rutas, la parte más importante es definir una función de costos apropiada. Dado que la fase de la célula en los conjuntos de datos de los marcadores de la fase celular está definida por el nivel de fluorescencia del marcador, la función de costos se basa en la intensidad nuclear. En este modelo, la función de costos pasa de enfatizar los núcleos claros a los núcleos oscuros a lo largo de las pistas. En otras palabras, el costo es bajo (movimiento rápido) en los núcleos claros y elevado en las áreas oscuras al comienzo de la pista y gradualmente pasa a un costo bajo para los núcleos oscuros y un costo elevado para las áreas claras. La función de velocidad se halla estableciendo una correlación de las intensidades con una función sigmoide. Después de la ejecución del algoritmo 70 de marcha rápida, los "túneles" segmentados en el volumen 48 de imagen tridimensional se enlazan con sus células hijas para crear "imágenes en árbol" bastas, según se muestra en la Fig. 6.
- 25
- 30
- 35
- 40

- La Fig. 8 y la Fig. 9 son visualizaciones esquemáticas alternativas para estudiar los efectos de fármacos antiproliferativos en el avance del ciclo celular. Tales representaciones de árboles y ramas de datos de complejidad elevada pueden permitir la visualización de variaciones en muchos parámetros que caracterizan la modificación del ciclo celular. Tales variaciones pueden incluir cambios intralinaje e interlinaje en la duración de las fases del ciclo celular (longitud del color en la rama), en los bloqueos del ciclo celular (rama alargada del árbol de un solo color), en la mitosis acelerada o retardada (distancia entre nodos de las ramas), en la morfología nuclear (espesor de la rama), en la endorreduplicación del ADN (replicación del ADN durante la fase S) o en la fragmentación nuclear (escisión de las ramas en ramillas) y en la muerte celular (terminación de las ramas). En la Fig. 8, la imagen muestra una sola célula que se escinde en el transcurso del tiempo, siendo el eje vertical el tiempo y estando codificadas las fases. El árbol también puede indicar aproximadamente cuánto tiempo pasa la célula en cada fase del ciclo celular. La Fig. 9 es una imagen esquemática que muestra "rebanadas" individuales que pueden corresponder a cada imagen bidimensional original. En cualquier caso, tales visualizaciones pueden proporcionar información útil a un investigador en cuanto a los efectos de un compuesto terapéutico potencial en el avance del ciclo celular. Por ejemplo, dado que cada volumen 48 de imagen tridimensional puede generar múltiples árboles, estos árboles pueden ser promediados para proporcionar una imagen de árbol compuesta que detalle la longitud media de tiempo en cada ciclo celular. Tal árbol compuesto puede ser comparado con otros árboles, como controles, para proporcionar una estimación de la alteración del ciclo celular.
- 45
- 50
- 55

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para hacer un seguimiento automáticamente de una fase del ciclo celular de una célula, comprendiendo el procedimiento las etapas de: generar un volumen tridimensional espacio-temporal a partir de una serie de imágenes bidimensionales de una o más células tomadas en el transcurso del tiempo; y llevar a cabo un análisis por segmentación del volumen tridimensional para clasificar las una o más células en una fase G1, S, G2 o M del ciclo celular en el transcurso del tiempo, en el que la realización del análisis por segmentación comprende las etapas de: identificar tubos claros y oscuros dentro del volumen tridimensional; llevar a cabo una segmentación tridimensional usando conjuntos de nivel en los tubos oscuros para clasificar las células en una fase G2 del ciclo celular; y clasificar los tubos claros en fases G1, M o S del ciclo celular usando un análisis de enlace.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la realización del análisis de enlace comprende una métrica de distancia euclídea para identificar una célula hija de las una o más células.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2 en el que la realización del análisis de enlace comprende un procedimiento de marcha rápida para identificar una célula hija de las una o más células.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que las una o más células están marcadas con un agente de formación de imágenes.
5. El procedimiento de la reivindicación 4 en el que el agente de formación de imágenes comprende un marcador celular dinámico adaptado para cambiar de posición en la célula durante el avance del ciclo celular.
6. Un medio legible por ordenador para hacer un seguimiento automáticamente de una fase del ciclo celular de una célula que comprende: código para generar un volumen tridimensional espacio-temporal a partir de una serie de imágenes bidimensionales de una o más células tomadas en el transcurso del tiempo; y código para llevar a cabo un análisis por segmentación del volumen tridimensional para clasificar las una o más células en una fase G1, S, G2 o M del ciclo celular en el transcurso del tiempo, en el que el código para llevar a cabo el análisis por segmentación comprende: código para identificar tubos claros y oscuros dentro del volumen tridimensional; código llevar a cabo una segmentación tridimensional usando conjuntos de nivel en los tubos oscuros para clasificar las células en una fase G2 del ciclo celular; y código para clasificar los tubos claros en fases G1, M o S del ciclo celular usando un análisis de enlace.
7. El medio legible por ordenador de la reivindicación 6 en el que el código para llevar a cabo el análisis de enlace comprende código para una métrica de distancia euclídea para identificar una célula hija de las una o más células.
8. El medio legible por ordenador de las reivindicaciones 6 o 7 en el que el código para llevar a cabo el análisis de enlace comprende código para un procedimiento de marcha rápida para identificar una célula hija de las una o más células.

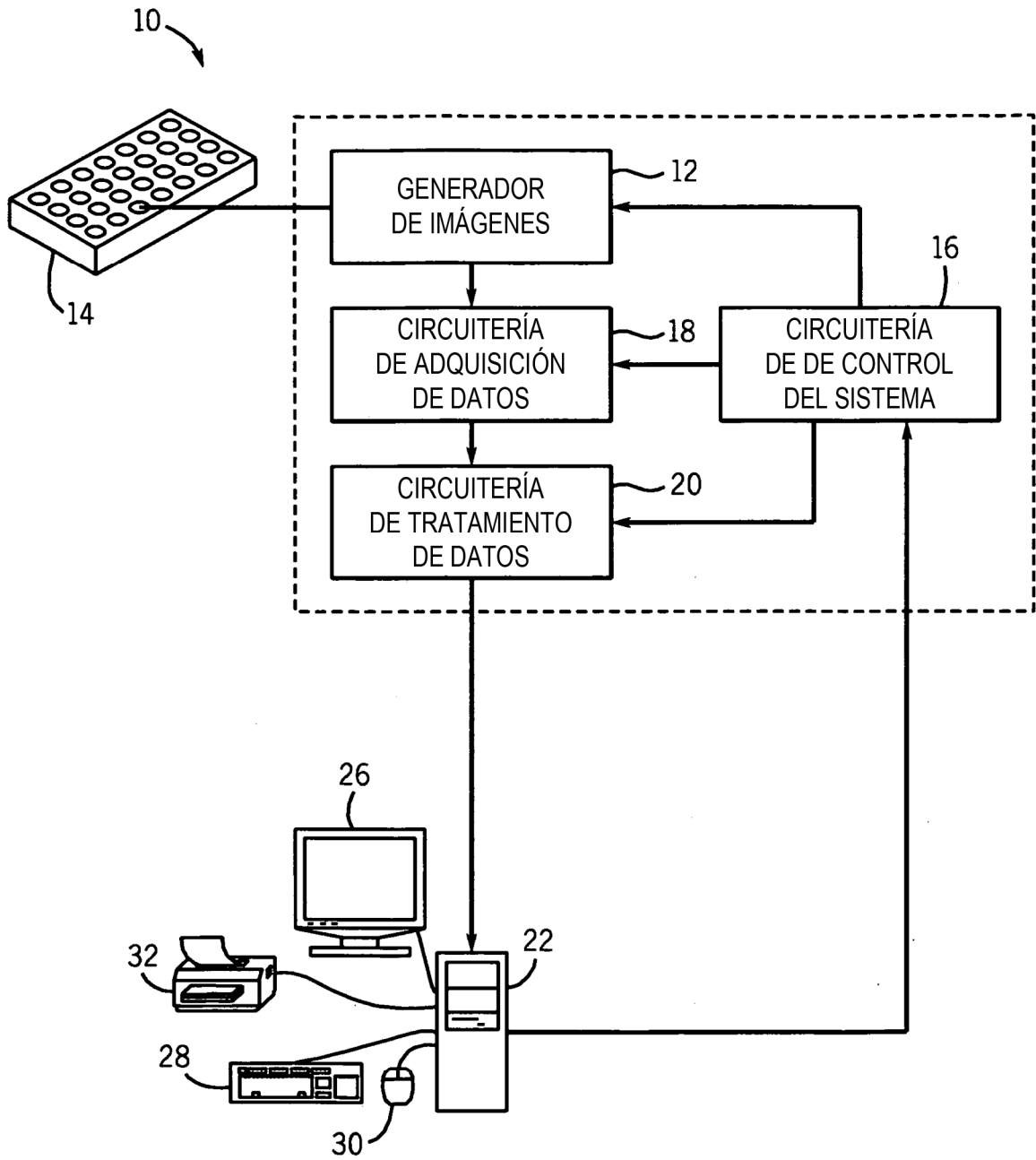
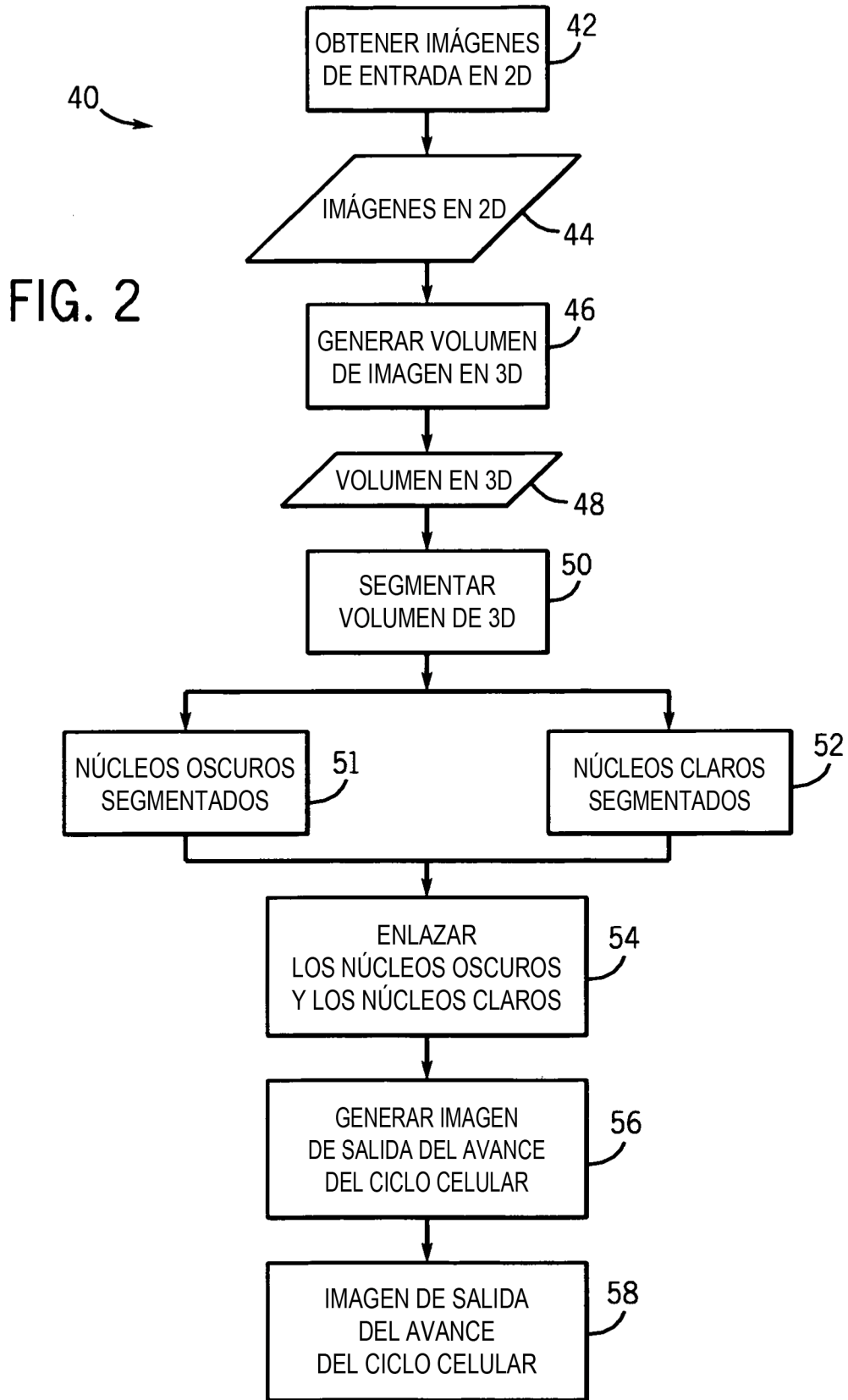


FIG. 1



44

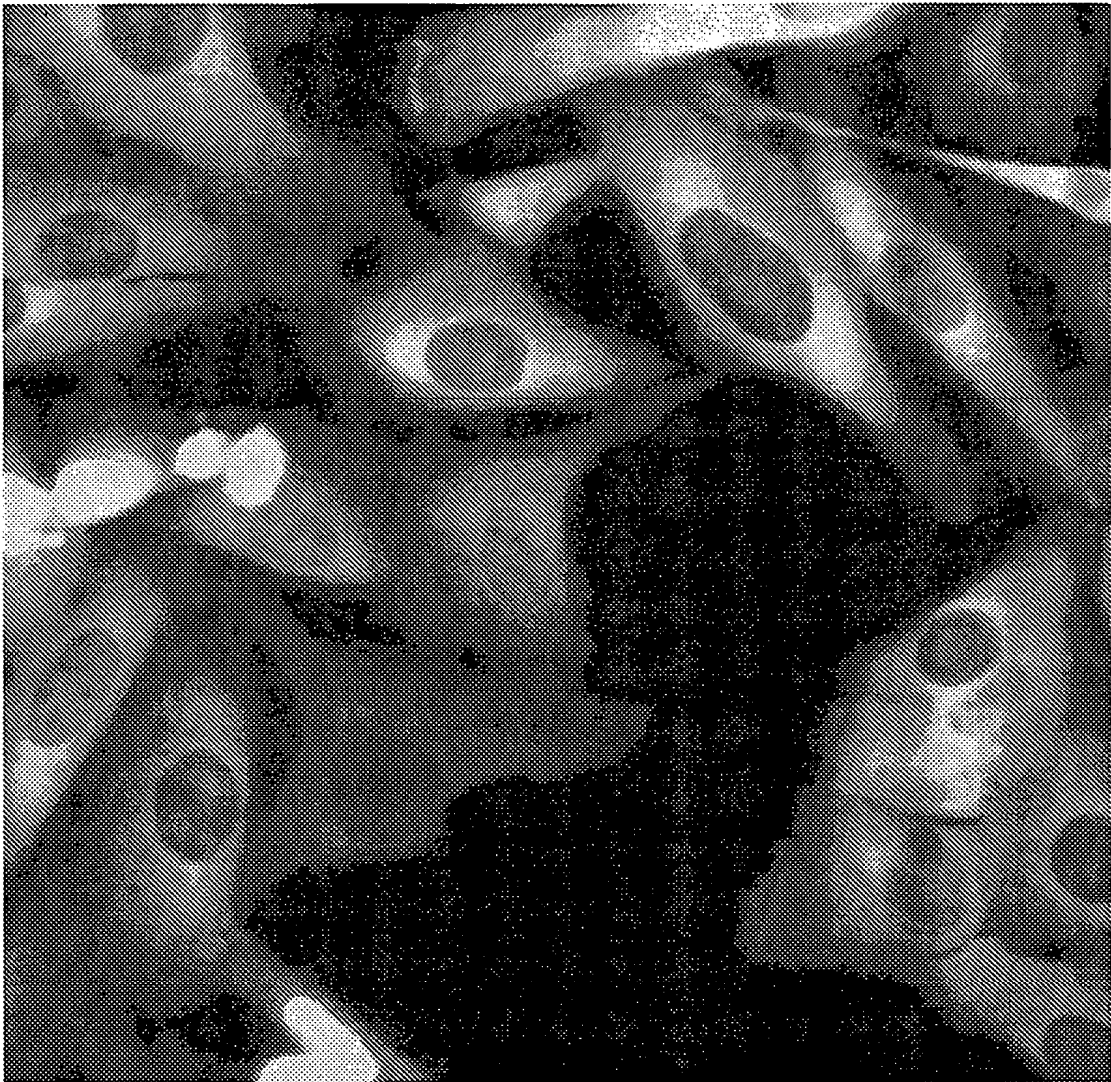


FIG. 3

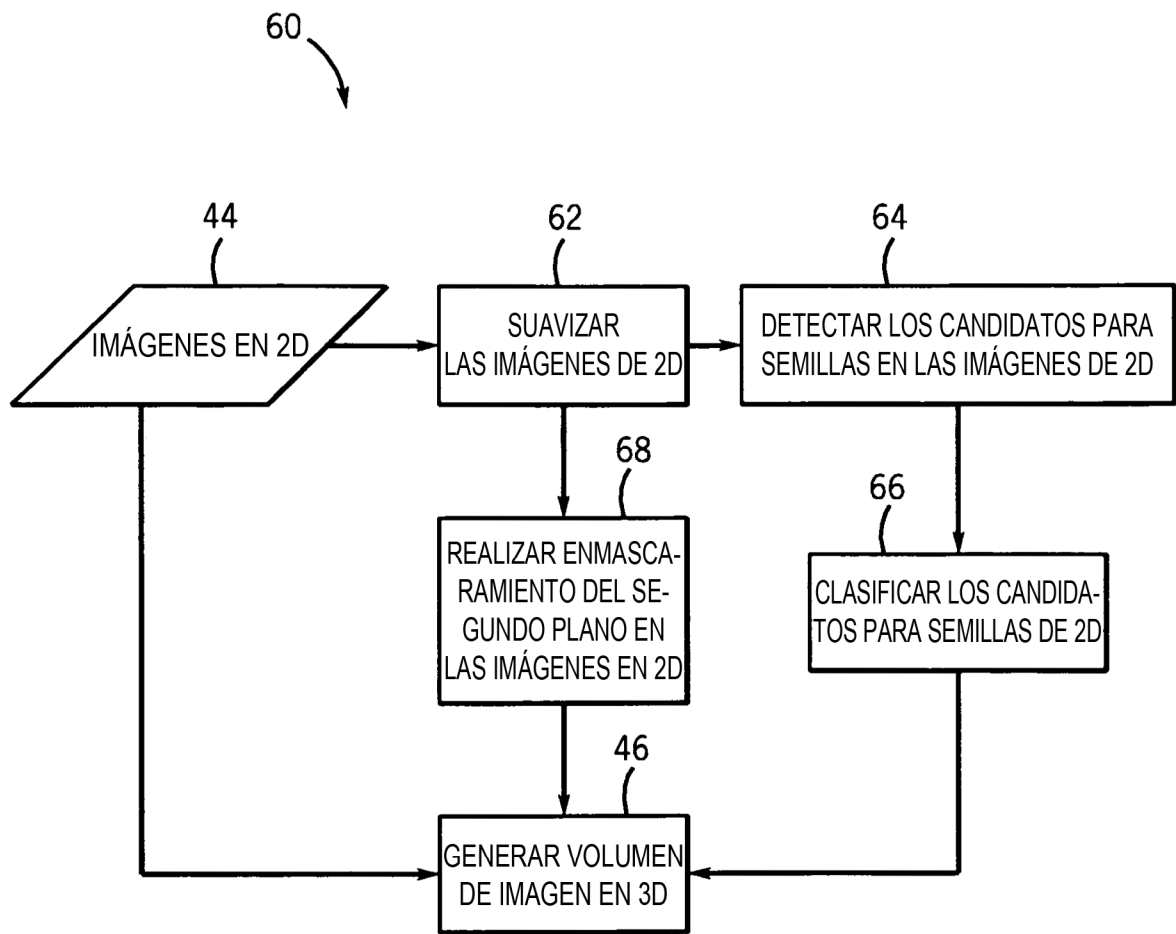


FIG. 4

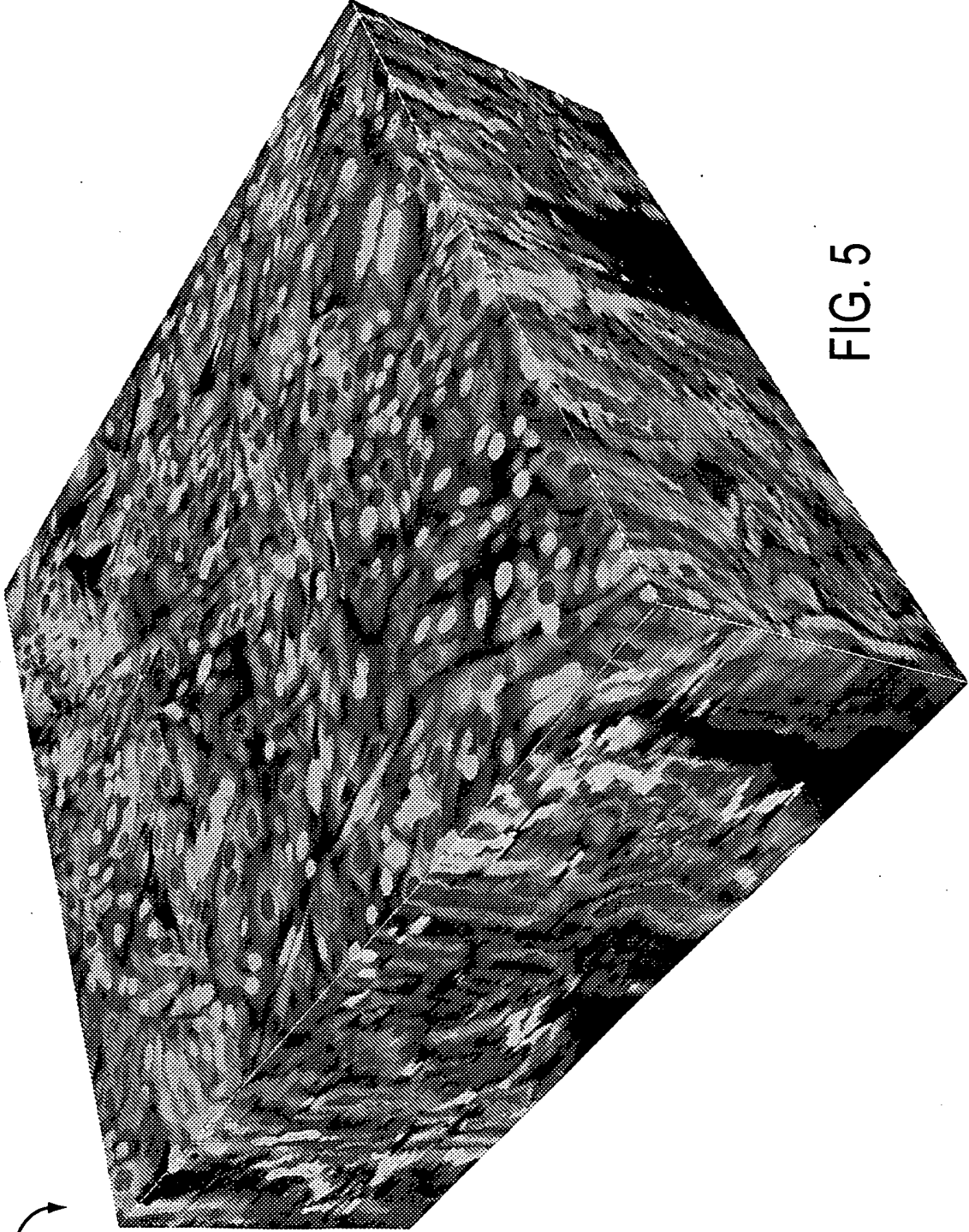


FIG. 5

48

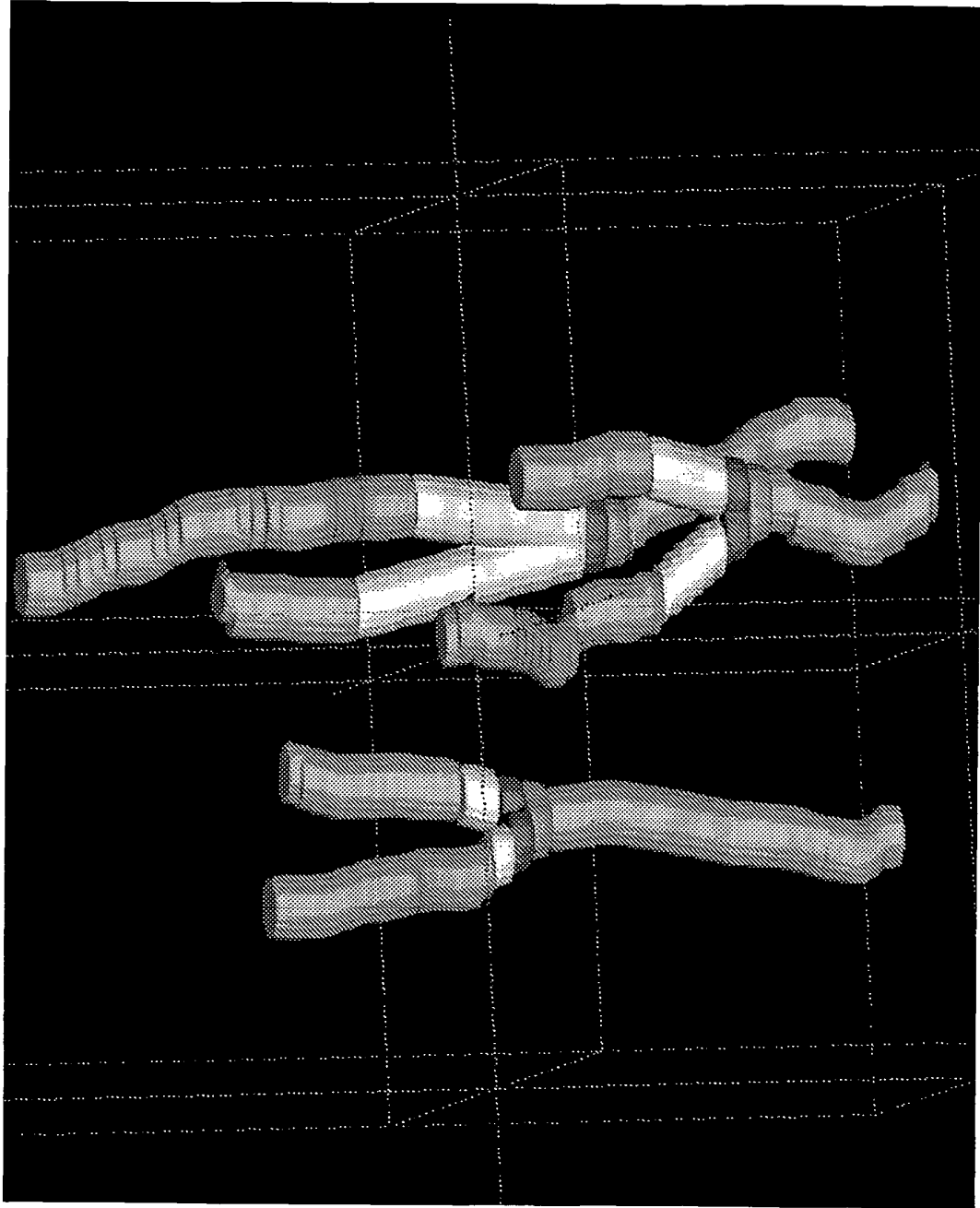


FIG. 6

58



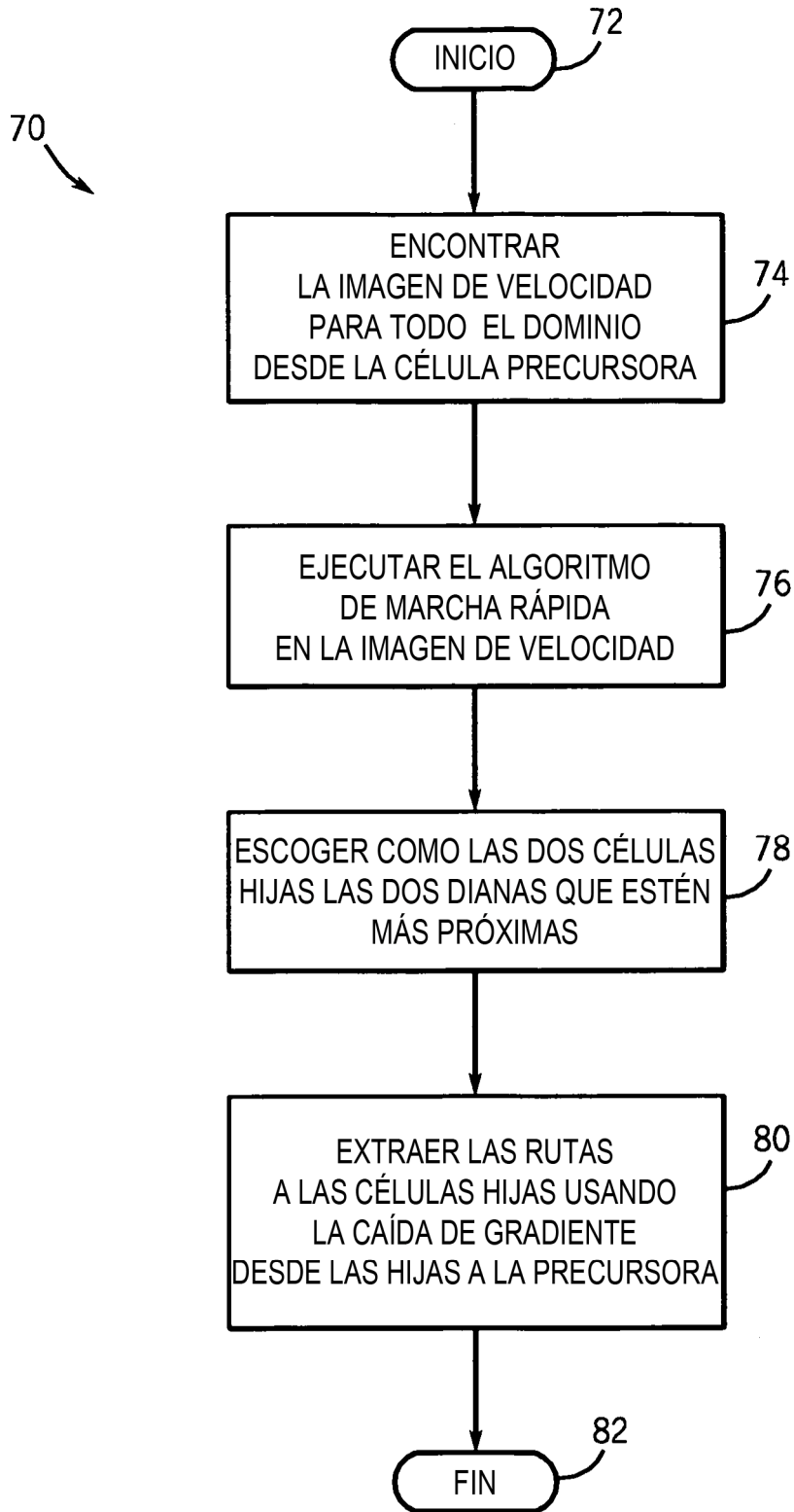


FIG. 7

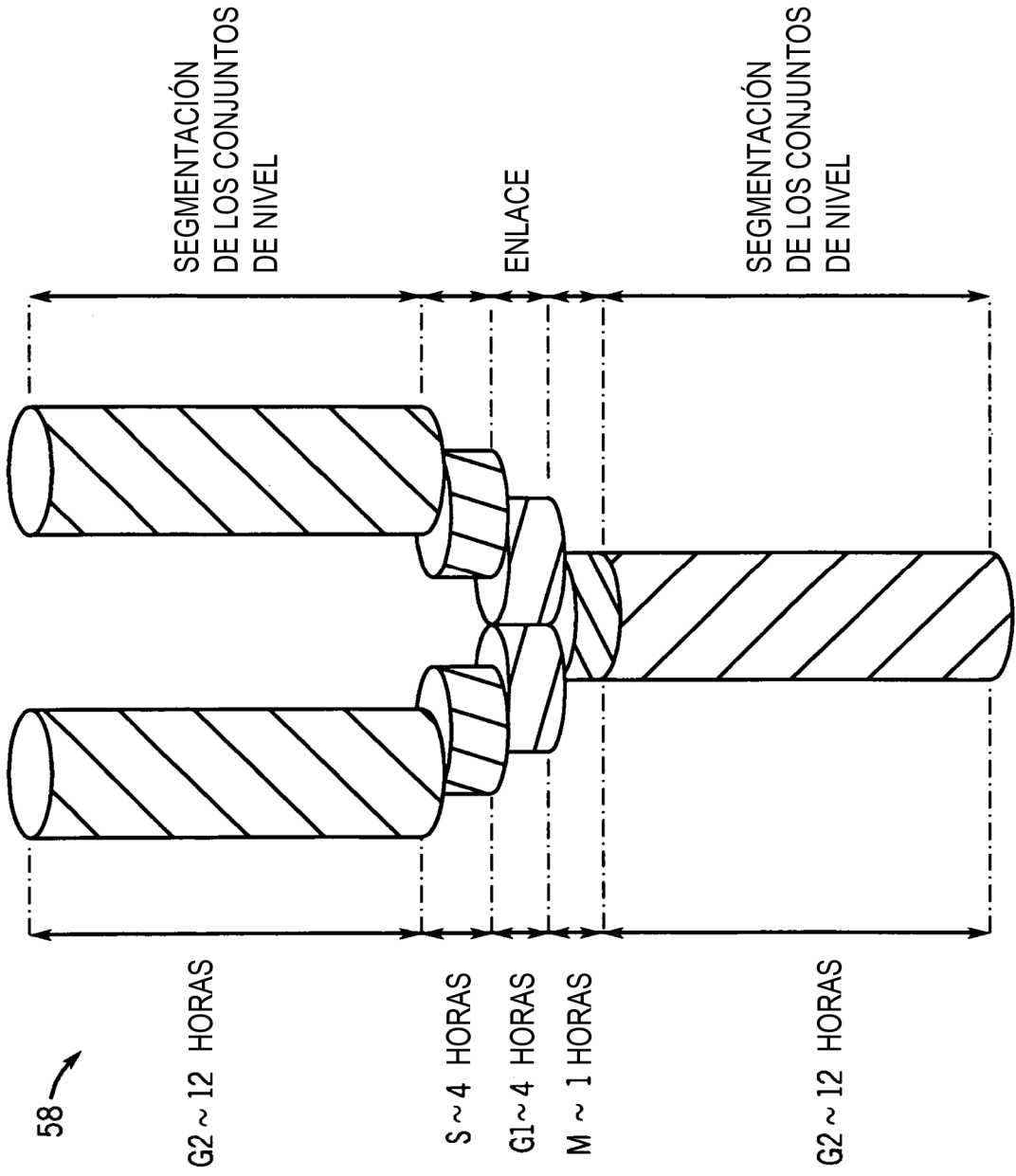


FIG. 8

FIG. 9

