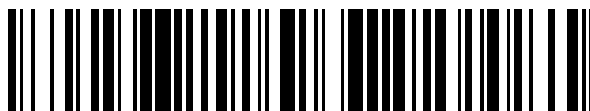


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 765**

51 Int. Cl.:

G06T 7/00 (2006.01)

G06T 7/40 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G02B 21/16 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2002 E 02739157 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1390747**

54 Título: **Sistemas y métodos para el análisis automatizado de células y tejidos**

30 Prioridad:

20.04.2001 US 285155 P

31.10.2001 US 334723 P

01.02.2002 US 62308

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

12.09.2014

73 Titular/es:

YALE UNIVERSITY (100.0%)

TWO WHITNEY AVENUE

NEW HAVEN, CT 06511, US

72 Inventor/es:

RIMM, DAVID L. y

CAMP, ROBERT L.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 493 765 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

Sistemas y métodos para el análisis automatizado de células y tejidos

1. Antecedentes de la invención

5 La tecnología de micromatrices de tejidos ofrece la oportunidad de realizar análisis de alto rendimiento de muestras de tejidos (Konen, J. et al., Nat. Med. 4:844-7 (1998); Kallioniemi, O.P. et al., Hum. Mol. Genet. 10:657-62, (2001); Rimm, D.L. et al., Cancer J. 7:24-31 (2001)). Por ejemplo, la capacidad de llevar a cabo rápidamente estudios a gran escala mediante el uso de micromatrices de tejidos puede proporcionar información crucial para identificar y validar objetivos farmacológicos / marcadores de pronóstico (p.ej. receptor de estrógenos (ER) y HER2/neu) y compuestos terapéuticos candidatos.

10 El análisis cuantitativo automatizado de muestras de tejidos en micromatrices, sin embargo, presenta varios retos, que incluyen la heterogeneidad de los cortes de tejido, la localización subcelular de la tinción, y la presencia de señales de fondo. Por ejemplo, dependiendo del tipo de tumor o corte de tejido que se analiza, el área de interés puede representar prácticamente toda la muestra, o solamente un pequeño porcentaje. Por ejemplo, un carcinoma pancreático o carcinoma lobulillar de mama con una respuesta desmoplásica sustancial puede mostrar un tejido estromal que representa un gran porcentaje del área total. Si el objetivo del ensayo es determinar la expresión de un marcador determinado en las células epiteliales, se debe usar un protocolo que estudie solamente esa región. El protocolo no solamente debe poder seleccionar la región de interés, sino también normalizarla, de forma que la lectura del nivel de expresión de cualquier área determinada se pueda comparar con el de otras áreas. La localización subcelular presenta retos similares. Las comparaciones de tinciones nucleares o membranosas, por ejemplo, son bastante diferentes de las de la tinción citoplásmica total.

20 Se han usado ciertos métodos (que incluyen la microscopía confocal y la microscopía de convolución / deconvolución) para cuantificar la expresión de proteínas a nivel celular (o subcelular) dentro de un único campo de gran aumento (Robinson, J.P. Methods Cell. Biol. 63:89-106 (2001); Shaw, P. Histochem. J. 26:687-94 (1994)). Sin embargo, éstas son técnicas computacionalmente intensivas y laboriosas, que funcionan con múltiples imágenes en serie. Como resultado, el estándar actual para el análisis de micromatrices de tejidos, como los cortes de tejidos, es el análisis convencional basado en patólogos y la clasificación de la muestra según una escala.

30 La mayoría de biomarcadores exhiben una distribución paramétrica (normal, "acampanada"), y por lo tanto la mejor forma de analizarlos es mediante una escala continua (p.ej., 0 a 1000). Desafortunadamente, la observación manual tiende a ser nominal (p.ej. 1+, 2+, 3+), principalmente porque el ojo humano es incapaz de distinguir con precisión diferencias nominales de intensidad de tinción. Se han desarrollado varios métodos para traducir las observaciones manuales nominales hasta una escala continua. El primero de éstos es el H-Score, en el que el porcentaje de células teñidas positivamente (0 a 100) se multiplica por la intensidad de la tinción (p.ej., 0 a 3) para producir una escala teóricamente continua (0 a 300). Sin embargo, la incapacidad de detectar diferencias sutiles de intensidad de tinción, en particular en los extremos bajo y alto de la escala, así como la tendencia a redondear los índices (p.ej., 35 50% a 3+ para un índice de 150, frente a 47% a 3+ para un índice de 141), limita la eficacia del H-Score.

El documento US 6.151.405 describe un sistema y método para clasificar muestras celulares. El sistema y método es para la determinación de la cantidad de marcador que identifica un precipitado en una muestra celular en un portaobjetos de microscopio.

40 El documento US 6.215.892 describe un método y aparato para el análisis celular automatizado de muestras biológicas, que escanea automáticamente a bajo aumento para adquirir imágenes que se analizan para determinar objetivos celulares candidatos de interés.

Agard D A: "Optical Sectioning Microscopy: Cellular Architecture in Three Dimensions" Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA, EE.UU., vol. 13, 1 de enero de 1984, páginas 191-219, ISSN: 0883-9182 se refiere al análisis de muestras biológicas en tres dimensiones.

45 El documento US 6.026.174 describe un sistema y método para detectar automáticamente células malignas y células que tienen cambios asociados a malignidad.

El documento WO 97/04418 describe un método para segmentar imágenes resueltas espectralmente. El método comprende la adquisición de tres imágenes de la misma escena micrográfica.

50 El documento WO 00/62247 describe un método para el análisis automatizado de imágenes de una muestra biológica mediante reconstrucción histológica, para analizar una muestra biológica que se ha teñido consecutivamente mediante un método de hibridación in situ o un método de inmunohistoquímica o una tinción de ácidos nucleicos, y con una contratinción.

55 Se necesitan sistemas y métodos automatizados para analizar rápidamente tejidos, que incluyen micromatrices de tejidos, que permitan la identificación y localización de biomarcadores identificados en los tejidos y otras muestras que contienen células.

2. Sumario de la invención

5 En un aspecto, la invención presenta sistemas y métodos para analizar rápidamente muestras que contienen células para localizar y cuantificar biomarcadores particulares dentro de las células. En una realización, el método se pone en práctica mediante un ordenador y superpone una imagen del biomarcador con una imagen de un área definida por el usuario dentro de la célula para determinar si el biomarcador está dentro del área definida por el usuario.

En otro aspecto, la invención presenta un algoritmo que facilita el análisis óptico de una matriz de muestras biológicas, a pesar de las irregularidades de la imagen, distorsiones, topologías variables, y la ausencia de uno o más elementos.

10 El análisis de las muestras de pacientes según los sistemas y procesos descritos en la presente memoria puede ser útil para el diagnóstico (p.ej. para identificar los pacientes que tienen una enfermedad particular, que han sido expuestos a una toxina particular o que están respondiendo bien a un agente terapéutico particular o trasplante de órganos) y para el pronóstico (p.ej. para identificar los pacientes que es probable que desarrollen una enfermedad particular, que respondan bien a un agente terapéutico particular o que vayan a recibir un trasplante de un órgano particular). A medida que se identifican nuevos y mejores marcadores de enfermedades en la era post-genómica, los
15 presentes procesos descritos, que no solamente cuantifican los marcadores, sino que también determinan su localización relativa dentro de una célula, tendrán una aplicabilidad incrementada.

20 El análisis automatizado de preparaciones que contienen células, como se describe en la presente memoria, puede proporcionar una determinación rápida del beneficio pronóstico de los biomarcadores. Además, estas técnicas automatizadas pueden identificar asociaciones que en general no se revelan mediante el uso de las técnicas manuales. Además, el análisis automatizado puede distinguir mejor las diferencias sutiles de intensidad de tinción, en particular en los extremos superior e inferior. La capacidad de detectar una expresión de nivel bajo y distinguirla de la ausencia de expresión puede proporcionar una información pronóstica importante. Además, el análisis de la distribución subcelular de ciertos biomarcadores puede dilucidar asociaciones previamente no reconocidas con la supervivencia de los pacientes.

25 Otras características, objetivos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras, descripción detallada y reivindicaciones.

3. Descripción de las figuras

30 La FIG. 1(A-D) muestra diferentes imágenes monocromáticas de un carcinoma de colon tomadas después de teñir con marcadores fluorescentes y combinarlas en una única imagen en color como sigue: DAPI (para visualizar los núcleos, azul), anti-citoqueratina (para distinguir los elementos tumorales de los no tumorales, verde), y anti-alfa-catenina (para visualizar las membranas celulares, rojo).

La FIG. 2(A-D) muestra una comparación de regresión de índices automatizados y basados en patólogos de los niveles de receptores de estrógenos.

35 La FIG. 3 es un diagrama de flujo de un método para identificar y explicar la localización relativa de los cortes en una matriz.

La FIG. 4 es un diagrama de flujo de un proceso para localizar una señal (p.ej. un biomarcador) en un lugar.

La FIG. 5 muestra una micromatriz de tejido.

La FIG. 6 muestra un sistema de microscopio óptico.

4. Descripción detallada

40 4.1 General

En general, en la presente memoria se describe un grupo de técnicas que se pueden usar para el análisis rápido y automatizado de muestras que contienen células, que incluyen tejidos y micromatrices de tejidos. Aunque estas técnicas se complementan entre sí y se describen como un proceso cohesivo, cada técnica tiene una amplia aplicabilidad y se puede usar individualmente o en combinaciones distintas de las descritas más adelante.

45 En una realización se presenta una técnica para identificar la localización de los cortes dentro de una imagen. La técnica, denominada "Spotfinder", puede identificar de manera flexible tales localizaciones a pesar de las irregularidades de la imagen, distorsiones, topologías variables, y la ausencia de uno o más elementos. Aunque el proceso se describe para localizar la posición de los cortes histológicos e identificar los cortes histológicos ausentes en imágenes de micromatrices de tejidos, la técnica tiene una aplicación más amplia. De manera más específica, se
50 puede usar para localizar elementos e identificar elementos ausentes en cualquier colección de elementos. Además, el proceso se puede usar en matrices de prácticamente cualquier dimensión y que comprenden una diversidad de elementos. Las muestras no están limitadas por su tamaño o forma, ni deben estar espaciadas de manera regular.

En otra realización, se presenta una técnica que se puede usar sola o junto con Spotfinder para localizar ópticamente y cuantificar un biomarcador dentro de una célula. Aunque una imagen de una preparación celular presenta en general dos dimensiones, las preparaciones celulares presentan profundidad. Por ejemplo, una característica celular puede hallarse sobre otra. Este solapamiento puede confundir potencialmente al programa de análisis de imágenes. Una técnica descrita en la presente memoria, denominada RESA (algoritmo de resta exponencial rápida), puede aproximarse a una imagen tridimensional restando elementos de imagen desenfocada. Así, se puede reducir el impacto de las características del fondo en una imagen, lo que permite un mejor análisis de imágenes.

Otra técnica descrita en la presente memoria, denominada PLACE (asignación de lugares basada en píxeles para la compartimentación de la expresión), distingue entre características celulares diferentes. Por ejemplo, la técnica puede determinar la localización de compartimentos subcelulares dentro de células individuales. Un ordenador que lleva a cabo esta técnica puede medir, por ejemplo, las intensidades relativas de las imágenes derivadas de tinciones específicas de compartimentos píxel a píxel. El ordenador determina entonces para píxeles individuales, en una imagen, la probabilidad de que el píxel corresponda a un lugar particular o área definida por el usuario dentro de la célula. Tal análisis permite que el ordenador asigne las señales a un compartimento subcelular con un grado establecido de exactitud (p.ej., 95%). La técnica puede co-localizar señales asociadas a biomarcadores particulares con imágenes de lugares definidos dentro de las células.

El uso de estas técnicas puede aumentar tanto la velocidad como la exactitud del análisis automatizado de micromatrices. La Figura 1 muestra diferentes imágenes monocromáticas de un carcinoma de colon tomadas después de teñir con marcadores fluorescentes y combinarlas en una única imagen en color como sigue: DAPI (para visualizar los núcleos, azul), anti-citoqueratina (para distinguir los elementos tumorales de los no tumorales, verde), y anti-alfa-catenina (para visualizar las membranas celulares, rojo) (panel A). Obsérvese el grado significativo de solapamiento entre los compartimentos subcelulares. Se toma una imagen monocromática del biomarcador β -catenina, (panel B, recuadro) y se redistribuye la intensidad de cada píxel en la imagen según la intensidad relativa de la señal de los diversos compartimentos en el panel A (azul = núcleos, rojo = membrana, verde = citoplasma).

Aunque la expresión de β -catenina en este tumor está asociada de manera predominante a la membrana, el solapamiento significativo de compartimentos en el panel A asigna de manera incorrecta una cantidad significativa de la señal al núcleo (píxeles magenta y azules, panel B). Para ayudar a eliminar las señales solapantes, la imagen monocromática de cada compartimento subcelular se resta exponencialmente de una imagen desenfocada. El Panel C muestra una composición de las imágenes restadas exponencialmente de DAPI y anti-alfa-catenina (azul y rojo, respectivamente), mostradas sobre una máscara derivada de la máscara anti-citoqueratina (píxeles verdes). Los píxeles con demasiado solapamiento entre canales se invalidan (<5%), ya que no son áreas tumorales, tal como se define mediante una máscara generada a partir de la imagen de anti-citoqueratina. En el Panel D, la intensidad de la señal de una imagen restada exponencialmente del biomarcador (β -catenina, recuadro) se redistribuye después según los compartimentos definidos en el Panel C. Esto da como resultado una asignación más exacta del biomarcador al compartimento de membrana, lo que puede tener un interés pronóstico importante. Debido a que la beta-catenina asociada a membranas estabiliza la adhesión mediada por cadherina facilitando la unión citoesquelética de complejos de adhesión, mientras la beta-catenina asociada al núcleo actúa como un factor de transcripción, que estimula varios genes importantes en la proliferación celular e invasión y se considera un oncogén por esta capacidad, la expresión de beta-catenina por sí sola no proporciona información pronóstica. Sin embargo, su localización en el núcleo puede ser un indicador importante de carcinogénesis.

1. Spot-finder

En una realización, mostrada en la FIG. 3, el ordenador elimina B1 cualquier corte de tamaño atípico de la imagen. Los cortes de tamaños atípicos pueden incluir, por ejemplo, imágenes de cortes fusionados y/o restos. El ordenador lleva a cabo el proceso automáticamente, aunque en otras realizaciones puede permitir el uso de la entrada de datos por parte del usuario para facilitar el proceso.

El ordenador crea o accede después a una máscara virtual opaca que tiene el tamaño y la forma de un corte típico. Mediante el uso de la máscara virtual, el ordenador escanea B2 la imagen para determinar B3 dónde la máscara cubre primero un área con la intensidad media de píxel más alta. El ordenador monitoriza la intensidad total de la imagen durante el escaneo y, debido a que la máscara es opaca, identifica la posición de la máscara cuando se minimiza la intensidad de imagen total. El ordenador identifica esta área como el primer corte y ajusta B4 los píxeles dentro de esta área para que tengan una intensidad cero. El ordenador también ajusta píxeles adicionales dentro de un área predefinida alrededor de esta área para que tengan una intensidad cero. Esto ayuda a diferenciar entre cortes solapantes.

Después de identificar el primer corte, el ordenador escanea otra vez B2 la imagen mediante el uso de la máscara para encontrar el área siguiente con la intensidad media de píxel más alta. Cuando se halla el área siguiente, el ordenador la identifica como el segundo corte y ajusta los píxeles en y alrededor de esta área para que tengan una intensidad cero. El ordenador repite este proceso hasta que ya no puede encontrar áreas de la imagen con una intensidad suficiente para calificarlas como cortes.

El ordenador identifica entonces B5 un punto de referencia (p.ej., el centro) en cada corte, y dibuja una línea que conecta el punto de referencia de cada corte con cada punto de referencia del corte vecino más cercano, arriba, abajo, a la izquierda, y a la derecha. Si el ordenador no puede identificar un vecino más cercano en ninguna de estas direcciones (es decir, el corte está en el borde de la matriz), el ordenador dibuja una línea desde el centro del corte hasta el borde más cercano de la imagen.

2. RESA y PLACE

Una vez que se determina la localización de un área de la imagen de interés, un microscopio óptico puede obtener una imagen de alta resolución a una longitud de onda adecuada para identificar las características celulares de interés. Estas características incluyen el biomarcador, también denominado "señal", las células de interés en el corte de tejido (denominadas "máscara celular"), o una localización definida por el usuario dentro de la máscara celular, también denominada "lugar". La señal, la máscara celular, y el lugar se denominan "canales".

Con respecto a la FIG. 4, un proceso 50 determina la región de interés en las imágenes desarrollando una máscara a partir del canal de la máscara celular (etapa C1). A continuación, el proceso aplica esta máscara a los canales de lugar y señal (etapa C2). El proceso elimina después la información desenfocada de las imágenes enmascaradas, por ejemplo, en un proceso de pseudo-deconvolución (etapa C3). A continuación, en una fase de "asignación de píxeles", el proceso identifica las características subcelulares en la imagen, asignando los píxeles de la imagen a los lugares (etapa C4). Una vez que se asignan los píxeles, el ordenador cartografía los lugares en la imagen de la señal (etapa C5), y cuantifica la cantidad de biomarcador en cada lugar. Esta fase se denomina "asignación de señal". Estas etapas se describen con más detalle más adelante.

20 Enmascaramiento

Durante este proceso, el programa informático identifica una región de interés en la imagen de las células teñidas de interés (es decir, el canal de la máscara celular). El programa informático enmascara los canales de lugar y señal evitando análisis innecesarios de áreas fuera de la región de interés.

Para identificar una región de interés, el ordenador determina una intensidad umbral para el canal de la máscara celular. Una vez determinadas, el ordenador redistribuye las intensidades de los píxeles en una redistribución binaria. En otras palabras, el ordenador ajusta la intensidad de cada píxel por debajo del umbral a cero, y ajusta los píxeles restantes para que tengan la intensidad máxima (p.ej., para una imagen de 8 bits la intensidad máxima es 255). El grupo de localizaciones de píxeles ajustados a la intensidad máxima se denomina máscara. Los procedimientos posteriores en las otras imágenes de la pila de imágenes se llevan a cabo en las localizaciones de píxeles que corresponden a la máscara.

La intensidad umbral está relacionada con la intensidad del fondo de la imagen, que el ordenador determina agrupando primero cada píxel según su intensidad (p.ej., en una imagen de 8 bits, cada píxel tiene una intensidad de 0 a 255). En ciertas realizaciones, el fondo corresponde al mayor agrupamiento (es decir, la intensidad de píxel más habitual). En otras realizaciones, el fondo corresponde al segundo mayor agrupamiento. Esto ocurre en ciertos casos cuando los tejidos muestran autofluorescencia y el mayor agrupamiento corresponde a un área de tejido fluorescente en vez de las tinciones histoquímicas fluorescentes. En cualquier caso, el ordenador supone que la intensidad de fondo es menor que una cierta fracción de la intensidad máxima (p.ej., menor de la mitad de la intensidad máxima).

El tamaño del agrupamiento se representa frente a la intensidad para producir un histograma. El pico máximo del histograma corresponde al mayor agrupamiento. En las realizaciones en las que el mayor agrupamiento corresponde al fondo, el ordenador asigna la intensidad del pico máximo como la intensidad de fondo. En otras realizaciones, en las que el fondo corresponde al segundo mayor agrupamiento, el histograma tiene un segundo pico a una intensidad inferior que la del pico máximo. Así, si el segundo pico es al menos una cierta fracción del tamaño del pico máximo (p.ej., al menos el cinco por ciento), el ordenador asigna la segunda intensidad del pico como la intensidad de fondo de la imagen.

Una vez establecido, el ordenador añade un factor adicional a la intensidad de fondo para determinar la intensidad umbral. Para una imagen de 8 bits, este factor es igual a $D(1/5)/10$ multiplicado por un valor definido por el usuario (normalmente 0,5). Aquí, $D(1/5)$ es la distribución por quintiles de los píxeles agrupados, que se determina como

$$D(1/5) = (I)_{sup20} - (I)_{inf20} ,$$

en la que $(I)_{sup20}$ es la intensidad media de píxel de los píxeles dentro del 20º percentil superior, y $(I)_{inf20}$ es la intensidad media de píxel de los píxeles en el 20º percentil inferior.

Los píxeles con una intensidad de o superior a la intensidad umbral se asignan a la máscara.

La máscara se modifica después adicionalmente según los parámetros definidos por el usuario y las técnicas de procesamiento de imágenes. Por ejemplo, la máscara se puede dilatar o reducir de forma que el área de la máscara coincida con un valor definido por el usuario, o puede tener orificios de un tamaño particular (definido por el usuario)

en su interior. Los parámetros definidos por el usuario para crear la máscara se pueden ajustar después de analizar un pequeño número de imágenes de cortes histológicos de muestra, antes de analizar la matriz completa.

Después de desarrollar la máscara, el ordenador aplica la máscara a las imágenes de la pila de imágenes, identificando la región de interés de cada una de estas imágenes como las localizaciones de píxeles que corresponden a las localizaciones de píxeles de la máscara.

Reducción del Fondo

Tal como se muestra, el proceso 50 reduce C3 el impacto de la información desenfozada de la imagen. Por ejemplo, el proceso 50 puede usar una técnica de pseudo-deconvolución. Aunque los píxeles de la imagen restante tienen una intensidad reducida, la información de la imagen representa una lámina virtual más fina a través de la parte superior del tejido. Además, la pseudo-deconvolución aumenta las áreas interfaciales entre las áreas de intensidad de tinción superior y las áreas de intensidad de tinción inferior de la imagen incrementando el contraste entre estas áreas.

El ordenador lleva a cabo una pseudo-deconvolución en los canales de lugar (compartimentos celulares) y señal (es decir, componentes celulares). El ordenador enmascara primero las imágenes de estos canales, lo que reduce el número de píxeles a analizar. El ordenador analiza dos imágenes de cada canal. La primera imagen es una imagen enfocada (es decir, una imagen de la parte superior del corte histológico). La segunda imagen es una imagen ligeramente desenfozada, producida colocando el plano focal ligeramente por debajo de la parte inferior del tejido (p.ej., para un corte histológico de un grosor de cinco micras, el plano focal de esta imagen se localiza alrededor de ocho micras por debajo de la parte superior del corte histológico).

Para cada localización de píxel, el ordenador resta un porcentaje de la intensidad de píxel de la imagen desenfozada, $I_{desenfocada}$, de la intensidad de píxel de la imagen enfocada correspondiente, $I_{enfocada}$. El ordenador determina la intensidad de píxel ajustada, $I_{nuevo\ píxel}$, mediante el uso de la distribución de cuartiles, $D(1/4)$, de la imagen enfocada como sigue:

$$I_{nuevo\ píxel} = I_{enfocada} - I_{desenfocada} \times \left(\frac{I_{max} - I_{enfocada}}{I_{max}} \right)^\psi,$$

en la que I_{max} es la intensidad máxima de píxel (p.ej., 255 para una imagen de 8 bits), y ψ se calcula a partir de

$$\psi = \alpha \times D(1/4)^{-\beta},$$

que se desarrolló a partir de un estudio empírico de una biblioteca de imágenes. Las deconvoluciones ópticas se evaluaron visualmente, y se representó la ψ para cada una frente a la distribución de cuartiles para la imagen enfocada. El análisis de regresión de los datos empíricos produjo valores para los parámetros de ajuste (es decir, α es alrededor de 80 y β es alrededor de 1,19). La distribución de cuartiles se determina a partir de

$$D(1/4) = (I)_{sup25} - (I)_{inf25},$$

en la que $(I)_{sup25}$ es la intensidad media de píxel de los píxeles dentro del 25º percentil superior, y $(I)_{inf25}$ es la intensidad media de píxel de los píxeles en el 25º percentil inferior. Conceptualmente, los píxeles de intensidad baja en las imágenes con una $D(1/4)$ baja (es decir, una proporción baja de señal respecto del ruido) se restan en menor medida que los píxeles de intensidad baja de las imágenes con una $D(1/4)$ elevada.

El valor de ψ se puede refinar determinando el porcentaje de intensidad de señal que queda tras la pseudo-deconvolución dentro del área enmascarada y comparándolo con un valor predefinido para ese canal. Si el porcentaje es, por ejemplo, mayor que el valor predefinido, se detiene la pseudo-deconvolución. De otra manera, el ordenador incrementa de manera iterativa el valor de ψ hasta que se alcanza el porcentaje predefinido de intensidad de señal. El valor predefinido es el porcentaje esperado de la máscara cubierta por un canal.

Tras la pseudo-deconvolución, cada píxel de las imágenes resultantes se asigna a un lugar en un proceso denominado asignación de píxeles.

Asignación de lugares basada en píxeles para la compartimentación de la expresión (PLACE)

Durante la fase de asignación de píxeles, el ordenador asigna una identidad basándose en la intensidad relativa de esa localización de píxel en cada una de las imágenes del canal de lugar (es decir, las imágenes de los lugares teñidos). Por ejemplo, durante esta fase el ordenador decide para cada localización de píxel de la imagen si pertenece al núcleo, a la membrana, o al citoplasma. El ordenador no hace una asignación a píxeles que no puede asignar dentro de un grado de confianza definido por el usuario (p.ej., 95%). Los niveles más elevados de confianza eliminan más píxeles del análisis.

En general, para cada localización de píxel en dos imágenes de lugares, el ordenador lee una intensidad de píxel y compara cada valor de intensidad con un valor de intensidad umbral predeterminado. Si el valor de intensidad de

solamente un lugar es mayor que el umbral, el ordenador asigna la localización de píxel a ese lugar. Si ambos valores de intensidad son mayores que sus umbrales respectivos, el ordenador compara los valores de intensidad de cada lugar, y asigna la identidad del lugar que tiene la mayor intensidad a esa localización de píxel. Si ambas intensidades de píxeles están por debajo de sus valores umbrales, el ordenador asigna el píxel a un tercer lugar.

- 5 Después de repetir lo anterior para las localizaciones de píxeles de las imágenes, el ordenador calcula el área de cada lugar, y compara el resultado con una fracción de cobertura predeterminada (esperada). Si la fracción de cobertura calculada (p.ej., número de píxeles de lugar nuclear/número de píxeles enmascarados) es mayor que la fracción de cobertura predeterminada, el ordenador elimina los píxeles que tienen la intensidad más baja del lugar. El ordenador continúa eliminando los píxeles de intensidad más baja hasta que la fracción de cobertura se reduce hasta alrededor de la fracción de cobertura predeterminada.

Lo siguiente es un ejemplo de cómo funciona este proceso. Las imágenes de los lugares de membranas y de los lugares de núcleos se seleccionan para el análisis de asignación realizado en un intervalo de confianza del 95%. Las localizaciones de píxeles se asignan al lugar del citoplasma mediante exclusión.

- 15 El ordenador lee las intensidades de los píxeles en cada localización de píxel de las imágenes de lugares de membranas y de núcleos, y las compara con los valores umbrales. Si ninguno de los valores de intensidad es mayor que los valores umbrales, la localización de los píxeles se asigna al lugar del citoplasma. Si solamente la intensidad nuclear o la intensidad de la membrana es mayor que el valor umbral, el ordenador asigna la localización de píxel al lugar con el umbral anterior. Si ambas intensidades son mayores que los umbrales, el ordenador compara la proporción de los valores de intensidad con uno, y hace una asignación como sigue:

20
$$\frac{\text{intensidad nuclear}}{\text{intensidad de la membrana}} > 1 \rightarrow \text{localización del píxel} = \text{lugar nuclear}$$

$$\frac{\text{intensidad nuclear}}{\text{intensidad de la membrana}} < 1 \rightarrow \text{localización del píxel} = \text{lugar de membrana}$$

$$\frac{\text{intensidad nuclear}}{\text{intensidad de la membrana}} = 1 \rightarrow \text{localización del píxel} = \text{sin asignar}$$

- 25 Así, si la intensidad nuclear es mayor que la intensidad de la membrana, el ordenador asigna la localización del píxel al lugar nuclear. Si la intensidad de la membrana es mayor que la intensidad nuclear, el ordenador asigna la localización del píxel al lugar de membrana. Si la intensidad de la membrana es igual a la intensidad nuclear, la localización del píxel se deja sin asignar. Esto se repite para las localizaciones de píxeles.

- 30 Una vez que se han analizado todas las localizaciones de píxeles, el ordenador determina la cantidad de intensidad nuclear asignada incorrectamente al lugar de membrana (es decir, excedente nuclear a membrana), y viceversa. Si la cantidad de intensidad nuclear asignada incorrectamente al canal de membrana es >5% de la intensidad nuclear total, el ordenador pondera la intensidad nuclear por un factor, w, y recalcula la proporción de intensidad nuclear ponderada respecto de la intensidad de membrana. Esta proporción se compara con uno, y se reasignan las localizaciones de píxeles como sigue:

$$\frac{w \times \text{intensidad nuclear}}{\text{intensidad de la membrana}} > 1 \rightarrow \text{localización del píxel} = \text{lugar nuclear}$$

$$\frac{w \times \text{intensidad nuclear}}{\text{intensidad de la membrana}} < 1 \rightarrow \text{localización del píxel} = \text{lugar de membrana}$$

$$\frac{w \times \text{intensidad nuclear}}{\text{intensidad de la membrana}} = 1 \rightarrow \text{localización del píxel} = \text{sin asignar}$$

- 35 El ordenador determina de nuevo la cantidad de cada lugar asignado incorrectamente. Si todavía es >5% el ordenador incrementa el valor de w y repite las etapas anteriores. Esto continúa hasta que la cantidad de lugar nuclear asignado incorrectamente es <5%. El ordenador emplea una técnica similar para minimizar el excedente membrana a nuclear.

- 40 El ordenador también calcula el área del lugar citoplásmico (exclusión) y lo compara con un valor predeterminado. Repitiendo el proceso de asignación, el ordenador asegura que hay <5% citoplásmico a nuclear o citoplásmico a membrana, tal como se determina basándose en la biología.

El ordenador evalúa después la cantidad de señal en cada lugar durante un proceso de "asignación de señales".

Tras la asignación de píxeles, el ordenador suma la señal en cada lugar. El ordenador lee la intensidad de píxel de la imagen de la señal (es decir, la imagen de la tinción que marca de manera selectiva el componente celular), y suma la intensidad de señal para las localizaciones de píxeles asignadas a compartimentos subcelulares similares. El ordenador calcula una suma de intensidades de píxeles de un lugar mediante la adición directa de la intensidad de señales de cada localización de píxel asignada a ese lugar. El ordenador también calcula una suma de proporciones de intensidades de píxeles sumando la proporción de la intensidad de señal y la intensidad de lugar para cada localización de píxel.

La suma de intensidades de píxeles y la suma de proporciones de intensidades de píxeles se usan después para calcular uno o más parámetros. Por ejemplo, el ordenador determina el porcentaje relativo de señal que se halla dentro de cada uno de los compartimentos (p.ej., un 30% de la señal total es membranosa, un 20% es citoplásmica, y un 50% es nuclear). En otro ejemplo, el ordenador expresa la cantidad de señal presente respecto del tamaño de un compartimento particular (p.ej., la intensidad de señal de los píxeles asignados al canal de membrana dividida por el número de píxeles asignados al canal de membrana). El usuario puede seleccionar que el ordenador evalúe otros parámetros de interés. Por ejemplo, qué cantidad del área de la imagen está cubierta por la máscara, qué cantidad de la máscara está cubierta por cada lugar, etc.

Poniendo en práctica el algoritmo de pseudo-deconvolución (que limita la mayoría de la intensidad de píxel irrelevante) junto con las medidas del área de intensidad (que definen adicionalmente el área de un lugar subcelular particular), el ordenador puede hacer asignaciones sumamente exactas de las localizaciones subcelulares de píxeles.

En ciertas realizaciones, el ordenador lleva a cabo etapas adicionales para utilizar mejor el intervalo dinámico de la cámara. Esto se consigue redistribuyendo las intensidades de píxeles en una imagen a través del intervalo dinámico del detector basándose en sus intensidades relativas.

Una forma de redistribución es la redistribución normalizada, por la cual el umbral inferior (es decir, la intensidad de píxel del fondo, determinada durante el enmascaramiento) se resta de todos los píxeles de la imagen, y cualquier píxel con un valor negativo resultante se ajusta a cero. La redistribución normalizada se usa para el canal de señal, ya que esta redistribución preserva la escala de una muestra respecto de la siguiente, lo que permite que se hagan comparaciones directas entre muestras. Esto se lleva a cabo después de enmascarar la imagen de señal.

La redistribución doble logarítmica ajusta todos los píxeles de una imagen por encima del 50% del umbral superior de la imagen (es decir, el valor respecto del cual solamente un 50% de los píxeles de la imagen tiene una intensidad mayor) al valor de intensidad máxima (p.ej., 255 para una imagen de 8 bits). Todos los píxeles con valores de intensidad por debajo del umbral inferior se ajustan a 0, y todos los píxeles con valores de intensidad entre los umbrales superior e inferior se reasignan según la fórmula:

$$I_{nueva} = \frac{\log(I_{antigua} - LT)}{I_{max} \log(\frac{1}{2}UT - LT)}$$

en la que I_{nueva} se refiere a la intensidad de píxel nueva, $I_{antigua}$ se refiere a la intensidad de píxel antigua, LT y UT son los umbrales inferior y máximo del 50%, respectivamente, e I_{max} es el valor de intensidad máxima. La redistribución doble logarítmica se usa para los canales de lugar, después del enmascaramiento o después de la pseudo-deconvolución de estos canales. Conceptualmente, esto asegura que los píxeles de las imágenes de lugares que tienen intensidades por encima del 50° percentil se asignan a su lugar durante la fase de asignación. Los píxeles con intensidades por debajo, pero cercanas, al 50° percentil se ponderan en mayor medida y es más probable que se asignen al lugar que los píxeles que tienen intensidades muy por debajo del 50° percentil.

Además de los ejemplos anteriormente descritos, se pueden usar otras redistribuciones definidas por el usuario, tales como las redistribuciones lineales u otras redistribuciones basadas en ecuaciones.

Aunque los algoritmos descritos anteriormente hacen referencia al análisis de micromatrices de tejidos, no se limitan a estudiar solamente tales matrices. El algoritmo Spotfinder se puede usar para identificar la localización de cualquier elemento que comprenda una colección, y los algoritmos RESA y PLACE se pueden usar para localizar y cuantificar un biomarcador en cualquier muestra que contenga células de la que se puedan obtener imágenes, que incluye biopsias de tejido y muestras líquidas que contienen células, tales como sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, linfa, líquido pleural, líquido peritoneal y líquido pericárdico.

Además, se puede usar cualquier dispositivo óptico o no óptico de formación de imágenes, tal como, por ejemplo, microscopios ópticos verticales o invertidos, microscopios confocales de barrido, cámaras, microscopios electrónicos de barrido o de efecto túnel, microscopios de sonda de barrido, y detectores infrarrojos de formación de imágenes, etc.

En las realizaciones descritas anteriormente, el ordenador puede incluir un equipo físico, programa informático, o

una combinación de ambos para controlar los otros componentes del sistema y para analizar las imágenes para extraer la información deseada sobre los cortes histológicos y las micromatrices de tejido. El análisis descrito anteriormente se pone en práctica en programas informáticos mediante el uso de técnicas de programación habituales. Tales programas se diseñan para ejecutarlos en ordenadores programables que comprenden cada uno un procesador, un sistema de almacenamiento de datos (que incluye elementos de memoria y/o de almacenamiento), al menos un dispositivo de entrada, al menos un dispositivo de salida, tal como una pantalla o impresora. El código del programa se aplica a los datos de entrada (p.ej., imágenes unidas entre sí o pilas de imágenes) para llevar a cabo las funciones descritas en la presente memoria y generar información (p.ej., localización de señales), que se aplica a uno o más dispositivos de salida. Cada programa informático se puede llevar a cabo en un lenguaje de programación por procedimientos de alto nivel u orientado a objetos, o en un lenguaje ensamblador o lenguaje de máquina. Cada uno de tales programas informáticos se puede almacenar en un medio de almacenamiento legible por ordenador (p.ej., CD ROM o disco magnético) que cuando se lee mediante un ordenador puede provocar que el procesador del ordenador lleve a cabo el análisis descrito en la presente memoria.

Lo siguiente proporciona una descripción detallada de una realización específica de la preparación y análisis de micromatrices de tejidos según los métodos descritos en la presente memoria, aunque se podrían llevar a cabo etapas similares con respecto a cualquier muestra que contenga células. Con respecto a la FIG. 5, una micromatriz de tejido 100 incluye múltiples muestras de cortes histológicos 120 preparadas a partir de núcleos histológicos incrustados en general en un bloque de parafina 130 delgado (p.ej., alrededor de cinco micras) a intervalos regulares, formando una serie de filas y columnas. Los cortes histológicos (cortes finos de núcleos histológicos) 120 pueden tener una forma sustancialmente discoidal y tendrán en general el mismo grosor que el bloque de parafina 130 (es decir, alrededor de cinco micras) y un diámetro de alrededor de 0,6 milímetros. En general, los centros de los cortes histológicos están espaciados entre sí alrededor de unas cuantas décimas de milímetro. El bloque de parafina 130 y los cortes histológicos 120 se pueden montar sobre un portaobjetos 110 de microscopio. Una micromatriz de tejido 100 puede incluir cualquier número de cortes histológicos, en general del orden de varios cientos a algunos miles.

Con respecto a la FIG. 6, se puede usar un sistema de microscopía óptica para obtener una imagen adecuada del tejido. El sistema de microscopía 200 incluye un microscopio óptico invertido 201 para la formación de imágenes del tejido, y un ordenador 290 para analizar las imágenes. El microscopio óptico 201 incluye un soporte 210, que alberga una fuente de luz 220, una platina de muestras 240, una lente del objetivo 250 y una cámara CCD 270. Un digitalizador de imágenes en el ordenador 290 obtiene las imágenes por medio de la cámara CCD 270.

El microscopio óptico 201 incluye también ruedas de filtros 230 y 260, que albergan una serie de filtros dicróicos. Los filtros de la rueda 230 permiten la selección de los espectros de iluminación adecuados para la microscopía estándar o fluorescente. Los filtros de la rueda 260 filtran la luz transmitida para el aislamiento de firmas espectrales en la microscopía de fluorescencia. La platina de muestras 240 soporta y coloca de manera adecuada la micromatriz de tejido 100. La platina de muestras 240 se puede trasladar linealmente en las direcciones x, y, y z (se muestran los ejes). La platina de muestras 240 incluye motores para permitir la traslación automatizada. El ordenador 290 controla la traslación de la platina de muestras 240 mediante servocontrol de los motores.

Se pueden generar imágenes de una micromatriz de tejido 100 como sigue: un usuario coloca la micromatriz sobre una platina de muestras 240. El usuario ajusta la platina de muestras 240 de forma que el primer corte histológico (es decir, superior izquierdo) esté en el centro del campo de visión y enfocado en la cámara CCD 270. La lente del objetivo 250 se debería ajustar a la resolución adecuada, por ejemplo, para que se pueda examinar un corte histológico de 0,6 milímetros a un aumento de 10X. En general, los cortes histológicos corresponden a áreas de intensidad de luz mayor que la parafina circundante, tal como se determina por diversos medios que incluyen las señales derivadas de la dispersión de luz visible de los tejidos teñidos, la autofluorescencia del tejido o de un marcador fluorescente. El ordenador 290 puede obtener una imagen de baja resolución (p.ej. 64 píxeles x 64 píxeles con resolución de 16 agrupamientos) mediante el uso de un programa informático (Softworx 2.5, Applied Precision, Issaquah, WA) y una plataforma de formación de imágenes (p.ej., Deltavision). El ordenador 290 traslada automáticamente la platina de muestras 240 en un valor aproximadamente igual a un campo de visión. El ordenador obtiene después una segunda imagen de baja resolución. Este proceso se repite hasta que el ordenador ha obtenido imágenes de toda la micromatriz de tejido. Después, mediante el uso de un programa informático disponible comercialmente, el ordenador genera una imagen compuesta de toda la micromatriz de tejido uniendo entre sí la secuencia de imágenes de forma similar a un mosaico.

Los marcadores biológicos que se pueden detectar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, lípidos, carbohidratos u otros componentes de una célula. Ciertos marcadores son característicos de células particulares, mientras otros marcadores se han identificado como asociados a una enfermedad o afección particular. Los ejemplos de marcadores de pronóstico conocidos incluyen los marcadores enzimáticos tales como galactosil transferasa II, enolasa específica de neuronas, protón ATPasa-2, y fosfatasa ácida. Los marcadores de hormonas o receptores de hormonas incluyen gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona adrenocorticotrópica, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), receptor de estrógenos, receptor de progesterona, receptor de andrógenos, receptor de complemento gC1q-R/p33, receptor de IL-2, receptor de neurotrofina p75, receptor de PTH, receptor de hormona tiroidea, y receptor de insulina.

Los marcadores linfoides incluyen alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, marcador de células B, bcl-2, bcl-6, antígeno de linfocitos B de 36 kD, BM1 (marcador mielóide), BM2 (marcador mielóide), galectina-3, granzima B, antígeno de clase I del HLA, antígeno de clase II del HLA (DP), antígeno de clase II del HLA (DQ), antígeno de clase II del HLA (DR), defensinas de neutrófilos humanos, inmunoglobulina A, inmunoglobulina D, inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, cadena ligera kappa, cadena ligera lambda, antígeno linfocito/histiocito, marcador de macrófagos, muramidasa (lisozima), quinasa de linfoma anaplásico p80, marcador de células plasmáticas, inhibidor de proteasas de leucocitos secretores, receptor de antígenos de células T (JOVI 1), receptor de antígenos de células T (JOVI 3), desoxinucleotidil transferasa terminal, marcador de células B sin agrupar.

Los marcadores tumorales incluyen alfa-fetoproteína, apolipoproteína D, BAG-1 (proteína RAP46), CA19-9 (Sialyl-Lewis^A), CA50 (antígeno de mucina asociado a carcinoma), CA125 (antígeno de cáncer ovárico), CA242 (antígeno de mucina asociado a tumor), cromogranina A, clusterina (apolipoproteína J), antígeno de membrana epitelial, antígeno relacionado epitelial, antígeno específico epitelial, proteína del fluido de la mastopatía fibroquística 15, antígeno específico de hepatocitos, herregulina, mucina gástrica humana, glóbulo de grasa de la leche humana, MAGE-1, metaloproteinasas de la matriz, melan A, marcador de melanoma (HMB45), mesotelina, metalotioneína, factor de transcripción de microftalmia (MITF), glicoproteína de núcleo Muc-1; glicoproteína Muc-1, glicoproteína Muc-2, glicoproteína Muc-5AC, glicoproteína Muc-6, mieloperoxidasa, Myf-3 (marcador de rhabdomyosarcoma), Myf-4 (marcador de rhabdomyosarcoma), MyoD1 (marcador de rhabdomyosarcoma), mioglobina, proteína nm23, fosfatasa alcalina placentaria, prealbúmina, antígeno prostático específico, fosfatasa ácida prostática, péptido inhibina prostática, PTEN, marcador de carcinoma de células renales, antígeno de mucina del intestino delgado, tetranectina, factor de transcripción tiroideo 1, inhibidor tisular de metaloproteínasa de la matriz 1, inhibidor tisular de metaloproteínasa de la matriz 2, tirosinasa; proteína relacionada con tirosinasa 1, villina, factor de von Willebrand.

Los marcadores asociados al ciclo celular incluyen el factor activador de proteasas de apoptosis 1, bcl-w, bcl-x, bromodesoxiuridina, CAK (quinasa activadora de cdk), proteína de susceptibilidad a la apoptosis celular (CAS), caspasa 2, caspasa 8, CPP32 (caspasa 3), CPP32 (caspasa 3), quininas dependientes de ciclina, ciclina A, ciclina B1, ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3, ciclina E, ciclina G, factor de fragmentación de ADN (extremo N-terminal), Fas (CD95), proteína del dominio de muerte celular asociada a Fas, ligando Fas, Fen-1, IPO-38, Mcl-1, proteínas de mantenimiento de minicromosomas, proteína de reparación de emparejamientos incorrectos (MSH2), poli (ADP-Ribosa) polimerasa, antígeno nuclear de células en proliferación, proteína p16, proteína p27, p34cdc2, proteína p57 (Kip2), proteína p105, Stat 1 alfa, topoisomerasa I, topoisomerasa II alfa, topoisomerasa III alfa, topoisomerasa II beta.

Los marcadores de tejidos y tumores neuronales incluyen alfa B cristalina, alfa-internexina, alfa sinucleína, proteína precursora de amiloide, beta amiloide, calbindina, colinacetiltransferasa, transportador de aminoácidos excitadores 1, GAP43, proteína ácida fibrilar glial, receptor de glutamato 2, proteína básica de mielina, receptor de factor de crecimiento neuronal (gp75), marcador de neuroblastoma, neurofilamento de 68 kD, neurofilamento de 160 kD, neurofilamento de 200 kD, enolasa específica de neuronas, receptor de acetilcolina nicotínico alfa4, receptor de acetilcolina nicotínico beta2, periferrina, producto del gen de la proteína 9, proteína S-100, serotonina, SNAP-25, sinapsina I, sinaptofisina, tau, triptófano hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, ubiquitina.

Los marcadores de grupo de diferenciación incluyen CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3delta, CD3epsilon, CD3gamma, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8alfa, CD8beta, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CDw93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD115, CD 116, CD117, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CDw125, CD126, CD127, CDw128a, CDw128b, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148. CDw149, CDw150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, y TCR-zeta.

Otros marcadores celulares incluyen proteína F del centrómero (CENP-F), giantina, involucrina, lamina A y C [XB10], LAP-70, mucina, proteínas de complejos de poros nucleares, proteína de cuerpos lamelares p180, ran, r, cathepsina D, proteína Ps2, Her2-neu, P53, S100, antígeno de marcador epitelial (EMA), TdT, MB2, MB3, PCNA, y Ki67.

Las muestras que contienen células se pueden teñir mediante el uso de colorantes o tinciones, o productos histoquímicos, que reaccionan directamente con los biomarcadores específicos o con los diversos tipos de células o compartimentos subcelulares. No todas las tinciones son compatibles. Por lo tanto, se debería considerar bien el tipo de tinciones empleadas y su secuencia de aplicación, pero un experto en la técnica lo puede determinar fácilmente. Tales productos histoquímicos pueden ser cromóforos detectables mediante microscopía de transmitancia o fluoróforos detectables mediante microscopía de fluorescencia. En general, una muestra que contiene células se puede incubar con una disolución que comprende al menos un producto histoquímico, que reaccionará directamente

o se unirá a los grupos químicos del objetivo. Algunos productos histoquímicos se deben co-incubar con un mordiente, o metal, para permitir la tinción. Se puede incubar una muestra que contiene células con una mezcla de al menos un producto histoquímico que tiñe un componente de interés y otro producto histoquímico que actúa como una contratinción y que se une a una región fuera del componente de interés. De manera alternativa, se pueden usar mezclas de sondas múltiples en la tinción, y proporcionan una manera de identificar las posiciones de las sondas específicas.

La siguiente lista no limitante proporciona cromóforos ejemplares que se pueden usar como tinciones histológicas o contratinciones y sus células, compartimentos subcelulares, o componentes celulares objetivo: Eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), Hematoxilina (ácidos nucleicos), Naranja G (eritrocitos sanguíneos, células del páncreas y de la hipófisis), Verde Claro SF (colágeno), Romanowsky-Giemsa (morfología celular global), May-Grunwald (células sanguíneas), contratinción Azul (Trevigen), Verde de Etilo (CAS) (amiloides), Feulgen-Amarillo Naftol S (ADN), Giemsa (tiñe de manera diferencial diversos compartimentos celulares), Verde de Metilo (amiloides), pironina (ácidos nucleicos), Amarillo Naftol (eritrocitos sanguíneos), Rojo Neutro (núcleos), tinción de Papanicolaou, que incluye en general una mezcla de Hematoxilina, Eosina Y, Naranja G y mezcla Marrón de Bismarck (morfología celular global), contratinción Roja B (Trevigen), contratinción Roja C (Trevigen), Rojo Sirius (amiloides), reactivo de Feulgen (pararosanilina) (ADN), Galocianina-alumbre de cromo (ADN), Galocianina-alumbre de cromo y Amarillo Naftol S (ADN), Verde de Metilo-Pironina Y (ADN), Tionina-reactivo de Feulgen (ADN), Naranja de Acrídina (ADN), Azul de Metileno (ARN y ADN), Azul de Toluidina (ARN y ADN), azul Alcian (carbohidratos), Rojo de rutenio (carbohidratos), Negro Sudán (lípidos), Sudán IV (lípidos), Rojo Aceite-O (lípidos), tinción tricrómica de Van Gieson (mezcla de fucsina ácida y ácido picrico) (células musculares), tinción tricrómica de Masson (mezcla de hematoxilina, fucsina ácida, y Verde Claro) (tiñe de manera diferencial el colágeno, citoplasma, nucleolos), Aldehído Fucsina (fibras de elastina), y tinción de Weigert (diferencia las fibras reticulares y colagenosas). Se proporciona una lista exhaustiva de tales tinciones, su descripción, y uso general en R.D. Lillie, "Conn's Biological Stains", 8ª ed., Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland (1969). Los expertos en la técnica conocen bien los mordientes y las composiciones adecuadas de lo anterior.

La siguiente lista no limitante proporciona tinciones histológicas fluorescentes ejemplares y sus células, compartimentos subcelulares, o componentes celulares objetivo si es aplicable: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ácidos nucleicos), Eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), Hoechst 33258 y Hoechst 33342 (dos bisbencimidias) (ácidos nucleicos), yoduro de propidio (ácidos nucleicos), Spectrum Orange (ácidos nucleicos), Spectrum Green (ácidos nucleicos), Quinacrina (ácidos nucleicos), Fluoresceína-faloidina (fibras de actina), Cromomicina A 3 (ácidos nucleicos), reacción Acriflavina-Feulgen (ácido nucleico), reacción Auramina O-Feulgen (ácidos nucleicos), Bromuro de etidio (ácidos nucleicos), tinciones de Nissl (neuronas), fluoróforos de ADN de afinidad elevada tales como POPO, BOBO, YOYO y TOTO y otros, y Proteína Fluorescente Verde fusionada a una proteína de unión al ADN, tal como histonas, ACMA, Quinacrina y Naranja de Acrídina.

Hay disponible una amplia diversidad de sondas fluorescentes patentadas específicas de orgánulos de Molecular Probes (Eugene, OR), que incluyen sondas específicas de mitocondrias (colorantes MitoFluor y MitoTracker), sondas de retículo endoplásmico (RE) y de Golgi (ER-Tracker y diversos conjugados de ceramida), y sondas lisosómicas (colorantes LysoTracker). Estas sondas, así como muchos productos histoquímicos fluorescentes sin patentar, están disponibles y descritos exhaustivamente en Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 8ª Ed. (2001), disponible de Molecular Probes, Eugene, OR.

Cada muestra que contiene células se puede co-incubar con sustratos adecuados para una enzima que es un componente celular de interés, y reactivos adecuados que producen precipitados coloreados en los sitios de actividad enzimática. Tales tinciones histoquímicas de enzimas son específicas para la enzima objetivo particular. La tinción con tinciones histoquímicas de enzimas se puede usar para definir un componente subcelular o un tipo particular de célula. De manera alternativa, las tinciones histoquímicas de enzimas se pueden usar de manera diagnóstica para cuantificar la cantidad de actividad enzimática en las células. Se conoce y se describe una amplia diversidad de sustratos enzimáticos y ensayos de detección en la técnica, y ciertos métodos seleccionados se ejemplifican más adelante.

Las fosfatasas ácidas se pueden detectar por medio de varios métodos. En el método de Gomori para fosfatasa ácida, se incuba una preparación de células con glicerofosfato y nitrato de plomo. La enzima libera fosfato, que se combina con plomo para producir fosfato de plomo, un precipitado incoloro. El tejido se sumerge después en una disolución de sulfuro amónico, que reacciona con fosfato de plomo para formar sulfuro de plomo, un precipitado negro. De manera alternativa, las células se pueden incubar con una disolución que comprende pararosanilina-HCl, nitrato sódico, naftol ASB1 fosfato (sustrato), y tampón veronal-acetato. Este método produce un precipitado rojo en las áreas de actividad de fosfatasa ácida. Debido a su contenido característico de fosfatasa ácida, los lisosomas se pueden distinguir de otros gránulos y orgánulos citoplásmicos por medio del uso de este ensayo.

Las deshidrogenasas se pueden localizar incubando las células con un sustrato adecuado para la especie de deshidrogenasa y tetrazol. La enzima transfiere iones de hidrógeno del sustrato a tetrazol, reduciendo tetrazol a formazano, un precipitado oscuro. Por ejemplo, la NADH deshidrogenasa es un componente del complejo I de la cadena respiratoria y se localiza de manera predominante en la mitocondria.

Otras enzimas para las que se han desarrollado técnicas de tinción muy conocidas, y sus localizaciones o actividades celulares principales, incluyen, pero sin limitación, las siguientes: ATPasas (fibras musculares), succinato deshidrogenasas (mitocondrias), citocromo c oxidasas (mitocondrias), fosforilasas (mitocondrias), fosfofructoquinasas (mitocondrias), acetil colinesterasas (neuronas), lactasas (intestino delgado), leucina aminopeptidasas (células hepáticas), mioadenilato desaminasas (células musculares), NADH diaforasas (eritrocitos), y sacarasas (intestino delgado).

La inmunohistoquímica está entre las técnicas histoquímicas más sensibles y específicas. Cada corte histológico se puede combinar con una composición de unión marcada que comprende una sonda de unión específica. Se pueden emplear diversos marcadores, tales como fluoróforos, o enzimas que producen un producto que absorbe la luz o que emite fluorescencia. Se conoce una amplia diversidad de marcadores que proporcionan señales intensas en relación con un único suceso de unión. Las múltiples sondas usadas en la tinción se pueden marcar con más de un marcador fluorescente distinguible. Estas diferencias de color proporcionan una manera de identificar las posiciones de las sondas específicas. El método para preparar conjugados de fluoróforos y proteínas, tales como anticuerpos, se describe exhaustivamente en la bibliografía y no requiere una ejemplificación en el presente documento.

Aunque existen al menos 120.000 anticuerpos disponibles comercialmente, a continuación se enumeran ciertos anticuerpos primarios ejemplares que se sabe que se unen de manera específica a componentes celulares y que se emplean en la actualidad como componentes en tinciones inmunohistoquímicas usadas para investigación y, en casos limitados, para el diagnóstico de diversas enfermedades. Anticuerpo anti-receptor de estrógenos (cáncer de mama), anticuerpo anti-receptor de progesterona (cáncer de mama), anticuerpo anti-p53 (múltiples cánceres), anticuerpo anti-Her-2/neu (múltiples cánceres), anticuerpo anti-EGFR (factor de crecimiento epidérmico, múltiples cánceres), anticuerpo anti-catepsina D (cáncer de mama y otros), anticuerpo anti-Bcl-2 (células apoptóticas), anticuerpo anti-cadherina E, anticuerpo anti-CA125 (cáncer ovárico y otros), anticuerpo anti-CA15-3 (cáncer de mama), anticuerpo anti-CA19-9 (cáncer de colon), anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti-glicoproteína P (MDR, multirresistencia a fármacos), anticuerpo anti-CEA (antígeno carcinoembrionario), anticuerpo anti-proteína de retinoblastoma (Rb), anticuerpo anti-proteína ras (p21), anticuerpo anti-Lewis X (también denominado CD 15), anticuerpo anti-Ki-67 (proliferación celular), anticuerpo anti-PCNA (múltiples cánceres), anticuerpo anti-CD3 (células T), anticuerpo anti-CD4 (células T auxiliares), anticuerpo anti-CD5 (células T), anticuerpo anti-CD7 (timocitos, células T inmaduras, células NK citolíticas), anticuerpo anti-CD8 (células T inhibidoras), anticuerpo anti-CD9/p24 (ALL), anticuerpo anti-CD10 (también denominado CALLA) (leucemia linfoblástica aguda común), anticuerpo anti-CD11c (Monocitos, granulocitos, AML), anticuerpo anti-CD13 (células mielomonocíticas, AML), anticuerpo anti-CD14 (monocitos maduros, granulocitos), anticuerpo anti-CD15 (enfermedad de Hodgkin), anticuerpo anti-CD19 (células B), anticuerpo anti-CD20 (células B), anticuerpo anti-CD22 (células B), anticuerpo anti-CD23 (células B activadas, CLL), anticuerpo anti-CD30 (células T y B activadas, enfermedad de Hodgkin), anticuerpo anti-CD31 (marcador de angiogénesis), anticuerpo anti-CD33 (células mieloides, AML), anticuerpo anti-CD34 (células madre endoteliales, tumores estromales), anticuerpo anti-CD35 (células dendríticas), anticuerpo anti-CD38 (células plasmáticas, células T, B, y mieloides activadas), anticuerpo anti-CD41 (plaquetas, megacariocitos), anticuerpo anti-LCA/CD45 (antígeno común de leucocitos), anticuerpo anti-CD45RO (células T inductoras, auxiliares), anticuerpo anti-CD45RA (células B), anticuerpo anti-CD39, CD100, anticuerpo anti-CD95/Fas (apoptosis), anticuerpo anti-CD99 (marcador de Sarcoma de Ewing, producto del gen MIC2), anticuerpo anti-CD106 (VCAM-1; células endoteliales activadas), anticuerpo anti-ubiquitina (enfermedad de Alzheimer), anticuerpo anti-CD71 (receptor de transferrina), anticuerpo anti-c-myc (oncoproteína y un hapteno), anticuerpo anti-citoqueratinas (receptor de transferrina), anticuerpo anti-vimentinas (células endoteliales) (células B y T), anticuerpo anti-proteínas HPV (papilomavirus humano), anticuerpo anti-cadenas ligeras kappa (células B), anticuerpo anti-cadenas ligeras lambda (células B), anticuerpo anti-melanosomas (HMB45) (melanoma), anticuerpo anti-antígeno prostático específico (PSA) (cáncer de próstata), anticuerpo anti-S-100 (melanoma, células salivares, células gliales), anticuerpo anti-antígeno tau (enfermedad de Alzheimer), anticuerpo anti-fibrina (células epiteliales), anticuerpo anti-queratinas, anticuerpo anti-citoqueratina (tumor), anti-alfa-catenina (membrana celular), y anticuerpo anti-antígeno Tn (carcinoma de colon, adenocarcinomas, y cáncer pancreático).

Los fluoróforos que se pueden conjugar a un anticuerpo primario incluyen, pero sin limitación, Fluoresceína, Rodamina, Rojo Texas, Cy2, Cy3, Cy5, Rojo VECTOR, ELF™ (fluorescencia marcada enzimáticamente), Cy0 Cy0.5, Cy1, Cy1.5, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy7, FluorX, Calceína, Calceína-AM, CRYPTOFLUOR™s, Orange (42 kDa), Tangerine (35 kDa), Gold (31 kDa), Red (42 kDa), Crimson (40 kDa), BHMP, BHDMP, Br-Oregon, Amarillo Lucifer, familia de colorantes Alexa, N-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino]caproilo] (NBD), BODIPY™, difluoruro de boro-dipirrometeno, Verde Oregon, Rojo MITOTRACKER™, DiOC₇ (3), DiIC₁₈, Ficoeritrina, Ficobiliproteínas BPE (240 kDa) RPE (240 kDa) CPC (264 kDa) APC (104 kDa), Spectrum Blue, Spectrum Aqua, Spectrum Green, Spectrum Gold, Spectrum Orange, Spectrum Red, NADH, NADPH, FAD, Colorantes Infra-Rojos (IR), GDP cíclico-Ribosa (cGDP), Calcofluor Blanco, Lisamina, Umbeliferona, Tirosina y Triptófano. Hay disponible una amplia diversidad de otras sondas fluorescentes y/o se describen de manera exhaustiva en el Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 8ª Ed. (2001), disponible de Molecular Probes, Eugene, OR., así como otros muchos fabricantes.

La amplificación adicional de la señal se puede conseguir mediante el uso de combinaciones de miembros de unión específica, tales como anticuerpos y anti-anticuerpos, en los que los anti-anticuerpos se unen a una región

conservada de la sonda de anticuerpo objetivo, en particular en los que los anticuerpos son de una especie diferente. De manera alternativa, se pueden usar pares receptor-ligando de unión específicos, tales como biotina-estreptavidina, en los que el anticuerpo primario se conjuga con un miembro del par y el otro miembro está marcado con una sonda detectable. Así, se construye de manera eficaz una estructura de tipo sándwich de miembros de unión, en la que el primer miembro de unión se une al componente celular y sirve para posibilitar la unión secundaria, en la que el miembro de unión secundario puede o no incluir un marcador, que puede posibilitar además la unión terciaria, en la que el miembro de unión terciario proporcionará un marcador.

El anticuerpo secundario, avidina, estreptavidina o biotina, está marcado cada uno independientemente con un resto detectable, que puede ser una enzima que realiza una reacción colorimétrica de un sustrato que tiene un producto de reacción coloreado sustancialmente insoluble, un colorante fluorescente (tinción), un colorante luminiscente o un colorante no fluorescente. A continuación se enumeran ejemplos acerca de cada una de estas opciones.

En principio, se podría usar cualquier enzima que (i) se pueda conjugar o unir indirectamente (p.ej., por medio de avidina conjugada, estreptavidina, biotina, anticuerpo secundario) a un anticuerpo primario, y (ii) use un sustrato soluble para proporcionar un producto insoluble (precipitado).

La enzima empleada puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa y/o glucosa oxidasa; y el sustrato puede ser, respectivamente, un sustrato de fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa o glucosa oxidasa.

Los sustratos de fosfatasa alcalina (AP) incluyen, pero sin limitación, sustrato AP-Blue (precipitado azul, catálogo de Zymed, pág. 61); sustrato AP-Orange (naranja, precipitado, Zymed), sustrato AP-Red (rojo, precipitado rojo, Zymed), fosfato de 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilo (sustrato BCIP, precipitado azul turquesa), fosfato de 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilo / nitroazul de tetrazolio / yodonitrotetrazolio (sustrato BCIP/INT, precipitado amarillo-marrón, Biomed), fosfato de 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilo / nitroazul de tetrazolio (sustrato BCIP/NBT, azul/púrpura), fosfato de 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilo / nitroazul de tetrazolio / yodonitrotetrazolio (BCIP/NBT/INT, precipitado marrón, DAKO), Fast Red (Rojo), Magenta-phos (magenta), Naftol AS-BI-fosfato (NABP)/Fast Red TR (Rojo), Naftol AS-BI-fosfato (NABP)/Nueva Fucsina (Rojo), Naftol AS-MX-fosfato (NAMP)/Nueva Fucsina (Rojo), sustrato Nueva Fucsina AP (rojo), fosfato de p-Nitrofenilo (PNPP, Amarillo, hidrosoluble), VECTOR™ Black (negro), VECTOR™ Blue (azul), VECTOR™ Red (rojo), Vega Red (color rojo frambuesa).

Los sustratos de peroxidasa de rábano (HRP, a veces abreviada PO) incluyen, pero sin limitación, sulfonato de 2,2'-Azino-di-3-etilbenz-tiazolina (ABTS, verde, hidrosoluble), aminoetil carbazol, 3-amino, 9-etilcarbazol AEC (3A9EC, rojo), Alfa-naftol pironina (rojo), 4-cloro-1-naftol (4C1N, azul, azul-negro), tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB, marrón), orto-dianisidina (verde), o-fenilén diamina (OPD, marrón, hidrosoluble), TACS Blue (azul), TACS Red (rojo), 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB, verde o verde/azul), TRUE BLUE™ (azul), VECTOR™ VIP (púrpura), VECTOR™ SG (azul-gris ahumado), y sustrato Blue HRP de Zymed (azul intenso).

Los sustratos de glucosa oxidasa (GO) incluyen, pero sin limitación, nitroazul de tetrazolio (NBT, precipitado púrpura), tetranitroazul de tetrazolio (TNBT, precipitado negro), cloruro de 2-(4-yodofenil)-5-(4-nitrofenil)-3-feniltetrazolio (INT, precipitado rojo o naranja), azul de tetrazolio (azul), nitroviola de tetrazolio (violeta), y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, púrpura). Todos los sustratos de tetrazolio requieren glucosa como co-sustrato. La glucosa se oxida y la sal de tetrazolio se reduce y forma un formazano insoluble que forma el precipitado coloreado.

Los sustratos de beta-galactosidasa incluyen, pero sin limitación, 5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-galactopiranosido (X-gal, precipitado azul). Los precipitados asociados a cada uno de los sustratos enumerados tienen firmas espectrales (componentes) únicas detectables.

La enzima se puede dirigir también a catalizar una reacción de luminiscencia de un sustrato, tal como, pero sin limitación, luciferasa y aequorina, que tiene un producto de reacción sustancialmente insoluble capaz de emitir luminiscencia o de dirigir una segunda reacción de un segundo sustrato, tal como, pero sin limitación, luciferina y ATP o coelenterazina y Ca⁺⁺, que tiene un producto luminiscente.

Las siguientes referencias, que se incorporan en la presente memoria, proporcionan ejemplos adicionales. J.M Elias (1990) Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis. ASCP Press (American Society of Clinical Pathologists), Chicago; J. F. McGinty, F. E. Bloom (1983) Double immunostaining reveals distinctions among opioid peptidergic neurons in the medial basal hypothalamus. Brain Res. 278: 145-153; y T. Jowett (1997) Tissue In situ Hybridization: Methods in Animal Development. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; J Histochem Cytochem, diciembre de 1997, 45(12):1629-1641.

Las preparaciones celulares se pueden someter a hibridación *in-situ* (ISH). En general, se sintetiza una sonda de secuencia de ácido nucleico y se marca con una sonda fluorescente o un miembro de un par ligando:receptor, tal como biotina/avidina, marcado con un resto detectable. Las sondas y restos ejemplares se describen en la sección anterior. La sonda de secuencia es complementaria a una secuencia de nucleótidos objetivo de la célula. Cada célula o compartimento celular que contiene la secuencia de nucleótidos objetivo se puede unir a la sonda marcada. Las sondas usadas en el análisis pueden ser oligonucleótidos o polinucleótidos de ADN o ARN y pueden contener

no solamente nucleótidos naturales, sino sus análogos tales como digoxigenina dCTP, biotina dcTP 7-azaguanosina, azidotimidina, inosina, o uridina. Otras sondas útiles incluyen sondas peptídicas y análogos de las mismas, ADN génico ramificado, moléculas peptidomiméticas, ácidos nucleicos peptídicos, y/o anticuerpos. Las sondas deberían tener una complementariedad suficiente hacia la secuencia de ácido nucleico objetivo de interés de forma que se dé una unión estable y específica entre la secuencia de ácido nucleico objetivo y la sonda. El grado de homología necesaria para una hibridación estable varía con la rigurosidad de la hibridación. Las metodologías convencionales para ISH, hibridación y selección de sondas se describen en Leitch, et al. In Situ Hybridization: a practical guide, Oxford BIOS Scientific Publishers, Microscopy Handbooks v. 27 (1994); y Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989).

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que no se deberían considerar limitantes de ninguna manera. Se incorpora expresamente el contenido de todas las referencias citadas en la presente memoria como referencia.

Ejemplo 1. Construcción de Micromatrices de Tejidos para un Análisis de Supervivencia del Receptor de Estrógenos (ER) y HER2/neu y para un Análisis de Beta-catenina Asociada Nuclear

Diseño de la micromatriz de tejido: Se identificaron muestras fijadas en formalina incrustadas en parafina de 345 casos de carcinoma de mama invasivo con nódulos positivos. Se identificaron las áreas de carcinoma invasivo, lejos de lesiones *in situ* y del epitelio normal, y se tomaron tres núcleos de "biopsia" en sacabocados de 0,6 mm de áreas diferentes. Cada núcleo se dispuso en un bloque receptor diferente, y se realizaron cortes de cinco micras de grosor y se procesaron como se describió previamente (Konenen, J. et al., Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens, (1987) Nat. Med. 4:844-7). De forma similar, se obtuvieron 310 casos de carcinoma de colon y se dispusieron como se describió previamente (Chung, G.G. et al., Clin. Cancer Res. (en prensa)).

Inmunohistoquímica: Se desparafinaron portaobjetos de micromatrices de tejidos revestidas con parafina precortadas y se recuperaron los antígenos mediante cocción a presión (Kato, A.K. et al., (1997) Biotech Histochem. F2:291-8). Los portaobjetos se tiñeron con anticuerpos hacia uno de tres antígenos objetivo: anti-E.R. monoclonal (ratón, Dako Corporation, Carpinteria, CA), anti-HER2/neu policlonal (conejo, Dako Corp.), anti-beta-catenina monoclonal (clon de ratón 14, BD Transduction Labs, San Diego CA), o anti-betacatenina de conejo policlonal. Los primarios se incubaron durante la noche a 4 °C. Después se aplicó el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo de cabra correspondiente conjugado con un esqueleto de polímero de dextrano dotado de peroxidasa de rábano durante 1 hora (Envision, DAKO Corp.). Los antígenos objetivo se visualizaron con un cromógeno de luz visible (Diaminobencidina, DAKO) para su análisis visual, o un cromógeno fluorescente (Cy-5-tiramida, NEN Life Science Products, Boston, MA). Los portaobjetos indicados para el análisis automatizado se tiñeron con una contratinción de DAPI para la visualización de los núcleos, y anti-citoqueratina de conejo policlonal (Zymed, So. San Francisco, CA) o anti-alfa-catenina de conejo para distinguir las células tumorales y el estroma, así como para visualizar la membrana celular. En muchos casos, las imágenes restadas exponencialmente de cortes histológicos teñidos con anti-citoqueratina proporcionaron un marcador aceptable para la membrana celular debido a la confluencia submembranosa de citoqueratina en las células tumorales. Estos anticuerpos se visualizaron mediante el uso de anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo de cabra conjugados a Cy3 o Alexa 488 (Amersham, Piscataway, NJ y Molecular Probes, Eugene, OR). Los portaobjetos indicados para la inspección visual se contra-tiñeron con hidróxido amónico-hematoxilina acidificada. El examen manual en las micromatrices de los niveles de E.R., HER2/neu, y beta-catenina se ha descrito previamente (Snead, D.R. et al., (1993) Histopathology 23:233-8).

Análisis de imágenes: Se obtuvieron imágenes de las micromatrices mediante el uso de una plataforma Deltavision y un programa informático (SoftWorx 2.5) (Applied Precision, Issaquah, WA), con una cámara acoplada Photometrics serie 300 refrigerada mediante agua a través de una lente Nikon Super-Fluor 10x en un microscopio fluorescente invertido TE200 con movimiento automatizado de la platina en X,Y,Z. Las imágenes de bajo aumento de las micromatrices se unieron entre sí mediante el uso de múltiples imágenes de baja resolución (~1500) de la micromatriz (64x64 píxeles). Estas imágenes se analizaron mediante los algoritmos informáticos descritos en la presente memoria para determinar la localización de cada una. Posteriormente, se obtuvieron imágenes monocromáticas de alta resolución (1024x1024 píxeles) de cada una, tanto en el plano focal como 8 micras por debajo de él. Se obtuvieron pares de imágenes para cada colorante fluorescente. Las imágenes se analizaron mediante el uso de algoritmos adicionales como sigue, en resumen. Las regiones de interés (tumor) se identificaron mediante el uso de una máscara derivada de un antígeno específico epitelial expresado de manera ubicua (citoqueratina o alfa-catenina). Las imágenes de los compartimentos de membrana y nucleares marcados con fluorescencia se restaron exponencialmente hasta que quedó una cantidad establecida de intensidad de imagen. Las imágenes se combinaron después de forma que hubo un solapamiento mínimo de la señal de un compartimento respecto de la siguiente. Los píxeles en los que hubo un grado significativo de solapamiento se invalidaron para el análisis posterior. La intensidad de píxel de las imágenes restadas exponencialmente del antígeno objetivo se asignaron a uno de tres compartimentos: nuclear, membrana, o ni nuclear ni membrana (citoplasma). Las intensidades objetivo se analizaron como se describe más adelante. Para E.R. se usó solamente la señal localizada nuclear, para HER2/neu se analizó solamente la señal localizada en la membrana. Para la señal total de beta-catenina, se analizó la proporción de señal nuclear respecto de la de membrana, y la proporción de señal nuclear respecto de la total.

5 Análisis de datos: Los índices de tinción de los cánceres de mama representan los resultados medios (para ER) o maximizados (para HER2/neu) de dos cortes histológicos puntuables. Los estudios posteriores revelaron que el análisis de un único corte histológico podría proporcionar un poder estadístico significativo para juzgar los resultados, de forma que los índices de tinción de la matriz de cáncer de colon representan el resultado de solamente un corte histológico. Se estudió el análisis de supervivencia global mediante el uso del análisis de Kaplan-Meier y el índice de orden logarítmico de Mantel-Cox para determinar la significación estadística. El riesgo relativo se estudió mediante el uso del modelo de riesgos proporcionales de Cox monofactorial. Los análisis se llevaron a cabo mediante el uso de Statview 5.0.1 (SAS Institute, Cary NC).

REIVINDICACIONES

1. Un método puesto en práctica por ordenador para localizar y cuantificar un biomarcador particular en muestras de tejido que contienen células, y el método comprende:

a) usar un dispositivo óptico de formación de imágenes para obtener:

- 5 i) una primera imagen de una célula con una primera tinción que es selectiva para una primera área definida dentro de la célula;
- ii) una segunda imagen de la célula con una segunda tinción que es selectiva para un biomarcador; y
- iii) una tercera imagen de la célula con una tercera tinción que es selectiva para una segunda área definida dentro de la célula, en la que cada imagen está compuesta de localizaciones de píxeles;

10 b) leer la intensidad de píxel en cada localización de píxel de la primera imagen y la tercera imagen y comparar cada valor de intensidad con un valor de intensidad umbral predeterminado;

c) asignar cada localización de píxel en la primera imagen y la tercera imagen a la primera área definida, la segunda área definida, o una tercera área definida, en el que, para cada localización de píxel, si el valor de intensidad de píxel en la localización de píxel solamente en la primera imagen es mayor que el valor de intensidad umbral respectivo, la localización de píxel se asigna a la primera área definida, si el valor de intensidad de píxel en la localización de píxel solamente en la tercera imagen es mayor que el valor de intensidad umbral respectivo, la localización de píxel se asigna a la segunda área definida, si los valores de intensidad de píxel en la localización de píxel tanto en la primera imagen como en la tercera imagen están por debajo de los valores de intensidad umbral respectivos, la localización de píxel se asigna a la tercera área definida, y si los valores de intensidad de píxel en la localización de píxel tanto en la primera imagen como en la tercera imagen son mayores que los valores de intensidad umbral respectivos, los valores de intensidad de píxel se comparan y la localización de píxel se asigna al área definida que corresponde a la imagen que tiene el mayor valor de intensidad de píxel en la localización de píxel;

15 d) determinar la cantidad de intensidad de la primera área definida incorrectamente asignada a la segunda área definida y la cantidad de intensidad de la segunda área definida incorrectamente asignada a la primera área definida y reasignar las localizaciones de píxeles a la primera área definida o la segunda área definida respecto de una proporción ponderada de intensidad de la primera área definida respecto de la segunda área definida, y la ponderación se determina mediante un factor que se incrementa de manera iterativa hasta que la cantidad de localizaciones de píxeles incorrectamente asignadas es menor del 5%;

20 e) comparar la segunda imagen con la primera y la tercera imágenes para identificar las localizaciones de píxeles en la segunda imagen que están dentro de la primera área definida o la segunda área definida; y

f) sumar los valores de intensidad de las localizaciones de píxeles en la segunda imagen asignadas a áreas definidas similares

para localizar y cuantificar así el biomarcador en las muestras de tejido que contienen células.

35 2. El método de la reivindicación 1, en el que cada área definida se selecciona del grupo que consiste en un núcleo celular, un citoplasma, una membrana nuclear, una membrana celular, una mitocondria, un retículo endoplásmico, un peroxisoma y un lisosoma.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un lípido o un carbohidrato.

40 4. El método de la reivindicación 1, en el que cada una de la primera, la segunda y la tercera tinción comprende un fluoróforo.

5. El método de la reivindicación 1, en el que la cuantificación del biomarcador presente dentro de la primera o la segunda áreas definidas comprende sumar los valores de intensidad de la segunda tinción en las localizaciones de píxeles dentro de tal área definida y dividir la suma por el número de píxeles en tal área definida.

45 6. El método de la reivindicación 1, en el que el tejido tiene un grosor de alrededor de cinco micras.

7. El método de la reivindicación 1, en el que la primera área definida es una membrana celular y la segunda área definida es un núcleo celular.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de tejido es un corte de tejido fijado.

50 9. El método de la reivindicación 1, en el que la primera o la tercera tinción reacciona con un marcador que se selecciona del grupo que consiste en citoqueratina, beta-catenina, y alfa-catenina.

10. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una de la primera, la segunda o la tercera tinción comprende un fluoróforo seleccionado del grupo que consiste en 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Cy3 y Cy-5-tiramida.
- 5 11. El método de la reivindicación 1, en el que el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en Her-2/neu, receptor de estrógenos, y receptor de progesterona.
12. El método de la reivindicación 1, en el que se aplica una máscara a la primera, la segunda y la tercera imágenes.
13. El método de la reivindicación 1, en el que la primera o la tercera tinción se selecciona del grupo que consiste en anti-citoqueratina, anti-beta-catenina, anti-alfa-catenina, y anti-vimentina.
- 10 14. El método de la reivindicación 1, en el que la segunda tinción se selecciona del grupo que consiste en anti-Her-2/neu, anti-receptor de estrógenos, anti-receptor de progesterona y anti-EGFR.
15. El método de la reivindicación 1, que comprende además después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b) llevar a cabo una etapa de pseudo-deconvolución que comprende:
- 15 1) obtener una imagen desenfocada de cada una de la primera, la segunda y la tercera tinción en la muestra de tejido en la que cada imagen tiene un valor de intensidad desenfocada para cada localización de píxel; y
- 2) restar el valor de intensidad desenfocada para cada localización de píxel del valor de intensidad en tal localización de píxel en la primera, la segunda y la tercera imágenes de la etapa (a);
- para obtener así una imagen procesada para cada tinción, corregida para el fondo.
- 20 16. El método de la reivindicación 1, en el que el dispositivo óptico de formación de imágenes es un microscopio óptico vertical o invertido.
17. Un sistema para localizar y cuantificar un biomarcador particular en muestras de tejidos que contienen células, y el sistema comprende:
- a) un dispositivo óptico de formación de imágenes para obtener una vista aumentada de la muestra de tejido;
- b) medios para usar el dispositivo óptico de formación de imágenes para obtener:
- 25 i) una primera imagen de una célula con una primera tinción que es selectiva para una primera área definida dentro de la célula;
- ii) una segunda imagen de la célula con una segunda tinción que es selectiva para un biomarcador; y
- iii) una tercera imagen de la célula con una tercera tinción que es selectiva para una segunda área definida dentro de la célula, en la que cada imagen está compuesta de localizaciones de píxeles;
- 30 c) medios para leer la intensidad de píxel en cada localización de píxel de la primera imagen y la tercera imagen y comparar cada valor de intensidad con un valor de intensidad umbral predeterminado;
- d) medios para asignar cada localización de píxel en la primera imagen y la tercera imagen a la primera área definida, la segunda área definida, o una tercera área definida, en el que, para cada localización de píxel, si el valor de intensidad de píxel en la localización de píxel solamente en la primera imagen es mayor que el valor de intensidad umbral respectivo, la localización de píxel se asigna a la primera área definida, si el valor de intensidad de píxel en la localización de píxel solamente en la tercera imagen es mayor que el valor de intensidad umbral respectivo, la localización de píxel se asigna a la segunda área definida, si los valores de intensidad de píxel en la localización de píxel tanto en la primera imagen como en la tercera imagen están por debajo de los valores de intensidad umbral respectivos, la localización de píxel se asigna a la tercera área definida, y si los valores de intensidad de píxel en la localización de píxel tanto en la primera imagen como en la tercera imagen son mayores que los valores de intensidad umbral respectivos, los valores de intensidad de píxel se comparan y la localización de píxel se asigna al área definida que corresponde a la imagen que tiene el mayor valor de intensidad de píxel en la localización de píxel;
- 35 e) medios para determinar la cantidad de intensidad de la primera área definida incorrectamente asignada a la segunda área definida y la cantidad de intensidad de la segunda área definida incorrectamente asignada a la primera área definida y reasignar las localizaciones de píxeles a la primera área definida o la segunda área definida respecto de una proporción ponderada de intensidad de la primera área definida respecto de la segunda área definida, y la ponderación se determina mediante un factor que se incrementa de manera iterativa hasta que la cantidad de localizaciones de píxeles incorrectamente asignadas es menor del 5%;
- 40 f) medios para comparar la segunda imagen con la primera y la tercera imágenes para identificar las
- 45
- 50

localizaciones de píxeles en la segunda imagen que están dentro de la primera área definida o la segunda área definida; y

g) medios para sumar los valores de intensidad de las localizaciones de píxeles en la segunda imagen asignadas a áreas definidas similares

5 para localizar y cuantificar así el biomarcador en las muestras de tejido que contienen células.

18. El sistema de la reivindicación 17, en el que el dispositivo óptico de formación de imágenes es un microscopio óptico vertical o invertido.

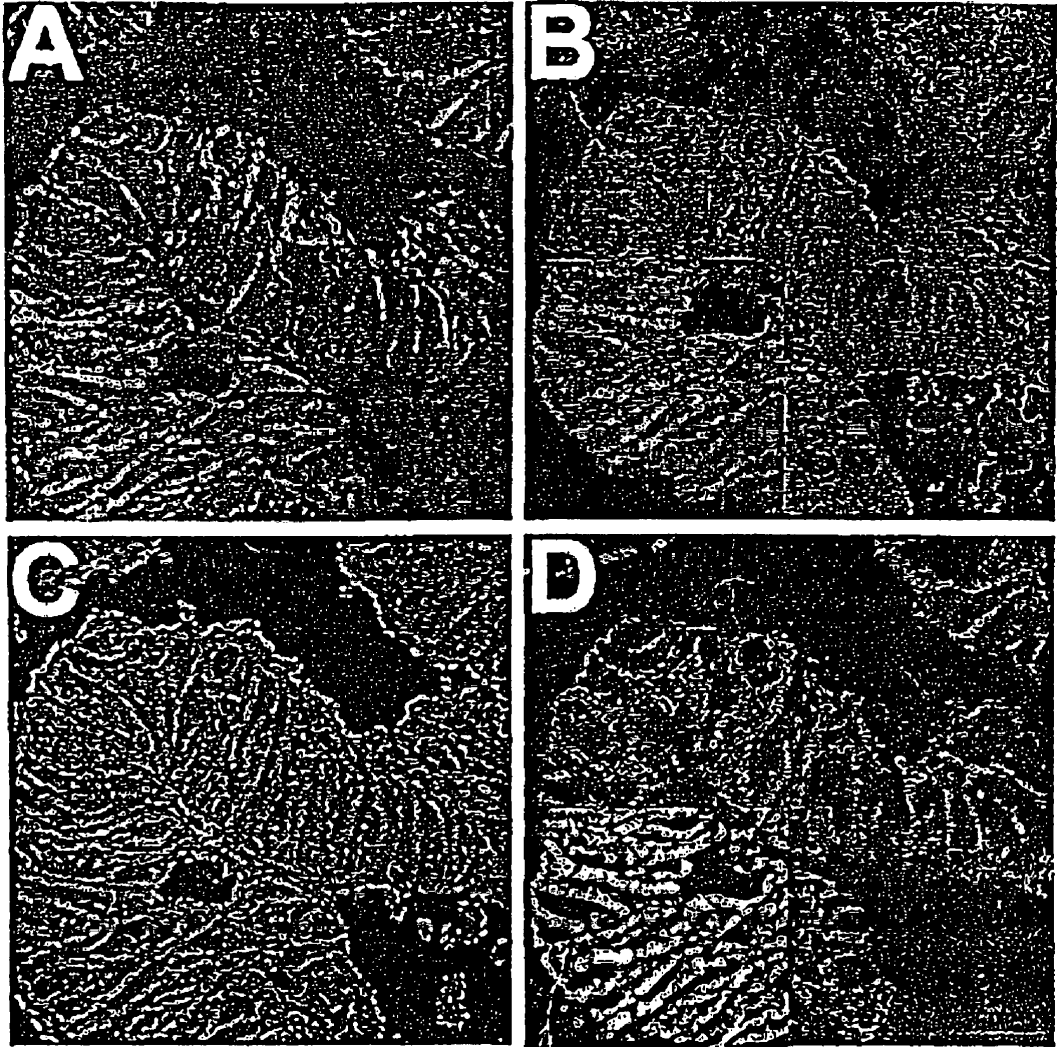


Figura 1

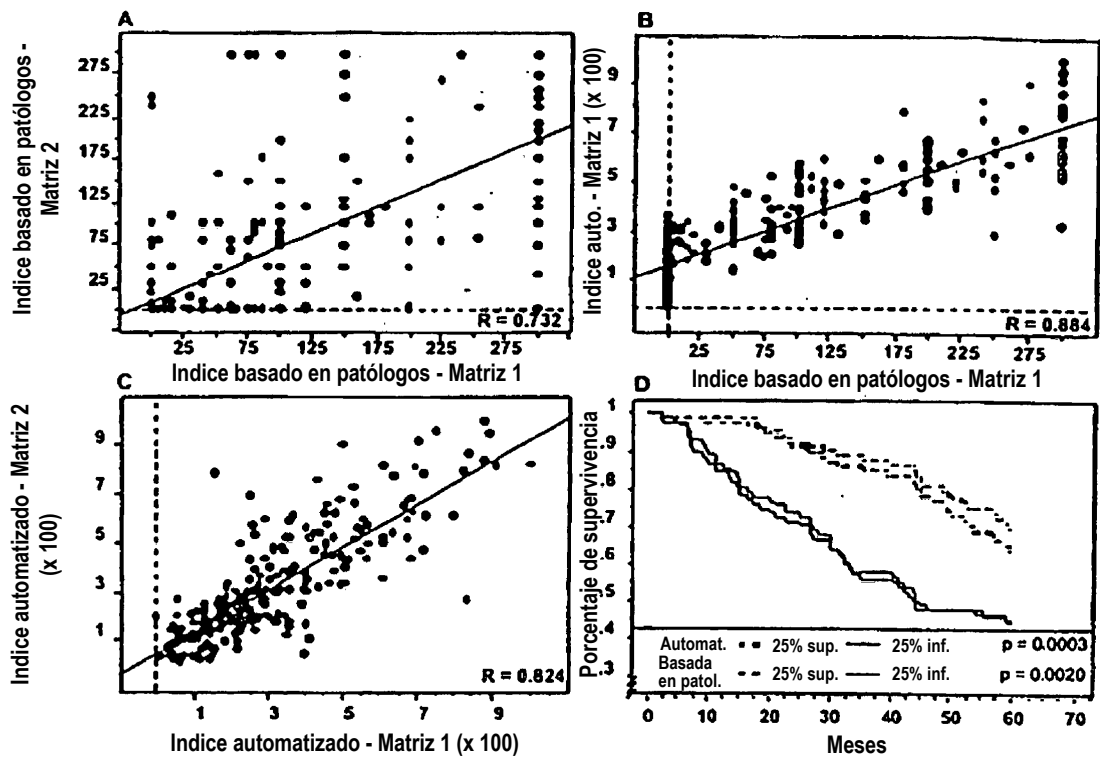


Figura 2

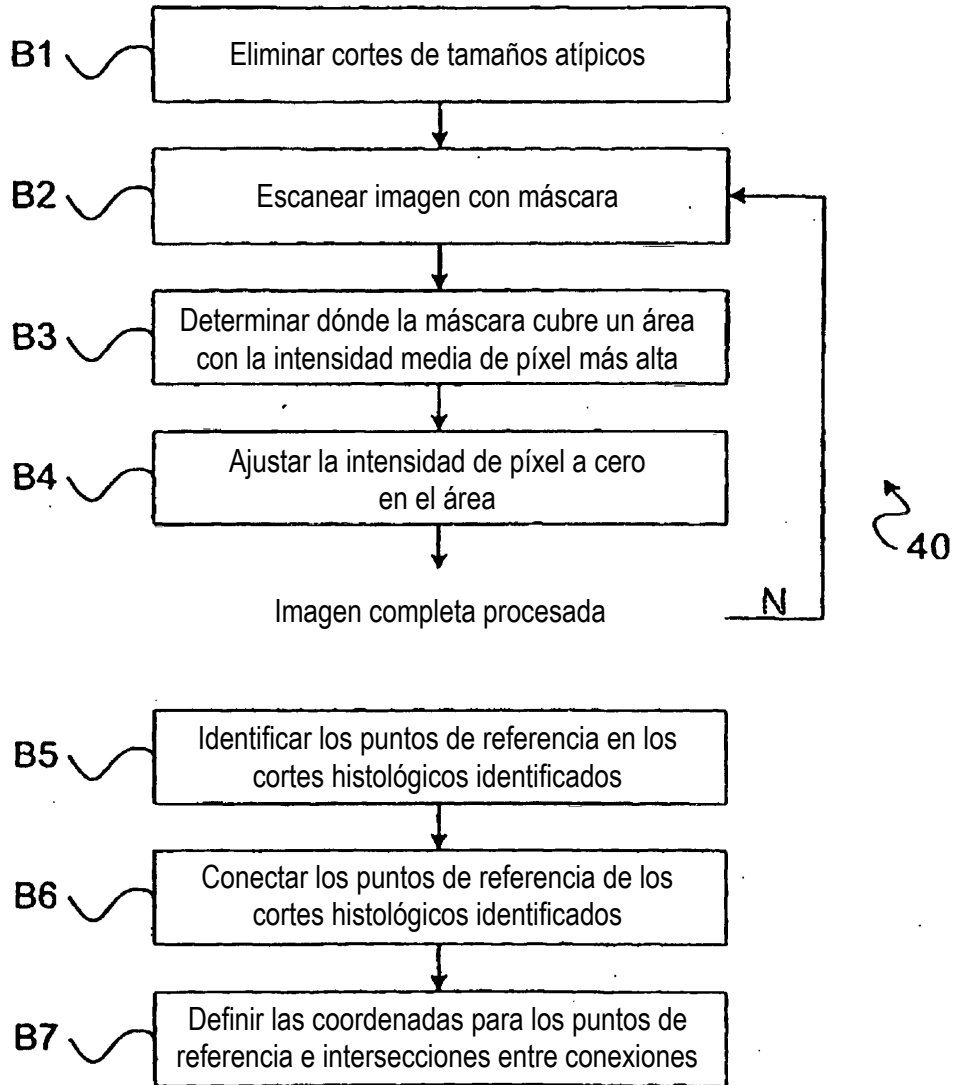


FIG. 3

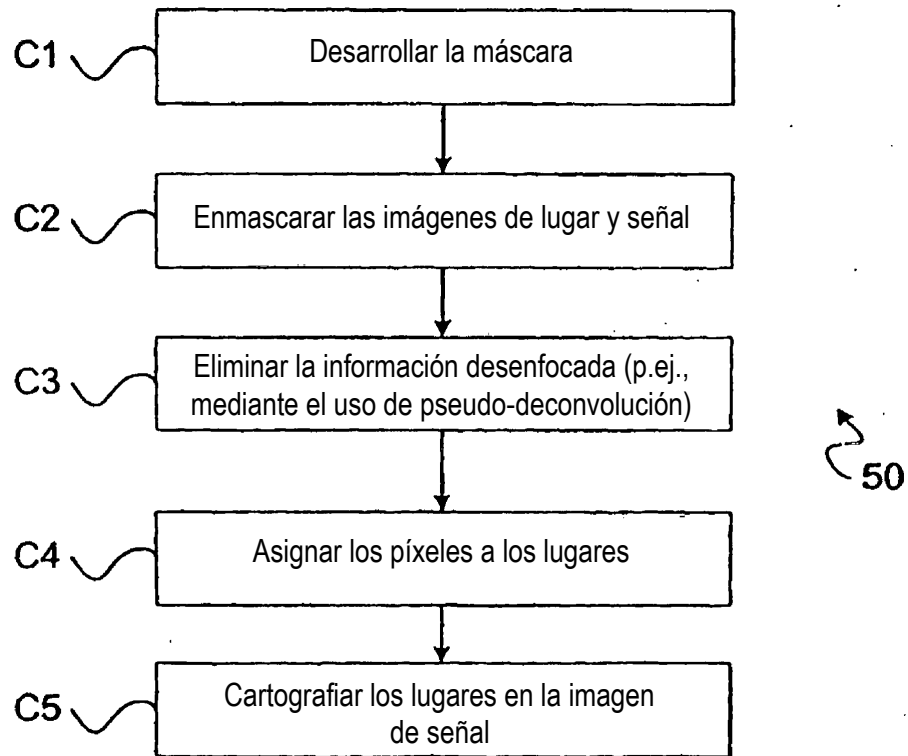


FIG. 4

100
↳

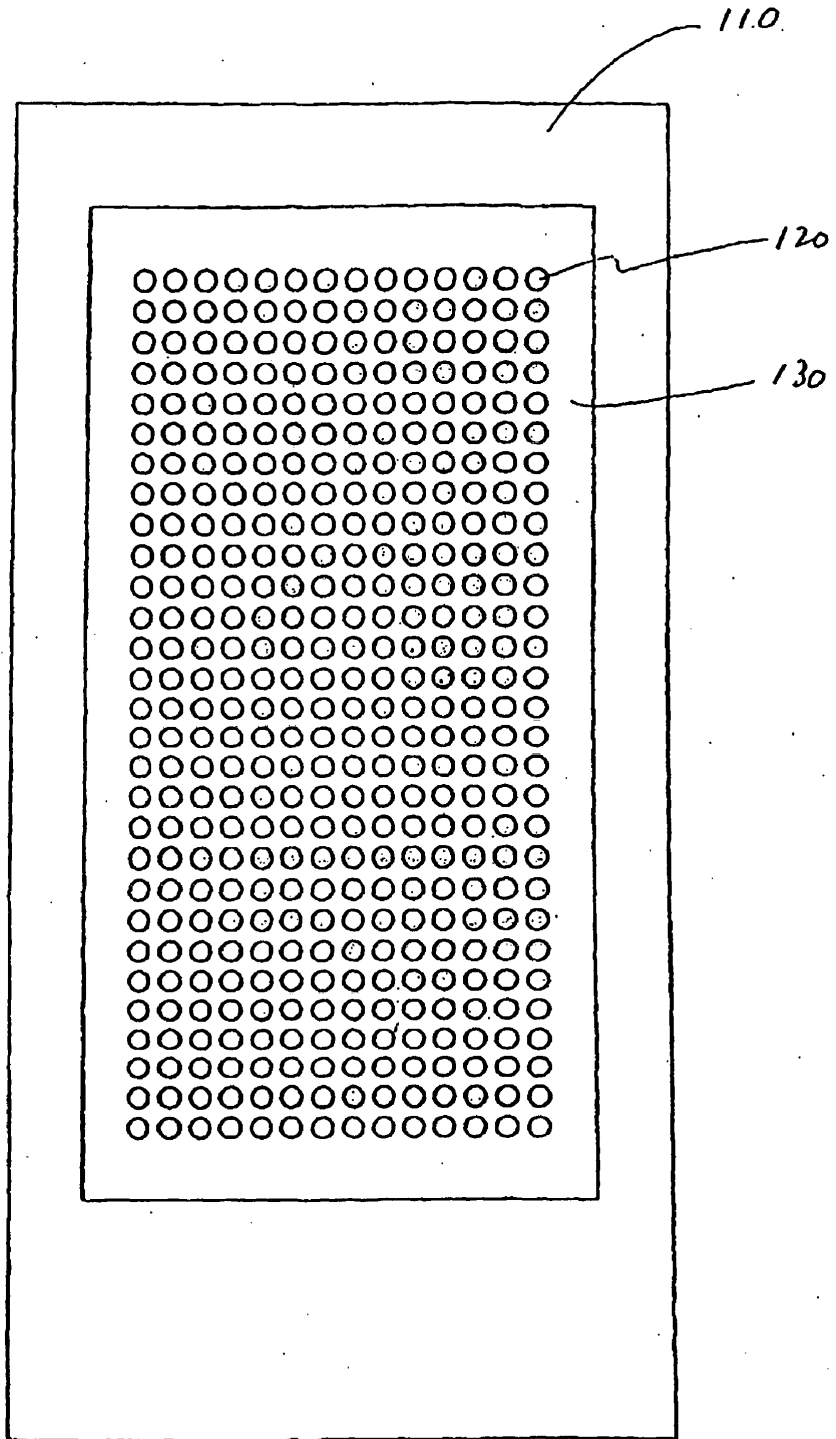


FIG. 5

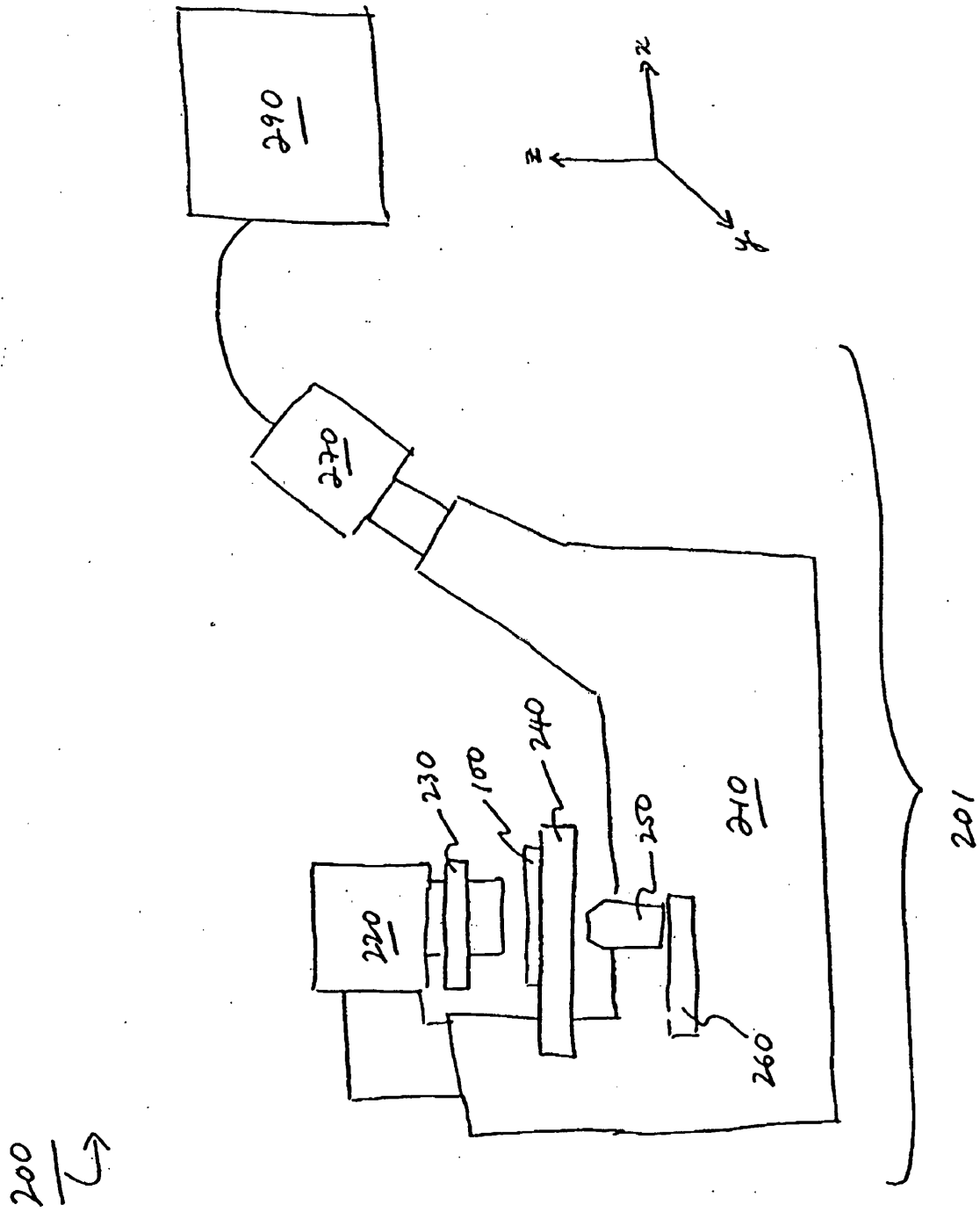


FIG. 6