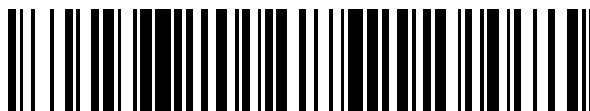


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 106**

51 Int. Cl.:

**G06T 5/00** (2006.01)

**G06T 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2012 E 12718491 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2697770**

54 Título: **Método para preparar videomicroscopía cuantitativa y sistema asociado**

30 Prioridad:

**12.04.2011 US 201161474514 P**

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

**30.07.2015**

73 Titular/es:

**TRIPATH IMAGING, INC. (100.0%)  
780 Plantation Drive  
Burlington, NC 27215, US**

72 Inventor/es:

**MARCELPOIL, RAPHAEL, RODOLPHE y  
ORNY, CEDRICK, RENE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 542 106 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para preparar videomicroscopía cuantitativa y sistema asociado

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al análisis de imágenes y, más particularmente, a un método para calibrar o preparar de otro modo un sistema de videomicroscopía para videomicroscopía cuantitativa en aplicaciones de biología celular y patología y a un sistema asociado y producto de programa de software informático para éste.

10

### **Antecedentes de la invención**

El análisis eficaz de imágenes microscópicas es esencial en biología celular y patología, en particular para la detección y cuantificación de materiales genéticos, tales como por ejemplo genes o ARN mensajero, o la expresión de esta información genética en forma de proteínas, tal como por ejemplo a través de amplificación génica, delección génica, mutación génica, cuantificación de moléculas de ARN mensajero o análisis de la expresión de proteínas. La amplificación génica es la presencia de demasiadas copias del mismo gen en una célula, donde una célula contiene habitualmente dos copias del mismo gen, conocidas de otro modo como alelos. La delección génica indica que puede encontrarse menos de dos copias de un gen en una célula. La mutación génica indica la presencia de genes incompletos o no funcionales. Los ARN mensajeros (ARNm) son moléculas de información genética sintetizadas a partir de un proceso de lectura de genes, que sirven como plantillas para la síntesis proteica. La expresión de proteínas es la producción de una proteína dada por una célula. Si está aumentada la codificación genética para una proteína dada, determinada a partir de un proceso de expresión de proteínas, o si está presente un exceso de copias del gen o del ARNm, la proteína puede estar sobreexpresada. A la inversa, si la codificación genética está suprimida o ausente, la proteína puede estar subexpresada o ausente.

15

20

25

Los comportamientos celulares normales están controlados de forma precisa por mecanismos moleculares que implican un gran número de proteínas, ARNm y genes. Se sabe que la amplificación génica, la delección génica y la mutación génica tienen un papel prominente en comportamientos celulares anormales a través de la expresión de proteínas anormales. La gama de comportamientos celulares de relevancia incluye comportamientos tan diversos como, por ejemplo, regulación de proliferación o diferenciación. Por lo tanto, la detección y cuantificación eficaz en amplificación, delección y mutación génicas, cuantificación del ARNm o análisis de la expresión de proteínas son necesarios para facilitar herramientas útiles de investigación, diagnóstico y pronóstico.

30

35

40

Existen numerosas técnicas de laboratorio dirigidas a la detección y cuantificación en amplificación, delección y mutación génicas, cuantificación del ARNm o análisis de la expresión de proteínas. Por ejemplo, dichas técnicas incluyen técnicas de transferencias de Western, Northern y Southern, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), ensayo de inmunoseparación ligado a enzimas ("ELISA"), e hibridación genómica comparada ("CGH"). Sin embargo, la microscopía se utiliza de forma rutinaria dado que es una técnica informativa, que permite realizar investigaciones rápidas a nivel celular y subcelular, al mismo tiempo que puede implementarse rápidamente a un coste relativamente bajo.

Cuando la microscopía es la técnica de laboratorio elegida, las muestras biológicas deben someterse en primer lugar a preparaciones de detección y revelado. Una vez que las muestras están preparadas, un experto humano típicamente analiza las muestras con un microscopio en solitario en un estudio cualitativo, o con un microscopio acoplado a una cámara y un ordenador en un estudio cuantitativo y generalmente estandarizado. En algunos casos, el microscopio puede estar configurado para análisis completamente automático, donde el microscopio está automatizado con platina y enfoque motorizados, cambiadores de objetivo motorizados, controles de intensidad de la luz automáticos y similares.

45

50

La preparación de las muestras para detección puede implicar diferentes tipos de técnicas de preparación que son adecuadas para el análisis microscópico de imágenes, tales como, por ejemplo, técnicas de preparación basadas en hibridación y basadas en inmunomarcado. Dichas técnicas de detección pueden acoplarse con técnicas de revelado apropiadas, tales como, por ejemplo, técnicas basadas en fluorescencia y basadas en reacciones cromáticas visibles.

55

La hibridación in situ ("ISH") e hibridación fluorescente in situ ("FISH") son técnicas de detección y revelado usadas, por ejemplo, para detección y cuantificación en análisis de amplificación y mutación de información genética. Tanto la ISH como la FISH pueden aplicarse a muestras histológicas o citológicas. Estas técnicas usan sondas complementarias específicas para reconocer secuencias precisas correspondientes. Dependiendo de la técnica usada, la sonda específica puede incluir un marcador químico (ISH) o un marcador fluorescente (FISH), donde después se analizan las muestras usando un microscopio de transmisión o un microscopio de fluorescencia, respectivamente. El uso de un marcador químico o un marcador fluorescente depende del objetivo del usuario, teniendo cada tipo de marcador ventajas correspondientes respecto al otro en casos particulares.

60

65

En análisis de la expresión de proteínas, pueden usarse técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") e

inmunocitoquímica ("ICC"), por ejemplo. La IHC es la aplicación de inmunoquímica a secciones de tejido, mientras que la ICC es la aplicación de inmunoquímica a células cultivadas o marcas de tejido después de que se han sometido a preparaciones citológicas específicas tales como, por ejemplo, preparaciones a base de líquido. La inmunohistoquímica es una familia de técnicas basadas en el uso de un anticuerpo específico, donde se usan anticuerpos para dirigirse específicamente a moléculas dentro de o sobre la superficie de células. El anticuerpo típicamente contiene un marcador que experimentará una reacción bioquímica y, de este modo, experimenta un cambio de color, al encontrarse con las moléculas diana. En algunos casos, la amplificación de señales puede estar integrada en el protocolo particular, donde un anticuerpo secundario, que incluye el colorante marcador, sigue la aplicación de un anticuerpo específico primario.

En estudios tanto de hibridación como de inmunomarcado, se usan cromógenos de diferentes colores para distinguir entre los diferentes marcadores. Sin embargo, el número máximo de marcadores que pueden usarse en un estudio está limitado por varios factores. Por ejemplo, el solapamiento espectral de los colores usados para revelar los respectivos marcadores puede ser un factor limitante, dado que los colorantes pueden absorber una gran parte del espectro visible. Por consiguiente, cuanto mayor sea el número de colorantes implicados en un estudio, mayor será el riesgo de solapamiento espectral. Además, la resolución espectral del dispositivo de adquisición puede ser un factor limitante y el desplazamiento cromático mínimo que el dispositivo es capaz de detectar debe ser considerado.

Además, generalmente se considera que la inmunohistoquímica, así como la química en ISH, muestran mala sensibilidad cuando debe conseguirse la cuantificación de un marcador. Sin embargo, la precisión de cuantificación de estas técnicas puede depender de varios factores. Por ejemplo, el tipo de reacción usada puede desempeñar un papel en la precisión de la técnica, dado que la linealidad de la relación entre la concentración del ligando y el grado de la reacción de tinción inmunohistoquímica puede depender fuertemente del tipo de reacción. Más particularmente, por ejemplo, un método de peroxidasa / anti-peroxidasa puede ser más lineal que un método de biotina-avidina. La localización celular de los marcadores también puede afectar a la precisión donde, por ejemplo, si los marcadores de membrana y nucleares se solapan espacialmente, el color resultante es una mezcla de los colores respectivos. Por consiguiente, dado que la cuantificación correspondiente es subjetiva, la precisión de la determinación puede resultar afectada. Además, un patrón de calibración tal como, por ejemplo, células con características conocidas, geles con concentraciones dadas del marcador, o similares, pueden requerirse donde se aplique un modelo de análisis desarrollado a un caso nuevo y diferente. Kits de tinción están generalmente disponibles que incorporan patrones de calibración. Sin embargo, el patrón de calibración es habitualmente aplicable solamente a una muestra particular, tal como una célula específica o una estructura de un tipo específico que se sabe que muestra características constantes con respecto al patrón, y puede ser de utilidad limitada cuando se aplica a una muestra de una naturaleza diferente.

En general, los estudios "colorimétricos" descritos presentan información de análisis de la muestra en color y facilitan el procesamiento y la cuantificación de la información para ayudar de este modo a proporcionar un diagnóstico o para formar un pronóstico del caso particular. Para ilustración, la detección y cuantificación de la expresión de proteínas HER2 y/o la amplificación génica pueden evaluarse mediante diferentes enfoques usados en microscopía cuantitativa. HER2 es una proteína de la membrana que ha demostrado tener una importancia en el diagnóstico y el pronóstico de cáncer de mama metastásico. Dado que los pacientes positivos para HER2 mostraron ser más sensibles a tratamientos que incluyen Herceptin® (un tratamiento diana desarrollado por Genentech), la definición del estado de HER2 de cánceres de mama metastásicos ha demostrado ser de importancia capital en la elección del protocolo de tratamiento apropiado. Esta definición del estado de HER2 se basó en un estudio de muestras tratadas con técnicas de hibridación (FISH, ISH) o inmunomarcado (IHC).

En dichos estudios, usar FISH con, por ejemplo, un kit aprobado por la FDA tal como PathVysion® producido por Vysis, requiere un protocolo de análisis de imágenes para contar el número de copias del gen HER2 presentes en cada célula. En un caso normal, se encuentran dos copias del gen en cada célula, mientras que más de tres copias del gen en una célula indican que el gen es amplificado. Como alternativa, usar IHC con, por ejemplo, un kit aprobado por la FDA tal como Herceptest® producido por Dako, requiere un protocolo de análisis de imágenes que clasificó los casos en cuatro categorías dependiendo de la intensidad y localización de la tinción de membrana específica de HER2. Estudios actuales tienden a mostrar que estas dos técnicas de investigación (hibridación e inmunomarcado) pueden ser complementarios y pueden ayudar a los patólogos en diagnóstico del subtipo de tumores, cuando se combinan.

Sin embargo, dichos estudios de colorimetría requieren exhaustiva preparación de la muestra y control del procedimiento. Por lo tanto, cuando se dispone de protocolos de tinción adaptados, es crítico ser capaces de verificar que la tinción para cada muestra concuerda con el modelo particular usado en el dispositivo de adquisición y procesamiento de imágenes, de modo que se obtengan resultados útiles y precisos a partir de la información recopilada. En caso contrario, el análisis puede tener que repetirse, partiendo de nuevo desde la fase de preparación de la muestra, dando como resultado posiblemente de este modo un proceso costoso y que requiere tiempo.

En un dispositivo de microscopía típico basado en la adquisición y el procesamiento de imágenes, la imagen aumentada de la muestra debe ser en primer lugar capturada y digitalizada con una cámara. Generalmente, se usan cámaras digitales de dispositivo de carga acoplada (CCD) en microscopía cuantitativa luminosa o de fluorescencia.

Excluyendo espectrofotómetros, una técnica usada para realizar estudios de microscopía colorimétricos incluye el uso de una cámara CCD en blanco y negro (BW). En tal caso, se obtiene una imagen del nivel de grises de la muestra, correspondiente a una luz monocromática que tiene una longitud de onda específica para la tinción de la muestra a analizar. La longitud de onda de luz específica se obtiene filtrando una luz de fuente blanca mediante un  
 5 filtro de ancho de banda estrecho específico, o controlando directamente la longitud de onda de la fuente de luz, usando controles manuales o electrónicos. Las imágenes de la muestra, que muestran la respuesta espectral de la muestra a diferentes longitudes de onda, son capturadas individualmente en orden secuencial para facilitar el análisis. Cuando se analizan múltiples escenas o campos de visión, el protocolo típico es automatizar la secuencia de modo secuencial para conservar tiempo de procesamiento. Sin embargo, cuando se analizan múltiples escenas,  
 10 campos de visión o regiones de interés, la escena, campo de visión o región de interés examinada en una imagen adquirida a una longitud de onda particular debe corresponder a una escena, campo de visión, o región de interés examinada en una imagen diferente adquirida a una longitud de onda diferente para garantizar el análisis preciso de la escena, campo de visión o región de interés. Además, las imágenes adquiridas a diferentes longitudes de onda deben corregirse para diferentes factores de aumento producidos por aberraciones cromáticas.

15 Por consiguiente, técnicas usadas en análisis colorimétricos de muestras preparadas son de uso limitado en la detección y cuantificación de especies de interés debido a varios factores tales como, por ejemplo, solapamiento espectral, mezcla de colores debido al solapamiento espacial de marcadores de membrana, citoplasmáticos y nucleares, aberraciones cromáticas en la trayectoria óptica, resolución espectral limitada del dispositivo de  
 20 adquisición, particularidades de calibración, subjetividad del proceso de detección y cuantificación, e inconsistencias entre operadores humanos. La parte de procesamiento de imágenes de las técnicas de análisis colorimétrico ha estado dirigida históricamente a la detección subjetiva de contraste dentro de la muestra preparada o a un análisis complejo y voluminoso de la muestra a diversas longitudes de onda de luz específicas usando una combinación de fuentes de luz y filtros. Por lo tanto, existe una necesidad de preparar sistemas de imaginología para proporcionar  
 25 comparaciones precisas entre múltiples imágenes, escenas, campos de visión y/o regiones de interés para generar datos de alta calidad, que comprenden la información de análisis necesaria acerca de la muestra, mientras reducen la subjetividad y la inconsistencia en el análisis de muestras.

El documento WO 03/025554 proporciona un método de determinación de una cantidad de al menos una especie  
 30 molecular que comprende una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante. La cantidad de la especie molecular se determina a partir de una imagen de la muestra capturada como datos de imagen por un dispositivo de adquisición de imágenes en color en un sistema de videomicroscopía. Una densidad óptica de la muestra se determina en primer lugar en cada uno de un canal rojo, verde y azul en un píxel particular en la imagen. Una matriz de densidad óptica correspondiente se forma seguidamente para ese píxel. La matriz de densidad óptica  
 35 se multiplica a continuación por la inversa de una matriz de coeficiente de absorción relativa para formar una matriz resultante para el píxel. La matriz de coeficiente de absorción relativa comprende un coeficiente de absorción relativa para cada colorante, independientemente de la muestra, en cada uno de los canales rojo, verde y azul. La matriz resultante comprende, por lo tanto, la cantidad de cada especie molecular, tal como se indica mediante el colorante respectivo, para ese píxel. También se proporcionan sistemas asociados y productos de programa de  
 40 software informático

### Sumario de realizaciones de la invención

La presente invención proporciona un método de calibración de un sistema de imaginología para analizar una  
 45 pluralidad de especies moleculares en una muestra, comprendiendo dicho método: adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra con un dispositivo de adquisición de imágenes a una pluralidad de longitudes de onda diferentes; comparar una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva con una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda diferente; determinar un factor de aumento para cada una de una pluralidad de longitudes de onda a partir de  
 50 una imagen de referencia, donde el factor de aumento caracteriza la diferencia de aumento entre una imagen tomada con respecto a una longitud de onda y otra imagen tomada con respecto a una longitud de onda diferente; y alinear la pluralidad de imágenes de modo que la región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva corresponda a la región de interés asociada con la al menos una de las imágenes adquiridas a la longitud de onda diferente; donde determinar el factor de aumento comprende: capturar  
 55 una imagen desenfocada de un portaobjetos de calibración en cada una de la pluralidad de longitudes de onda, comprendiendo el portaobjetos de calibración una cuadrícula de una pluralidad de celdas dispuestas en un patrón alterno, comprendiendo cada celda además una pluralidad de píxeles; determinar un sombreado de cada uno de la pluralidad de píxeles para formar una máscara para discriminar entre un porcentaje de los píxeles más claros y un porcentaje igual de los píxeles más oscuros; determinar un área para cada una de una pluralidad de celdas;  
 60 determinar un centro para cada una de una pluralidad de celdas; medir una distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas y sus celdas colindantes en la misma imagen; afinar las mediciones de las áreas para cada una de la pluralidad de celdas y las mediciones de las distancias entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas; proporcionar el factor de aumento en base al promedio de las distancias medidas.

65 En una realización descrita, un método para calibrar un sistema de imaginología para analizar una pluralidad de especies moleculares en una muestra incluye adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra con un dispositivo

de adquisición de imágenes, tal como una cámara en un sistema de videomicroscopía, a una pluralidad de longitudes de onda diferentes. El método incluye comparar una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva con una región de interés en asociación con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda diferente. Además, el método incluye alinear la pluralidad de

5 imágenes, de modo que la región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva corresponda a la región de interés asociada con la al menos una de las imágenes adquiridas a la longitud de onda diferente.

De acuerdo con una realización de la invención, el método puede incluir además determinar un factor de aumento para cada una de una pluralidad de longitudes de onda a partir de una imagen de referencia, donde el factor de aumento caracteriza la diferencia de aumento entre una imagen tomada con respecto a una longitud de onda y otra imagen tomada con respecto a una longitud de onda diferente. Determinar el factor de aumento puede comprender capturar una imagen desenfocada de un portaobjetos de calibración en cada una de la pluralidad de longitudes de onda. Dicho portaobjetos de calibración puede incluir una cuadrícula de una pluralidad de celdas dispuestas en un patrón alterno, cada celda comprendiendo además una pluralidad de píxeles. De acuerdo con una técnica, la imagen desenfocada es capturada aplicando un filtro de paso bajo a una imagen enfocada del portaobjetos de calibración. En otra realización, la imagen desenfocada puede capturarse ajustando el plano de enfoque en el eje z positivo o negativo.

10

En un aspecto, el método puede incluir además determinar un sombreado de cada uno de la pluralidad de píxeles para formar una máscara de imagen que discrimina entre un porcentaje de píxeles que tienen el sombreado más claro y un porcentaje de píxeles que tienen el sombreado más oscuro. En una realización, el porcentaje de píxeles que tienen el sombreado más oscuro y más claro es equivalente, y pueden ser cada uno de aproximadamente el 25%. Además, el método puede incluir determinar un área y el centro para cada una de la pluralidad de celdas, medir la distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas, y afinar las mediciones de las áreas para cada una de la pluralidad de las celdas y las distancias entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas.

20

La distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas puede medirse promediando las distancias medidas entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas y los centros de cada una de las celdas colindantes cardinales de la pluralidad de celdas en las direcciones norte, este, sur y oeste. Además, la distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas puede afinarse excluyendo del cálculo de la media distancias que están fuera de un intervalo de confianza desde el cálculo de la media. Del mismo modo, las mediciones para las áreas de la pluralidad de celdas pueden afinarse excluyendo del cálculo de la media las áreas que están fuera de un intervalo de confianza del cálculo de la media.

30

Además, las mediciones del factor de aumento pueden afinarse desplazando el portaobjetos de calibración en una dirección aleatoria o de otro modo no establecida de antemano una pluralidad de veces, capturando una imagen desenfocada para cada una de las veces que el portaobjetos de calibración es desplazado, determinando un sombreado de cada uno de la pluralidad de píxeles en cada uno de los portaobjetos de calibración desplazados para formar una máscara para discriminar entre un porcentaje de los píxeles que tienen el sombreado más claro y un porcentaje igual de los píxeles que tienen el sombreado más oscuro, determinando un área para cada una de la pluralidad de celdas en cada uno de los portaobjetos de calibración, determinando un centro para cada una de la pluralidad de celdas en los portaobjetos de calibración desplazados, midiendo las distancias entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas en cada uno de los portaobjetos de calibración desplazados, y afinando las mediciones para las áreas de cada una de la pluralidad de celdas en cada uno de los portaobjetos de calibración desplazados y las mediciones de distancias entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas en cada uno de los portaobjetos de calibración desplazados.

35

En una realización de la presente invención, adquirir la pluralidad de imágenes de la muestra incluye explorar la imagen a una pluralidad de longitudes de onda diferentes. Cada exploración produce un factor de desplazamiento en una primera dirección y una segunda dirección. El factor de desplazamiento define la diferencia de desplazamiento entre una región de interés de una imagen tomada con respecto a una longitud de onda y una región de interés de una imagen tomada con respecto a una segunda longitud de onda.

50

Otra realización de la presente invención incluye redimensionar las coordenadas horizontales de las áreas de perfil horizontales y verticales de coordenadas medidas en píxeles a coordenadas medidas mediante la distancia entre una posición de píxel de referencia central y cada una de las posiciones de píxel horizontales correspondientes. En una realización, la distancia puede medirse en micrómetros. Las coordenadas verticales de las áreas de perfil horizontales y verticales pueden redimensionarse para referirse a una intensidad óptica promedio en una posición de coordenada horizontal particular y la longitud de onda relacionada de la imagen. Además, realizaciones de la presente invención pueden comprender además determinar un movimiento entre la pluralidad de imágenes determinando la diferencia de desplazamiento entre las áreas de perfil horizontales y verticales redimensionadas de una imagen de referencia y las áreas de perfil horizontales y verticales redimensionadas de una imagen diana. Además, alinear la pluralidad de imágenes puede comprender además redimensionar la pluralidad de imágenes mediante un factor de aumento respectivo y mover las imágenes en una dirección horizontal y vertical para alinear las áreas de perfil horizontales y verticales redimensionadas de cada una de las imágenes con las áreas de perfil

55

60

65

horizontales y verticales redimensionadas de la imagen de referencia.

Otro aspecto ventajoso de la presente invención comprende determinar una cantidad de especie molecular, tal como se indica mediante un colorante respectivo, para cada píxel en cada ubicación de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes, estando la pluralidad de imágenes alineadas unas con respecto a otras. Adicionalmente, la presente invención puede comprender un sistema de imaginología para analizar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, comprendiendo el sistema un dispositivo de adquisición de imágenes configurado para adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra a diferentes longitudes de onda, y un dispositivo procesador en comunicación con el dispositivo de adquisición de imágenes. El dispositivo procesador puede estar configurado para comparar una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva con una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda diferente y para alinear la pluralidad de imágenes capturadas por el sistema de imaginología, de modo que la región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva corresponda a la región de interés asociada con la al menos una de las imágenes adquiridas a la longitud de onda diferente.

En una realización, el dispositivo de adquisición de imágenes puede estar configurado además para adquirir la pluralidad de imágenes explorando las imágenes, produciendo cada exploración un factor de desplazamiento en una primera y una segunda dirección, definiendo el factor de desplazamiento la diferencia de desplazamiento entre una región de interés de una imagen tomada con respecto a una longitud de onda y una región de interés de una imagen tomada con respecto a una longitud de onda diferente. El dispositivo procesador puede estar configurado para determinar una cantidad de especies moleculares, tal como se indica mediante un colorante respectivo, para cada píxel en la pluralidad de imágenes. Además, el dispositivo procesador puede estar configurado para determinar un factor de aumento para cada una de la pluralidad de imágenes tomadas con longitudes de onda que son diferentes de la longitud de onda de una imagen de referencia. En otra realización, el dispositivo de adquisición de imágenes puede comprender una cámara en blanco y negro y puede comprender una pluralidad de filtros, correspondiendo cada filtro a una longitud de onda diferente representativo de un colorante respectivo en la muestra.

Otro aspecto ventajoso más de la presente invención comprende un producto de programa de software informático configurado para ser ejecutable en un dispositivo informático para calibrar un sistema de imaginología para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra. El producto de programa informático comprende una parte ejecutable para adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra con un dispositivo de adquisición de imágenes a una pluralidad de longitudes de onda diferentes, una parte ejecutable para comparar una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva con una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda diferente, y una parte ejecutable para alinear la pluralidad de imágenes, de modo que la región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva corresponda a una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a la longitud de onda diferente.

Por lo tanto, realizaciones de la presente invención comprenden una técnica de calibración para preparar un sistema de imaginología para proporcionar comparaciones precisas entre múltiples imágenes, escenas, campos de visión y/o regiones de interés para generar datos de alta calidad, que comprenden la información necesaria sobre la muestra, mientras se reduce la subjetividad e inconsistencia en el análisis de la muestra. Realizaciones de la presente invención pueden proporcionar además un aparato y un producto de programa informático para preparar un sistema de imaginología para proporcionar comparaciones precisas entre múltiples imágenes, escenas, campos de visión y/o regiones de interés para generar datos de alta calidad para el análisis de la muestra.

### Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito de este modo la invención en términos generales, a continuación se hará referencia a los dibujos adjuntos, que no están necesariamente dibujados a escala, y donde:

La figura 1 es una representación esquemática general de un sistema de videomicroscopía cuantitativa de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 2 es una representación esquemática general de un sistema de videomicroscopía cuantitativa de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 3 es un diagrama de flujo para calibrar un sistema de videomicroscopía de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 4 es un diagrama de flujo para calibrar un sistema de videomicroscopía de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 5 es un diagrama de dispersión que ilustra una evaluación de la distorsión de una imagen tomada a partir de un sistema de videomicroscopía de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 6 es un histograma que ilustra estadísticas de densidad óptica de una pluralidad de píxeles en una imagen de una muestra tomada de un sistema de videomicroscopía de acuerdo con una realización de la presente invención; y

La figura 7 es una ilustración de una región de interés de un portaobjetos que comprende áreas de perfil vertical

y horizontal.

### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se describirá a continuación más completamente en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran realizaciones preferidas de la invención. Esta invención puede, sin embargo, materializarse en muchas formas diferentes y no debe considerarse limitada a las realizaciones descritas en el presente documento; en su lugar, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación sea exhaustiva y completa, y transportarán completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia. Números similares se refieren a elementos similares en toda ella.

15 Realizaciones de la presente invención se refieren, en general, a sistemas y métodos para calibrar o preparar de otro modo un sistema de videomicroscopía, donde el sistema puede estar configurado para determinar una cantidad (por ejemplo, concentración) de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando la especie molecular indicada por un colorante. La cantidad de la especie molecular se determina analizando imágenes de la muestra que son capturadas usando un dispositivo de adquisición de imágenes, tal como una cámara o un escáner, en un sistema de videomicroscopía. De acuerdo con una realización de la invención, el sistema puede estar configurado para ser capaz de detectar uno o más colorantes particulares, correspondiendo cada colorante a una firma espectral particular, para determinar la cantidad de una especie molecular en cada píxel en cada ubicación de píxel en las imágenes. En una realización, el sistema de videomicroscopía se prepara antes para determinar la cantidad de una especie molecular en cada píxel en cada ubicación de píxel en las imágenes. Por lo tanto, realizaciones de la presente invención pueden proporcionar ventajas respecto a la técnica anterior, tales como reducir errores en las estimaciones de las concentraciones de colorante debido a calibración inapropiada o comparaciones imprecisas de cada píxel en cada ubicación de píxel en la pluralidad de imágenes.

25 De acuerdo con una realización de la presente invención, el análisis de la muestra puede usarse para cuantificar la tinción con melastatina tanto en núcleos de melanocitos normales (melanocitos de la capa basal de células epiteliales), considerados como núcleos de referencia, como en núcleos de melanocitos anormales (melanocitos de focos tumorales). Los resultados de dicho análisis cuantitativo indican si el gen está regulado negativamente o es expresado normalmente en los núcleos anormales. Sin embargo, la eficiencia del análisis cuantitativo depende mucho de la metodología de análisis de imágenes, que debe considerar y realizar segmentación de los núcleos de melanocitos, así como análisis colorimétricos de los colorantes específicos usados en el protocolo.

35 Una pluralidad de cromógenos pueden estar presentes en una muestra histológica o citológica tal como, por ejemplo, uno o más marcadores (por ejemplo, Brown DAB o BCIP-NBT), uno o más contraindicaciones morfológicas (por ejemplo, Nuclear Fast Red-NFR, Hematoxilina, Eosina, Light Green SF, Orange G), y uno o más pigmentos naturales (por ejemplo, melanina). Todos los cromógenos son tenidos típicamente en cuenta para analizar la muestra, y realizaciones de la presente invención proporcionan técnicas para analizar la muestra dado cada uno de los cromógenos, píxel a píxel, para cuantificar la cantidad de una o más especies moleculares en la muestra. Por ejemplo, el ensayo citológico basado en la tinción de Papanicolaou es un procedimiento de tinción multicromática que contendría 4 colorantes diferentes: hematoxilina, Orange G, Eosina Y y Light Green SF.

45 La plataforma para la evaluación de muestras biológicas mediante el análisis de imágenes se está desplazando cada vez más desde un analizador de imágenes de uso general a una "estación de trabajo de patología" dedicada más, y a menudo muy, especializada. Dichas estaciones de trabajo están diseñadas típicamente para facilitar el trabajo de rutina, a menudo combinando muchas de las herramientas necesarias para proporcionar a un patólogo la información necesaria para determinar los mejores resultados posibles. Un ejemplo de dicha estación de trabajo se ilustra en la figura 1 como un sistema de videomicroscopía cuantitativa, indicado mediante el número 100, de acuerdo con una realización de la presente invención. El sistema 100 generalmente comprende un microscopio 150 que tiene una fuente de luz 200 y un objetivo de aumento 250, una pluralidad de filtros 600, una cámara 300, un dispositivo informático 350, y un kit de transmisión de datos 400 entre la cámara 300 y el dispositivo informático 350. El microscopio 150 puede comprender, por ejemplo, un microscopio Axioplan (o Axiovert) producidos por ZEISS de Alemania o un microscopio similar que tiene una fuente de luz de campo claro. La cámara 300 se acopla de forma operativa al microscopio 150 y, en una realización, comprende una cámara en blanco y negro, tal como, por ejemplo la prosilica GE1910 de Allied Vision Technologies. Típicamente, dicha cámara 300 también incluye un capturador de fotogramas asociado (no mostrado) para facilitar la captura de imágenes, estando tanto la cámara 300 como el capturador de fotogramas asociado denominados en el presente documento como la "cámara 300" por comodidad. En algunos casos, tanto la cámara 300 como el microscopio 150 pueden sustituirse por, por ejemplo, un escáner plano lineal en blanco y negro y una fuente de iluminación controlada. Nótese que, aunque diferentes configuraciones del sistema necesario 100 están contempladas por la presente invención, la presente invención se describirá en el presente documento en términos de una cámara 300 y microscopio asociado 150. Por consiguiente, un experto en la materia entenderá y apreciará las capacidades y metodologías asociadas con estas diferentes configuraciones para conseguir la presente invención tal como se detalla en el presente documento. Además, aunque la presente realización se desvela como una cámara, se entiende que la cámara puede ser cualquier dispositivo de adquisición de imágenes, tal como una cámara, escáner, o cualquier dispositivo configurado para capturar una pluralidad de imágenes. El sistema de adquisición de imágenes es capaz de capturar imágenes de baja

y/o alta resolución a cualquier aumento deseado, diversas regiones de interés, y dentro de diversos campos de visión que pueden corresponder a toda o una parte de la muestra o el portaobjetos.

5 La cámara 300 está generalmente configurada para capturar una pluralidad de imágenes 450 de una muestra 500 a través del objetivo de aumento 250 (donde se usa un escáner plano, la imagen 450 es capturada a través de lentes internas), donde las imágenes 450 pueden comprender además una imagen digital que tiene datos de imagen correspondientes (denominados colectivamente en el presente documento como “la imagen 450”). De acuerdo con una realización, una imagen de calibración 451 de un portaobjetos de calibración 550 tal como se muestra en la figura 2, capturada mediante el sistema de adquisición de imágenes, puede usarse para preparar el sistema de 10 microscopía antes del análisis de muestras colocadas sobre portaobjetos. Los filtros 600 filtran la luz procedente de la fuente de luz 200, y durante el funcionamiento del sistema 100, múltiples imágenes de la muestra 500 se toman usando diferentes filtros, los filtros diferenciados proporcionados por una rueda de filtros u otro dispositivo de filtración como es conocido por los expertos en la materia. De acuerdo con una realización, cada longitud de onda corresponde a un colorante respectivo de interés que puede estar presente en las imágenes. En una realización, los 15 filtros empleados pueden corresponder a las longitudes de onda de 460 nm, 490 nm, 520 nm, 570 nm y 630 nm. Por consiguiente, las imágenes 450 son capturadas generalmente de forma individual, donde cada imagen corresponde a una imagen filtrada de longitud de onda individual del campo de visión. De acuerdo con una realización de la presente invención, la cámara 300 está configurada para capturar una pluralidad de imágenes de calibración 455 de un portaobjetos de calibración 550 correspondiente a cada uno de la pluralidad de filtros, correspondiendo los filtros a diferentes firmas espectrales. El kit de transmisión de datos 400 está configurado para ser capaz de transmitir la 20 imagen de calibración 455 al dispositivo informático 350, donde el dispositivo informático 350 está configurado además para ser capaz de analizar la imagen de calibración 455 con respecto a cada una de las longitudes de onda. Un experto en la materia apreciará que el dispositivo informático 350 puede ser cualquier clase de dispositivo procesador o elemento de procesamiento configurado para comunicar con el sistema de adquisición de imágenes y está configurado además para analizar una pluralidad de imágenes tal como se describe en el presente documento. 25

De acuerdo con un aspecto particularmente ventajoso de la presente invención, el sistema 100 está configurado para analizar las imágenes de calibración para preparar un sistema de videomicroscopía para videomicroscopía 30 cuantitativa en aplicaciones de biología celular y patología de acuerdo con la ley de Lambert-Beer. La ley de Lambert-Beer generalmente describe una proporcionalidad que puede observarse entre la concentración de moléculas en una solución (la concentración de la “especie molecular” o la “muestra”) y la intensidad de luz medida a través de la solución. La ley de Lambert-Beer se expresa típicamente como:

$$35 \quad \text{a.} \quad \text{DO} = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (1)$$

donde DO es la densidad óptica de la solución,  $\varepsilon$  es una constante de proporcionalidad llamada el coeficiente de extinción molar o absorción,  $l$  es el grosor de la muestra, y  $C$  es la concentración de la especie molecular. El 40 coeficiente de absorción  $\varepsilon$  es específico de la especie molecular y se expresa típicamente en unidades de  $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Esta relación de proporcionalidad definida por la ley de Lambert-Beer se ha verificado en las varias condiciones que incluyen, por ejemplo, luz monocromática que ilumina la muestra, baja concentración molecular dentro de la 45 muestra, generalmente ninguna heterogeneidad de respuesta de fluorescencia o luminosa (fluorescencia y difusión despreciables) de la muestra, y falta de fotosensibilidad química de la muestra. Además, otro requisito para un análisis de acuerdo con la ley de Lambert-Beer incluye, por ejemplo, correcta iluminación Köhler de la muestra bajo el microscopio. La iluminación Köhler está disponible con muchos microscopios modernos, proporcionando una iluminación uniforme de la muestra en el plano de la imagen y permitiendo un control del contraste eficaz. La 50 iluminación Köhler es crítica para ciertos procesos tales como, por ejemplo, análisis de densitometría. Una correcta iluminación Köhler es proporcionada típicamente mediante, por ejemplo, un sistema de iluminación de dos platinas para el microscopio en el que se adquieren imágenes de la fuente en la abertura del condensador de subplatina mediante un condensador auxiliar. El condensador de subplatina, a su vez, forma una imagen del condensador auxiliar sobre el objeto. Un diafragma de iris también puede estar colocado en cada condensador, donde el primer iris controla el área del objeto a iluminar, y el segundo iris modifica la abertura numérica del haz de iluminación. 55

Para medir de forma precisa la concentración de especies dadas de las que se adquieren imágenes en un microscopio, las mediciones de las densidades ópticas realizadas a diferentes longitudes de onda deben corresponder específicamente a la parte observada de la muestra. Por consiguiente, un aspecto ventajoso de la presente invención incluye un método para determinar un aumento relativo de un portaobjetos de calibración, 60 escena, o patrón dado del que se adquieren imágenes a diferentes longitudes de onda para corresponder específicamente un píxel en una ubicación de píxel dada de una parte observada de una muestra a una longitud de onda a un píxel en la ubicación de píxel correspondiente en la parte observada de la muestra en una o más diferentes longitudes de onda. Las coordenadas del centro del objetivo de aumento 250 se determinan con respecto al centro del dispositivo o chip electrónico que comprende el componente que produce imágenes de la cámara 300. 65 Un factor de aumento observado se determina a continuación para cada longitud de onda y se compara con el factor



de aumento para una longitud de onda seleccionada de forma arbitraria. Por ejemplo, una longitud de onda central comprendería la longitud de onda seleccionada a la que el factor de aumento para cada una de las otras longitudes de onda se compararía. La imagen para cada longitud de onda se ajusta a continuación de acuerdo con el factor de aumento relativo determinado y las coordenadas relativas del centro del objetivo de aumento 250.

5 De acuerdo con una realización y con referencia a la figura 3, un portaobjetos de calibración que comprende una imagen con patrón de tablero de ajedrez, tal como una placa de calibración de punto focal (FocalPoint Calibration Plate), es capturado (Bloque 10) por la cámara 300 a diferentes longitudes de onda. Específicamente, el patrón de tablero de ajedrez puede ser capturado como una imagen desenfocada aplicando un filtro de paso bajo a una  
10 imagen enfocada del patrón de tablero de ajedrez. En otra realización, una imagen desenfocada del patrón de tablero de ajedrez puede ser capturada capturando directamente una imagen desenfocada del patrón de tablero de ajedrez ajustando el plano de enfoque en una dirección vertical, por encima o por debajo del mejor plano de enfoque z. Después de que se obtiene la imagen desenfocada, se obtiene un histograma de la imagen desenfocada que detalla, por ejemplo, el 25% de píxeles más oscuros y el 25% de más claros en la imagen.

15 Por consiguiente, la imagen desenfocada puede modificarse para presentar el 25% de píxeles más oscuros y el 25% de píxeles más claros, y el 50% de píxeles medios son desechados de la imagen para crear una máscara de imagen (Bloque 11) de la imagen desenfocada que comprende una cuadrícula de celdas, conteniendo las celdas, por ejemplo, el 25% de píxeles más oscuros y el 25% de más claros. Las celdas que contienen los píxeles más oscuros y más claros que tocan el borde de la imagen desenfocada también pueden desecharse y excluirse de las posteriores etapas de calibración. Además, el área de las celdas de la máscara de imagen puede medirse (Bloque 12), y el tamaño de área medio y las desviaciones típicas pueden calcularse. Las celdas que tienen tamaños de área que están fuera, por ejemplo, de un intervalo de confianza al 95% también son desechadas del proceso de calibración.

25 Las coordenadas para el centro de gravedad para cada una de las celdas restantes que componen la cuadrícula de la imagen desenfocada pueden calcularse a continuación. La distancia entre las coordenadas del centro de cada celda y las coordenadas del centro de cada una de las celdas colindantes en diferentes direcciones, tales como direcciones norte, este, sur y oeste, puede medirse a continuación (Bloque 12). Una distancia promedio inicial puede calcularse a continuación, que promedia las distancias medidas entre cada una de las coordenadas del centro de cada una de las celdas y las coordenadas del centro de cada una de las celdas colindantes de las celdas. Para una celda dada, la distancia promedio entre la coordenada del centro de la celda y las coordenadas del centro de las colindantes cardinales de la celda pueden calcularse mediante la siguiente ecuación, donde  $k_{NNi}^{ésima}$  es la  $k_i^{ésima}$   
30 colindante cardinal de la celda.

$$\bar{d}_{i_{NN}} = \frac{1}{4 \text{ Colindantescardinales}} \sum d(i, k_{NNi}^{ésima}) \quad (2)$$

35 además de la distancia media, el proceso de calibración también puede incluir determinar la desviación típica de modo que aquellas distancias que están fuera de, por ejemplo, el intervalo de confianza al 95% son desechadas a continuación de la caracterización de la distancia media de las celdas de la cuadrícula (Bloque 13). Por consiguiente, cualquier celda dentro de la máscara de imagen que no tenga, por ejemplo, 4 distancias válidas a 4 colindantes cardinales válidas en las direcciones norte, este, sur y oeste es excluida del cálculo de la media y la desviación típica de las distancias de la cuadrícula de celdas. A partir de las distancias válidas restantes, la distancia de la cuadrícula de celdas promedio proporciona entonces un factor de aumento relativo para la escena observada (Bloque 14).  
40

45 Otro aspecto ventajoso de la presente invención incluye afinar el factor de aumento tomado de un portaobjetos de calibración, imagen o patrón a cada una de las diferentes longitudes de onda. Una vez que la distancia de la cuadrícula de celdas promedio se ha calculado para un portaobjetos de calibración, imagen o patrón dado a una longitud de onda específica, el portaobjetos de calibración, imagen o patrón puede desplazarse en una pluralidad de direcciones aleatorias o direcciones de otro modo no establecidas de antemano, tales como direcciones en los ejes tanto x como y. El portaobjetos de calibración puede enfocarse a continuación automáticamente en el plano de enfoque del eje z, y el proceso de calibración se repite. De acuerdo con una realización, repetir el proceso de calibración puede incluir obtener una nueva imagen desenfocada, crear una nueva máscara de imagen y calcular nuevas distancias de la cuadrícula de celdas promedio para cada una de las imágenes nuevamente desplazadas.  
50 En una realización de la presente invención, este proceso de afinado del aumento se repite una pluralidad de veces, tales como al menos treinta veces. Aunque la actual realización incluye un proceso de afinado del aumento que se repite al menos treinta veces, un experto en la materia apreciará que la invención puede repetirse cualquier número de veces.

60 De acuerdo con un aspecto ventajoso adicional de la presente invención, el sistema también limita la distorsión, y la aberración que puede hacer que líneas rectas se curven cerca de los bordes de una imagen capturada. Esta aberración hace que la imagen se curve de forma hacia fuera como un barril o se curve de forma hacia dentro como un acerico. Las aberraciones de distorsión son problemáticas en sistemas de videomicroscopía dado que una

ubicación de píxel en una imagen tomada a una longitud de onda específica debe corresponder a la ubicación de píxel respectiva en cada una de las múltiples imágenes tomadas a longitudes de onda diferentes. Por lo tanto, las aberraciones de distorsión pueden crear imprecisiones cuando se comparan imágenes tomadas a longitudes de onda diferentes. Las aberraciones de distorsión pueden determinarse representando gráficamente las distancias entre las coordenadas del centro de cada celda y las coordenadas del centro de cada una de las celdas colindantes en una pluralidad de direcciones, tales como las direcciones norte, este, sur y oeste, con respecto a la distancia de la celda del centro del campo de visión de la imagen. Una vez que estos puntos están representados gráficamente, puede usarse una línea de regresión lineal para modelizar la función lineal entre las distancias cardinales de la celda frente a la distancia de la celda hasta el centro del campo de visión. Una imagen que tiene aberraciones de distorsión creará una línea de regresión lineal que tiene una pendiente que es sustancialmente positiva o negativa. Una distorsión similar a un barril o acerico generaría una pendiente negativa y positiva, respectivamente. Además, el sistema puede capturar imágenes con la misma trayectoria óptica, de modo que si cualquier aberración de distorsión significativa estuviera presente, la distorsión estaría presente en cada una de las imágenes, y si fuera necesario, técnicas de eliminación de distorsiones (“*unwarping*”) de imágenes precisas, tal como se conoce bien en la técnica, podrían aplicarse para corregir esta distorsión.

De acuerdo con un sistema ejemplar, pueden usarse objetivos Plan Apo de Achromat de extremo alto, una cámara GE1910 de Allied Vision Technology, un patrón Chessboard 100 de FocalPoint de la placa de calibración, e imágenes con regiones de interés que son más pequeñas que un campo de visión, para limitar la distorsión. La distorsión se espera principalmente en los bordes del campo de visión. Además, de acuerdo con una realización de la presente invención, las regiones de interés analizadas pueden representar una parte central de la imagen del campo de visión y pueden representar groseramente solamente de un tercio a una mitad de toda la imagen del campo de visión. Un diagrama de dispersión y línea de regresión que usan dicho sistema, tal como se muestra en la figura 5, ilustra una línea de regresión que tiene una pendiente de aproximadamente 0,0001. Por consiguiente, esta realización de la presente invención limita las aberraciones de distorsión a una cantidad insignificante.

Tal como se ha mencionado anteriormente, para resolver ecuaciones de separación de cromógeno derivadas de la ley de Lambert-Beer, una premisa básica es que la misma parte del objeto en el campo de visión debe ser examinada. Por lo tanto, un aspecto ventajoso de la presente invención es la corrección de la aberración cromática lateral que, cuando se observa, proporcionará una diferencia de aumento para luz de diferentes longitudes de onda debido a las diferentes longitudes focales de las mismas. Por ejemplo, una imagen vista a longitudes de onda de luz azul relativamente cortas parecerá más grande que la misma imagen vista a longitudes de onda de luz roja relativamente más largas. Sin embargo, incluso después de que la pluralidad de imágenes sean corregidas con el factor de aumento apropiado del proceso descrito anteriormente, una ubicación de píxel en una imagen tomada a una longitud de onda puede no corresponder a una ubicación de píxel en una segunda imagen tomada a una longitud de onda diferente si las imágenes no están alineadas.

Con referencia de nuevo a la realización ejemplar de la figura 3, imágenes de la muestra son capturadas por el sistema (Bloque 30), que explora el área o región de interés de la muestra sobre el portaobjetos. Cada imagen es transformada a partir de transmitancias en densidades ópticas de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, tal como se conoce bien en la técnica. En una realización, puede usarse una etapa de calibración para capturar una imagen de referencia negra (B) y una imagen de referencia blanca (I<sub>0</sub>) para cada una de una pluralidad de longitudes de onda (λ). Cada imagen de densidad óptica corregida en sombreado puede calcularse transformando las transmitancias de cada píxel (x,y) capturado a una longitud de onda dada en la densidad óptica de cada píxel DO<sub>xyλ</sub>, capturado a la longitud de onda específica con la siguiente fórmula:

$$DO_{xy\lambda} = Nx \log_{10} \left( \frac{I_{0xy\lambda} - B_{xy}}{I_{xy\lambda} - B_{xy}} \right) \quad (3)$$

N es un factor de multiplicación que depende de la profundidad de píxel de las imágenes, que puede de aproximadamente 10.000 para una imagen de 16 bits por píxel.

El sistema explora la muestra completamente con respecto a una longitud de onda particular antes de explorar la muestra de nuevo con respecto a una longitud de onda diferente. Por lo tanto, imágenes obtenidas para longitudes de onda de luz independientes pueden ajustarse para proporcionar correlación con respecto a las regiones del campo de visión dónde posteriormente se emplean ecuaciones de separación de cromógeno para determinar la cantidad de especies moleculares en una muestra. Además, la pluralidad de imágenes adquiridas de cada una de las exploraciones del objeto tomadas con respecto a una longitud de onda específica pueden alinearse de modo que las ubicaciones de píxel de una imagen capturada a una longitud de onda correspondan a ubicaciones de píxel de una imagen capturada a una longitud de onda diferente. De acuerdo con una realización de la presente invención, cuando se explora el área o región de interés de la muestra sobre el portaobjetos, el sistema puede producir factores de desplazamiento, dado que cada exploración de la muestra con respecto a una longitud de onda se completa antes de explorar el sistema con respecto a una longitud de onda diferente. Por lo tanto, una exploración completada a una longitud de onda puede producir una imagen que tiene una región de interés que está desplazada desde la

región de interés correspondiente de una imagen tomada con respecto a una longitud de onda diferente, estando el desplazamiento caracterizado por el factor de desplazamiento.

5 Por consiguiente, realizaciones de la presente invención proporcionan un método de alineamiento de cada una de las imágenes exploradas, de modo que cada ubicación de píxel de una imagen tomada a una longitud de onda corresponda a una ubicación de píxel respectiva de una imagen tomada a una longitud de onda diferente, tal como se muestra en la figura 3. Otra realización de la invención proporciona un método de alineamiento de cada una de las imágenes exploradas, de modo que una región de interés de al menos una de las imágenes tomadas a una longitud de onda corresponde a una región de interés de al menos una de las imágenes tomadas a una longitud de onda diferente. Después de que cada imagen ha sido corregida mediante el factor de aumento apropiado con respecto a la longitud de onda central, las imágenes pueden alinearse, de modo que las ubicaciones de píxel de cada una de las imágenes correspondan a las ubicaciones de píxel de cada una de las imágenes capturadas. Una realización de la presente invención permite extraer una serie de perfiles en una pluralidad de direcciones diferentes (por ejemplo, perfiles horizontales y verticales) de cada una de la pluralidad de imágenes en base al fondo y la densidad óptica el objeto para alinear la pluralidad de las imágenes. Específicamente, los perfiles horizontales y verticales pueden extraerse a partir de una primera imagen para alinear una región de interés dentro de la primera imagen tomada con respecto a una longitud de onda de referencia o central con una región de interés dentro de una segunda imagen tomada con respecto a una longitud de onda diferente. Además, pueden extraerse perfiles horizontales y verticales de cada una de las imágenes para alinear la misma región de interés de la imagen de referencia con la región de interés correspondiente en las otras imágenes.

25 En un ejemplo que no forma parte de la presente invención, se aplica un filtro de paso bajo (Bloque 31) a cada una de las imágenes para reducir artefactos de ruido de alta frecuencia. De acuerdo con un ejemplo, el filtro de paso bajo comprende un núcleo integral, tal como una matriz cuadrada que tiene un número igual de filas y de columnas (por ejemplo, un núcleo integral 3x3), con cada elemento teniendo un valor particular igual a aproximadamente la inversa del producto del número total de filas y el número total de columnas (por ejemplo, +1/9 para un núcleo integral 3x3). Por consiguiente, cuando se aplica un núcleo integral 3x3 a un píxel particular, el píxel central de cada uno de los ocho píxeles colindantes que rodean al píxel central se añade conjuntamente y a continuación se dividen por 9. El valor resultante sustituye a continuación al valor para el píxel central. Este proceso puede repetirse para cada píxel dentro de la imagen para crear una imagen de densidad óptica filtrada.

35 Para extraer los perfiles horizontales y verticales de la imagen, puede crearse una máscara de imagen binarizada a partir de la imagen con corrección de sombra. Un histograma que detalla las densidades ópticas de los píxeles puede crearse (Bloque 32) en base a la imagen de densidad óptica con corrección de sombra, estando el histograma construido para binarizar la imagen con corrección de sombra para formar una máscara de imagen binarizada. Por lo tanto, de acuerdo con un ejemplo, el histograma se crea en base a las estadísticas máximas de fondo de cada uno de los píxeles. Dónde, por ejemplo, se usa una cámara en blanco y negro de 16 bits 300 en el sistema 100, la intensidad de luz transmitida a través de cada uno de los píxeles en cada filtro de longitud de onda puede expresarse como  $2^{16}$  (=65536) valores entre 0 y 65535. Además, la densidad óptica para cada uno de los píxeles puede calcularse de acuerdo con la ley de Lambert-Beer y puede almacenarse en un dispositivo informático 350 usando un intervalo dinámico de 16 bits. Por consiguiente, el histograma que detalla las densidades ópticas de cada uno de los píxeles tendrá una serie de intervalos (bins) entre 0 y 65535, tal como se muestra en la figura 6. Por ejemplo, la intensidad inicial  $I_0$  de la fuente de luz 200, que corresponde al 100% de transmitancia, se expresará preferentemente en cada una de la pluralidad de longitudes de onda como un valor que se aproxima a 65535, representando el valor más brillante posible en cada longitud de onda, y un valor de 0 después de ser convertido de transmitancia a densidad óptica. A la inversa, en ausencia de luz, que corresponde generalmente a transmitancia que se aproxima al 0%, una "imagen negra" tendrá un valor de intensidad que se aproxima a 0 en cada una de las longitudes de onda o el extremo superior del histograma después de haberse convertido en densidad óptica.

50 Una vez que el histograma que detalla las estadísticas máximas de fondo de cada uno de los píxeles se ha construido, un umbral utilizado para binarizar la imagen para crear una máscara de imagen binaria (Bloque 33) puede calcularse en base al modo y las desviaciones típicas del fondo. De acuerdo con una realización, el modo se determina mediante el máximo de fondo de la densidad óptica descubierto entre el intervalo mínimo y el intervalo mínimo más 4096. La desviación típica puede calcularse en base a la anchura completa a la mitad del máximo. Específicamente, en un ejemplo, la desviación típica del histograma de densidad óptica se calcula como la anchura completa a la mitad del máximo (FWHM) dividida por, por ejemplo, 2,35, tal como se muestra en la ecuación a continuación.

$$Desvtip = \frac{FWHM}{2,35} \quad (4)$$

60 La anchura completa a la mitad del máximo se calcula añadiendo las dos distancias entre el modo (es decir, el pico de fondo entre el intervalo mínimo y el intervalo mínimo más 4096) y los intervalos que igualan, por ejemplo, el 50% del modo, tal como se muestra mediante la ecuación a continuación y se ilustra en la figura 6.

$$FWHM = D_1 + D_2 \quad (5)$$

5 Si una de las distancias entre el modo y el intervalo que iguala el 50% del modo es, por ejemplo, 1,2 veces mayor que la otra distancia entre el modo y el otro intervalo que iguala el 50% del modo, la anchura completa a la mitad del valor máximo puede calcularse como, por ejemplo, 2 veces la más pequeña de las dos distancias, tal como se muestra mediante la ecuación a continuación y se ilustra en la figura 6.

$$Si (D_2 > 1,2 \cdot D_1): FWHM = 2 \cdot D_1$$

10 Por consiguiente, tal como se ha mencionado anteriormente, la desviación típica puede calcularse a continuación como la anchura completa a la mitad del máximo dividida por 2,35, y el umbral usado para crear la máscara de imagen binarizada (Bloque 33) se calcula como el modo más, por ejemplo, 6 veces la desviación típica, tal como se muestra mediante la ecuación a continuación.

$$Umbral = Modo + 6 \cdot Desv_{tip} \quad (7)$$

20 En otro ejemplo, el umbral puede calcularse como el modo más, al menos, 3 veces la desviación típica.

El valor de cada uno de los píxeles en la imagen puede compararse entonces con el umbral para crear la máscara de imagen binaria. A aquellos píxeles que tienen un valor menor que o igual al umbral se les puede asignar un valor de cero, mientras que a los píxeles que tienen un valor mayor que el umbral se les puede asignar un valor de uno. Por consiguiente, la imagen puede convertirse a continuación en una máscara binarizada, teniendo cada píxel dentro de la máscara de imagen un valor de cero o uno. De acuerdo con un ejemplo, el porcentaje de píxeles que tienen un valor mayor que el umbral en la imagen de referencia puede usarse para afinar el umbral usado para generar la máscara binarizada de la imagen a realinear. Una vez que la máscara de imagen binaria se aplica a cada una de las imágenes, los perfiles horizontales y verticales pueden extraerse para cada una de las imágenes, correspondiendo las imágenes a una longitud de onda diferente. Los perfiles horizontales y verticales se extraen (Bloque 34) para alinear la región de interés de una parte de cada una de las imágenes que son capturadas.

35 A partir de la imagen binarizada, los perfiles horizontales extraídos representan la proyección vertical de la región de interés en el eje horizontal, tal como se ilustra mediante la figura 7. Del mismo modo, los perfiles verticales extraídos representan la proyección horizontal de la región de interés en el eje vertical. El número de perfiles horizontales se correlaciona con el número de píxeles necesarios para cubrir la tolerancia en el desplazamiento en la dirección vertical, mientras que el número de perfiles verticales se correlaciona con el número de píxeles necesarios para cubrir la tolerancia en desplazamiento en la dirección horizontal. En un ejemplo, la región de interés examinada tiene una longitud y anchura de igual valor. Por consiguiente, los perfiles horizontales tienen una longitud horizontal igual al tamaño de la región más dos veces un factor de desplazamiento horizontal. El factor de desplazamiento horizontal es igual al desplazamiento horizontal medio más, por ejemplo, doce desviaciones típicas. Del mismo modo, un factor de desplazamiento vertical es igual al desplazamiento vertical medio más, por ejemplo, doce desviaciones típicas. Además, los perfiles verticales tienen una longitud vertical igual al tamaño de la región más dos veces el factor de desplazamiento vertical.

45 Una vez que los perfiles horizontales y verticales son extraídos para cada una de la pluralidad de imágenes, los perfiles horizontales y verticales para cada una de las imágenes pueden redimensionarse usando funciones spline. De acuerdo con un ejemplo, las coordenadas horizontales de cada uno de los perfiles horizontales y verticales para cada una de la pluralidad de imágenes se convierten de coordenadas definidas por el número de píxeles en coordenadas definidas en micrómetros, tal como se muestra en la ecuación a continuación.

$$X(\mu m) = [X(px) - X_{centro}(px)] \cdot \text{tamaño de píxel}(\mu m) + X_{centro}(px) \quad (8)$$

55 El nuevo valor de coordenada horizontal redimensionado en micrómetros,  $X(\mu m)$ , es igual al valor de coordenada horizontal original en píxeles,  $X(px)$ , menos las coordenadas horizontales del punto de referencia, tal como el centro de la imagen, en píxeles,  $X_{centro}(px)$ , multiplicado por el tamaño de un píxel en micrómetros, tamaño de píxel( $\mu m$ ) más las coordenadas horizontales del punto de referencia. De acuerdo con una realización, el valor de coordenada horizontal del punto de referencia puede ser igual a cero.

60 Las coordenadas verticales de cada uno de los perfiles horizontales y verticales para cada una de la pluralidad de imágenes pueden redimensionarse mediante las funciones spline (Bloque 35) a un nuevo valor para estar relacionadas al menos en parte por la intensidad del perfil. Específicamente, las coordenadas verticales de cada uno de los perfiles horizontales y verticales se redimensionan de acuerdo con la ecuación a continuación.

$$Y_{\text{valor}} = \text{valor del perfil} \cdot \text{tamaño de píxel}(\lambda) \div \text{tamaño de píxel}(\lambda_{\text{ref}}) \quad (9)$$

5 El nuevo valor de coordenada vertical,  $Y_{\text{valor}}$ , es igual a la intensidad promedio del píxel en la posición horizontal correspondiente, valor del perfil, multiplicada por el tamaño del píxel a la longitud de onda correspondiente, tamaño de píxel( $\lambda$ ), dividido por el tamaño del píxel de la longitud de onda de referencia, tamaño de píxel( $\lambda_{\text{ref}}$ ). En un ejemplo, la longitud de onda de referencia puede ser igual a 570 nm. El número de perfiles de spline redimensionados puede ser igual al número de perfiles.

10 Una vez que cada uno de los perfiles horizontales y verticales extraídos de cada una de la pluralidad de imágenes están redimensionados de acuerdo con las funciones spline, ejemplos que no forman parte de la presente invención permiten evaluar el desplazamiento entre perfiles de spline de la imagen de referencia con perfiles de spline para cada una de la pluralidad de imágenes (Bloque 36). En primer lugar, los perfiles de spline de una imagen diana pueden evaluarse contra los perfiles de spline de la imagen de referencia calculando un factor de error de acuerdo con la ecuación a continuación.

$$\text{Error} = \sum [P\lambda(dx, dy) - P\lambda_{\text{ref}}(0, 0)]^2 \quad (10)$$

20 El perfil de spline con la cantidad máxima de error concuerda mejor con el perfil de referencia. El factor de error es igual a la suma del cuadrado de las diferencias entre las coordenadas del perfil de spline y las coordenadas del perfil de referencia. El desplazamiento se evalúa para tanto los perfiles de spline horizontales como los perfiles de spline verticales. De acuerdo con un ejemplo, promediar los desplazamientos entre los perfiles de spline y los perfiles de spline de referencia proporciona una precisión preferida para evaluar el desplazamiento entre perfiles. Además, otro ejemplo puede comprender extraer perfiles de una pluralidad de regiones de interés de las dos imágenes que deben alinearse y compararse.

30 Una vez que se determina el perfil de spline con la menor cantidad de error, la imagen diana puede alinearse con la imagen de referencia (Bloque 37) redimensionando en primer lugar la imagen con el factor de aumento determinado previamente. La imagen puede alinearse a continuación con la imagen de referencia desplazando la imagen en las direcciones horizontal y vertical mediante los factores de desplazamiento que se determinaron para proporcionar la cantidad más pequeña de error. El redimensionamiento de aumento y el desplazamiento correctivo en la dirección horizontal y vertical pueden aplicarse a cada una de la pluralidad de imágenes espectrales con respecto a la imagen de longitud de onda de referencia. Una vez que cada una de la pluralidad de imágenes espectrales han sido redimensionadas y alineadas con respecto a la imagen de longitud de onda de referencia, de acuerdo con una realización de la invención, el sistema puede proceder a continuación con el análisis de separación de cromógenos de la muestra (Bloque 40).

40 Particularmente, el sistema puede proceder a continuación con la determinación de una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, estando cada especie molecular indicada por un colorante. En una realización, el sistema puede determinar una cantidad de una pluralidad de especies molecular usando técnicas de separación de cromógenos. Dicha técnica incluye determinar una densidad óptica de la muestra en cada píxel en cada ubicación de píxel correspondiente en la pluralidad de imágenes. En una realización, se forma una matriz de densidad óptica correspondiente para ese píxel y se multiplica por la inversa de una matriz de coeficiente de absorción relativa para formar una matriz resultante para el píxel. La matriz de coeficiente de absorción relativa comprende un coeficiente de absorción relativa para cada colorante, independientemente de la muestra, en cada una de la pluralidad de longitudes de onda. En una realización, el método puede incluir afinar la cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una o más ubicaciones de píxel en la pluralidad de imágenes. Además, el sistema puede comprender un sistema de videomicroscopía que comprende un dispositivo de adquisición de imágenes configurado para capturar una pluralidad de imágenes digitales aumentadas de la muestra y un dispositivo procesador configurado para determinar una cantidad de cada especie molecular. Para descripción ejemplar adicional respecto a técnicas para determinar la cantidad de una especie molecular en una muestra, véase la solicitud de patente de Estados Unidos N° 61/474.250, titulada METHOD FOR OPTIMIZATION OF QUANTITATIVE VIDEO-MICROSCOPY AND ASSOCIATED SYSTEM, que se presentó el 12 de abril de 2012 y se incorpora en su totalidad en el presente documento.

60 De acuerdo con la metodología descrita en el presente documento, las concentraciones de colorante determinadas pueden usarse entonces para reconstruir una imagen artificial de la muestra. Las imágenes artificiales pueden generarse como una imagen sustancialmente en tiempo real o en directo, o como una imagen fija, usando combinaciones de colorantes que comprenden un marcador y/o una contratinción usados para preparar la muestra. Más particularmente, puede producirse una imagen artificial del campo de visión que muestre la muestra como afectada por todos los colorantes, la muestra como afectada por uno o más colorantes marcadores, o la muestra como afectada por la contratinción. En consecuencia, dado que los colorantes usados para preparar la muestra son caracterizados por el sistema, las capacidades del sistema pueden ampliarse de modo que, por ejemplo, la muestra o campo de visión pueda ser explorado automáticamente para detectar una región de interés específica tal como se

identifica mediante las características de un colorante particular o para afectar a o facilitar una tarea a realizar en esa región de interés específica.

5 Adicionalmente, la imagen artificial del campo de visión también puede usarse para facilitar la identificación y extracción de características seleccionadas de la muestra tratada. Por ejemplo, pueden usarse procesos puntuales  
 10 marcados, análisis contextual y/o geoestadística para identificar y extraer características de la imagen en base, por ejemplo, a un análisis de distribución espacial de un colorante particular. Dicha capacidad de extracción de características permitiría también, por ejemplo, que se clasifiquen, marquen o identifiquen o agrupen de otro modo  
 15 campos de visión u objetos de interés en base, por ejemplo, al contenido global de un colorante marcador dado o una proporción seleccionada de marcador particular. Donde, por ejemplo, puede establecerse un criterio umbral, dicha capacidad sería la detección de acontecimientos raros, de empeoramiento u otros graves. Procediendo  
 adicionalmente, clasificadores basados específicamente en el procesamiento de la imagen que resulta de las imágenes específicas de contratiñición y/o colorante marcador, pueden establecerse y usarse entonces para evaluar  
 la presencia de ciertos tipos de celda o para realizar un diagnóstico basado en el campo de visión. Por ejemplo,  
 20 HER2 puede evaluarse de esta manera mediante comparación con una escala de diagnóstico continua establecida de acuerdo con el sistema y los métodos descritos en el presente documento. Dichos clasificadores pueden habitualmente abarcar también otras características informativas tales como, por ejemplo, detalle basado en la morfología o la textura de las celdas.

20 Se entenderá que la metodología y los procedimientos detallados en el presente documento junto con el sistema 100  
 especifican un método de calibración o preparación de otro modo de un sistema de videomicroscopía para adquirir y  
 analizar imágenes de una muestra. Un experto en la materia apreciará también que dicho método puede  
 25 automatizarse para proporcionar un producto de programa de software informático, ejecutable en un dispositivo informático, que tiene partes ejecutables capaces de determinar un factor de aumento y alinear la pluralidad de  
 imágenes. Por consiguiente, las realizaciones de la presente invención describen la implementación de un método  
 y/o producto de programa de software informático correspondiente que puede conseguirse en hardware, software o  
 una combinación de hardware y software configurado apropiadamente de acuerdo con el alcance de la presente  
 invención. Por lo tanto, realizaciones de la presente invención comprenden una técnica de preparación para un  
 30 sistema de videomicroscopía para analizar muestras preparadas que pueden proporcionar detección y cuantificación  
 eficaz de especies de interés que supera factores limitantes de tecnologías de la técnica anterior, tales como errores  
 en estimaciones de la concentración de colorante debidos a fluctuaciones de ruido, calibración inapropiada y/o  
 aberraciones cromáticas.

35 Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención vendrán a la mente de un experto en la materia a la que pertenece esta invención teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, debe entenderse que la invención no debe limitarse a las realizaciones específicas  
 desveladas y que se pretende que modificaciones y otras realizaciones estén incluidas dentro del alcance de las  
 reivindicaciones adjuntas. Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, estos se usan en un  
 40 sentido genérico y descriptivo solamente y no para fines de limitación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de calibración de un sistema de imaginología para analizar una pluralidad de especies moleculares en una muestra, comprendiendo dicho método:

5 adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra con un dispositivo de adquisición de imágenes a una pluralidad de longitudes de onda diferentes;  
 10 comparar una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva con una región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda diferente;  
 15 determinar un factor de aumento para cada una de una pluralidad de longitudes de onda a partir de una imagen de referencia, donde el factor de aumento caracteriza la diferencia de aumento entre una imagen tomada con respecto a una longitud de onda y otra imagen tomada con respecto a una longitud de onda diferente; y  
 20 alinear la pluralidad de imágenes de modo que la región de interés asociada con al menos una de las imágenes adquiridas a una longitud de onda respectiva corresponda a la región de interés asociada con la al menos una de las imágenes adquiridas a la longitud de onda diferente;  
 donde determinar el factor de aumento comprende:

20 capturar una imagen desenfocada de un portaobjetos de calibración en cada una de la pluralidad de longitudes de onda, comprendiendo el portaobjetos de calibración una cuadrícula de una pluralidad de celdas dispuestas en un patrón alterno, comprendiendo además cada celda una pluralidad de píxeles;  
 25 determinar un sombreado de cada uno de la pluralidad de píxeles para formar una máscara para discriminar entre un porcentaje de los píxeles más claros y un porcentaje igual de los píxeles más oscuros;  
 30 determinar un área para cada una de una pluralidad de celdas;  
 35 determinar un centro para cada una de una pluralidad de celdas;  
 40 medir una distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas y sus celdas colindantes en la misma imagen;  
 45 afinar las mediciones de las áreas para cada una de la pluralidad de celdas y las mediciones de las distancias entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas, proporcionando el factor de aumento en base al promedio de las distancias medidas.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la imagen desenfocada se genera aplicando un filtro de paso bajo a una imagen enfocada de un portaobjetos de calibración, o ajustando el plano de enfoque en el eje z positivo o negativo.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde medir la distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas comprende medir la distancia en cada una de las direcciones norte, este, sur y oeste entre un centro de una celda y un centro de cada una de una celda colindante en las direcciones norte, este, sur y oeste.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde medir la distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas comprende además:

45 determinar una media y una desviación típica de la distancia entre los centros de la pluralidad de celdas; y  
 50 afinar una media de una pluralidad de distancias entre los centros de la pluralidad de celdas excluyendo del cálculo de la media las distancias entre los centros de la pluralidad de celdas que están fuera de un intervalo de confianza.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde determinar las áreas para cada una de la pluralidad de celdas comprende además:

50 determinar una media y una desviación típica de las áreas para cada una de la pluralidad de celdas; y  
 55 afinar una media de una pluralidad de áreas de la pluralidad de celdas excluyendo del cálculo de la media las áreas que están fuera de un intervalo de confianza.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde afinar las mediciones comprende además:

60 desplazar el portaobjetos de calibración en una dirección aleatoria;  
 65 capturar una imagen desenfocada del portaobjetos de calibración desplazado;  
 70 determinar un sombreado de cada uno de la pluralidad de píxeles en el portaobjetos de calibración desplazado para formar una máscara para discriminar entre un porcentaje de los píxeles más claros y un porcentaje igual de los píxeles más oscuros;  
 75 determinar un área para cada una de una pluralidad de celdas en el portaobjetos de calibración desplazado;  
 80 determinar un centro para cada una de una pluralidad de celdas en el portaobjetos de calibración desplazado; y  
 85 medir una distancia entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, donde afinar las mediciones comprende además:

- desplazar el portaobjetos de calibración en una dirección aleatoria una pluralidad de veces;  
 capturar una imagen desenfocada del portaobjetos de calibración desplazado cada una de la pluralidad de veces  
 que el portaobjetos es desplazado;
- 5 determinar un sombreado de cada uno de la pluralidad de píxeles en cada uno de los portaobjetos de calibración  
 desplazados para formar una máscara para discriminar entre un porcentaje de los píxeles que tienen el  
 sombreado más claro y un porcentaje igual de los píxeles que tienen el sombreado más oscuro;
- determinar un área para cada una de la pluralidad de celdas en cada uno de los portaobjetos de calibración  
 desplazados;
- 10 determinar un centro para cada una de la pluralidad de celdas en los portaobjetos de calibración desplazados; y  
 medir las distancias entre los centros de cada una de la pluralidad de celdas en los portaobjetos de calibración  
 desplazados.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde adquirir la pluralidad de imágenes de la muestra comprende  
 además explorar la imagen a una pluralidad de longitudes de onda diferentes, produciendo cada exploración un  
 15 factor de desplazamiento en una primera y segunda dirección, definiendo el factor de desplazamiento la diferencia  
 de desplazamiento entre una región de interés de una imagen tomada con respecto a una longitud de onda y una  
 región de interés de una imagen tomada con respecto a una longitud de onda diferente.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde alinear la pluralidad de imágenes comprende además  
 20 alinear una pluralidad de áreas de perfil de cada una de las imágenes con una pluralidad de áreas de perfil de una  
 imagen de referencia.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde alinear la pluralidad de imágenes comprende además:
- 25 redimensionar la imagen mediante un factor de aumento; y  
 mover la imagen redimensionada en una dirección horizontal y vertical.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además determinar una cantidad de especie  
 molecular, tal como se indica mediante un colorante respectivo, para cada píxel en cada ubicación de píxel  
 30 correspondiente en la pluralidad de imágenes.
12. Un sistema de imaginología para analizar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una  
 muestra, comprendiendo dicho sistema:
- 35 un dispositivo de adquisición de imágenes configurado para adquirir una pluralidad de imágenes de la muestra a  
 diferentes longitudes de onda; y  
 un dispositivo procesador en comunicación con el dispositivo de adquisición de imágenes y configurado para  
 llevar a cabo el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 40 13. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 12, donde el dispositivo de adquisición de imágenes comprende una  
 cámara en blanco y negro.
14. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 12, donde el dispositivo de adquisición de imágenes comprende una  
 45 pluralidad de filtros, correspondiendo cada filtro a una longitud de onda diferente representativa de un colorante  
 respectivo en la muestra.
15. Un medio legible por ordenador codificado con un programa informático para calibrar un sistema de imaginología  
 para determinar una cantidad de una pluralidad de especies moleculares en una muestra, siendo dicho medio legible  
 por ordenador codificado con un programa informático ejecutable en un dispositivo informático y comprendiendo:
- 50 partes ejecutables para llevar a cabo el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.



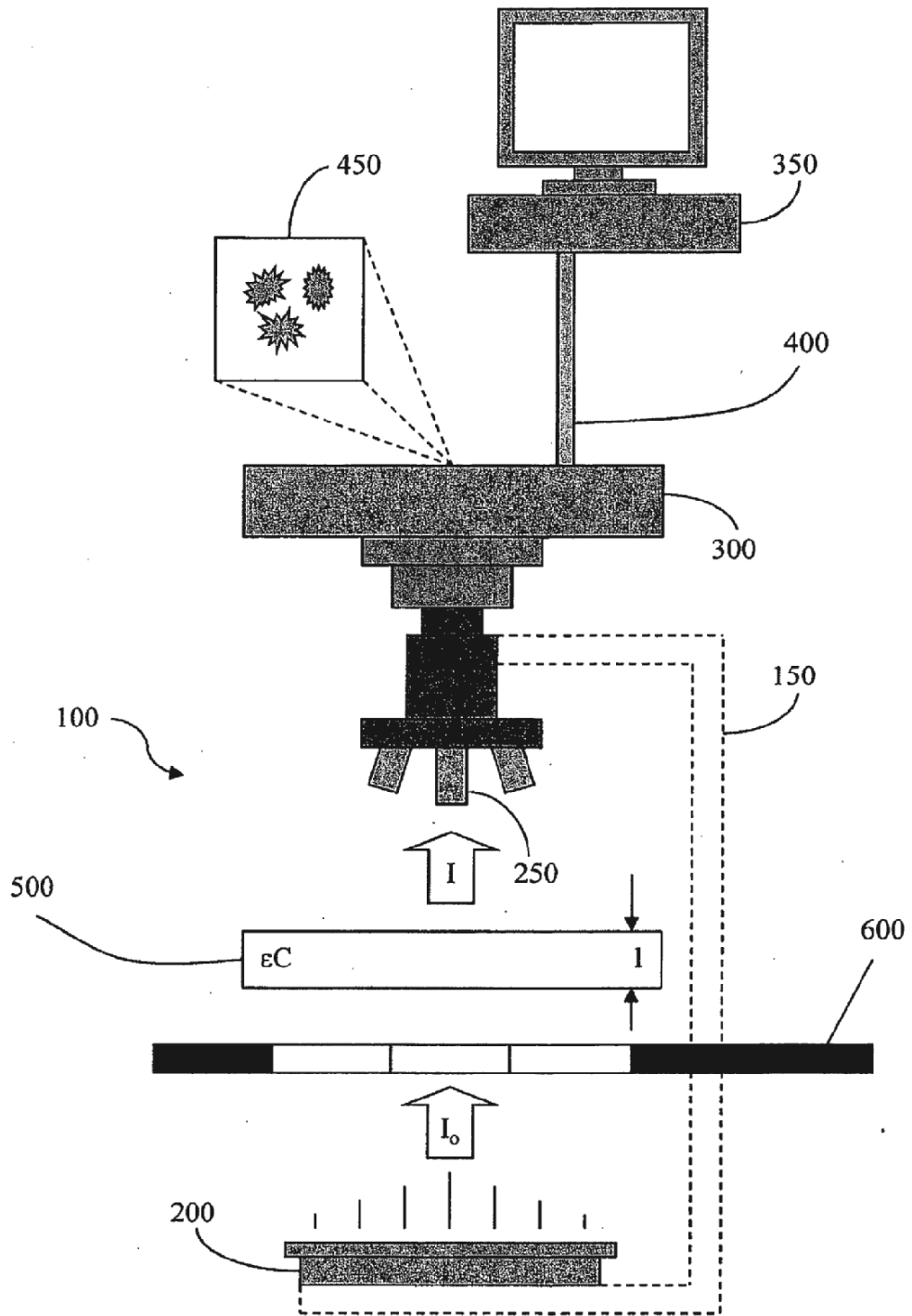


FIG. 1

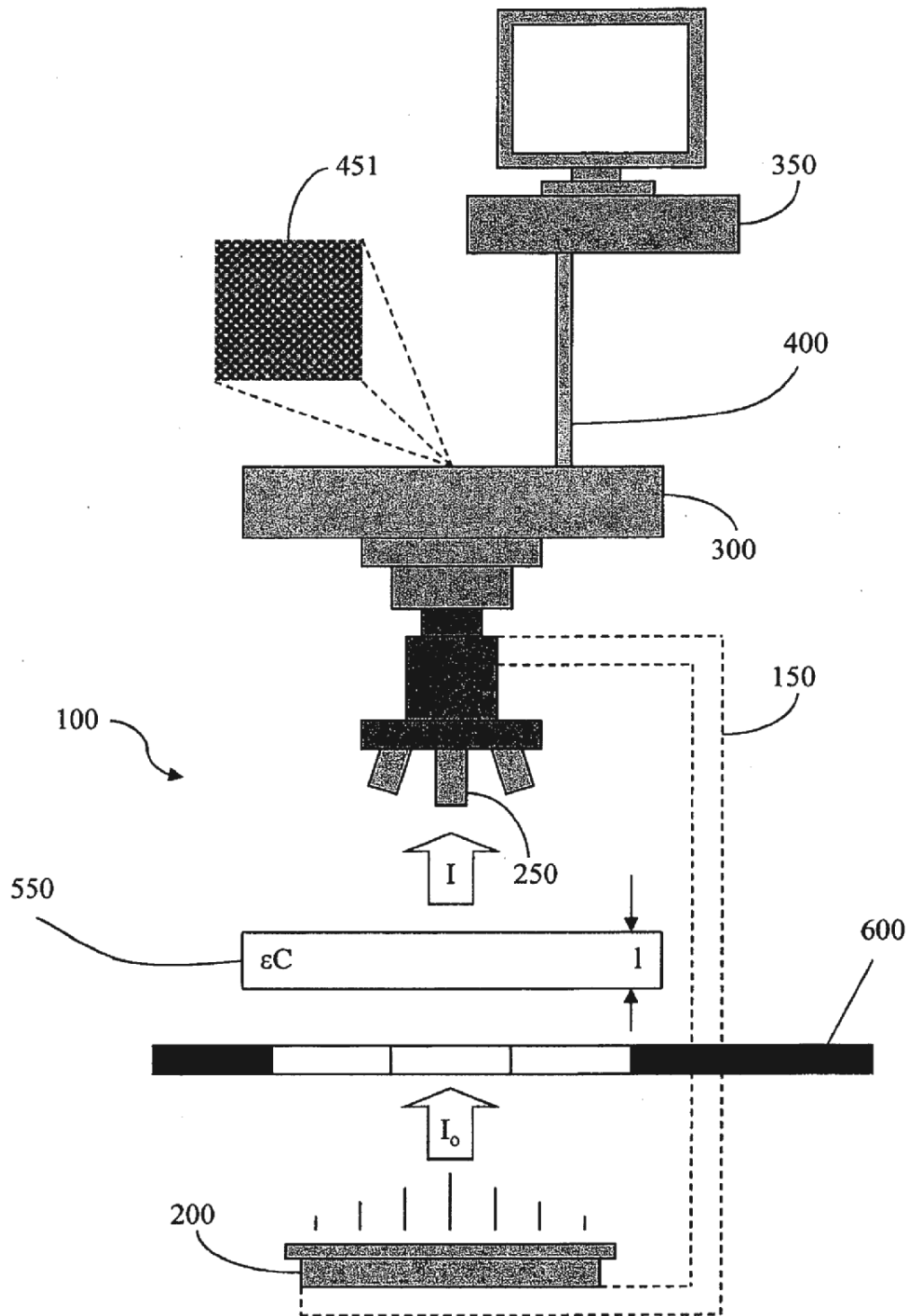


FIG. 2

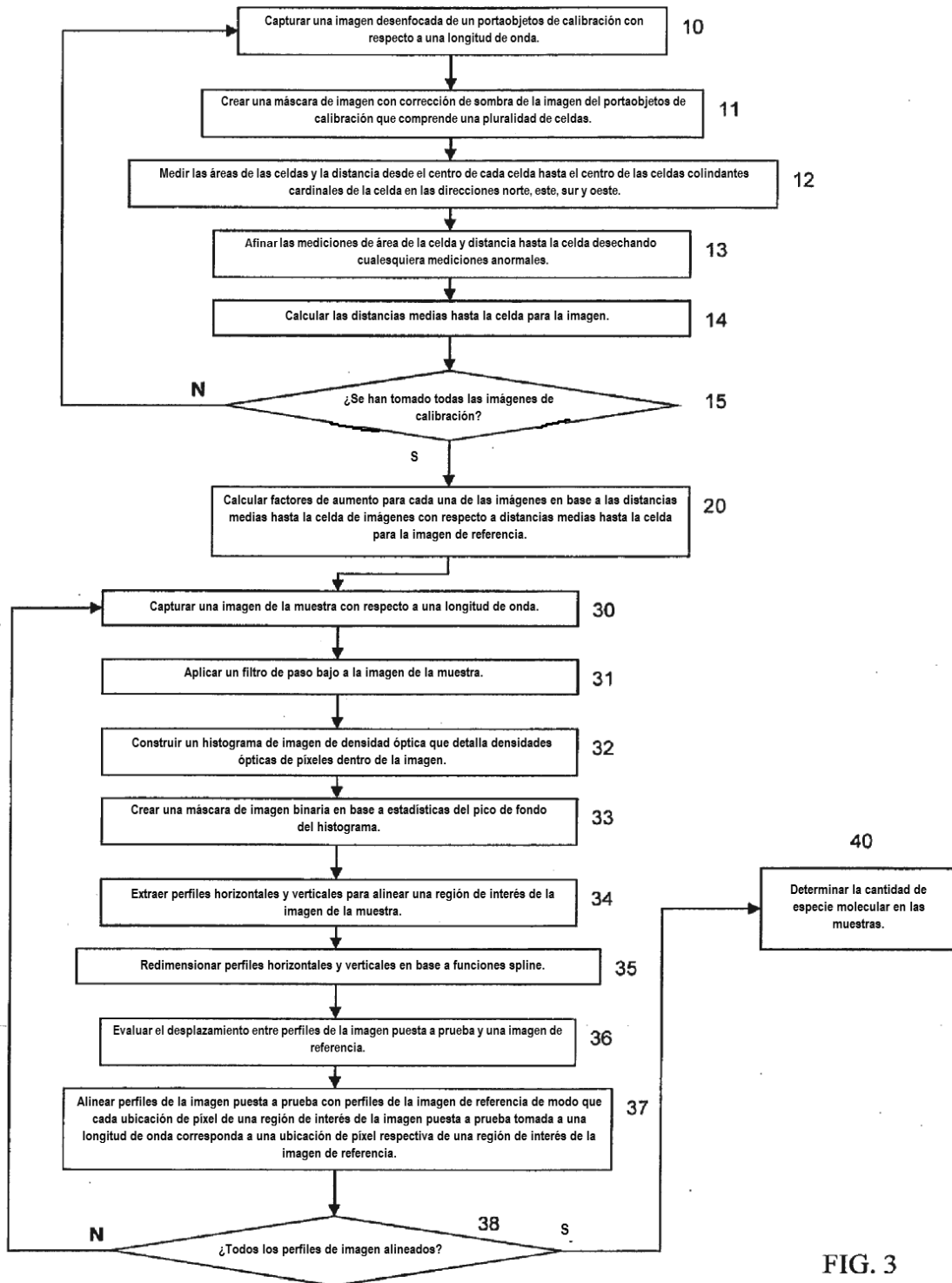


FIG. 3

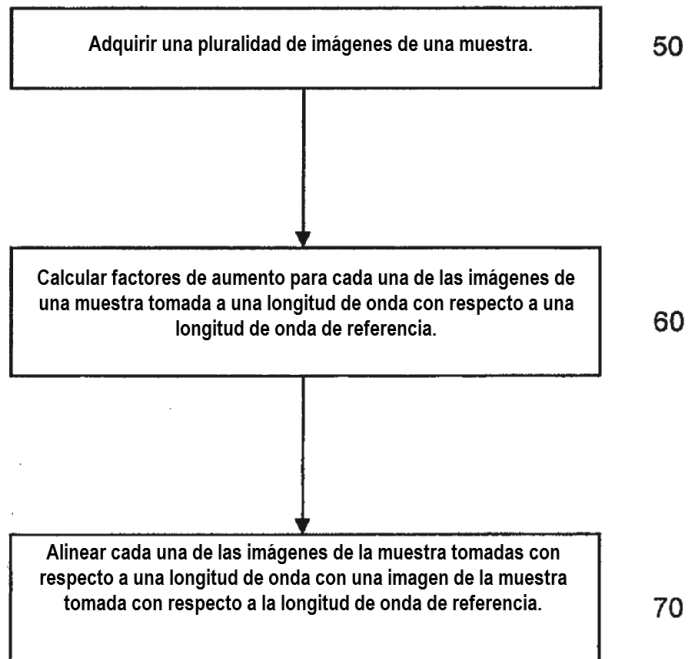


FIG. 4

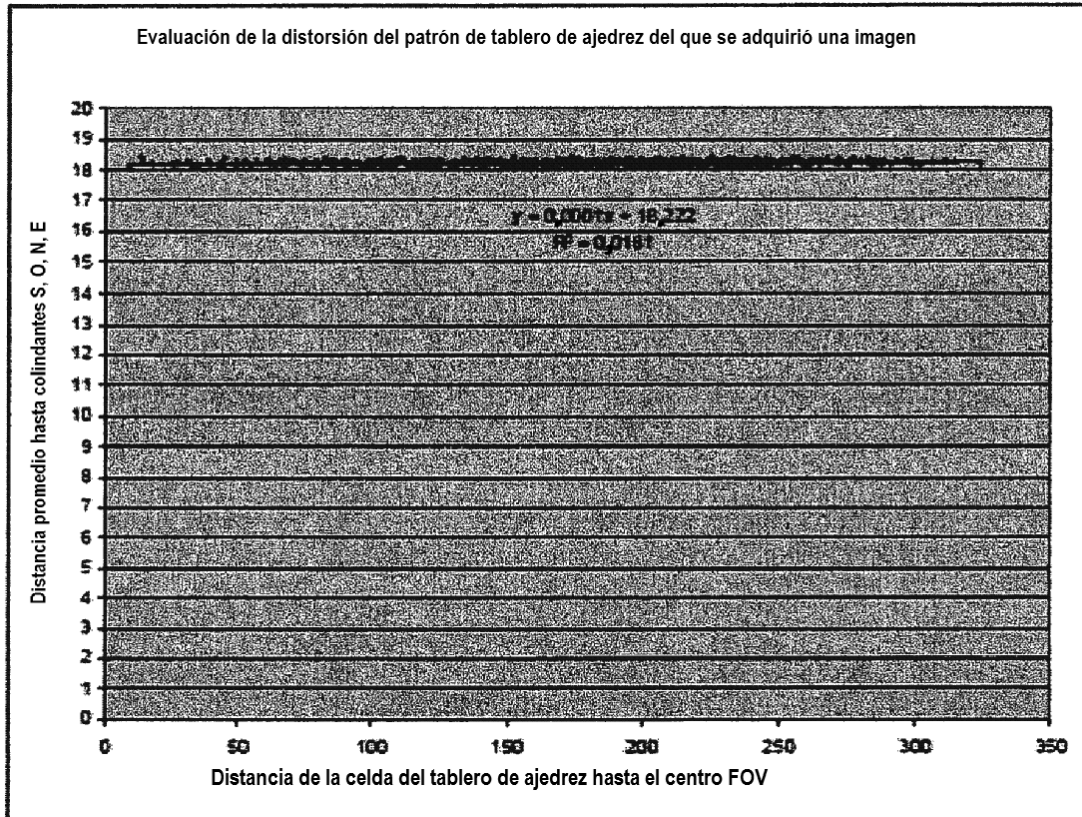


FIG. 5

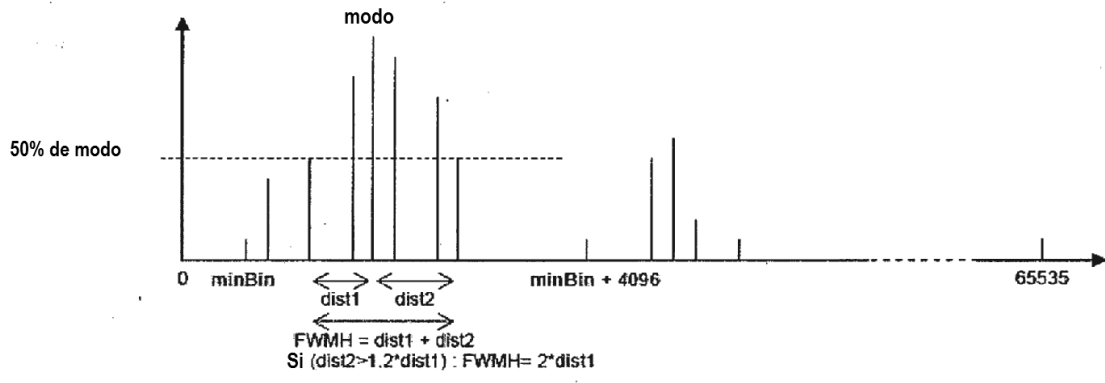


FIG. 6

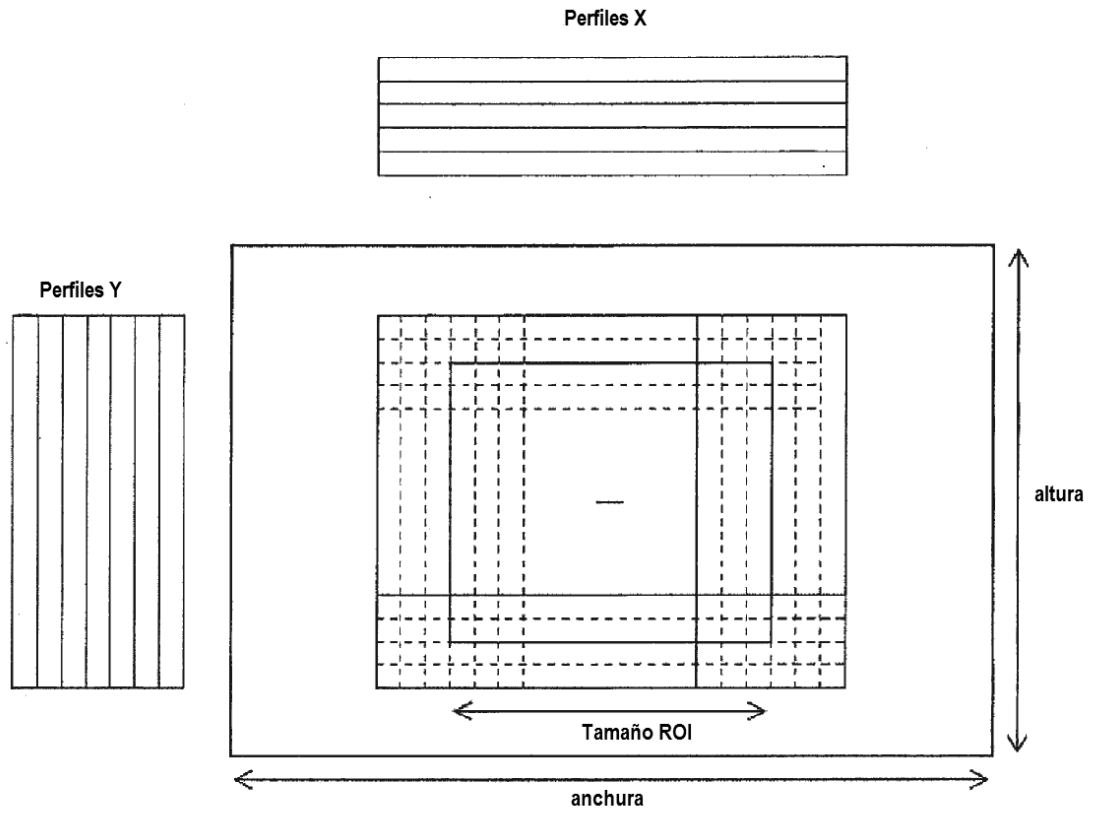


FIG. 7