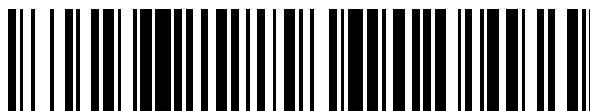


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 661**

51 Int. Cl.:

**G06K 9/00** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012 PCT/SE2012/050851**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13015740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012 E 12818014 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2737454**

54 Título: **Método para proporcionar imágenes de un corte de tejido**

30 Prioridad:

**28.07.2011 SE 1150724**

**28.07.2011 US 201161512617 P**

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

**23.07.2019**

73 Titular/es:

**MEDETECT AB (100.0%)**

**Medicon Village**

**223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**ERJEFÄLT, JONAS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 720 661 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 proporcionar imágenes de un corte de tejido

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere al campo de la inmunohistoquímica así como al análisis de imágenes basado en ordenador. Más específicamente, la solicitud proporciona un método para diferenciar áreas en una serie de imágenes.

10

Antecedentes de la invención

El análisis de una muestra de tejido histológico se usa comúnmente para fines de diagnóstico, por ejemplo, análisis de una muestra de tejido mamario para diagnosticar el cáncer de mama o con fines de investigación, por ejemplo para estudiar los tipos de células inflamatorias en afecciones inflamatorias tales como el asma, la arterioesclerosis o las enfermedades inflamatorias del intestino.

La inmunohistoquímica (IHC), mediante la cual se detecta un marcador (es decir, un antígeno) por un anticuerpo específico de antígeno, se usa comúnmente para identificar células en cortes histológicos. Idealmente, la identificación de un tipo de célula se puede obtener con la detección de un antígeno celular específico de la célula. Sin embargo, para varios tipos de células se deben analizar combinaciones de varios antígenos para una identificación apropiada.

Cualquier tejido enfermo se asocia normalmente con una composición celular alterada. Por ejemplo, en las vías respiratorias inflamadas en el asma hay una composición alterada de las células estructurales que forman las vías respiratorias, tales como las células epiteliales, las células de las glándulas, las células de los vasos sanguíneos, los nervios, etc. Además, varios tipos de células inmunitarias (es decir, leucocitos) se infiltran en las vías respiratorias inflamadas.

En muchas enfermedades, la patología (es decir, las alteraciones destructivas) en el tejido no está causada por un tipo de célula, sino por una interacción compleja entre varios tipos de células. Por lo tanto, cuando se explora una muestra de tejido enfermo, a menudo es conveniente estudiar varias poblaciones de células y estructuras tisulares. La información sobre el contenido celular se puede obtener teñiendo un tipo de célula cada vez en cortes seccionados en serie. Aunque este tratamiento proporciona una buena estimación del contenido de varios tipos de células en una muestra de tejido, no proporciona información detallada sobre la relación espacial (es decir, la relación física) entre los tipos de células analizados.

Para explorar mejor cómo la composición de las células puede definir ciertas condiciones de la enfermedad, o estudiar cómo las células interactúan y se relacionan entre sí dentro de un tejido enfermo, es deseable desarrollar medios para visualizar múltiples tipos de células dentro del mismo espacio tridimensional, por ejemplo dentro de un solo corte de tejido.

Con las técnicas de IHC disponibles en la actualidad es posible teñir hasta 4 tipos de células en un corte utilizando técnicas de cromógenos múltiples o de inmunofluorescencia múltiple. Sin embargo, en la práctica habitual, a menudo solo 2 tipos de células pueden detectarse simultáneamente debido a la falta de combinaciones apropiadas de anticuerpos de detección primarios.

El documento US 2011/0091081 A1 describe una técnica para obtener y almacenar datos sobre la expresión de múltiples biomarcadores en células individuales o los compartimentos de células individuales en una muestra de tejido. También se describen métodos para utilizar los datos para crear grupos, cuyos elementos comparten un cierto grado de similitud mayor que la población general de la que se extraen los datos, mediante un análisis de imágenes digitales de una parte de la muestra de tejido que se ha teñido iterativamente para generar señales ópticas, normalmente fluorescentes, que reflejan la cantidad de cada uno de los biomarcadores examinados. El análisis de las imágenes implica una rutina de segmentación en la que cada píxel de las imágenes examinadas es asignado a una célula individual o a un compartimento de una célula individual, la intensidad de la señal representativa de cada biomarcador se mide para cada píxel, se crea un conjunto de datos en el que cada célula o compartimentos de cada célula se asocian con una intensidad de señal para cada biomarcador examinado, y el conjunto de datos es consultado con herramientas numéricas apropiadas para crear grupos. También describe la visualización de tales grupos en imágenes del tejido examinado, de manera que las células individuales que pertenecen a un grupo particular están marcadas o indicadas en una de las imágenes examinadas.

Para aumentar el número de marcadores en un corte de tejido, se han desarrollado nuevos planteamientos metodológicos, tales como la técnica SIMPLE descrita en el documento WO 2010/115089 y la técnica MELC (Schubert et al., Nature Biotechnology vol. 24, págs. 1270-1278). Aunque son potentes, estos nuevos tipos de técnicas se han desarrollado principalmente para estudios de colocalización e incluyen o bien procedimientos destructivos de tejidos, procedimientos que implican la destrucción de grupos de detección o bien la dependencia de

65

anticuerpos primarios marcados con moléculas de detección, características que limitan el número de marcadores celulares que pueden ser teñidos.

5 Dado que las técnicas mencionadas anteriormente se desarrollaron principalmente para estudios de colocación, no abordan el hecho de que muchos marcadores de identificación también pueden estar presentes ocasionalmente en tipos de células a las que no están destinados.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos tratamientos técnicos mediante los cuales un gran número de tipos de células se puedan identificar adecuadamente de manera simultánea dentro del mismo espacio físico, tal como un corte de tejido. Idealmente, cualquier técnica de este tipo debería ser capaz de analizar una gran sección completa de muestras y proporcionar información detallada sobre todas las células individuales marcadas, tal como sus coordenadas espaciales en el tejido, sus parámetros de tamaño y forma, etc.

15 Resúmen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para diferenciar áreas en una serie de N imágenes digitales primarias de un corte de tejido en donde N es un número entero  $>1$ , creando así una nueva imagen, comprendiendo dicho método los pasos de:

20 a) proporcionar una serie de N imágenes digitales primarias que comprenden áreas de marcador indeterminadas, en donde una imagen  $I_{n+1}$  contiene al menos las mismas áreas de marcador indeterminadas que una imagen digital primaria  $I_n$  para  $1 \leq n \leq N$ , en donde n es un número entero;

25 b) evaluar cada imagen digital primaria  $I_n$  para  $1 \leq n \leq N$  de acuerdo con los criterios de selección predeterminados y definir áreas de marcador de la imagen como áreas de marcador indeterminadas que cumplen con los criterios de selección predeterminados, y almacenar información sobre cualesquiera de dichas áreas de marcador de la imagen en o en conexión/asociación con una imagen digital secundaria resultante correspondiente, obteniendo así una serie de N imágenes digitales secundarias;

30 c) proporcionar una nueva imagen  $I_{nueva}$  del corte de tejido sin áreas de marcador;

d) insertar nuevas áreas de marcador de imagen en la nueva imagen  $I_{nueva}$ , teniendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen la misma forma y posición que las áreas de marcador de imagen presentes en la imagen  $I_1$ , y siendo dichas áreas de marcador de imagen identificables en  $I_{nueva}$ , por una característica única;

35 e) para cada n para  $2 \leq n \leq N$  de la serie de imágenes digitales secundarias obtenidas en el paso b), insertar nuevas áreas de marcador de imagen en la nueva imagen  $I_{nueva}$ , teniendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen la misma forma y posición que las áreas de marcador de imagen presentes en la imagen  $I_n$  pero no en la imagen  $I_{n-1}$ , y siendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen identificables en  $I_{nueva}$  por una característica única.

40 Preferiblemente, la nueva imagen  $I_{nueva}$  es una copia de una de las imágenes en dicha serie de imágenes.

45 Preferiblemente, dicha característica única en los pasos d) y e) es una característica que tiene un valor único para cada n,  $1 \leq n \leq N$ .

Preferiblemente, dicha característica única es un color general y dicho valor único de dicha característica única es un color específico asociado con un marcador de célula particular.

50 Preferiblemente, los criterios de selección predeterminados comprenden un umbral para una propiedad visual de un área de marcador indeterminada.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para visualizar poblaciones de células dentro de un corte histológico de tejido, comprendiendo dicho método los pasos de:

55 a) proporcionar un corte de tejido que se haya preparado para la tinción molecular de una manera conocida previamente;

60 b) proporcionar una serie de K medios de detección molecular particulares para unir específicamente y detectar elementos de una serie predeterminada de marcadores de K células que puedan estar presentes en el corte de tejido del paso a), siendo dichos medios de detección molecular capaces de generar la formación de una respuesta iniciable y detectable, siendo K un número entero  $>2$ ;

65 c) para cada medio de detección molecular particular  $k = 1, 2, \dots, K$  del paso b) llevar a cabo el siguiente procedimiento:

1) poner en contacto dicho corte de tejido del paso a) con dichos medios de detección molecular particulares que dan como resultado una unión específica a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares;

5 2) lavar dicho corte de tejido para eliminar los medios de detección molecular que no se han unido a ningún marcador celular;

3) iniciar la respuesta de los medios de detección molecular que pueden haberse unido a marcadores celulares del corte de tejido permitiendo así la detección de dichos medios de detección molecular; y

10 4) cuando se puedan detectar dichos medios de detección molecular, escanear/obtener imágenes del corte de tejido para generar una imagen digital primaria  $I_k$  que puede contener una o más áreas de marcador indeterminadas asociadas con la generación de un polímero detectable;

15 por lo que se obtiene una serie de  $K$  imágenes digitales primarias  $I_k$  para  $k = 1, \dots, K$  que contienen una cantidad creciente de áreas de marcador indeterminadas;

d) llevar a cabo el método del primer aspecto en la serie de  $K$  imágenes digitales primarias  $I_k$  para  $k = 1, \dots, K$  obtenido en el paso c), generando así una imagen  $I_{nueva}$  que hace visibles dichas estructuras celulares.

20 En una realización preferida del método del segundo aspecto, dichos medios de detección molecular son un conjunto de anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos, en donde cada anticuerpo se une a un marcador celular específico y en donde una enzima se ha conjugado con cada anticuerpo, siendo dicha enzima capaz de generar la formación de un polímero detectable en presencia de uno o más substratos adecuados,

25 en donde los puntos 1) y 2) del paso c) se llevan a cabo de tal manera que:

30 i) el corte de tejido del paso a) se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares; estando dicho anticuerpo conjugado con una enzima, siendo dicha enzima capaz de generar, en presencia de uno o más substratos adecuados, la formación de un polímero detectable;

35 ii) después del paso i) anterior, el corte de tejido se lava para eliminar los anticuerpos no unidos; y

en donde el punto 3) del paso c) se lleva a cabo de tal manera que:

40 iii) después del punto 2) el corte de tejido se expone a uno o más substratos adecuados para dicha enzima, lo que conduce a la formación de polímeros detectables en caso de que dicho elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares esté presente en dicho corte de tejido.

45 En otra realización preferida del método del segundo aspecto, dichos medios de detección molecular son un conjunto de complejos moleculares, donde cada complejo comprende un primer anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que se une a un marcador celular específico, un segundo anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal unido específicamente a dicho primer anticuerpo, y una enzima conjugada a dicho segundo anticuerpo, siendo dicha enzima capaz de generar la formación de un polímero detectable en presencia de uno o más substratos adecuados,

50 en donde los puntos 1) y 2) del paso c) se llevan a cabo de tal manera que:

i) el corte de tejido del paso a) se pone en contacto con un primer anticuerpo que se une específicamente a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares;

55 ii) después del paso i) anterior, el corte de tejido se lava para eliminar los anticuerpos no unidos;

60 iii) después del paso ii) anterior, el corte de tejido se pone en contacto con un segundo anticuerpo que se une específicamente a dicho primer anticuerpo, estando dicho segundo anticuerpo conjugado con una enzima, siendo dicha enzima capaz de generar la formación de un polímero detectable en presencia de uno o más substratos adecuados; y

iv) después del paso iii) anterior, el corte de tejido se lava para eliminar los anticuerpos no unidos; y

en donde el punto 3) del paso c) se lleva a cabo de tal manera que:

65 v) después del punto 2) el corte de tejido se expone a uno o más substratos adecuados para dicha enzima, lo que conduce a la formación de polímeros detectables en caso de que dicho elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares esté presente en dicho corte de tejido.

Preferiblemente, dicha enzima se elige de entre el grupo de fosfatasa alcalina y peroxidasa, tal como la peroxidasa de rábano rústicano.

5 Preferiblemente, dicho sustrato se selecciona de entre el grupo de 3, 3'-diaminobencidina, Ferangi Blue, Vulcan Fast Red, Vina Green y aminoetil carbazol (AEC). Vina Green es un ejemplo de un sustrato que genera un polímero que es al menos parcialmente soluble en agua en ciertas condiciones. El aminoetil carbazol (AEC) es un ejemplo de polímeros generadores de sustrato que son al menos parcialmente solubles en alcoholes inferiores como el etanol, en ciertas condiciones. 3, 3'-diaminobencidina, Ferangi Blue y Vulcan Fast Red son ejemplos de  
10 sustratos que generan polímeros insolubles.

Se entiende que se pueden utilizar diferentes sustratos y/o enzimas durante la ejecución del método. Por ejemplo, la diaminobencidina se puede utilizar como sustrato en la primera ejecución del punto 2), y Vulcan Fast Red se puede utilizar como sustrato en una ejecución posterior del punto 2).

15 En otra realización preferida del método del segundo aspecto, dichos medios de detección molecular son un conjunto de conjugados moleculares que comprenden una parte de reconocimiento unida a una parte de detección, en donde dicha parte de reconocimiento es capaz de unirse específicamente a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares, estando dicha parte de reconocimiento seleccionada de entre el grupo de:  
20 un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, o fragmentos del mismo, y una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ARN o una molécula de ADN, siendo dicha parte de detección un <math>t\_0</math> /> fluorocromo, siendo dicho fluorocromo capaz de emitir radiación de una longitud de onda particular después de la exposición a una radiación de iniciación diferente de dicha radiación emitida

25 en donde el punto 3) del paso c) se lleva a cabo de tal manera que el corte de tejido y cualquier medio de detección molecular que se haya unido al mismo estén expuestos a la radiación de iniciación que conduce a la emisión de radiación de una longitud de onda particular en caso de que dicho elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares esté presente en dicho corte de tejido; y en donde el punto 4) del paso c) se lleva a cabo cuando se emite dicha radiación de una longitud de onda particular.

30 En otra realización preferida más del método del segundo aspecto, se usa un sustrato que genera polímeros al menos parcialmente solubles como polímeros detectables, tales como el Vina Green o el aminoetil carbazol (AEC). Esta realización comprende además los pasos de

35 e) lavar dicho corte de tejido para eliminar los polímeros solubles detectables; y

f) repetir los pasos b - d con una nueva serie de medios de detección molecular.

Esta realización es útil cuando se debe evaluar la presencia de una gran cantidad de marcadores celulares.

40 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para visualizar la distribución tridimensional de múltiples poblaciones celulares y estructuras celulares dentro del mismo espacio tridimensional en una muestra histológica, que comprende los pasos de:

45 A) proporcionar una muestra de tejido, y cortar dicha muestra en una pluralidad de cortes de tejido originalmente superpuestos de una manera conocida previamente;

B) llevar a cabo el método según el segundo aspecto para todas las secciones de tejido obtenidas en el paso A) y

50 C) superponiendo las imágenes obtenidas en el paso B) según los principios conocidos, obteniendo así una visualización tridimensional de la distribución tridimensional de múltiples poblaciones celulares y estructuras celulares dentro del mismo espacio tridimensional en una muestra histológica.

#### Definiciones

55 Al describir y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se exponen a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, los métodos y materiales preferidos se describen en el  
60 presente documento. Como se usa en este documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado a él en esta sección. Los valores específicos y preferidos enumerados a continuación para radicales, sustituyentes y rangos son solo para ilustración; no excluyen otros valores definidos dentro de rangos definidas para los radicales y sustituyentes.

65

- 5 Por marcador celular se entiende una estructura específica que, dependiendo del tipo de célula, puede aparecer más o menos específicamente, a menudo en la superficie de una célula del tipo de célula, pero a veces también dentro de la célula. Normalmente, un marcador celular es un receptor capaz de unirse específicamente a una molécula objetivo particular. El marcador celular puede ser una proteína, una glicoproteína o un hidrato de carbono, un ácido nucleico, un lípido u otro tipo de molécula biológica de origen natural. El experto en la materia conoce tales marcadores celulares y tipos de células en los que aparecen. La presencia de uno o más de estos marcadores celulares puede indicar que la célula pertenece a cierta clase o tipo de células.
- 10 Por medios de detección molecular se entiende un agregado o conjugado bifuncional que comprende una primera parte capaz de unirse específicamente a un marcador celular particular, y una segunda parte capaz de generar una respuesta detectable. Se podrían usar muchos tipos diferentes de medios de detección molecular en la presente invención.
- 15 Normalmente, dicha primera parte capaz de unirse específicamente a un marcador celular particular podría ser un anticuerpo o un fragmento del mismo, tal como un fragmento Fab, o un nanoanticuerpo, o una molécula de ácido nucleico, como una molécula de ADN o una molécula de ARN o un ácido nucleico derivado tal como el PNA. Normalmente, dicha segunda parte capaz de generar una respuesta detectable podría ser una enzima, o un compuesto químico capaz de generar algún tipo de señal detectable, tal como un fluorocromo, cuando es inducida por una acción específica.
- 20 Un medio de detección molecular podría, en su realización más simple, comprender una primera parte, tal como un anticuerpo o una molécula de ácido nucleico, a la que se ha unido la segunda parte, tal como una enzima o un fluorocromo. Alternativamente, un medio de detección molecular adecuado podría ser un complejo que comprende una primera entidad, normalmente un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a un marcador celular particular, una segunda entidad, normalmente un anticuerpo monoclonal o policlonal, que se une específicamente a la primera entidad, y una tercera entidad unida a la segunda entidad, donde dicha tercera entidad podría ser una enzima o un compuesto químico capaz de generar algún tipo de señal detectable, tal como un fluorocromo, cuando es inducida por una acción específica.
- 25 Por respuesta detectable se entiende una respuesta que podría detectarse en un paso de escaneo/obtención de imágenes de tal manera que la respuesta podría encontrarse dentro de la imagen producida por dicho paso de escaneo/obtención de imágenes.
- 30 En una realización, la respuesta detectable es la formación de un polímero opaco y/o coloreado. Tales polímeros podrían formarse poniendo en contacto ciertas enzimas que forman parte de un medio de detección molecular con substratos específicos en las condiciones adecuadas. Ejemplos de enzimas adecuadas son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa, tal como la peroxidasa de rábano rústico. Ejemplos de substratos adecuados para dichas enzimas son 3, 3'-diaminobencidina, Ferangi Blue, Vulcan Fast Red, aminoetil carbazol (AEC) y Vina Green.
- 35 En otra realización, la respuesta detectable es la emisión de radiación de una cierta longitud de onda, tal como la radiación emitida por un fluoróforo después de la excitación.
- 40 En otra realización, se utilizan diferentes formas de respuestas detectables dentro de una única ejecución del método.
- 45 Por imagen digital primaria se entiende una imagen digital que se ha obtenido mediante digitalización directa (por ejemplo, escaneo de portaobjetos o microfotografía) de un corte de tejido. No se ha realizado ninguna adaptación, edición o evaluación adicional de la imagen. Dicha imagen debe considerarse como datos de fuente sin procesar.
- 50 Por imagen digital secundaria se entiende una imagen obtenida mediante algún tipo de edición o evaluación digital de una imagen digital primaria. Se puede obtener una imagen digital secundaria, por ejemplo, editando y/o evaluando una imagen digital primaria. La imagen digital primaria se redefine así como una imagen digital secundaria.
- 55 Por área de marcador indeterminada se entiende un elemento o estructura detectable en una imagen digital primaria de un corte de tejido. Un área de marcador indeterminada puede indicar la presencia de estructuras y elementos opacos de origen natural, tales como vasos sanguíneos y orgánulos celulares, en el corte de tejido o pigmento endógeno en elementos de tejido. También puede indicar la presencia de medios de marcador detectable, tales como un polímero detectable o un fluorocromo, que a su vez indica la presencia de un marcador celular que ha sido detectado por un medio de detección molecular que genera la producción de dicho polímero o una emisión de radiación detectable tras la excitación.
- 60 Por área de marcador de imagen se entiende un área en una imagen digital secundaria de un corte de tejido. Un área de marcador de imagen corresponde a la totalidad o a una parte de un área de marcador indeterminada en una imagen digital primaria. Un área de marcador de imagen se obtiene evaluando una imagen digital primaria, y en particular áreas de marcador indeterminadas de una imagen digital primaria, y definiendo áreas de marcador de
- 65

imagen de acuerdo con los criterios de selección especificados. Una imagen digital secundaria que contiene áreas de marcador de imagen también contiene o está conectada/asociada con información sobre cada área de marcador de imagen.

5 Por forma de un área de marcador se entiende la forma del perímetro del área. Existen varios métodos conocidos para determinar la forma de las áreas en una imagen digital, incluidos en software como ImageJ suministrado por el National Institute of Health (NIH) y Photoshop® suministrado por Adobe®.

10 Por posición de un área en una imagen se entiende qué posición tiene el área en la imagen. Por la misma posición para un área en diferentes imágenes se entiende

- la misma posición en relación con un sistema de coordenadas igualmente construido para las imágenes; o

15 - una posición correspondiente en términos del motivo representado, si las dos imágenes representan el mismo motivo.

20 Por criterios de selección se entiende criterios de selección que se pueden usar para evaluar una imagen digital primaria para definir áreas de marcador de imagen. Los criterios pueden, por ejemplo, comprender umbrales de color y/o intensidad para un píxel o un grupo de píxeles adyacentes en una imagen. Los criterios de selección podrían comprender criterios de forma, criterios de color, criterios de tamaño u otros tipos de criterios que se expondrán en la descripción detallada y que el experto en la materia apreciará. Además, es natural para la persona experta que lleva a cabo el presente método optimizar parámetros y criterios de selección para circunstancias particulares.

25 Por característica única se entiende una característica de una o más áreas de marcador de imagen identificadas como un tipo particular diferenciado de otras áreas de marcador de imagen. La característica única puede comprender una característica visual tal como un color, un símbolo, una forma, una marca o ser una asociación digital entre las áreas de marcador de imagen y su tipo particular (por ejemplo, un tipo de célula primaria). La asociación se almacena, por ejemplo, en una base de datos. La característica única puede ser cualquier otra característica adecuada para distinguir un área de marcador de cierto tipo en una imagen digital de áreas de marcador de otros tipos.

30 Dicha característica también puede subdividirse además en valores únicos. Por ejemplo, los medios de detección molecular para detectar marcadores celulares similares pero diferentes podrían identificarse por una característica única (tal como un color) y cada marcador celular individual podría identificarse por un valor único (tal como un matiz de dicho color).

Breve descripción de los dibujos

40 La presente invención se describirá ahora con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 ilustra un aparato que ejecuta el método según la presente invención.

45 Las figuras 2a-b ilustran un método para diferenciar áreas de marcador en una serie de imágenes según la presente invención.

La figura 3 ilustra una evaluación de una imagen digital primaria.

50 La figura 4 ilustra una serie de imágenes de un corte de tejido.

Las figuras 5a-b ilustran imágenes creadas por el método según la presente invención.

55 Las figuras 6a-c ilustran diferentes características visuales únicas de áreas de marcadores de imagen en imágenes creadas por el método según la presente invención.

La figura 7 ilustra una interfaz gráfica según una realización de la presente invención.

La figura 8 ilustra un proceso de detección según la presente invención.

60 Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a una técnica denominada tinción múltiple basada en la exclusión y la substracción, ESMS abreviada. La técnica hace posible proporcionar una imagen de alta resolución de un corte histológico de tejido en la que se podrían identificar una pluralidad de tipos de células y estructuras tisulares. Los métodos de análisis espacial para la pluralidad de células y tipos de células se pueden aplicar para proporcionar información espacial útil para un corte de tejido que no se puede proporcionar con las técnicas conocidas. La presente invención

se basa en la comprensión de que dicha información puede ser de gran valor al analizar cortes de tejido. El inventor de la presente invención ha ideado una tecnología para proporcionar imágenes del corte de tejido que comprenden información espacial de una manera simple y eficiente. La tecnología también hace posible proporcionar datos de imágenes de alta resolución en tres dimensiones, lo que facilita los estudios de interacciones complejas de células y estructuras tisulares dentro del mismo espacio tridimensional en una muestra de tejido.

El método proporciona imágenes compuestas de secciones de tejido que, además de visualizar la distribución de múltiples marcadores dentro del mismo corte, proporcionan la base para extraer información que se puede usar para el análisis matemático avanzado de los patrones de distribución de estructuras y elementos en el corte de tejido. Los ejemplos de dicha información son la relación entre elementos, tales como las células, o información sobre estructuras en los cortes reveladas por la tinción de fondo azul convencional, tales como las estructuras histológicas o áreas focales de daños tisulares, hipotrofia, remodelación de tejidos, etc.

La presente invención podría llevarse a cabo a partir de cualquier muestra de tejido que pueda usarse para detectar moléculas o estructuras en estudios histológicos. Los ejemplos de detección molecular en la presente solicitud se refieren a métodos inmunohistológicos, pero también se podrían usar otros medios para teñir moléculas; por ejemplo, hibridación in situ, técnicas de unión a ligandos no dependientes de anticuerpos o histoquímica de enzimas. Normalmente, antes de la detección molecular, una muestra de tejido se sumerge en fijador (por ejemplo, 4% de formaldehído tamponado, pH 7.6) durante la noche seguido de deshidratación en una serie de soluciones con concentración creciente de alcohol (EtOH) y la inmersión final en xileno. Después del paso de deshidratación, la muestra deshidratada se embebe en parafina y los cortes de parafina se generan con un micrótopo de corte de parafina de rutina. Los cortes de parafina se montan en portaobjetos de vidrio de microscopio estándar y se almacenan a 4 °C hasta su uso. El experto en la materia conoce bien diferentes fijadores y procesos de fijación adecuados para diferentes tipos de cortes de tejido y, por lo tanto, puede utilizar otros métodos similares a los mencionados anteriormente, incluidas las técnicas de corte criogénico.

Antes de la propia inmunohistoquímica (IHC abreviada), los cortes de parafina se desparafinan y se someten normalmente a la recuperación de antígeno inducida por calor o enzimática. Dichos procesos también son bien conocidos por los expertos.

El corte de tejido obtenido después de la desparafinación y la recuperación del antígeno inducida por calor se somete luego a una detección específica adicional. Es esencial poder determinar los tipos de células y los tipos de tejidos comprendidos en dicho corte de tejido. Para poder hacer eso, se comprueba la aparición de algunos marcadores celulares específicos en el corte de tejido.

La tabla 1 a continuación enumera algunos ejemplos de marcadores de células inmunes que son adecuados para su uso en la presente invención, y las células que los expresan:

Tabla 1: Marcadores celulares para detección IHC de células en cortes histológicos

Marcador celular	Célula primaria
CD20	Linfocitos B
CD8	Linfocitos T
ECP (EG2)	Eosinófilos
CD11c	Células dendríticas mieloides, macrófagos
Triptasa	Mastocitos
CD68	Macrófagos/monocitos (y ocasionalmente neutrófilos)
MPO	Neutrófilos
CD163	La mayoría de los macrófagos tisulares (pero no en macrófagos foliculares) y células de Langerhan
CD123	Células dendríticas plasmocitoides, macrófagos/monocitos, neutrófilos, eosinófilos
CD68	Macrófagos/monocitos, neutrófilos, basófilos, linfocitos grandes
CD45	Todos los leucocitos

Cuando se determina la presencia de un marcador celular en un corte de tejido según la presente invención, el corte de tejido se expone a un medio de detección molecular que se une específicamente a dicho marcador celular.

La primera parte de un medio de detección molecular podría ser un ligando natural asociado con el marcador celular al que se une específicamente. Alternativamente, y preferiblemente, la primera parte es un anticuerpo, y con frecuencia un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.

La segunda parte de un medio de detección molecular comprende normalmente una enzima capaz de generar un polímero detectable en presencia de un sustrato adecuado. Los ejemplos no limitantes de tales enzimas son la fosfatasa alcalina y las peroxidasas, tales como la peroxidasa de rábano rústico. Las peroxidasas, por ejemplo, generan un polímero de color marrón detectable en presencia del sustrato de la peroxidasa 3,3'-diaminobencidina (DAB abreviada), y las fosfatasas alcalinas generan polímeros detectables en presencia de Ferangi Blue y Vulcan



Fast Red. Otro ejemplo no limitante de un sustrato que genera un polímero al menos parcialmente soluble es el Vina Green. El polímero resultante del Vina Green es soluble en agua en ciertas condiciones. Otro ejemplo no limitante de un sustrato que genera un polímero al menos parcialmente soluble es el aminoetil carbazol (AEC). El polímero resultante del aminoetilcarbazol es soluble en alcoholes inferiores, como el etanol, en ciertas condiciones. Otros sustratos pueden generar polímeros que son solubles en otros fluidos.

La persona experta puede encontrar otras enzimas y sustratos adecuados, o sabrá también que, en lugar de enzimas, se pueden usar fluorocromos para visualizar moléculas marcadoras por microscopía de inmunofluorescencia.

Los medios de detección molecular podrían proporcionarse como un conjugado único, que normalmente comprende un anticuerpo que se une a un marcador celular y una enzima tal como una peroxidasa o fosfatasa alcalina, donde el anticuerpo y la enzima están unidos por un grupo de enlace químico. Alternativamente, y más preferiblemente, los medios de detección molecular se proporcionan como un agregado molecular que comprende un primer anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento del mismo y un segundo anticuerpo o fragmento del mismo unido químicamente a una enzima tal como la fosfatasa alcalina o una peroxidasa. El segundo anticuerpo molecular o fragmento del mismo se une específicamente al primer anticuerpo primario o fragmento del mismo, formando así el agregado molecular.

El método de la invención proporciona una manera de diferenciar elementos y estructuras en un corte de tejido y, por consiguiente, se usa una serie de tales medios de detección molecular. Dependiendo del tipo de órgano o tejido del cual se tomó el corte de tejido, así como del conocimiento básico de marcadores celulares de diferentes tipos de células y tejidos, el experto puede diseñar una serie adecuada de medios de detección molecular que se usará en diferenciar tipos de células y tejidos en el corte de tejido.

Se entiende que se pueden combinar diferentes tipos de medios de detección molecular dentro de una única ejecución del método de la invención. Esto puede ser ventajoso ya que los elementos y las estructuras pueden diferenciarse más fácilmente entre sí y sus alrededores durante el análisis de imagen de las imágenes digitales primarias.

Según la presente invención, el siguiente proceso de detección para el corte de tejido se ejecuta uno por uno con un medio de detección molecular de dicha serie de medios de detección molecular:

1) poner en contacto dicho corte de tejido del paso a) con dichos medios de detección molecular particulares que dan como resultado una unión específica a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares;

2) lavar dicho corte de tejido para eliminar los medios de detección molecular que no se han unido a ningún marcador celular;

3) agregar un sustrato adecuado que dé como resultado la generación de un polímero detectable;

4) lavar el corte de tejido para eliminar el resto del sustrato; y

5) escanear/obtener imágenes del corte de tejido para generar una imagen digital primaria que puede contener una o más áreas de marcador indeterminadas de la imagen asociadas con la generación de un polímero detectable.

El proceso de detección se ilustra como un método en la figura 8, donde el método comprende los pasos de:

- proporcionar (811) un corte de tejido;

- proporcionar (812) medios de detección molecular;

- poner en contacto (813) el corte de tejido con los medios de detección molecular, como se describe en el paso 1) anterior;

- lavar (814) el corte de tejido, como se describe en el paso 2) anterior;

- agregar (815) un sustrato adecuado, como se describe en el paso 3) anterior;

- lavar (816) el corte de tejido, como se describe en el paso 4) anterior; y

- obtener imágenes (817) del corte de tejido, como se describe en el paso 5) anterior.

Al repetir los pasos 812-817, según lo indicado por 821, para diferentes medios de detección molecular y sustratos adecuados para diferentes tipos de células primarias, se proporciona una serie de imágenes que comprenden las

imágenes generadas en el paso 817. Un ejemplo de una serie de imágenes de este tipo se ilustra en la figura 4, que se describirá con más detalle más adelante.

5 El paso de escaneo/visualización incluido como paso 5 en el proceso de detección podría llevarse a cabo con cualquier equipo de escaneo de portaobjetos disponible comercialmente diseñado para cortes de tejido, un microscopio equipado con una cámara digital o un robot de escáner de portaobjetos completo.

10 Los pasos repetidos 812-817 se pueden llevar a cabo de manera automatizada. Como ejemplo no limitativo, se puede utilizar la llamada técnica de cámara de deslizamiento para los pasos repetidos. En la técnica de cámara de deslizamiento, el corte de tejido se dispone en un microcompartimento a través del cual pueden pasar los medios de detección molecular, los líquidos de lavado, etc. Los diferentes pasos 812-817 se pueden así llevar a cabo sin necesidad de mover la muestra de tejido hacia y desde los medios de obtención de imágenes. Por lo tanto, las imágenes primarias se pueden proporcionar con las mismas características de imagen, tales como revelar exactamente la misma parte de la muestra de tejido y tener la misma profundidad de enfoque. Además, el método puede llevarse a cabo de una manera más eficiente en el tiempo y sin la necesidad de manipulación manual o interacción. El experto en la materia se da cuenta de que el método también puede llevarse a cabo por medio de otras técnicas automatizadas.

20 Cuando se ha llevado a cabo el proceso de detección para todos los medios de detección molecular de la serie, se obtiene una serie de imágenes donde hay una mayor cantidad de manchas de color. Las primeras imágenes correspondientes al tratamiento con una pequeña cantidad de medios de detección molecular pueden comprender solo algunas manchas. La última imagen, por otra parte, debe comprender una multitud de manchas y también es posible que algunas manchas se hayan fusionado y expandido en grandes áreas coloreadas.

25 En una realización, la serie de imágenes se puede proporcionar mediante la obtención de imágenes de un corte de tejido según el siguiente proceso de detección:

30 1) poner en contacto el corte de tejido con un medio de detección molecular particular dando como resultado una unión específica a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares;

2) lavar el corte de tejido para eliminar los medios de detección molecular que no se han unido a ningún marcador de superficie celular;

35 3) agregar reactivos de detección adecuados, tales como un anticuerpo secundario que reconozca el anticuerpo de detección primario. Normalmente, el anticuerpo secundario se marca con una enzima, por ejemplo, peroxidasa.

4) lavar el corte de tejido para eliminar los medios de detección molecular que no se han unido a ningún marcador de superficie celular;

40 5) añadir un sustrato de enzima que dé como resultado la generación de un polímero detectable;

6) lavar el corte de tejido para eliminar el sustrato restante; y

45 7) escanear/obtener imágenes del corte de tejido para generar una imagen digital primaria que puede contener una o más áreas de marcador indeterminadas asociadas con la generación de un polímero detectable.

50 Como se indica en la tabla 1 anterior, algunos marcadores de superficie celular están asociados con una gama restringida de células, mientras que otros marcadores aparecen en una gama más amplia. En la tabla 1, se puede observar, por ejemplo, que el CD20 se asocia principalmente con los linfocitos B. En contraste, el CD123 está asociado con una gama substancialmente mayor de tipos de células. Al configurar dicha serie de medios de detección molecular, al comienzo de la serie de medios de detección molecular es ventajoso incluir medios de detección molecular específicos para solo una pequeña cantidad de tipos de células, y preferiblemente para solo un tipo de célula. Luego, la confusión de los tipos de célula y las estructuras asociadas y detectadas con los primeros medios de detección molecular se puede descartar al determinar los tipos celulares y las estructuras utilizando medios de detección molecular más generales más adelante y la precisión de la identificación celular aumenta. Basándose en esta información, a los expertos les resulta fácil concebir series adecuadas de marcadores de detección molecular.

60 Resulta que los siguientes ejemplos de series de medios de detección molecular que se unen a marcadores de la superficie celular proporcionan buenos resultados:

A: Detección simultánea de 10 poblaciones de leucocitos con identificación celular mejorada

Marcador celular	Célula primaria	Comentario
CD20	Linfocitos B	
CD4	Linfocitos Th	

(continuación)

Marcador celular	Célula primaria	Comentario
CD8	Linfocitos Tct	
BB1	Basófilos	
EG2	Eosinófilos	
MPO	Neutrófilos	
Triptasa	Mastocitos	
CD68	MQ/monocitos (pero también neutrófilos ocasionales)	Los neutrófilos que causan confusión ya se han teñido e identificado en un paso previo y son tanto física como digitalmente excluidos en el ciclo de tinción CD68.
CD11c	Células dendríticas mieloides (pero también en macrófagos)	Los macrófagos que causan confusión ya han sido identificados
CD123	Células dendríticas plasmacitoides (pero también en macrófagos y en neutrófilos y en eosinófilos)	Los macrófagos y neutrófilos que causan confusión han sido ya identificados y pueden ser excluidos

B: Identificación simultánea de múltiples compartimentos histológicos tisulares.

Marcador de la superficie celular	Estructura/compartimento del tejido
Enolasa neuronal específica o el marcador de nervio PGP	Nervios
Actina del músculo liso alfa	Tejido muscular liso
DP-40 (prox-1)	Vasos linfáticos
Cav-1 (o CD31)	Vasos sanguíneos
Citoqueratina	Tejidos epitelial y glandular
Vimentina	Fibroblastos (cuando se aplica tras un paquete de leucocitos)

5

C: Análisis de patrones de infiltración leucocitaria en relación con las áreas de daño/reparación del tejido y los principales compartimentos histológicos de tejido de las vías respiratorias

Marcador de la superficie celular	Célula primaria/estructura
CD20	Linfocitos B
CD3	Linfocitos T
BB1	Basófilos
EG2	Eosinófilos
MPO	Neutrófilos
Triptasa	Mastocitos
CD68	Macrófagos
Pan-citoqueratina	Tejido epitelial
Factor Von Willebrand	Vasos sanguíneos
Actina del músculo liso alfa	Tejido muscular liso

E: Identificación mejorada de poblaciones de células dendríticas (DC) tisulares

Marcador de la superficie celular	Célula primaria/estructura	Ventaja/Información adicional
CD21	DC foliculares	
CD68	Macrófagos/monocitos	Enmascaramiento de macrófagos y monocitos que causan confusión
BDCA-3	Subconjunto BDCA3 <sup>+</sup> de células dendríticas mieloides	Los marcadores de la nueva imagen representan células dendríticas CD-68 negativas, BDCA-3 <sup>+</sup>
CD11c	Células dendríticas mieloides BDCA3-negativo	La nueva imagen representa células dendríticas CD68 <sup>-</sup> , BDCA-3 <sup>-</sup> , CD11c <sup>+</sup>
CD123	DC plasmacitoides	Células dendríticas *CD68 <sup>-</sup> , CD123 <sup>+</sup>
Langerin (CD207)	DC mucosa pop 1	Células dendríticas *CD68 <sup>-</sup> , CD11c <sup>-</sup> , CD207 <sup>+</sup>
CD1a	DC mucosa pop 2	*CD68 <sup>-</sup> , CD207 <sup>-</sup> , CD1a <sup>+</sup>
*Solo se describen los marcadores positivos y negativos relevantes para una mejor identificación de las células (técnicamente, las células que se tiñen en cualquier paso son negativas para todos los marcadores utilizados en los ciclos de tinción anteriores)		

10

La parte central de la presente invención se refiere a cómo las series de imágenes obtenidas se analizan y se transforman en nuevas imágenes editadas y en representaciones tridimensionales que comprenden información adicional para visualizar múltiples poblaciones de células y estructuras tisulares y su relación espacial dentro del mismo espacio bi o tridimensional.

La parte de análisis de imágenes de la presente invención se describirá ahora más detalladamente a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran ciertas realizaciones de la invención. Esta invención puede, sin embargo, ser materializada de muchas formas diferentes, y no deben interpretarse como limitadas a las realizaciones expuestas en este documento; más bien, estas realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo para que esta descripción sea exhaustiva y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia. Los números similares se refieren a elementos similares en todo el documento.

La figura 1 es un diagrama de bloques que ilustra un dispositivo, generalmente dado por 1, para diferenciar áreas en una serie de imágenes según la presente invención. El dispositivo comprende un aparato 10 que comprende un procesador 11 y una memoria 12. El aparato 10 podría ser parte de un ordenador. El procesador 11 puede estar programado para registrar la forma y la posición de las áreas en una imagen. La forma y la posición pueden almacenarse asociadas con o en conexión con la imagen, por ejemplo en una base de datos en la memoria 12. El procesador 11 puede estar programado además para evaluar una imagen con el fin de identificar áreas de marcador de imagen según criterios de selección predeterminados. Además, el procesador 11 puede estar programado para comparar dos imágenes e identificar áreas de marcador de imagen presentes en una de las imágenes pero no en la otra. El procesador 11 también puede estar programado para insertar nuevas áreas de marcador de imagen que tienen la misma forma y posición que las áreas de marcador de imagen identificadas en otra imagen, en donde los marcadores insertados son identificables en la otra imagen por una característica única.

En una realización, una unidad 13 de obtención de imágenes está conectada al aparato 10. La unidad 13 de obtención de imágenes es, por ejemplo, una cámara digital CCD o un escáner digital tal como un escáner de portaobjetos. Alternativamente, en lugar de tener una unidad 13 de obtención de imágenes conectada al aparato 10, se pueden proporcionar imágenes al aparato 10 conectando un medio de almacenamiento, tal como una memoria USB, que contiene las imágenes. Las imágenes proporcionadas pueden almacenarse en la memoria 12.

Se puede conectar una unidad 14 de salida al aparato 10 para proporcionar salida desde el aparato 10 a un usuario. La unidad 14 de salida es, por ejemplo, una pantalla tal como una pantalla de ordenador o una pantalla de teléfono móvil. La salida tiene preferiblemente la forma de una interfaz de software, es decir, una interfaz gráfica de usuario para mostrar una imagen. El aparato 10 preferiblemente comprende además una unidad 15 de entrada para recibir la entrada del usuario. Los ejemplos típicos de una unidad 15 de entrada son un teclado o un medio de conexión de datos.

La figura 2a ilustra en general un método según la presente invención para diferenciar áreas de marcadores en una serie de imágenes que pueden ejecutarse en el aparato 10. El método comprende los siguientes pasos:

- Un primer paso 211 de evaluar una serie de imágenes digitales primarias para definir áreas de marcadores de imagen de acuerdo con criterios de selección predeterminados.

- Un segundo paso 212 para crear una nueva imagen, basada en las imágenes de la serie, al insertar nuevos marcadores correspondientes a las áreas de marcadores de imagen definidas en el paso anterior 211, de manera que los marcadores sean identificables.

El método ahora se describirá en detalle con referencia a las figuras 2b y 1.

El paso 221 comprende proporcionar una serie de N imágenes digitales primarias  $I_1, I_2, \dots, I_N$  donde N es un número entero igual o mayor que 2. Las imágenes son proporcionadas por la unidad 13 de obtención de imágenes o por una unidad de almacenamiento (no mostrada) conectada al aparato 10.

La serie de N imágenes digitales primarias se proporciona al obtener imágenes de un corte de tejido según el siguiente proceso de detección (también descrito anteriormente y como se ilustra en la figura 8):

1) poner en contacto el corte de tejido con un medio de detección molecular particular dando como resultado una unión específica a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares;

2) lavar el corte de tejido para eliminar los medios de detección molecular que no se han unido a ningún marcador celular;

3) agregar un sustrato adecuado que dé como resultado la generación de un polímero detectable;

4) lavar el corte de tejido para eliminar el resto del sustrato; y

5) escanear/obtener imágenes del corte de tejido para generar una imagen digital primaria que puede contener una o más áreas de marcador indeterminadas asociadas con la generación de un polímero detectable.

El proceso de detección se repite un número deseado de veces. El paso 5 (correspondiente al paso 817 en la figura 8) genera una imagen digital primaria en cada ciclo de proceso. Por lo tanto, N ciclos generan una serie de N imágenes.

5 El proceso genera imágenes donde la imagen  $I_{n+1}$  comprende al menos la misma cantidad de áreas de marcadores de imagen indeterminados que la imagen  $I_n$  para  $2 \leq n \leq N$ , donde n es un número entero. Por lo tanto, la serie de imágenes comprende una cantidad creciente de áreas de marcador indeterminado donde la imagen  $I_N$  comprende la mayor cantidad de áreas de marcador indeterminadas e  $I_1$  comprende la menor cantidad de áreas de marcador indeterminadas.

10 A continuación, el paso 222 comprende evaluar cada imagen  $I_n$  para  $1 \leq n \leq N$  de acuerdo con los criterios de selección predeterminados, y definir áreas de marcador de imagen. En particular, se evalúan las áreas de marcador indeterminadas. Las áreas de la imagen que cumplen con los criterios de selección predeterminados se definen como áreas de marcador de imagen. Como ya se mencionó en la sección de definiciones anterior, normalmente  
15 podría haber criterios de tamaño, criterios de forma y criterios de color. Los criterios de selección influyen en gran medida en el resultado del proceso de evaluación. Por ejemplo, un nivel de umbral comparativamente alto en relación con el tamaño puede llevar a imágenes más claras que son fáciles de evaluar, pero siempre existe el riesgo de que no se detecten las estructuras relevantes que tienen un tamaño menor. Al decidir los criterios de selección, por lo tanto, se prefiere considerar los datos relativos a las células y las estructuras celulares normalmente presentes  
20 en un corte del tipo de tejido que está a punto de estudiarse. El experto tiene este conocimiento.

Un área consta de uno o más píxeles. Además, un área puede definirse como una pluralidad de píxeles adyacentes en la imagen. Cómo se define un área podría ser parte de los criterios de selección predeterminados. Los criterios podrían, por ejemplo, incluir un criterio de que solo las áreas de más de veinte píxeles deben definirse como áreas  
25 de marcador de imagen. Otro criterio podría ser que los píxeles que forman el área deberían parecerse a una forma particular. El paso 222 corresponde al paso 211 en la figura 2a.

El paso 223 comprende proporcionar una nueva imagen digital secundaria  $I_{nueva}$ . La nueva imagen puede representar el mismo motivo que la serie de imágenes. En particular, la nueva imagen puede ser una copia de una  
30 de las imágenes digitales primarias en la serie de imágenes. En tal realización,  $I_{nueva}$  puede crearse copiando una de las imágenes en la serie de imágenes.

Ventajosamente, la nueva imagen representa la muestra de tejido lo más parecida posible a la muestra de tejido original, es decir, antes de cualquier ciclo de proceso de detección. Esto puede lograrse obteniendo imágenes del  
35 corte de tejido, creando así una imagen  $I_0$ , antes de que se realice el primer ciclo de proceso de detección. En tal realización, la imagen  $I_0$  puede proporcionarse en un paso antes del paso 221 de proporcionar la serie de imágenes.

Alternativamente, la nueva imagen puede ser una imagen en blanco, es decir, sin ningún contenido. El procesador  
40 11 puede crear una imagen en blanco. Por imagen en blanco se entiende, por ejemplo, una imagen en donde todos los valores de píxeles, por ejemplo, el valor RGB, se ponen a cero.

En otra realización alternativa, la nueva imagen se proporciona capturando una imagen después de una tinción inicial de la muestra de tejido con una tinción de contador estándar como la hematoxilina, o cualquier otra tinción que proporcione información valiosa sobre el fondo del tejido y no interfiera con la inmunohistoquímica posterior y los  
45 pasos de detección.

Se debe tener en cuenta que la nueva imagen puede proporcionarse desde, por ejemplo, una unidad de obtención de imágenes o desde una unidad de memoria y que el método no está limitado a ninguna de estas alternativas.

50 Las nuevas áreas de marcador de imagen se pueden insertar en  $I_{nueva}$  en cualquier orden.

Debe observarse que el paso 223 de proporcionar la nueva imagen  $I_{nueva}$  puede ejecutarse antes del paso 222 de evaluar cada imagen o antes del paso 221 de proporcionar la serie de imágenes, es decir, el paso de proporcionar la nueva imagen no depende de sus pasos previos.

55 El paso 224 comprende insertar nuevas áreas de marcador de imagen, en la nueva imagen  $I_{nueva}$ . Para cada imagen  $I_n$  para  $2 \leq n \leq N$ , las nuevas áreas de marcador de imagen se insertan en  $I_{nueva}$  con la misma forma y posición que las áreas de marcador de imagen presentes en la imagen  $I_n$  pero no en la imagen  $I_{n-1}$ . Esto se logra comparando cada imagen  $I_n$  con su imagen subsiguiente  $I_{n-1}$  e identificando las áreas de marcadores de imagen presentes en  $I_n$  pero  
60 no en  $I_{n-1}$ . La evaluación no necesita realizarse para n en un cierto orden y, de hecho, puede realizarse en el orden que se considere adecuado. Sin embargo, lo importante es que se mantenga el orden de las imágenes dentro de la serie y que solo se identifiquen las áreas de marcador de la imagen presentes en la imagen  $I_n$  pero no en la imagen  $I_{n-1}$ .

65 La forma de comparar e insertar áreas de marcadores de imagen con la misma forma y posición en la nueva imagen se puede realizar de muchas maneras, todas bien conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos son el

almacenamiento de parámetros de forma y/o posición en una base de datos y; utilizando una función de copiar y pegar en un software editor de imágenes; etc. El paso 224 se explicará con más detalle en relación con las figuras 4-5.

5 Las áreas de marcador de imagen insertadas en  $I_{nueva}$  se identifican además en  $I_{nueva}$  por una característica única, en particular el valor único de una característica única. La característica identificable es una característica que originalmente no estaba presente en  $I_{nueva}$  y podría ser, por ejemplo, un color. En este caso, un valor único de un color podría ser un matiz particular y único. Lo que es importante es que el valor es único para los medios de detección molecular particulares utilizados en el ciclo de proceso de detección que genera la imagen  $I_n$  y, por consiguiente, el elemento o estructura correspondiente. Un propósito de la característica/valor único es que diferencian diferentes marcadores de imagen que se originan en diferentes ciclos de procesos de detección y, por lo tanto, diferentes medios de detección molecular para diferentes elementos/células primarias y estructuras del corte de tejido. En una realización, la característica única es marcadores visuales en la nueva imagen. En una realización, la característica única es un color general y el valor único de la característica única es un color específico asociado con un marcador de célula particular.

En otra realización, la característica única para áreas de marcador de la imagen que se originan en  $I_n$  es una asociación/conexión digital entre áreas de marcador de la imagen y los elementos y/o estructuras correspondientes que son el objetivo por marcar en el ciclo  $n$  del proceso de detección. La asociación/conexión se almacena en asociación/conexión con la imagen  $I_n$ , tal como en una base de datos asociada en la memoria 12.

El paso 211 de evaluar una serie de imágenes para definir áreas de marcador de imagen de acuerdo con criterios de selección predeterminados se describirá ahora con referencia a la figura 3.

25 La figura 3 ilustra una imagen digital primaria  $I_{1a}$  que representa una muestra de tejido. La imagen se origina a partir de un ciclo del proceso de detección descrito anteriormente y como se ilustra en la figura 8.  $I_{1a}$  comprende diferentes elementos y estructuras correspondientes a elementos y estructuras del corte de tejido. Por razones pedagógicas, los elementos y estructuras de  $<t0 />$  la muestra de tejido se representa como formas geométricas simplificadas en la figura 3. En realidad, la imagen normalmente comprende miles de elementos y estructuras.

30 En este ejemplo, el proceso de detección se ha elegido de tal manera que la generación de polímero detectable conduce a un cambio de color en el área donde se genera el polímero. El cambio de color es tal que las áreas se vuelven más oscuras. Cuando se ven afectados por el proceso de detección (paso 815 en la figura 8), las áreas donde se ha producido una generación de polímero detectable se denominan áreas de marcador indeterminadas. En la figura 3, las áreas de marcador indeterminadas se indican con 31a, 32a, 33a y 34a.

Dado que las áreas son generadas por un polímero detectable, pueden identificarse detectando el polímero.

40 En el presente ejemplo, una mayor generación de polímero detectable en un área produce un área más oscura. En un proceso de detección ideal, la generación de polímero detectable solo está presente en relación con los elementos que se dirigen hacia la elección de los medios de detección molecular particulares. Sin embargo, el polímero detectable con frecuencia también se generará en otras áreas también debido a la reactividad cruzada y a la unión no específica del anticuerpo de detección (o componentes utilizados para la detección molecular). La imagen puede comprender áreas de marcador indeterminadas adicionales, que no han sido afectadas por el proceso de detección. Es deseable separar las áreas que más probablemente se originan de elementos y estructuras "verdaderos", es decir, los elementos y estructuras que se pretenden marcar en un ciclo de proceso de detección particular. Por lo tanto, cada imagen en la serie de imágenes se evalúa, como se ilustra en el paso 310 en la figura 3, de acuerdo con los criterios de selección predeterminados. Los criterios de selección se seleccionan para adaptarse al proceso de detección particular.

50 Los criterios de selección pueden comprender una pluralidad de subcriterios, tales como:

- Umbral de color

55 - Intervalo de color

- Propiedades geométricas (parámetros de forma y tamaño)

60 - Naturaleza de los patrones de tinción dentro de un área marcada (por ejemplo, parámetros de textura; granularidad, engrosamiento, tinción uniforme suave, tinción punteada, etc.).

- Posición (por ejemplo, en relación con estructuras tisulares que, por ejemplo, se pueden identificar en un corte no teñido o después de una tinción de tejido de fondo).

65 El experto en la materia sabe que evaluar una imagen utilizando estos criterios u otros similares puede hacerse utilizando un software como ImageJ, suministrado por el National Institute of Health (NIH), EE. UU. ; Image-Pro Plus

de Media Cybernetica Inc, EE. UU.; Visiomorph de Visiopharm A/S Dinamarca; Definiens Tissue Studio de Definiens AG, Alemania; Genie de Aperio Technologies, EE. UU.; MATLAB de Mathworks Inc, EE. UU.; Adobe Photoshop, etc.

5 Por umbral de color se entiende un umbral en una escala de color, tal como una escala de color HLS (tono-luminosidad-saturación), en donde un píxel con un valor de color por encima o por debajo del umbral de la escala de color particular cumple el subcriterio de selección.

10 Por intervalo de color se entiende un intervalo dentro de una escala de color, como un valor R para una imagen de escala de color RGB dentro de un intervalo particular, como 200-230. Las áreas con píxeles que tienen valores de píxeles dentro del intervalo cumplen con el subcriterio de selección.

15 El umbral de color y los criterios de intervalo de color también son aplicables con otras escalas de color, como una escala de color HSB o escalas de color HIS. Muchas otras escalas de color también existen, como bien sabe el experto en la materia.

20 Por propiedades geométricas se entiende los parámetros asociados con la forma y/o el tamaño del área. Los ejemplos son redondez, circularidad, longitud, parámetros de irregularidad, etc. Los criterios de valor de forma se pueden usar para definir elementos/estructuras verdaderos a partir de elementos/estructuras falsos por su forma. Por ejemplo, los nervios tienen una forma alargada, por lo que las áreas de marcador indeterminadas en una imagen que resultan de un proceso de detección para los nervios, que tienen formas diferentes a las alargadas, pueden excluirse de ser definidas como áreas de marcador de imagen para la imagen en particular.

25 Según entiende el experto en la materia, en la presente invención también pueden usarse otros tipos adecuados de criterios de selección. Por adecuado se entiende que los criterios de selección están adaptados para clasificar las áreas de marcador indeterminadas que más probablemente se originen a partir de los elementos y estructuras a las que se dirige en el ciclo del proceso de detección correspondiente en particular.

30 En una realización, los criterios de selección comprenden un umbral para una propiedad visual, tal como un color, una textura, un tamaño o una redondez. Por propiedad visual se entiende algún tipo de aspecto característico de un área de marcador. Téngase en cuenta que no es necesario visualizar la propiedad en, por ejemplo, una unidad de salida para que sea una propiedad visual.

35 Los criterios de selección pueden comprender uno o más de los tipos de criterios mencionados anteriormente. También se puede incluir una combinación de diferentes tipos de criterios, tales como una combinación de un criterio de umbral de color y un criterio de valor de forma en donde ambos criterios deben cumplirse en un área de marcador indeterminada para poder definirla como un área de marcador de imagen.

40 En este ejemplo, los criterios de selección comprenden una propiedad visual, más en particular, un umbral de color. Solo las áreas con suficiente color oscuro se definen como áreas de marcador de imagen y, por lo tanto, se dice que se correlacionan con elementos y estructuras "verdaderos". Dado que este ejemplo solo comprende colores en escala de grises, el umbral de color se puede establecer en todos los píxeles con una intensidad más alta de un cierto valor en la escala de grises. En una escala de grises de 0-1, donde 0 corresponde a negro y 1 corresponde a blanco, se puede establecer un valor de umbral de 0,75. En otras realizaciones que comprenden imágenes de otra escala de color, por ejemplo en una escala de color RGB, se puede establecer un umbral de la manera correspondiente según lo entienden los expertos en la técnica.

45 Diferentes criterios de selección producen diferentes resultados de evaluación y, por lo tanto, diferentes imágenes secundarias. En el presente ejemplo de la figura 3, los criterios de selección comprenden que los píxeles de un área de marcador indeterminada deben estar por encima de un umbral de color en escala de grises. Mediante la evaluación, se obtiene una imagen digital secundaria  $I_{1b}$  con un área 31b de marcador de imagen. El área 31b de marcador de imagen se define evaluando el área 31a de marcador indeterminada que cumple los criterios de selección. Otras áreas 32a, 33a, 34a de marcador de imagen indeterminadas no cumplen los criterios de selección y, por lo tanto, no se definen como áreas de marcador de imagen. En un paso 311 adicional, la información de la evaluación, que comprende, por ejemplo, los parámetros espaciales geométricos (coordenadas) o el índice de forma de las áreas de marcador evaluadas, se almacena en o en conexión/asociación con la imagen  $I_{1b}$  secundaria, tal como en una base de datos asociada. Dicha base de datos puede actualizarse posteriormente con información sobre las áreas de marcadores indeterminadas que se definen como áreas de marcadores de imagen. La información se puede utilizar para insertar nuevas áreas de marcador de imagen en la nueva imagen en el paso 224.

60 La imagen  $I_{1b}$  puede ser exactamente la misma imagen que  $I_{1a}$  o puede ser copiada y/o editada digitalmente, por ejemplo al insertar una marca visual en las áreas de marcador de imagen. Sin embargo, la imagen digital secundaria no se limita a ser la misma imagen que la imagen digital primaria.

65 La diferencia entre una imagen digital secundaria y una imagen digital primaria es que la imagen digital secundaria se ha evaluado para definir áreas de marcador de imagen, mientras que una imagen digital primaria tiene datos no procesados, sin editar y sin evaluar. Cualquier imagen digital editada o creada en el método se conoce como una

imagen secundaria, ya que no es ninguna imagen sin procesar obtenida directamente de la toma de imágenes digital o del escaneo. Por lo tanto, también las nuevas imágenes creadas en, por ejemplo, los pasos 212 y 224 de la presente invención se denominan imágenes digitales secundarias.

5 En una realización, un usuario puede evaluar una imagen digital primaria mediante el uso de un software de imagen y definir áreas de marcadores de imagen de acuerdo con un criterio de selección predeterminado, tal como una cierta intensidad de color, alrededores de la posición y/o forma. Ejemplos de software de imágenes útiles para este tipo de evaluación son Image-Pro Plus, de Media Cybernetica Inc, EE. UU.; Visiomorph, de Visiopharm A/S Dinamarca; Definiens Tissue Studio, de Definiens AG, Alemania; y Matlab, de Mathworks Inc, EE.UU.

10 El paso 212 de crear una nueva imagen insertando nuevos marcadores identificables y categorizados correspondientes a las áreas de marcador de imagen definidas se describirá ahora con referencia a la figura 4.

15 La figura 4 describe una serie de imágenes de una realización de la presente invención. Las imágenes  $I_1, I_2, I_3, I_4$  forman una serie de  $N$  imágenes, en donde  $N = 4$ . El objeto representado en cada imagen es un corte de tejido (o una parte de un corte de tejido). Cada imagen comprende (la misma parte de) el mismo corte de tejido. Cada una de las imágenes ha sido evaluada de acuerdo con el paso 211 y el paso 222.

20 Cada imagen comprende áreas de marcador de imagen:  $I_1$  comprende un área 411a de marcador de imagen;  $I_2$  comprende las áreas 411b y 421a de marcador de imagen;  $I_3$  comprende las áreas 411c, 421b, 431a y 432a de marcador de imagen; y  $I_4$  comprende las áreas 411d, 421c, 431b, 432b, 441a y 442a de marcador de imagen. La información relacionada con las áreas de marcador de imagen, tales como los parámetros de posición, los parámetros de forma, los valores de color, los valores de intensidad, etc., se almacenan preferiblemente en o en conexión/asociación con la imagen en sí, tal como en una base de datos asociada a la imagen. Dicha base de datos se puede disponer en la memoria 12. Los parámetros se almacenan, por ejemplo, de acuerdo con el paso 311 de la figura 3 (descrito anteriormente).

30 Como se describió anteriormente, las imágenes en la serie de imágenes comprenden al menos la misma o normalmente una cantidad creciente de áreas de marcador de imagen.  $I_4$  comprende la mayor cantidad de áreas de marcador de imagen e  $I_1$  comprende la menor cantidad de áreas de marcador de imagen.  $I_n$  comprende al menos la misma cantidad de áreas de marcador de imagen que  $I_{n-1}$  para  $n = 2, 3$  o  $4$ .

35 Al comparar  $I_4, I_3$  y/o información relacionada con ellas en la base de datos asociada, se encuentra que las áreas 441a y 442a de marcadores de imagen están presentes en  $I_4$  pero no en  $I_3$ . Por lo tanto, las nuevas áreas de marcador de imagen que tienen la misma forma y posición que las áreas 441a y 442a de marcador de imagen se insertan en  $I_{nueva}$  según el paso 224. Las nuevas áreas de marcador de imagen se identifican además por una característica única, en particular un valor único de una característica única.

40 En las figuras 5a y 5b, se dan ejemplos de nuevas imágenes. Estos se pueden obtener en el presente ejemplo. La nueva imagen  $I_{nueva}$  en la figura 5a se proporciona al copiar una de las imágenes  $I_1$ - $I_4$ , como por ejemplo  $I_1$ . En la figura 5b, la nueva imagen  $I_{nueva}$  se proporciona creando una imagen vacía, es decir, sin ninguna información.

45 Como se describió anteriormente, se insertan nuevas áreas de marcador de imagen que tienen la misma forma y posición que las áreas 441a y 442a de marcador de imagen. En las figuras 5a-5b, estas se denominan 541 y 542.

50 En las figuras 5a-5b, las características únicas son marcadores visuales y comprenden patrones únicos para las áreas de marcadores de imagen insertadas de un grupo específico. Las áreas 541 y 542 de marcador de imagen pertenecen a un grupo de áreas marcadas en el ciclo del proceso de detección entre la obtención de la imagen  $I_3$  y la obtención de la imagen  $I_4$ . Para las áreas 541 y 542 de marcador de imagen, el marcador visual de la característica única es un patrón de puntos.

55 Para insertar las áreas 541 y 542 de marcador de imagen con la misma forma y posición que las áreas 441a y 442a de marcador de imagen, una base de datos puede comprender información que se refiere a las áreas 441a y 442a de marcador de imagen. Como se describió anteriormente, dicha información se puede almacenar en una base de datos en el paso 311 adicional en la figura 3. Además, el método según la figura 2b puede comprender un paso adicional para registrar la forma y la posición de cada área de marcador de imagen identificada de acuerdo con los criterios de selección predeterminados. Al conocer la forma y la posición de las áreas 441a y 442b de marcador de imagen, se pueden insertar las nuevas áreas 541 y 542 de marcador de imagen. Como puede comprender el experto en la técnica, pueden insertarse nuevas áreas de marcador de imagen en la nueva imagen mediante otros procedimientos comúnmente conocidos en la técnica.

60 Al comparar  $I_3$  con  $I_2$ , las áreas 431a y 432a de marcador de imagen se identifican como presentes en  $I_3$  pero no en  $I_2$ . Las nuevas áreas 531 y 532 de marcador de imagen con la misma forma y posición que las áreas 431a y 432a de marcador de imagen se insertan en  $I_{nueva}$ . En las figuras 5a-5b, el marcador visual de la característica única de 531 y 532 es un patrón de relleno.



Al comparar  $I_2$  con  $I_1$ , el área 421a del marcador de imagen se identifica como presente en  $I_2$  pero no en  $I_1$ . La nueva área 521 de marcador de imagen con la misma forma y posición que el área 521a de marcador de imagen se inserta en  $I_{nueva}$ . En las figuras 5a y 5b, el marcador visual de la característica única de 521 es un patrón de líneas.

5 Dado que  $I_1$  es el resultado del primer ciclo de proceso de detección,  $I_1$  no necesita compararse con ninguna otra imagen.

En este ejemplo, el área 411a de marcador de imagen se identifica como presente en  $I_1$  y, por lo tanto, se origina en el ciclo del proceso de detección que genera  $I_1$ . Una nueva área 511 de marcador se inserta en  $I_{nueva}$  con la misma forma y posición que 411a. Además, el área 511 de marcador de imagen se puede identificar de acuerdo con una característica única. En las figuras 5a y 5b, el marcador visual de la característica única del área 511 del marcador de imagen es un patrón a cuadros.

15 Por lo tanto, se ha creado una nueva imagen  $I_{nueva}$  que comprende áreas de marcadores de imágenes categorizadas según el ciclo de detección y, en consecuencia, qué marcador de célula y célula primaria representa cada área de marcador de imagen. Por el método de la presente invención, múltiples células o estructuras tisulares pueden identificarse y categorizarse usando una iteración del mismo tipo de proceso de detección. Los marcadores utilizados, tales como los polímeros detectables o fluorocromos, para marcar elementos o estructuras tisulares no necesitan ser únicos en sí mismos. Se puede usar un solo tipo de polímero detectable o un fluorocromo de una longitud de onda específica en cada ciclo del proceso de detección, y generar áreas de marcadores que tengan la misma intensidad, color o longitud de onda emisora de luz. Esta ventaja se ilustra con la imagen  $I_4$  en la figura 4 y con  $I_{nueva}$  en, por ejemplo, la figura 5a. Con las técnicas conocidas, el resultado de múltiples procesos de detección genera la imagen  $I_4$ . Aquí, las áreas de marcador son imposibles de diferenciar entre sí, es decir, no es posible ver qué tipo de célula primaria o estructura tisular representa un área de imagen en  $I_4$ . Sin embargo, mediante el novedoso concepto de la presente invención en donde se combina la obtención de múltiples imágenes con el método de análisis de imágenes descrito, se puede lograr una imagen que comprenda áreas de marcador de imágenes con una categorización de una manera simple y eficiente. De este modo, se pueden resolver muchos problemas con las técnicas conocidas, tal como la limitación de detectar múltiples marcadores dentro del mismo corte.

30 Las figuras 6a-6b ilustran ejemplos de características visuales únicas para las áreas de marcadores de imágenes categorizadas en la imagen  $I_{nueva}$  según la presente invención. Las imágenes representan una muestra de tejido con elementos y estructuras. Las imágenes se han proporcionado a través del método de la presente invención.

35 En la figura 6a, la característica única es patrones diferentes.

En la figura 6b, la característica única es el color gris y los valores únicos son intensidades del color gris y, en particular, diferentes intensidades en escala de grises. Una nueva imagen podría comprender una pluralidad de características, tales como diferentes colores, y dichos colores podrían subdividirse aún más en valores únicos, cuyos valores podrían ser diferentes intensidades de dichos colores diferentes.

40 En la figura 6c, la característica única es símbolos diferentes. En esta realización, los símbolos son caracteres, pero también podrían ser dígitos, símbolos geométricos, etc. o una combinación de los mismos. Los símbolos están dispuestos en la imagen digital  $I_{nueva}$  cerca del área del marcador de imagen que representan, de modo que quede claro con qué marcador de imagen están asociados.

50 Como se mencionó anteriormente, se debe tener en cuenta que la característica única no necesariamente tiene que ser una característica visual dispuesta en la nueva imagen. En lugar de, o en combinación con, un marcador visual puede ser información digital, tal como un valor digital único, donde las áreas de marcador de imagen de un grupo están asociadas entre sí. Dicha información puede almacenarse en una base de datos, y preferiblemente en la base de datos mencionada anteriormente, que comprende información relativa a la posición, la forma y otras características de tinción de las áreas de marcadores de imagen.

55 La figura 7 ilustra una realización de la presente invención en la que se usa una interfaz gráfica, generalmente dada por 7, para proporcionar a un usuario información relacionada con el método de la presente invención. Un programa informático que proporciona la interfaz 7 gráfica puede almacenarse en la memoria 12 y ser ejecutado por el procesador 11. El programa informático puede almacenarse alternativamente en cualquier unidad de almacenamiento adecuada, tal como una memoria USB o un CD-ROM. El programa informático puede además ejecutar el método de diferenciación de áreas de marcador en una serie de imágenes según la presente invención.

60 La interfaz 7 gráfica comprende una ventana 71 gráfica que se proporciona a un usuario a través de una unidad 14 de salida, tal como una pantalla de ordenador, en conexión con el aparato 10. El usuario puede proporcionar al programa informático una entrada, tal como una selección, mediante una unidad 15 de entrada, tal como un ratón o teclado de ordenador, en conexión con el aparato 10.

La ventana 71 gráfica comprende una imagen 72 correspondiente a una nueva imagen  $I_{nueva}$  proporcionada por el método según la presente invención. En esta realización, la imagen 72 representa el mismo corte de tejido que las figuras 4-5.

5 La ventana 71 gráfica comprende además al menos un cuadro 75 para adaptar cómo ver la imagen 72. El cuadro 75 puede comprender un cuadro 76 de selección para proporcionar una elección entre diferentes alternativas. En esta realización, el cuadro 75 ofrece una elección sobre qué grupo de poblaciones de células primarias resaltar en la imagen 72. Al elegir la alternativa "linfocitos B" en el cuadro 76 de selección, se resaltan las áreas 751 y 752 de marcador de imagen asociadas con las células primarias de linfocitos B. La asociación entre un área de marcador de imagen y una célula primaria puede almacenarse en una base de datos, en donde la información relacionada con la asociación puede obtenerse mediante el programa informático de la base de datos. La base de datos puede obtenerse mediante el método según la presente invención como se describe anteriormente, en particular mediante el paso 311. Las alternativas proporcionadas por el cuadro 75 no se limitan a comprender solo un tipo de tipos de células, sino que también podrían comprender un grupo de una pluralidad de tipos de células.

15 La ventana 71 gráfica puede comprender otros cuadros de selección múltiple u otros medios de adaptación adecuados, tales como casillas de verificación, ventanas de selección múltiple, etc.

20 La ventana 71 gráfica comprende además un cuadro 77 asociado con un cuadro 79 de información. La información proporcionada en el cuadro de información está asociada con las áreas de marcador de imagen de la imagen 72. La información puede obtenerse mediante una base de datos que comprende información relativa a las áreas de marcador de imagen de la imagen 72. El cuadro 77 de selección comprende un cuadro 78 de selección. El usuario puede elegir entre diferentes tipos de información para mostrar dicha información específica sobre áreas de marcadores de imagen en el cuadro 79 de información. En este ejemplo ilustrado, el usuario ha elegido mostrar las coordenadas seleccionando la alternativa "coordenadas X, Y" en el cuadro 78 de selección. La información relativa a las coordenadas x e y de las áreas 751 y 752 de marcadores de imagen resaltadas, elegidas en el cuadro 76 de selección, se proporciona en el cuadro 79 de información.

30 Por supuesto, la interfaz 7 gráfica puede tomar muchas formas diferentes y comprender muchas funciones diferentes. Por lo tanto, el tipo de información relativa a las áreas de marcador de imagen que puede ser proporcionada al usuario por la interfaz 7 gráfica no está limitada por este ejemplo. Por el método reivindicado, a un usuario se le puede proporcionar información tal como:

- 35 - el área, expresada en, por ejemplo,  $4 \mu\text{m}^2$ , para cualquier área de marcador.
- valores de forma para un área de marcador de imagen, por ejemplo perímetro y redondez
- valores de intensidad, por ejemplo intensidad media de píxeles en un área de marcador de imagen
- 40 - distancias dentro de la imagen, por ejemplo distancias entre dos áreas de marcador de imagen
- correlaciones espaciales entre áreas de marcador de imagen, o grupos de áreas de marcador; por ejemplo, mediante el uso de algoritmos estadísticos en el software, un usuario puede obtener información sobre la relación espacial entre, por ejemplo, áreas de marcador correspondientes a linfocitos B y aquellas áreas de marcador en la misma área de tejido que corresponden a la población celular de, por ejemplo, linfocitos T.

50 Se debe tener en cuenta que al solicitar la presente invención para cortar en serie cortes de tejido (por ejemplo, 30 cortes consecutivos, cada uno con un grosor fijo de, por ejemplo,  $4 \mu\text{m}^2$ ), una interfaz gráfica similar tal como la que se muestra en la figura 7 también puede mostrar la distribución tridimensional de las áreas de marcador de imagen en una imagen 3D. De manera similar, un usuario puede obtener información 3D sobre áreas de marcador de imagen, tal como sus coordenadas x, y y z. Mediante el uso de algoritmos comúnmente conocidos para la representación 3D, un usuario puede obtener cálculos (o representaciones gráficas) sobre el volumen de una célula marcada o de una estructura tisular.

55 El programa informático y la interfaz 7 gráfica deben considerarse como medios para proveer al usuario con cualquier información que pueda extraerse de las imágenes del método de la presente invención. La forma de extraer y almacenar dicha información, por ejemplo, en una base de datos es de conocimiento general para una persona experta en la técnica. El cómo elaborar un programa informático para cumplir con las características descritas en relación con lo anterior también puede ser llevado a cabo por una persona con conocimientos generales en la técnica. Cabe señalar que el programa informático no se limita a las características descritas anteriormente y, por ejemplo, podría comprender otras características bien conocidas, tales como la edición y la revisión de imágenes digitales. La interfaz 7 gráfica también podría comprender características para realizar la evaluación de imágenes digitales primarias.

65 En resumen, la presente solicitud describe un método para diferenciar áreas en una serie de imágenes digitales, comprendiendo el método los pasos de: proporcionar una serie de imágenes que comprenden áreas de marcador

indeterminadas; evaluar cada imagen  $I_n$  para  $1 \leq n \leq N$  de acuerdo con los criterios de selección predeterminados y definir áreas de marcador de imagen como áreas de marcador indeterminadas que cumplen con los criterios de selección predeterminados; proporcionar una nueva imagen  $I_{nueva}$ ; e insertar nuevas áreas de marcador de imagen en la nueva imagen  $I_{nueva}$ , teniendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen la misma forma y posición que las áreas de marcador de imagen presentes en la imagen  $I_n$  pero no en la imagen  $I_{n-1}$ , y siendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen identificables en  $I_{nueva}$  por una característica única.

Además, la solicitud describe un método para visualizar poblaciones celulares en corte de tejido de una muestra histológica.

Además, la solicitud describe un método para visualizar la distribución tridimensional de múltiples poblaciones celulares en una muestra histológica.

### Ejemplos

La presente invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los ejemplos adjuntos.

Ejemplo 1: Manejo de tejidos, preparación de muestras y generación de cortes.

Se incluyeron los siguientes tejidos humanos:

- Colon distal humano: extirpación quirúrgica debida a inflamación crónica y sospecha de colitis inespecífica.

- Tejido pulmonar humano de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, EPOC y fibrosis quística: extirpación pulmonar debido a la sospecha de cáncer de pulmón, el tejido analizado no estaba afectado por el cáncer y se obtuvo lo más lejos posible del tumor.

- Ganglios linfáticos humanos: grandes ganglios linfáticos drenantes retirados en asociación con un trasplante de pulmón debido a una EPOC grave o fibrosis quística.

- Amígdalas humanas: se retiran como parte de una amigdalectomía de rutina debido a episodios repetidos de amigdalitis.

Las muestras (es decir, trozos de tejido) de todos los tipos de tejido se sumergieron al ser sometidos a una fijación de rutina mediante inmersión en un fijador de rutina (formaldehído tamponado al 4%, pH 7,6). Después de la fijación durante la noche, las muestras se deshidrataron en una serie de soluciones con concentración creciente de alcohol (EtOH) e inmersión final en xileno. La deshidratación se llevó a cabo en una máquina de deshidratación automática (Shandon Hypercenter XP Tissue Processor, Shandon/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las muestras deshidratadas se embebieron posteriormente en parafina a 60 °C usando una máquina de embebido en parafina. Los cortes de parafina (4 mm) se generaron con un micrótopo de corte de parafina de rutina (micrótopo de parafina Microm HM360, Microm, Alemania) y se montaron en portaobjetos de vidrio de microscopio estándar. Los cortes se almacenaron entonces a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 2: Tinción inmunohistoquímica múltiple y generación de imágenes digitales en serie.

La tinción inmunohistoquímica se realizó con un robot de inmunohistoquímica automatizado (Autostainer CL-classic; Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) con el sistema de detección DAKO REAL EnVision, un método estándar sensible destinado a la detección de anticuerpos primarios de ratón o conejo (kit IHC Código K5007, Dako Cytomation, Dinamarca; para más detalles, véase [www.dako.com](http://www.dako.com)). Los anticuerpos primarios utilizados para detectar los antígenos específicos de la célula (anteriormente denominados "marcadores celulares") se enumeran en la tabla 2 y se aplican en los cortes a la dilución recomendada por los productores comerciales para la tinción inmunohistoquímica de tejidos humanos preparados para el examen patológico de rutina (es decir, cortes de muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina). En la tabla 3 se enumeran ejemplos de series de marcadores que se usaron en la evaluación de ESMS.

Tabla 2. Ejemplos de anticuerpos utilizados para la validación experimental de la técnica ESMS

Marcador	Tipo de célula primaria	Suministrador
CD20	Linfocitos B	Dako
CD3	Linfocitos T	Dako
CD8	Linfocitos T CD68 <sup>+</sup>	Dako
ECP (EG2)	Eosinófilos	Pharmacia
Triptasa	Mastocitos MCt	Chemicon
Quimasa	Mastocitos MCtc	Chemikon
CD68	Macrófagos/monocitos (también basófilos, linfocitos grandes)	Dako

(continuación)

Marcador	Tipo de célula primaria	Suministrador
MPO	Neutrófilos	Dako
CD163	Macrófagos de la mayoría de los tejidos	Novocastra
CD123	Células dendríticas plasmacitoideas (también monocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos)	BD-Pharmigen
CD1a	Células dendríticas intraepiteliales	Novocastra
CD11c	Células dendríticas mieloides (pero también, por ejemplo, macrófagos)	Novocastra
BDCA-3	Subpoblación de células dendríticas mieloides	Novus
CD21	Células dendríticas foliculares	Dako
Vimentina	Los principales fibroblastos	Novocastra
Citoqueratina	Células epiteliales	Novocastra
Lyve-1	Vasos linfáticos	Dako
Caveolin-1	Células endoteliales (vasos sanguíneos)	Novocastra
Enolasa neuronal específica (NSE)	Nervios (y células neuroendocrinas epiteliales)	Novocastra
Actina del músculo liso alfa	Tejido muscular liso	Sigma-Aldrich

5 Antes del paso de la propia inmunohistoquímica, los cortes de parafina se desparafinaron y se sometieron a la recuperación de antígenos inducida por calor. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando una máquina comercial y programable de recuperación de antígeno <math>t0 /></math> (PT Link de Dako Cytomation, Dinamarca) con una temperatura máxima de 95 °C y la solución de recuperación de objetivos Envision FLEX, pH 6.1 (Dako Cytomation).

10 Después de la recuperación del antígeno, los portaobjetos se colocaron en el robot Autostainer. El protocolo inmunohistoquímico programado fue el siguiente:

- 1) Paso de enjuague con regulador de lavado Envision FLEX (pH 7.6) durante 5 min.
- 2) Bloqueo de peroxidasa endógena en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en dH<sub>2</sub>O (10 min).
- 15 3) Incubación con anticuerpos primarios debidamente diluidos (véase la tabla 2) durante 60 min. Los anticuerpos se diluyeron en un regulador PBS suplementado con un detergente Tween al 0,1%.
- 4) Paso de enjuague con regulador de lavado Envision FLEX (pH 7.6) durante 5 min.
- 20 5) Incubación durante 30 min. con reactivo secundario (anticuerpos anti-ratón y anti-conejo unidos a un polímero de dextrano con enzima de detección unida, peroxidasa HR (HRP).
- 6) Pasos de enjuague repetidos con el regulador de lavado Envision FLEX (pH 7.6) durante 5 min.
- 25 7) Incubación con solución de sustrato de enzima HRP (diaminobencidina, DAB) durante 10 min.
- 8) Pasos de enjuague repetidos con el regulador de lavado Envision FLEX (pH 7.6) durante 5 min.
- 9) Los cortes desarrollados se montaron cuidadosamente con cubreobjetos estándar utilizando regulador PBS suplementado con un Tween del 0,1% como medio de montaje.

30 10) A continuación, la información del patrón de tinción en cada corte fue digitalizada. La precipitación insoluble marrón formada por la enzima HRP en el lugar de la inmunorreactividad se capturó en todo el corte utilizando un robot comercial de escáner de portaobjetos completo (Aperio Scanscope CS, Aperio Technology, EE. UU.). La digitalización se realizó utilizando una lente de microscopio x20 y el tamaño de la imagen de resolución ultra-alta generada para cada corte fue normalmente de 2 a 5 GB de tamaño (y originalmente en un formato de archivo de imagen SVS; partes de la imagen SVS grande se exportaron también como imágenes TIFF utilizando las funciones de exportación proporcionadas por el software ImageScope suministrado por Aperio, véase a continuación).

40 11) Alternativamente, o como complemento de la digitalización de portaobjetos completos, las regiones seleccionadas de los cortes también se capturaron con un aumento mayor (x400 o x600; imágenes TIFF o JPEG) utilizando un microscopio de campo claro (Microscopio de investigación Nikon 80i, Nikon, Japón) equipado con una cámara digital en color (Olympus DP-50, Olympus, Japón) y un software de captura de imágenes (Viewfinder Lite, v1.0, 2000, Pixera Co).

45 12) Después de la digitalización, los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se enjuagaron en un regulador antes de entrar en un nuevo ciclo de inmunohistoquímica (comenzando en el paso 2 del protocolo). En algunos casos, antes de que los cortes entraran en el siguiente ciclo de tinción, se sumergieron en una solución de

bloqueo que hace que los anticuerpos primarios anteriores no sean reconocibles para los anticuerpos de detección secundarios en el ciclo de tinción posterior. La interrupción del lugar de reconocimiento de antígenos se llevó a cabo mediante modificación química. Dicha modificación química se realizó de dos maneras diferentes. El sitio de reconocimiento de antígenos se destruyó por desnaturalización de proteínas utilizando la solución de bloqueo desnaturalizante DNS001H de BioCARE, Concord, CA, EE. UU. Alternativamente, los anticuerpos podrían ser escindidos enzimáticamente.

13) A continuación, el corte entró en un nuevo ciclo de tinción que comienza con el paso 2 (bloque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el protocolo anterior).

14) Después de n números de ciclos y el desarrollo de la inmunorreactividad del marcador final, los cortes se enjuagan en ddH<sub>2</sub>O, se tiñen a contracorriente con hematoxilina (Htx, Merck, Darmstadt, Alemania), se deshidratan a través de una serie de soluciones alcohólicas y xileno, y finalmente se montan con medios de montaje Pertex. (HistoLab, Gotemburgo, Suecia) antes de digitalizarse como se describe anteriormente.

Tabla 3. Ejemplos de series de marcadores utilizadas en la validación de la técnica ESMS

	Ciclo-1	Ciclo-2	Ciclo-3	Ciclo-4	Ciclo-5	Ciclo-6	Ciclo-7	Ciclo-8
<b>Pólipo</b>								
Corte 1	CD20	CD8	ECP	Tryp	MPO	CD68	Cytok	Viement
Corte 2	CD20	CD8	ECP	Tryp	NSE	Lyve-1	Cytok	
Corte 3	CD8	EG2	MPO	SMA	NSE	Lyve-1	Cytok	
<b>Colon</b>								
Corte 1	CD20	CD8	ECP	Tryp	CD68	CD11c	Cytok	Viement
Corte 2	CD20	CD8	ECP	Tryp	NSE	SMA	Cytok	CD68
Corte 3	CD20	CD8	CD3	CD68	ECP	Chym	Tryp	MPO
<b>Ganglio linfático</b>								
Corte 1	CD21	CD68	CD11c	BDCA-3	CD20	CD8	SMA	
Corte 2	CD20	CD3	CD21	CD11c	Chym	Tryp		
Corte 3	CD21	CD3	CD68	CD20	Chym	Tryp		
<b>Pulmones</b>								
Corte 1	CD20	CD8	CD3	CD68	ECP	Chym	Tryp	MPO
Corte 2	CD20	CD8	CD3	CD68	CD11c	ECP	MPO	Tryp
Corte 5	CD20	CD8	Tryp	NSE	Cytok	SMA	Lyve-1	CD68
Corte 6	NSE	CD8	Tryp	Lyve-1	Cytok	SMA	CD68	Viement
Corte 7	NSE	CD1a	CD68	BDCA-3	CD11c	SMA	Cytok	

SMA = Actina del músculo liso alfa, Chym = Chymasa, Tryp = Triptasa, Cytok = Citoqueratina, NSE = Enolasa neuronal específica

Ejemplo 3: Análisis de imágenes informatizadas y descodificación de patrones de tinción específicos de marcadores.

Los cortes digitalizados del escáner de portaobjetos de Aperio, correspondientes a una serie de imágenes primarias según la invención descrita, se inspeccionaron manualmente utilizando un software de visualización (Aperio ImageScope, versión 10.0.35.1798, Aperio Technologies Inc). En la evaluación inicial, las regiones de interés en cada corte se seleccionaron para un análisis más detallado. Usando la función de extracción y exportación de imágenes en el software ImageScope, las imágenes sin procesar, es decir, las imágenes digitales primarias, se exportaron como archivos TIFF o JPEG; una imagen por cada ciclo de tinción. Juntas, las imágenes formaron una serie de imágenes por región de interés.

Para algunas imágenes, el patrón de distribución de la precipitación DAB marrón ya estaba delineado antes de la exportación de la imagen mediante las características de segmentación de color (algoritmo de "píxel positivo") incluidas en el software ImageScope tras seleccionar los valores RGB y tono característicos de la precipitación DAB marrón.

En caso de que la tinción inmune marrón, es decir, las áreas del marcador de imagen, no se hubieran delineado ya en ImageScope, esto se realizó utilizando un software fácilmente disponible con funciones de reconocimiento de color (por ejemplo, ImageJ, versión 1.44o, National Institute of Health (NIH), EE. UU. o Adobe Photoshop® CS4 Extended, versión 11.0.2, Adobe Systems Incorporated, EE. UU.). A través de la retroalimentación visual de las manchas detectadas, una persona con conocimiento sobre el patrón de tinción típico y la apariencia de tinción de cada tipo de célula ajustó los valores de umbral hasta que se produjo la detección óptima.

A continuación, se evaluó la serie de imágenes, con las áreas de marcador de imagen indeterminadas acumuladas producidas después de cada ciclo de detección molecular. Las áreas de marcador de imagen se cortaron

digitalmente y se les dio un pseudocolor único para el ciclo correspondiente del proceso de detección. Usando la última imagen, es decir, la imagen N en la serie de N imágenes, como plantilla, los puntos de tinción acumulados codificados por colores, es decir, las áreas de marcador de imagen coloreadas, se copiaron y pegaron en la plantilla en orden inverso (si hizo falta, este procedimiento fue precedido de un paso de alineación que, utilizando el contorno del tejido como puntos de referencia, corrigió diferencias ocasionales menores en la orientación física entre las imágenes dentro de la misma serie).

Por ejemplo, en el caso de una serie de imágenes con siete imágenes, es decir, resultantes de siete ciclos de proceso de detección, se utilizó una copia de la última imagen (la séptima), con toda la tinción acumulada como la nueva plantilla de imagen. En algunas realizaciones es ventajoso copiar la última, ya que tiene la mejor morfología debido a que el portaobjetos con el corte de tejido se montó de manera óptima y definitiva en un medio de montaje no acuoso antes de generar la última imagen digital primaria. Las áreas de marcador de imagen en la sexta imagen se copiaron y pegaron en la nueva imagen. Por lo tanto, las áreas de marcador de imagen que ya estaban presentes en la nueva imagen se enmascararon, es decir, las áreas de marcador que no se generaron en la séptima ronda de detección fueron enmascaradas. De manera similar, las áreas de marcador de imagen en la quinta imagen enmascararon todas las áreas de marcador de imagen que no se generaron en la sexta ronda de proceso de detección.

La nueva imagen compuesta generada finalmente mostró siete colores distintos: uno para cada grupo de áreas de marcadores de imagen que se originaron a partir de diferentes ciclos de tinción, es decir, ciclos de proceso de detección.

La información de la nueva imagen se podría extraer seleccionando automáticamente un color de marcador (por ejemplo, utilizando el software ImageJ o el MATLAB®) y utilizando luego el "algoritmo de análisis de partículas", u operación similar, para generar información detallada sobre cada mancha teñida (perímetro, área, índice de forma, coordenadas x, y para el centroide de la mancha, etc.).

Esta función también puede incluirse en la interfaz gráfica de usuario descrita (ilustrada en la figura 7).

Otro tratamiento para la generación de imágenes compuestas mediante la evaluación de la serie de imágenes fue utilizar las herramientas de segmentación de color y las herramientas de análisis de partículas proporcionadas por Image J (v 1.44) y los complementos disponibles de forma gratuita para Image J. En resumen, cada imagen de la serie fue sometida al siguiente procedimiento:

1) las manchas teñidas con DAB de color marrón, es decir, las áreas de marcador de imagen, se segmentaron por segmentación basada en el color mediante la evaluación de las imágenes con criterios de selección que comprenden valores umbrales de HSB (tono, saturación, brillo) apropiados;

2) las imágenes se transformaron en una imagen binaria en blanco/negro (es decir, se hicieron binarias)

3) las imágenes transformadas del paso 2) se evaluaron utilizando la herramienta de análisis de partículas de Image J (versión 1.4.4) con las restricciones de tamaño apropiadas y se produjo y almacenó una lista de datos, es decir, una base de datos de todas las áreas de marcador de imagen, es decir, todas las áreas de marcador de imagen. La lista de datos contenía las coordenadas x, y, área, perímetro, circularidad, redondez, intensidad de tinción media, etc. para todas las áreas individuales de marcador de imagen. El programa produjo automáticamente una imagen marcada donde las áreas de marcador se delinean junto con el número del área de marcador que corresponde a la misma mancha en la lista de datos.

A continuación, al comparar los valores numéricos de la distribución del área de marcador (es decir, las coordenadas x, y) fue posible calcular qué áreas de la imagen estaban presentes, por ejemplo, en la imagen n pero no en n-1. Este tratamiento se realizó en todos los pares de imágenes consecutivas, lo que generó información sobre qué marcador de imagen apareció después de cada nuevo ciclo de detección molecular. Finalmente, utilizando esta información, junto con la lista de datos de todas las áreas de marcador acumuladas de la última imagen, fue posible crear una nueva imagen compuesta. Después de activar el administrador de la Región de Interés (ROI), a las áreas de marcadores pertenecientes a un ciclo de detección molecular específico se les asignó un color específico en la imagen marcada correspondiente.

Para ilustrar una ventaja de la información que se puede extraer, consideremos el escenario de un tejido inflamado y la tinción de múltiples poblaciones de células inmunes infiltrantes de tejido (leucocitos). En un corte rutinario convencional, normalmente hay decenas de miles de células de cada población. La extracción de las coordenadas x, y para células individuales dentro de múltiples poblaciones de leucocitos hace posible realizar un nuevo tipo de potente análisis de patrones celulares. Por ejemplo, el campo relativamente nuevo y emergente del análisis espacial (estadística espacial) y el análisis de grupos se puede realizar para obtener información sobre las constelaciones celulares potencialmente específicas de la enfermedad (patrones de infiltración), qué células se atraen entre sí o son atraídas por ciertas microlocalizaciones en el tejido, o ciertas combinaciones de células etc.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para diferenciar áreas en una serie de N imágenes digitales primarias de un corte de tejido, en donde N es un número entero  $>1$ , creando así una nueva imagen, comprendiendo dicho método los pasos de:
- 5 a) proporcionar una serie de N imágenes (221) digitales primarias que comprenden áreas de primer marcador, en donde una imagen  $I_{n+1}$  comprende al menos las mismas áreas de primer marcador que una imagen digital  $I_n$  primaria en para  $1 \leq n < N$  en donde n es un número entero;
- 10 b) evaluar (211, 222, 310) cada imagen digital  $I_n$  primaria para  $1 \leq n \leq N$  de acuerdo con los criterios de selección predeterminados e identificar como áreas de marcador de imagen aquellas áreas de primer marcador que cumplen con los criterios de selección predeterminados, y almacenar información (311) sobre cualquiera de esas áreas de marcador de imagen en o en conexión/asociación con una imagen digital secundaria resultante correspondiente, obteniendo así una serie de N imágenes digitales secundarias;
- 15 c) proporcionar (223) una nueva imagen  $I_{nueva}$  del corte de tejido sin áreas de marcador;
- d) insertar (212, 224) nuevas áreas de marcador de imagen en la nueva imagen  $I_{nueva}$ , teniendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen la misma forma y posición que las áreas de marcador de imagen presentes en la imagen  $I_1$ , y siendo dichas áreas de marcador de imagen identificables en  $I_{nueva}$ , por una característica única;
- 20 e) para cada n para  $2 \leq n \leq N$  de la serie de imágenes digitales secundarias obtenidas en el paso b), insertar nuevas áreas de marcador de imagen en la nueva imagen  $I_{nueva}$ , teniendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen la misma forma y posición que las áreas de marcador de imagen presentes en la imagen  $I_n$  pero no en la imagen  $I_{n-1}$ , y siendo dichas nuevas áreas de marcador de imagen identificables en  $I_{nueva}$  por una característica única.
- 25 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la nueva imagen  $I_{nueva}$  es una copia de una de las imágenes en dicha serie de imágenes primarias.
- 30 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicha característica única en los pasos d) y e) es una característica que tiene un valor único para cada n,  $1 \leq n \leq N$ .
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, caracterizado por que dicha característica única es un color general y dicho valor único de dicha característica única es un color específico asociado con un marcador de célula particular.
- 35 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que los criterios de selección predeterminados comprenden un umbral para una propiedad visual de un área de primer marcador.
- 40 6. Un método para visualizar poblaciones de células dentro de un corte histológico de tejido, comprendiendo dicho método los pasos de:
- a) proporcionar (811) un corte de tejido que se haya preparado para la tinción molecular de una manera conocida previamente;
- 45 b) proporcionar (812) una serie de K medios de detección molecular particulares para unirse específicamente y detectar elementos de una serie predeterminada de K marcadores de células que pueden estar presentes en el corte de tejido del paso a), siendo dichos medios de detección molecular capaces de generar la formación de una respuesta iniciable y detectable, siendo K un número entero  $> 2$ ;
- 50 c) para cada medio de detección molecular particular  $k = 1, 2, \dots, K$  del paso b) llevar a cabo el siguiente procedimiento:
- 1) poner en contacto (813) dicho corte de tejido del paso a) con dichos medios de detección molecular particulares dando como resultado la unión específica a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares;
- 55 2) lavar (814) dicho corte de tejido para eliminar medios de detección molecular que no se hayan unido a ningún marcador celular;
- 60 3) iniciar la respuesta (815) desde los medios de detección molecular que pueden haberse unido a marcadores celulares del corte de tejido permitiendo así la detección de dichos medios de detección molecular; y
- 65 4) cuando se pueden detectar dichos medios de detección molecular, escanear/obtener imágenes (817) del corte de tejido para generar una imagen digital primaria  $I_k$  que puede contener una o más áreas de primer marcador asociadas con la generación de un polímero detectable;

por lo que se obtiene una serie de K imágenes digitales primarias I<sub>k</sub> para k = 1, ..., K que contienen una cantidad creciente de áreas de primer marcador;

5 d) llevar a cabo el método de la reivindicación 1 en la serie de K imágenes digitales primarias I<sub>k</sub> para k = 1, ..., K obtenida en el paso c), generando así una imagen I<sub>nueva</sub> en la que se visualizan dichas estructuras celulares.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que dichos medios de detección molecular son un conjunto de anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos, en donde cada anticuerpo se une a un marcador celular específico y en donde se ha conjugado una enzima a cada anticuerpo, siendo dicha enzima capaz de generar, en presencia de uno o más sustratos adecuados, la formación de un polímero detectable,

15 en donde los puntos 1) y 2) del paso c) se llevan a cabo de tal manera que:

i) el corte de tejido del paso a) se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares; estando dicho anticuerpo conjugado con una enzima, siendo dicha enzima capaz de generar, en presencia de uno o más sustratos adecuados, la formación de un polímero detectable;

20 ii) después del paso i) anterior, el corte de tejido se lava para eliminar los anticuerpos no unidos; y en donde el punto 3) del paso c) se lleva a cabo de tal manera que:

25 iii) después del punto 2) el corte de tejido se expone a uno o más sustratos adecuados para dicha enzima, lo que conduce a la formación de polímeros detectables en caso de que dicho elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares esté presente en dicho corte de tejido.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que dichos medios de detección molecular son un conjunto de complejos moleculares, donde cada complejo comprende un primer anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que se une a un marcador celular específico, un segundo anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal unido específicamente a dicho primer anticuerpo y una enzima conjugada con dicho segundo anticuerpo, siendo dicha enzima capaz de generar, en presencia de uno o más sustratos adecuados, la formación de un polímero detectable,

35 en donde los puntos 1) y 2) del paso c) se llevan a cabo de tal manera que:

i) el corte de tejido del paso a) se pone en contacto con un primer anticuerpo que se une específicamente a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares;

40 ii) después del paso i) anterior, el corte de tejido se lava para eliminar los anticuerpos no unidos;

45 iii) después del paso ii) anterior, el corte de tejido se pone en contacto con un segundo anticuerpo que se une específicamente a dicho primer anticuerpo, estando dicho segundo anticuerpo conjugado con una enzima, siendo dicha enzima capaz de generar en presencia de uno o más sustratos adecuados la formación de un polímero detectable; y

iv) después del paso iii) anterior, el corte de tejido se lava para eliminar los anticuerpos no unidos; y

50 en donde el punto 3) del paso c) se lleva a cabo de tal manera que:

v) después del punto 2) el corte de tejido se expone a uno o más sustratos adecuados para dicha enzima, lo que conduce a la formación de polímeros detectables en caso de que dicho elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares esté presente en dicho corte de tejido.

55 9. Un método según las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que dicha enzima se elige de entre el grupo de fosfatasa alcalina y peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano rústicano.

60 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado por que dicho sustrato se selecciona de entre el grupo de 3, 3'-diaminobencidina, Ferangi Blue, Vulcan Fast Red, aminoetil carbazol (AEC) y Vina Green.

65 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que dichos medios de detección molecular son un conjunto de conjugados moleculares que comprenden una parte de reconocimiento unida a una parte de detección, en donde dicha parte de reconocimiento es capaz de unirse específicamente a un elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares, siendo dicha parte de reconocimiento seleccionada de entre el grupo de: un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal y fragmentos del mismo, y una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ARN y una molécula de ADN, siendo dicha parte de detección



un fluorocromo, siendo dicho fluorocromo capaz de emitir radiación de una longitud de onda particular después de la exposición a una radiación de iniciación diferente de dicha radiación emitida

5 en donde el punto 3) del paso c) se lleva a cabo de tal manera que el corte de tejido y cualquier medio de detección molecular que se haya unido al mismo estén expuestos a la radiación de iniciación que conduce a la emisión de radiación de una longitud de onda particular en caso de que dicho elemento particular de dicha serie predeterminada de marcadores celulares esté presente en dicho corte de tejido; y en donde el punto 4) del paso c) se lleva a cabo cuando se emite dicha radiación de una longitud de onda particular.

10 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde un sustrato que genera polímeros al menos parcialmente solubles, tales como Vina Green o aminoetil carbazol (AEC), se usa como un sustrato para producir un polímero detectable, comprendiendo el método además los pasos de

15 e) lavar dicho corte de tejido para eliminar dicho polímero detectable; y

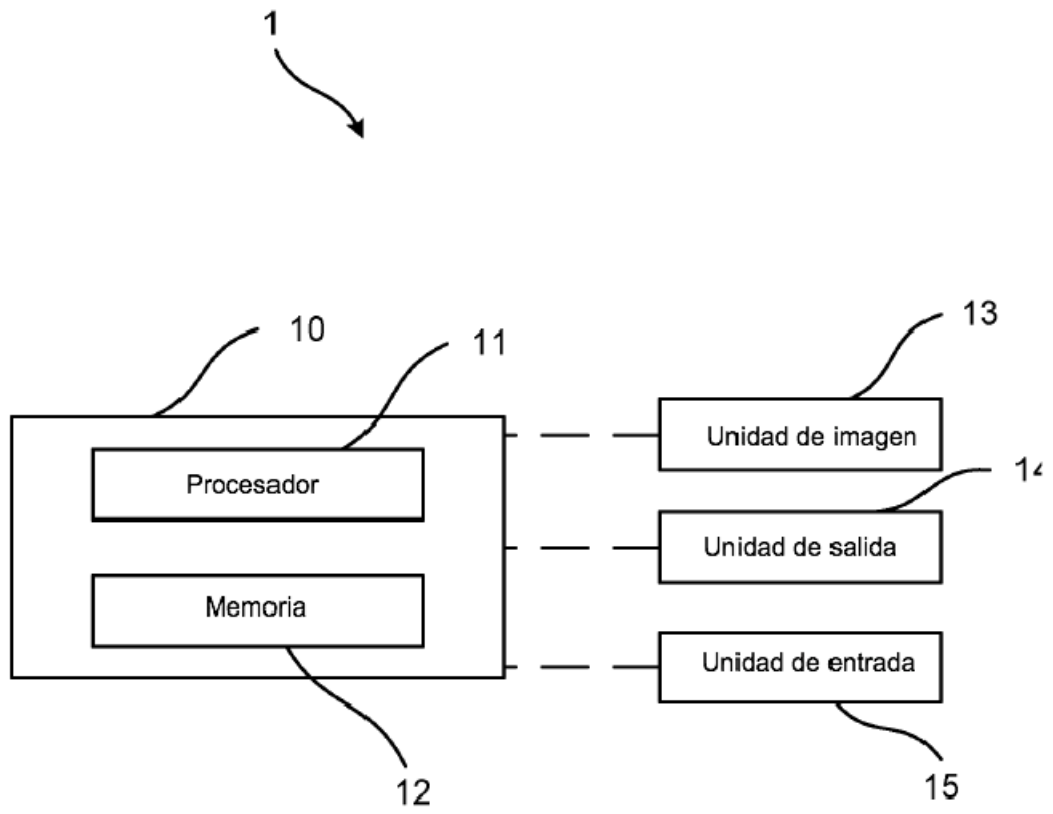
f) repetir los pasos b-d con una nueva serie de medios de detección molecular.

20 13. Un método para visualizar la distribución tridimensional de múltiples poblaciones celulares y estructuras celulares dentro del mismo espacio tridimensional en una muestra histológica, que comprende los pasos de:

A) proporcionar una muestra de tejido, y cortar dicha muestra en una pluralidad de cortes de tejido originalmente superpuestos de una manera conocida previamente;

25 B) llevar a cabo el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-12 para todos los cortes de tejido obtenidos en el paso A); y

30 C) superponer las imágenes obtenidas en el paso B) según unos principios conocidos, obteniendo así una visualización tridimensional de la distribución tridimensional de múltiples poblaciones celulares y estructuras celulares dentro del mismo espacio tridimensional en una muestra histológica.



*Fig. 1*

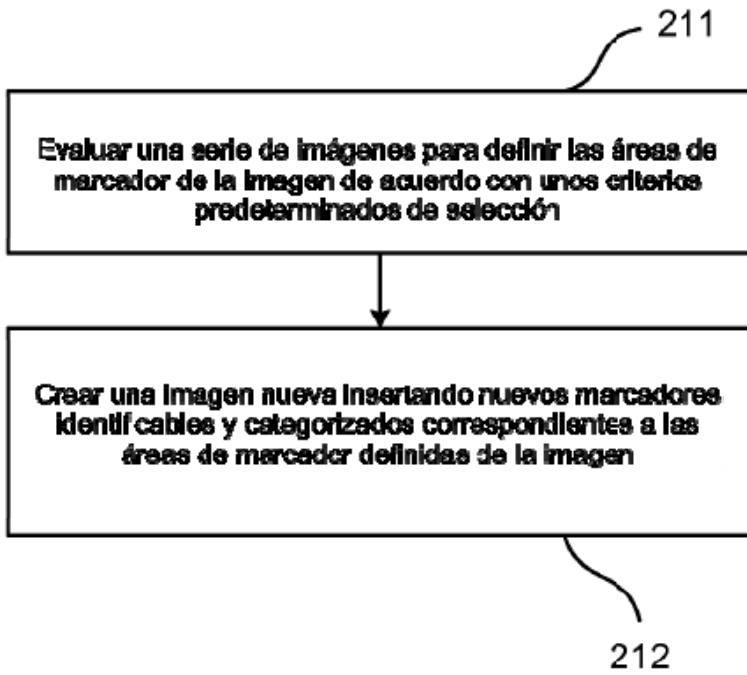


Fig. 2a

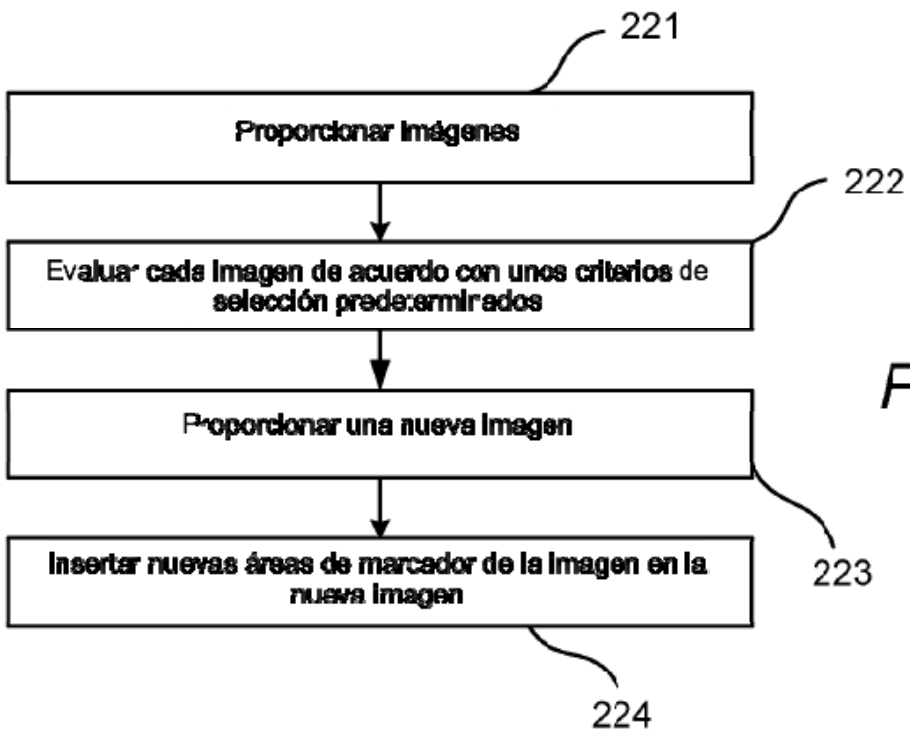


Fig. 2b

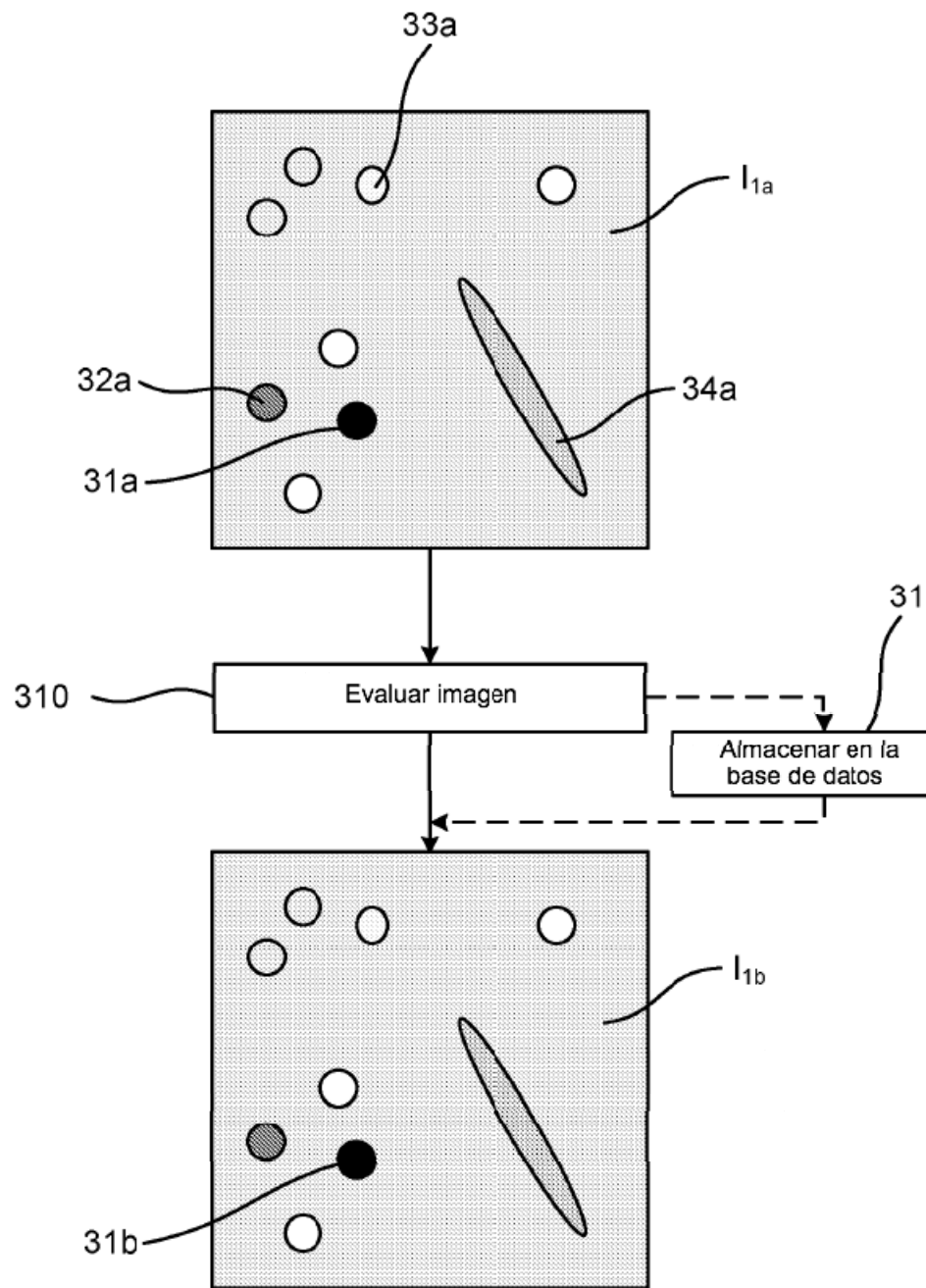
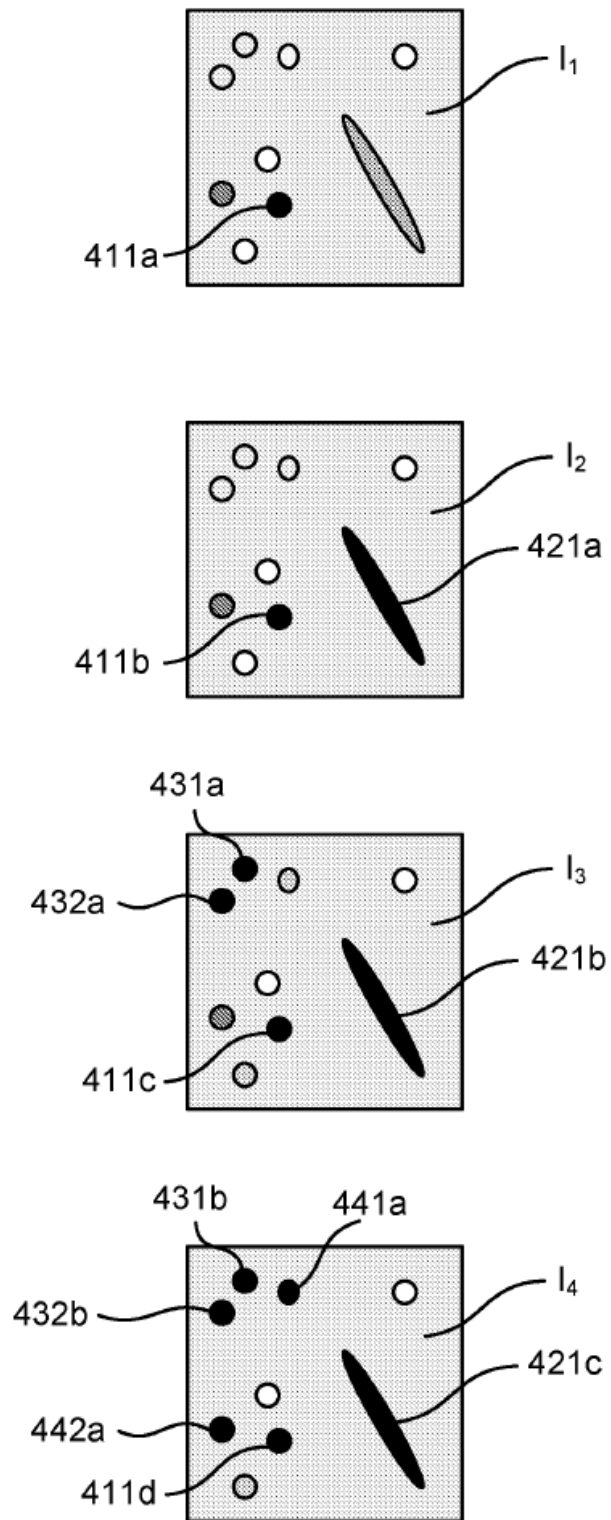
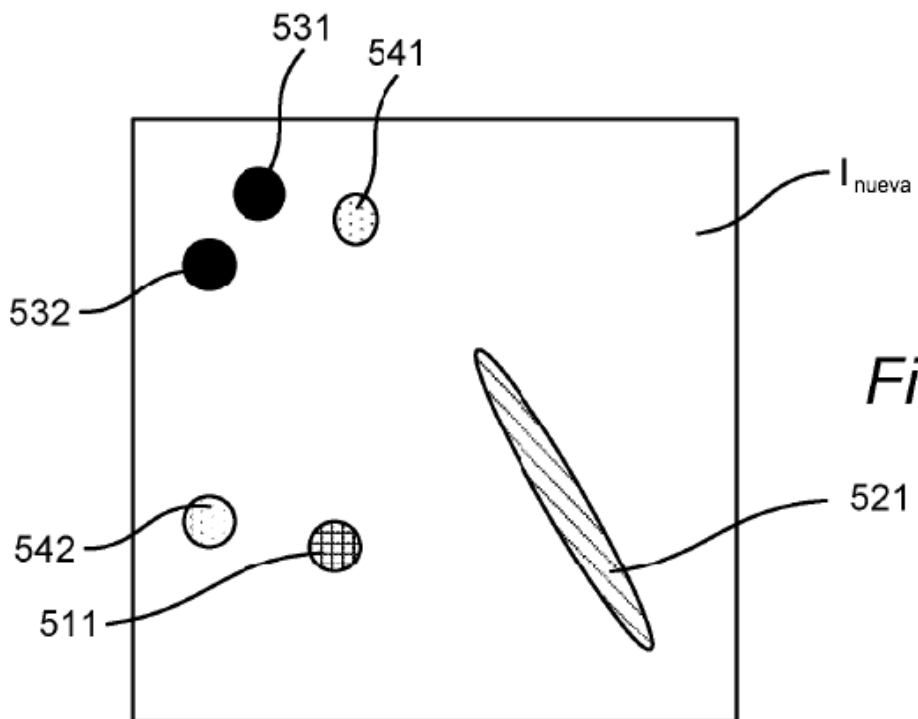
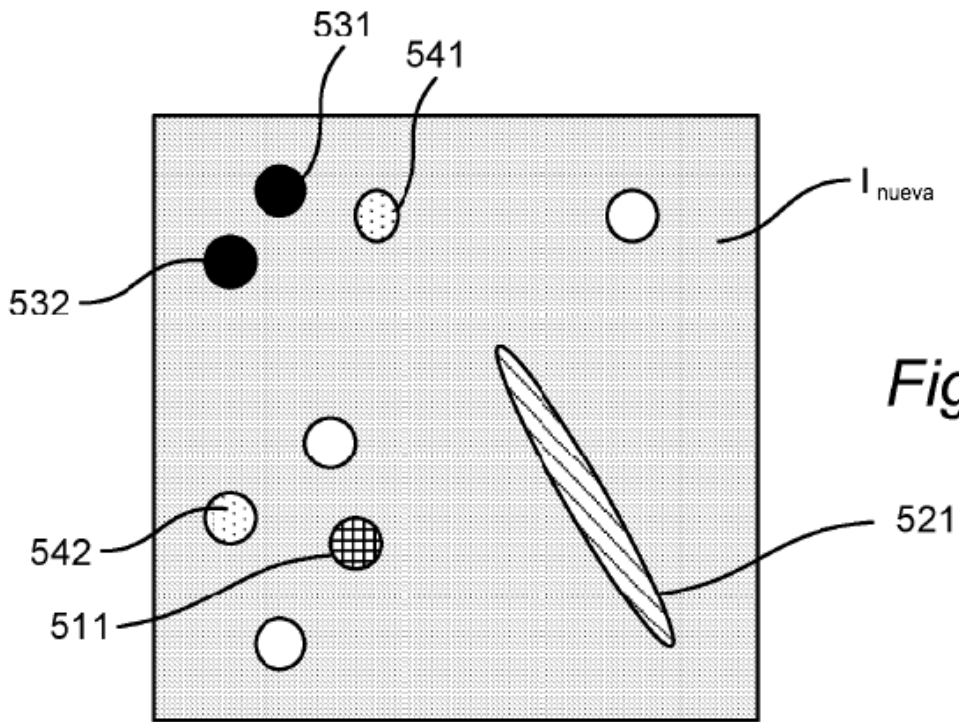
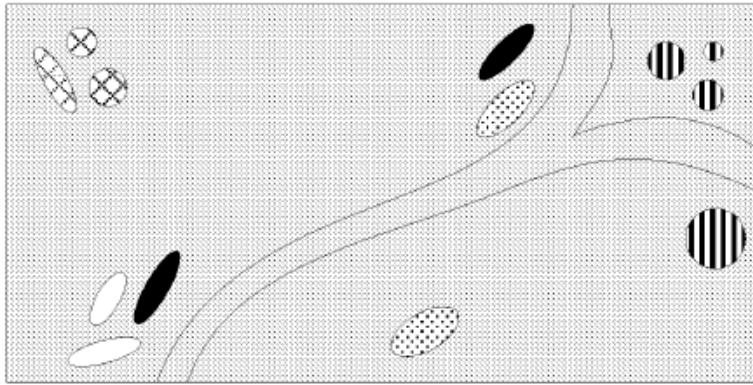


Fig. 3

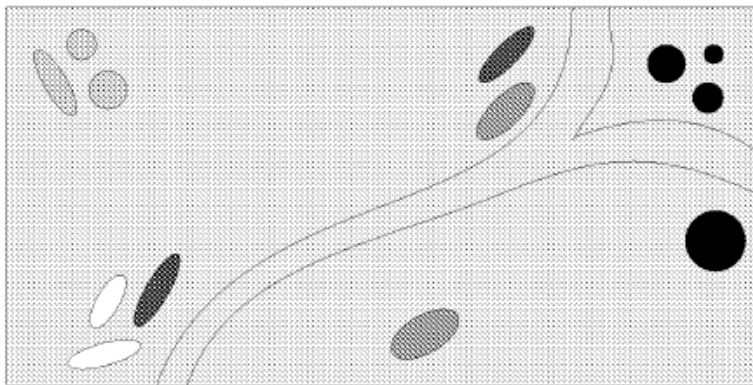


*Fig. 4*

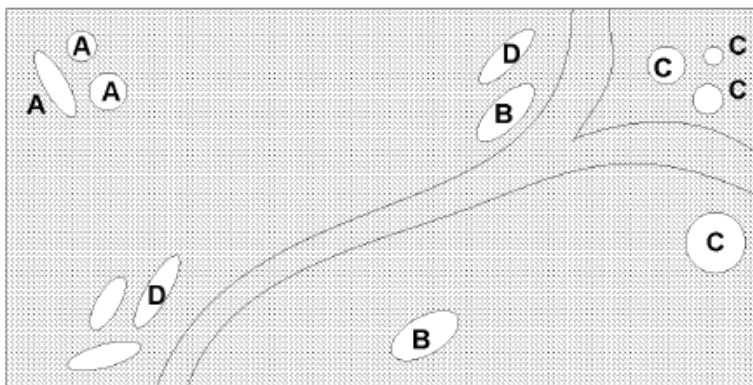




*Fig. 6a*



*Fig. 6b*



*Fig. 6c*

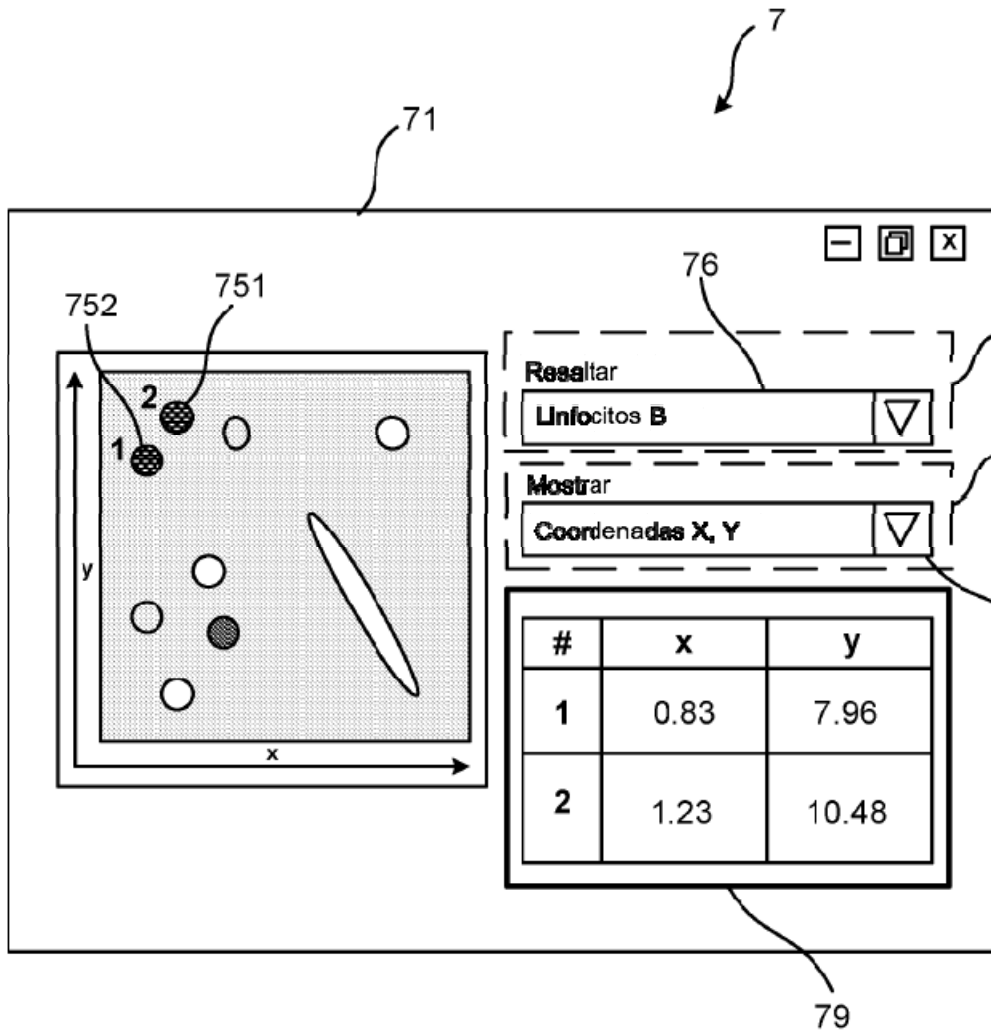
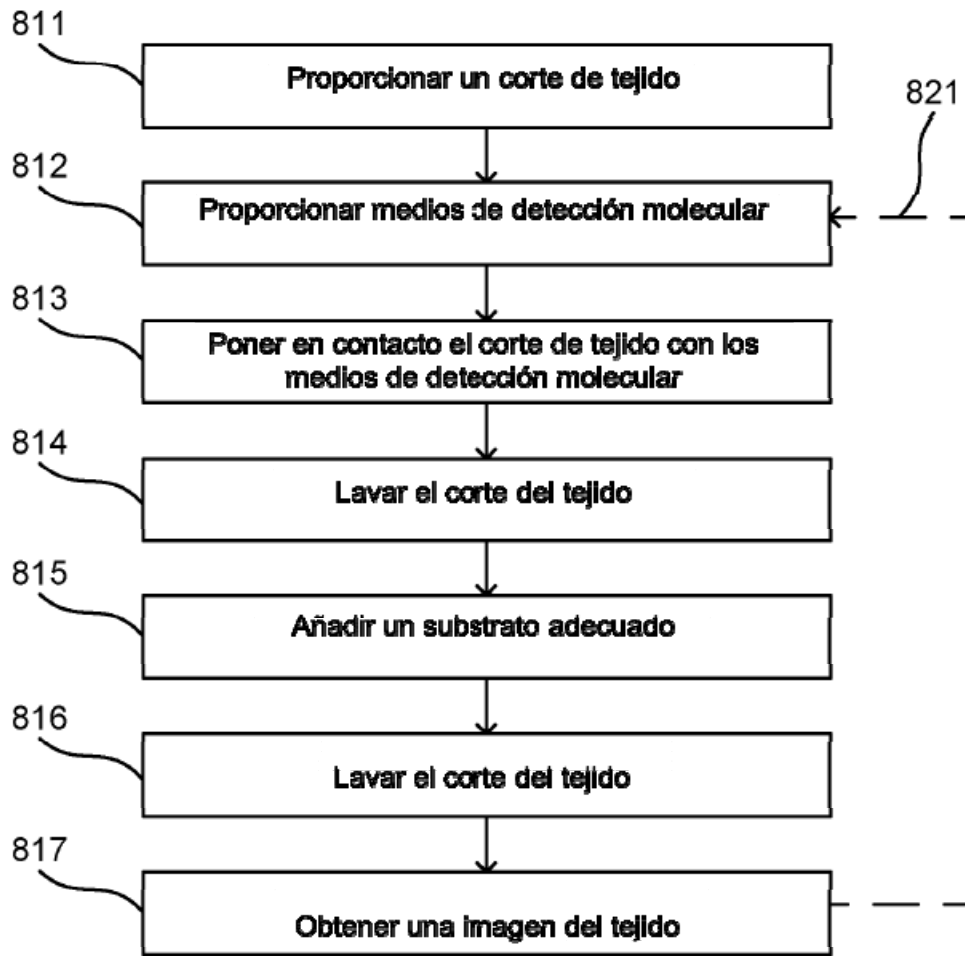


Fig. 7





*Fig. 8*