

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 007**

51 Int. Cl.:

**G01N 29/024** (2006.01)

**G01N 29/44** (2006.01)

**G01N 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2011 PCT/US2011/027284**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO11109769**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2011 E 11709549 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2542883**

54 Título: **Sistema de procesamiento para procesar muestras usando energía acústica**

30 Prioridad:

**04.03.2010 US 310653 P**

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

**07.05.2020**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**OTTER, MICHAEL;  
CHAFIN, DAVID;  
PIERSON, ABBEY y  
TAFT, JEFFERSON, CURTIS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 759 007 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

Sistema de procesamiento para procesar muestras usando energía acústica

- 5 La presente invención se refiere en general a procedimientos y sistemas para analizar muestras usando energía. Más específicamente, la invención está relacionada con procedimientos y sistemas para analizar muestras de tejido usando energía acústica.

**Antecedentes**

- 10 La conservación de tejidos de las intervenciones quirúrgicas es actualmente un tema de gran importancia. Actualmente, no existen procedimientos estándar para fijar tejidos y esta falta de organización da lugar a una variedad de problemas de tinción, tanto con colorantes primarios como avanzados. La primera etapa después de la extracción de una muestra de tejido de un sujeto es colocar la muestra en un líquido que suspenderá las actividades metabólicas de las células. Este procedimiento se conoce comúnmente como "fijación" y se puede conseguir con varios tipos diferentes de líquidos. El fijador más común usado por los laboratorios de anatomía patológica es el formol tamponado neutro (FTN) al 10 %. Este fijador forma una reticulación entre las moléculas de formaldehído y las moléculas celulares que contienen aminos. Además, este tipo de fijador conserva las proteínas para su almacenamiento.

- 20 Otro tipo de fijador común son soluciones a base de etanol o disolventes. Estos fijadores tienden a deshidratar el tejido y se denominan comúnmente "fijadores precipitantes". Como sugiere el término, estas soluciones tienden a desnaturalizar las proteínas e inactivar los constituyentes celulares de una manera diferente al formol.

- 25 Las muestras biológicas que se "fijan" en formol tamponado neutro al 10 % conservan el tejido de la destrucción autocatalítica al reticular gran parte de las proteínas y los ácidos nucleicos por medio de puentes de metileno. La reticulación conserva las características del tejido, tales como la estructura del tejido, la estructura celular y la integridad molecular. Típicamente, la fijación con FTN al 10 % lleva varias horas y se puede considerar como dos etapas separadas. En primer lugar está la etapa de difusión donde un gran volumen de formol en el exterior del tejido se tiene que difundir en el tejido. Este proceso se rige por leyes físicas y depende del grosor del tejido, la concentración de formol y la temperatura (por ejemplo, temperatura del formol, temperatura del tejido, etc.). En la segunda etapa, las moléculas de formol interactúan con las moléculas biológicas del tejido y se incorporan en los reticulados de metileno. Esta estructura reticulada puede mantener intacta la estructura celular durante el procesamiento posterior, tal como la deshidratación del tejido y la inclusión del tejido en parafina.

- 35 Si el tejido se fija en exceso, puede resultar difícil difundir líquidos de procesamiento a través del tejido debido a la extensa red de moléculas reticuladas. Esto puede dar como resultado una penetración inadecuada de los líquidos de procesamiento. Si el líquido de procesamiento es un colorante, las tasas de difusión lentas pueden provocar una tinción desigual e irregular. Este tipo de problemas se pueden incrementar si el colorante tiene moléculas relativamente grandes. Por ejemplo, las biomoléculas conjugadas (moléculas de anticuerpos o sondas de ADN) pueden ser relativamente grandes, teniendo a menudo una masa de varios cientos de kilodaltonios, provocando que se difundan lentamente en el tejido sólido estando los tiempos típicos para una difusión suficiente en un intervalo de varios minutos a unas pocas horas.

- 45 Si el tejido se fija deficientemente, el tejido puede ser susceptible de graves problemas de morfología o destrucción autocatalítica. Los problemas graves de morfología son el resultado de una red incompleta de moléculas reticuladas y la posterior contracción de las células, núcleos y citoplasma durante las etapas de deshidratación. La destrucción autocatalítica puede dar como resultado la pérdida de la estructura del tejido, la estructura celular y la morfología del tejido, especialmente si el tejido no se procesa dentro de un período de tiempo relativamente corto. En consecuencia, el tejido deficientemente fijado puede ser inadecuado para su examen y a menudo se desecha.

- 50 Para preparar muestras biológicas para su examen, los tejidos a menudo se tiñen usando una variedad de tintes, procedimientos de tinción inmunohistoquímica (IHQ) o hibridación *in situ* (HIS). La tasa de tinción inmunohistoquímica y por hibridación *in situ* de tejido fijado (por ejemplo, tejido fijado seccionado incluido en parafina) en un portaobjetos de microscopio está limitada por la velocidad a la que las moléculas (por ejemplo, biomoléculas que se conjugan) se pueden difundir en el tejido fijado e interactuar a nivel molecular desde una solución acuosa puesta en contacto directo con la sección de tejido. En algunos tejidos, tales como el tejido relativamente adiposo (por ejemplo, el tejido mamario), es difícil predecir los tiempos de procesamiento de la fijación debido a estos problemas de inaccesibilidad. En consecuencia, los tejidos se pueden fijar en exceso (por ejemplo, excesivamente reticulados) o fijar deficientemente (por ejemplo, insuficientemente reticulados).

- 60 Se puede usar una amplia variedad de técnicas para analizar muestras biológicas antes o bien después de su exposición a un fijador. Las técnicas de ejemplo incluyen microscopía, análisis de micromatrices (por ejemplo, análisis de micromatrices de proteínas y ácidos nucleicos), procedimientos de espectrometría de masas y una variedad de técnicas de biología molecular. Sin embargo, no existen procedimientos adecuados para determinar el estado de fijación de una muestra.

65

La práctica convencional de la anatomopatología se basa a menudo en configuraciones de fijación predeterminadas basadas en el conocimiento empírico de los tiempos de procesamiento para las dimensiones de la muestra (por ejemplo, grosores) y el tipo de tejido. A menudo es difícil teñir el tejido sin conocer esta información; por tanto, el tejido a menudo se somete a prueba para obtener dicha información. Desafortunadamente, las pruebas pueden llevar mucho tiempo, destruir partes significativas de la muestra y dar lugar a residuos de reactivos. A modo de ejemplo, se pueden realizar numerosas iteraciones con diferentes configuraciones de recuperación de antígenos para los colorantes IHQ/HIS para igualar y/o compensar un estado de fijación desconocido y una composición del tejido desconocida. Las series de tinción repetidas dan como resultado un consumo adicional de material de muestra y largos períodos para el diagnóstico.

La energía acústica se ha usado en una serie de aplicaciones en ciencia y en medicina. Estas incluyen intentos de acelerar las reacciones biológicas que varían desde ensayos que tienen interacciones moleculares hasta la fijación de muestras de tejido. Además, la acústica se ha usado durante mucho tiempo para vigilar la presencia de submarinos y otros buques por la marina estadounidense. La acústica también se ha aplicado en la vigilancia de la temperatura del océano midiendo la velocidad de una señal entre dos puntos. Desafortunadamente, la acústica no se ha usado para determinar las características deseadas de las muestras.

El documento US 2007/0072258 A1 se refiere a procedimientos de fijación y procesamiento de tejido y muestras en una membrana usando radiación ultrasónica como parte del procedimiento. Se usan ultrasonidos con una frecuencia en el intervalo de 0,1-50 MHz y la muestra o tejido recibe 0,1-200 W/cm<sup>2</sup> de intensidad ultrasónica. También se divulgan aparatos que comprenden transductores de uno o de múltiples cabezales para producir la radiación ultrasónica y que comprenden además una unidad central de procesamiento y que opcionalmente comprenden uno o más sensores. Los sensores pueden incluir aquellos para medir y vigilar ultrasonidos y la temperatura. Este sistema de vigilancia permite lograr una fijación y procesamiento de tejidos exactos y óptimos sin fijación excesiva ni daño tisular. El sistema también permite que la realización de reacciones antígeno-anticuerpo o hibridaciones de ácidos nucleicos se completen en muy poco tiempo, sin dejar de ser altamente específicas y con un trasfondo muy bajo o nulo.

El documento WO 2005/054811 A2 se refiere a un sistema ecográfico portátil de campo para medir con exactitud el hematocrito y la concentración de hemoglobina en pequeñas muestras de sangre. La información del tiempo de vuelo de los impulsos ecográficos que se transmiten a través de la muestra de sangre y la información de la temperatura de la muestra de sangre se pueden usar para derivar información sobre el hematocrito y la concentración de hemoglobina.

## BREVE SUMARIO

Un objetivo es proporcionar nuevas tecnologías para mejorar el análisis de una muestra biológica mientras se realiza un procedimiento histológico en la muestra.

El objetivo se resuelve mediante la invención definida en las reivindicaciones independientes 1 y 14.

Al menos algunos modos de realización se refieren a procedimientos y sistemas para analizar una muestra. La muestra se puede analizar basándose en sus propiedades. Estas propiedades incluyen propiedades acústicas, propiedades mecánicas, propiedades ópticas o similares que pueden ser estáticas o dinámicas durante el procesamiento. En algunos modos de realización, las propiedades de la muestra se vigilan continuamente o periódicamente durante el procesamiento para evaluar el estado y las condiciones de la muestra. Basándose en la información obtenida, el procesamiento se puede controlar para potenciar la uniformidad del procesamiento, reducir los tiempos de procesamiento, mejorar la calidad del procesamiento o similares.

La acústica se puede usar para analizar objetos blandos, tales como muestras de tejido. Cuando una señal acústica interactúa con el tejido, la señal transmitida depende de varias propiedades mecánicas de la muestra, tales como la elasticidad y la firmeza. A medida que las muestras de tejido que se han colocado en fijador (por ejemplo, formol) intensifican su reticulación, la velocidad de transmisión cambiará de acuerdo con las propiedades del tejido.

El estado de una muestra biológica se vigila basándose en el tiempo de vuelo de las ondas acústicas. El estado puede ser un estado de densidad, estado de fijación, estado de tinción o similares. La vigilancia puede incluir, sin limitación, medir cambios en la densidad de la muestra, reticulación, descalcificación, color de la tinción o similares. La muestra biológica puede ser un tejido no líquido, tal como hueso u otro tipo de tejido.

En algunos modos de realización, los procedimientos y sistemas se refieren al uso de energía acústica para vigilar una muestra. Basándose en la interacción entre la energía acústica en los modos de reflexión y/o de transmisión, se puede obtener información sobre la muestra. Se pueden realizar mediciones acústicas. Los ejemplos de mediciones incluyen amplitud de la señal acústica, atenuación, dispersión, absorción, tiempo de vuelo (TDV) en la muestra, desplazamientos de fase de las ondas acústicas o combinaciones de los mismos.

- La muestra, en algunos modos de realización, tiene propiedades que cambian durante el procesamiento. En algunos modos de realización, se aplica un fijador a la muestra. A medida que la muestra se fija más, sus propiedades mecánicas (por ejemplo, elasticidad, rigidez, etc.) cambian debido a la reticulación molecular. Estos cambios se pueden vigilar usando mediciones de la velocidad del sonido por medio del TDV. Basándose en las mediciones, se puede determinar un estado de fijación u otro estado histológico de la muestra. Para evitar una fijación deficiente o una fijación excesiva, se pueden vigilar las características estáticas del tejido, las características dinámicas del tejido o ambas. Las características del tejido incluyen características de transmisión, características de reflectancia, características de absorción, características de atenuación o similares.
- En algunos modos de realización, un procedimiento para procesar una muestra de tejido incluye realizar un procedimiento (por ejemplo, un procedimiento de fijación u otro procedimiento histológico, tal como incluir, deshidratar, infiltrar, incluir, seccionar y/o teñir) en una muestra de tejido que se ha extraído de un sujeto para fijar al menos parcialmente o alterar de otro modo la muestra de tejido. En determinados modos de realización, se transmiten ondas acústicas a través de la muestra de tejido mientras se realiza el procedimiento de fijación. Después de realizar al menos una parte del procedimiento se evalúa un cambio de la velocidad de al menos algunas de las ondas acústicas transmitidas que se propagan a través de la muestra de tejido. En determinados modos de realización se evalúa la mayoría de las ondas acústicas transmitidas a través de la muestra.
- Para evaluar el cambio de velocidad de las ondas acústicas se comparan las ondas acústicas antes de penetrar en la muestra de tejido con las ondas acústicas que han salido de la muestra de tejido. En algunos modos de realización se determina un TDV basándose en la comparación. En algunos modos de realización se puede medir el TDV del medio de fijación en el que está sumergida la muestra y usarlo para determinar el TDV en la muestra. En determinados modos de realización, el TDV se mide y registra antes de la inserción de la muestra, para evaluar los efectos de la temperatura del medio. Los datos de dichas mediciones se pueden almacenar para su posterior consulta. Las velocidades del sonido en la muestra se evalúan basándose en uno o más de un TDV del medio, un TDV de un canal de medición u otras mediciones del TDV que se pueden usar para determinar efectos secundarios, tales como los efectos de la temperatura.
- En algunos modos de realización se genera un protocolo de procesamiento de tejidos basándose en una evaluación del cambio de velocidad de la señal acústica aplicada a la muestra de tejido. El protocolo de procesamiento de tejidos se puede usar para procesar la muestra, manualmente o bien en un sistema automatizado, y puede incluir un protocolo de fijación, un protocolo de preparación de tejidos, un protocolo de inclusión y/o un protocolo de tinción. En determinados modos de realización, el protocolo de fijación puede incluir la duración del tiempo de fijación, la temperatura del fijador o la temperatura de la muestra. El protocolo de preparación de tejidos puede incluir instrucciones para el número y los tipos de líquidos que se van a aplicar a la muestra para preparar la muestra para su inclusión. Los líquidos pueden incluir agentes de limpieza, agentes de infiltración, agentes de deshidratación o similares. En determinados modos de realización, el protocolo de inclusión incluye el tipo y la composición del material en el que se va a incluir la muestra. El protocolo de tinción puede incluir una serie y tipos de reactivos, composiciones de reactivo, volúmenes de reactivo, tiempos de procesamiento, instrucciones para una unidad de tinción automatizada o similares. También se pueden generar otros tipos de protocolos. En un sistema automatizado, un controlador puede usar el protocolo para procesar las muestras.
- La muestra se puede procesar basándose en la evaluación del cambio de la velocidad de las ondas acústicas. En determinados modos de realización, el procedimiento de fijación se detiene basándose en la evaluación. En determinados modos de realización, el procedimiento de tinción se controla basándose en la evaluación. Aún en otros modos de realización, se realiza un procedimiento de inclusión basándose en la evaluación.
- En algunos modos de realización, un procedimiento para fijar una muestra de tejido incluye realizar un procedimiento de fijación en una muestra de tejido que se ha extraído de un sujeto para fijar la muestra de tejido al menos parcialmente. Se transmiten ondas acústicas a través de al menos una parte de la muestra de tejido mientras se realiza el procedimiento de fijación. Se evalúa un cambio de velocidad de al menos algunas de las ondas acústicas que se propagan a través de la parte de la muestra de tejido. En determinados modos de realización, el nivel de fijación se vigila después de realizar al menos una parte del procedimiento de fijación.
- En otros modos de realización, un procedimiento comprende realizar un procedimiento de fijación en una pluralidad de muestras de tejido. Se obtiene al menos una característica de velocidad del sonido para cada una de las muestras de tejido. Las características de velocidad del sonido se correlacionan con las muestras de tejido respectivas. Las características de velocidad del sonido correlacionadas se almacenan en un dispositivo informático. En algunos modos de realización, las características de velocidad del sonido correlacionadas se almacenan en la memoria o en una base de datos. Una muestra de tejido se puede procesar basándose en al menos una de las características de velocidad del sonido almacenadas. El procesamiento puede incluir al menos uno de un procedimiento de fijación, un procedimiento de preparación de tejidos, un procedimiento de inclusión y un procedimiento de tinción.
- En determinados modos de realización, un procedimiento para evaluar una muestra de tejido incluye analizar la velocidad de las ondas acústicas antes, durante y/o después del procesamiento de la muestra. Esto se consigue

estableciendo en primer lugar una medición de referencia para una muestra de tejido fresca y sin fijar mediante el envío de una onda acústica desde un transmisor hasta la muestra de tejido extraída de un sujeto. El TDV de referencia de la onda acústica se detecta usando un receptor. Después o durante el procesamiento de la muestra de tejido, se envía una segunda onda acústica desde el transmisor hasta la muestra de tejido. El TDV de la segunda onda acústica se detecta usando el receptor después de que la segunda onda acústica se haya propagado a través de la muestra de tejido. Se comparan las velocidades del sonido en la muestra de tejido basándose en el primer TDV y el segundo TDV para determinar un cambio de velocidad. Estas mediciones pueden ser singulares para cada muestra de tejido analizada y, por lo tanto, se pueden usar para establecer un valor de referencia para cada muestra de tejido. Se pueden usar mediciones adicionales del TDV para determinar las contribuciones del TDV atribuibles al medio, el canal de medición o similares. En algunos modos de realización, el TDV del medio se mide cuando no hay muestra presente para determinar un TDV de referencia del medio.

En determinados modos de realización se realiza un procedimiento de fijación en una muestra de tejido para fijar al menos una parte de la muestra de tejido. Se evalúa un cambio de velocidad del sonido que se propaga a través de la muestra de tejido usando ondas acústicas que se han propagado a través de al menos una parte de la muestra de tejido. El procedimiento de fijación se ajusta basándose en la evaluación del cambio de la velocidad del sonido. En determinados modos de realización, el ajuste del procedimiento de fijación incluye reducir el tiempo de fijación, ajustar la composición del fijador, cambiar la temperatura del fijador o combinaciones de los mismos.

Un sistema para evaluar una muestra de tejido incluye un transmisor, un receptor y un dispositivo informático. El transmisor se configura para emitir energía acústica a través de una muestra de tejido que se ha extraído de un sujeto. El receptor se configura para detectar la energía acústica que se ha propagado a través de la muestra de tejido antes, durante o después de que se haya administrado un protocolo de fijación. El dispositivo informático puede recibir datos del transmisor y del receptor. El dispositivo informático se configura para evaluar los datos de la velocidad del sonido y convertir los datos recibidos en un valor de TDV.

En algunos modos de realización, un sistema para vigilar una muestra de tejido incluye un recipiente, un transmisor, un receptor y un dispositivo informático. El transmisor se configura para emitir ondas acústicas a través de una muestra de tejido localizada en una cámara del recipiente en respuesta a una señal de accionamiento. El receptor se sitúa para detectar ondas acústicas transmitidas a través de la muestra de tejido. El receptor también se configura para emitir una señal. En determinados modos de realización, el receptor se sitúa para detectar ondas acústicas que se han propagado a través del grosor de la muestra de tejido. En otros modos de realización, el receptor se sitúa para detectar ondas acústicas que se reflejan de la muestra de tejido. El sistema puede incluir un transductor que incluye tanto el transmisor como el receptor (combinación de generador de impulsos/receptor) y alterna electrónicamente entre los modos de transmisión y recepción.

El dispositivo informático se acopla al transmisor y se configura para evaluar las velocidades del sonido en la muestra de tejido comparando los cambios del TDV. En algunos modos de realización, el dispositivo informático incluye una memoria que almacena información sobre la muestra de tejido. El dispositivo informático puede usar la evaluación de las velocidades del sonido en la muestra de tejido y la información almacenada para determinar información sobre la muestra de tejido.

En otras alternativas ejemplares, un procedimiento de análisis de una muestra de tejido incluye transmitir energía acústica a través de al menos una parte de la muestra de tejido. Se determina un TDV comparativo de la energía acústica en la muestra de tejido. Se determina un grado de fijación de la muestra de tejido, si lo hay, basándose en el TDV comparativo de la energía acústica. La muestra se puede analizar durante un protocolo de fijación, que se continúa o bien la muestra de tejido se traslada a un procedimiento diferente dependiendo del estado relativo de fijación (por ejemplo, si se alcanza un grado de fijación deseado o diana). En determinados modos de realización, un grado de fijación deseado puede estar en un intervalo de grados de fijación. En otros modos de realización, el grado de fijación deseado es una cantidad de fijación umbral que se puede especificar, por ejemplo, por un usuario.

La muestra de tejido se traslada al siguiente procedimiento (por ejemplo, de una fijación a otro procedimiento) cuando el grado de cambio de la señal de TDV indica que se han producido cambios mínimos en la fijación, por ejemplo, en un determinado período de tiempo. En determinados modos de realización, evaluar el grado de fijación incluye comparar el TDV con un TDV de referencia. El TDV de referencia se puede almacenar en un dispositivo informático, determinar usando mediciones del TDV de la muestra de tejido, o combinaciones de los mismos. En otros modos de realización, evaluar el grado de fijación incluye evaluar un cambio de la velocidad del sonido en la muestra de tejido respecto a un cambio de referencia de la velocidad del sonido. El grado de fijación es igual o superior al grado de fijación deseado cuando el cambio de la velocidad del sonido es menor que el cambio de referencia de la velocidad del sonido. El cambio de referencia de la velocidad del sonido puede ser un cambio de referencia calculado de la velocidad del sonido, un cambio medido de la velocidad del sonido de un tipo de tejido similar, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el cambio calculado y el medido de la velocidad del sonido se puede usar para determinar el cambio de referencia.

Aún en otras alternativas ejemplares, un procedimiento para fijar una muestra de tejido que se ha extraído de un sujeto incluye poner en contacto la muestra de tejido con un fijador líquido para fijar la muestra de tejido, al menos

parcialmente. Se transmiten ondas acústicas a través de al menos una parte de la muestra de tejido mientras el fijador líquido fija la muestra de tejido, al menos parcialmente. Se evalúan los cambios de velocidad de al menos algunas de las ondas acústicas que se propagan a través de la parte de la muestra de tejido. En determinados modos de realización, los cambios de velocidad se deben al fijador líquido que fija la muestra de tejido.

5

La muestra de tejido puede ser una muestra de tejido sin fijar (por ejemplo, una muestra de tejido recién cortada) que se pone en contacto con el fijador líquido. Los cambios de la velocidad del sonido se pueden evaluar de forma continua o intermitente durante todo el procedimiento de fijación o una parte del procedimiento de fijación. Una vez que la muestra de tejido esté apropiadamente fijada, la muestra de tejido se retira del fijador líquido. En determinados modos de realización, la muestra de tejido se sumerge en un baño del fijador líquido. El procedimiento de fijación se puede detener retirando la muestra de tejido del baño.

10

Las ondas acústicas se pueden transmitir a través de la muestra de tejido a medida que el fijador líquido cambia el grado de fijación de la muestra de tejido. La evaluación del cambio de velocidad se puede usar para vigilar el grado de fijación de la muestra de tejido. Después de fijar la muestra de tejido se pueden evaluar características de la muestra de tejido para vigilar el estado de la muestra de tejido, incluso después de un almacenamiento a largo plazo.

15

En determinados modos de realización, una muestra de tejido se evalúa usando ondas sonoras mientras la muestra de tejido está sumergida en un fijador líquido. La muestra de tejido se extrae de un baño de fijador líquido basándose en el grado de fijación de la muestra de tejido. El grado de fijación se puede establecer por un usuario o se puede determinar automáticamente por un controlador. La muestra de tejido se puede enjuagar a continuación y procesar adicionalmente.

20

Las muestras se pueden vigilar basándose en el TDV. Se puede usar un cambio de la velocidad de las ondas acústicas que se propagan a través de la muestra para obtener información sobre la muestra. Se pueden usar uno o más algoritmos de compensación, algoritmos suavizadores, protocolos de comparación (por ejemplo, rutinas de diferencia de ángulo de fase), algoritmos interactivos, modelos o algoritmos predictivos, algoritmos de procesamiento de señales, combinaciones de los mismos u otros algoritmos o protocolos para vigilar la muestra. En determinados modos de realización, se pueden usar señales con diferentes características (por ejemplo, formas de onda, frecuencias, número de ráfagas o similares) para vigilar la muestra. Se pueden usar señales y los datos medidos correspondientes para determinar retrasos temporales, cambios de tiempo u otros cambios usando las señales. Se pueden usar diferentes señales para obtener diferentes datos o mediciones, tales como el cambio de las fases.

25

30

35

En algunos modos de realización, un procedimiento comprende realizar un procedimiento en una muestra de tejido que se ha extraído de un sujeto para alterar la muestra de tejido. Se transmiten ondas acústicas a través de al menos una parte de la muestra de tejido. Midiendo o vigilando el cambio de velocidad de al menos algunas de las ondas acústicas que se propagan a través de la parte de la muestra de tejido después de realizar al menos una parte del procedimiento. En diversos modos de realización, el procedimiento incluye fijación, reticulación, perfusión de líquidos con diferentes características (por ejemplo, densidades), cambios térmicos, descalcificación y/o deshidratación. En determinados modos de realización, las propiedades de densidad del tejido se vigilan durante una reacción que altera la densidad de la muestra. Se puede vigilar o analizar una amplia gama de procedimientos histológicos, que incluyen, sin limitación, un procedimiento de fijación, un procedimiento de deshidratación, una inclusión, un procedimiento de tinción, etc.

40

45

Si bien la invención se define en las reivindicaciones adjuntas, a continuación se divulgan modos de realización o alternativas preferentes. De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento que comprende vigilar un estado de una muestra biológica basándose en el tiempo de vuelo de las ondas acústicas.

50

El procedimiento comprende etapas de realizar un procedimiento histológico en la muestra biológica, en el que la muestra biológica se ha extraído de un sujeto para alterar la muestra biológica; y transmitir las ondas acústicas a través de al menos una parte de la muestra biológica mientras se realiza el procedimiento histológico en la muestra biológica. El procedimiento puede comprender además una etapa de evaluar un cambio de velocidad de al menos algunas de las ondas acústicas que se propagan a través de la parte de la muestra biológica después de realizar al menos una parte del procedimiento.

55

El procedimiento puede comprender además una etapa de generar un protocolo de tinción basado en el estado de la muestra biológica.

60

El procedimiento puede comprender además una etapa de realizar un procedimiento histológico en la muestra biológica basándose en el estado de la muestra biológica, en el que el estado es al menos uno de un estado de densidad y un estado de fijación.

65

El procedimiento puede comprender además una etapa de transmitir las ondas acústicas a través de un grosor de la muestra biológica.

- 5 El procedimiento puede comprender además etapas de reflejar al menos algunas de las ondas acústicas desde la muestra biológica, recibir las ondas acústicas reflejadas y evaluar las ondas acústicas que penetran en la muestra biológica y las ondas acústicas reflejadas para evaluar el cambio de velocidad.
- 10 La etapa de vigilar el estado puede comprender etapas de determinar un primer tiempo de vuelo de las ondas acústicas que se propagan a través de una parte de la muestra biológica; determinar al menos un segundo tiempo de vuelo de las ondas acústicas que se propagan a través de la parte de la muestra biológica; y comparar el primer tiempo de vuelo con el segundo tiempo de vuelo.
- 15 La etapa de vigilar el estado puede comprender además una etapa de determinar un desplazamiento de fase entre una señal emitida para generar las ondas acústicas transmitidas y una señal recibida de las ondas acústicas que se han propagado a través de la muestra biológica. El procedimiento puede comprender además una etapa de comparar una pluralidad de desplazamientos de fase correspondientes de las ondas.
- 20 El procedimiento puede comprender además una etapa de determinar un cambio en un tiempo de vuelo de las ondas acústicas provocado por el procedimiento, en el que el procedimiento es un procedimiento de fijación.
- 25 El procedimiento puede comprender además una etapa de detener el procedimiento basándose en el cambio del tiempo de vuelo.
- 30 El procedimiento puede comprender además etapas de almacenar información sobre un cambio de velocidad de las ondas acústicas; y realizar un procedimiento en otra muestra biológica basándose en la información almacenada.
- 35 La información puede incluir una velocidad del sonido característica para la muestra biológica.
- 40 La información puede ser representativa de las características de velocidad del sonido de una pluralidad de muestras biológicas diferentes.
- 45 El procedimiento puede comprender además etapas de almacenar información de fijación para diferentes tipos de muestras biológicas, incluyendo la información de fijación al menos una característica de velocidad del sonido relacionada con uno de los tipos respectivos de muestras biológicas; seleccionar una característica de velocidad del sonido almacenada basándose en una composición de la muestra biológica; y controlar un procedimiento de fijación para fijar la muestra biológica basándose en la característica de velocidad del sonido seleccionada.
- 50 El procedimiento puede comprender una etapa de análisis de datos usando al menos uno de un algoritmo de compensación y un algoritmo suavizador.
- 55 En otro modo de realización, se proporciona un procedimiento que comprende etapas de realizar un procedimiento en una pluralidad de muestras biológicas; obtener al menos una característica de velocidad del sonido para cada una de las muestras biológicas; correlacionar las características de velocidad del sonido con las muestras biológicas respectivas; almacenar las características de velocidad del sonido correlacionadas; y realizar un procedimiento histológico en una muestra biológica basándose en al menos una de las características de velocidad del sonido almacenadas.
- 60 La etapa de procesar la muestra biológica puede incluir poner en contacto la muestra biológica con un fijador; y desactivar el fijador.
- 65 La etapa de procesar la muestra biológica puede incluir colocar la muestra biológica en un baño fijador; y retirar la muestra biológica del baño fijador.
- El procedimiento puede comprender además etapas de seleccionar al menos una de las ondas con diferentes longitudes de onda transmitidas a través de la muestra biológica y las características de velocidad del sonido almacenadas de una de las muestras biológicas con una composición que corresponde a una composición de la muestra biológica.

- 5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65
- Todavía en otro modo de realización, se proporciona un procedimiento para evaluar una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento etapas de enviar una primera onda acústica desde un transmisor a la muestra biológica extraída de un sujeto; detectar la primera onda acústica con un receptor después de que la primera onda acústica se haya propagado a través de la muestra biológica para determinar un primer tiempo de vuelo; después de procesar la muestra biológica, enviar una segunda onda acústica desde el transmisor a la muestra biológica; detectar la segunda onda acústica con el receptor después de que la segunda onda acústica se haya propagado a través de la muestra biológica para determinar un segundo tiempo de vuelo; y evaluar las velocidades del sonido en la muestra biológica basándose en el primer tiempo de vuelo y en el segundo tiempo de vuelo en comparación con el tiempo de vuelo directo de un medio de procesamiento en un canal de medición.
- La etapa de evaluar las velocidades del sonido en la muestra biológica puede comprender al menos uno de comparar el primer tiempo de vuelo de la primera onda acústica con el segundo tiempo de vuelo de la segunda onda acústica, evaluar una tasa de cambio del primer tiempo de vuelo de la primera onda acústica y evaluar una tasa de cambio del segundo tiempo de vuelo de la segunda onda acústica.
- El procedimiento puede comprender además una etapa de contener la muestra biológica en un soporte portátil sumergido en el medio que comprende un fijador mientras se envía al menos una de la primera onda acústica y la segunda onda acústica.
- El procedimiento puede comprender una etapa de procesamiento de la muestra biológica basada en la evaluación de las velocidades del sonido en la muestra biológica y la atenuación de al menos una de la primera onda acústica y la segunda onda acústica.
- En un ejemplo, se proporciona un procedimiento para procesar una muestra biológica extraída de un sujeto, comprendiendo el procedimiento etapas de realizar un procedimiento de fijación en la muestra biológica para fijar al menos una parte de muestra biológica; evaluar un cambio de velocidad del sonido que se propaga a través de la muestra biológica usando ondas acústicas que se propagan a través de la muestra biológica después de realizar al menos una parte del procedimiento de fijación; y ajustar el procedimiento de fijación basándose en la evaluación del cambio de la velocidad del sonido.
- La etapa de evaluar el cambio de la velocidad del sonido puede incluir evaluar un desplazamiento de fase entre las ondas acústicas antes de que las ondas acústicas penetren en la muestra biológica y las ondas acústicas que han salido de la muestra biológica.
- La etapa de ajustar el procedimiento de fijación puede incluir detener el procedimiento de fijación mediante al menos uno de retirar la muestra biológica de un baño de fijador y desactivar el fijador.
- La etapa de la evaluación del cambio de la velocidad del sonido puede incluir comparar un cambio del tiempo de vuelo en la muestra biológica con un cambio del tiempo de vuelo de referencia.
- El procedimiento puede comprender además una etapa de transmitir energía ultrasónica a través de la muestra biológica usando un transmisor ultrasónico y un receptor ultrasónico, en la que la evaluación del cambio de la velocidad del sonido en la muestra biológica se basa en la energía ultrasónica transmitida.
- El procedimiento puede comprender una etapa de enviar señales desde el receptor ultrasónico a un dispositivo informático que evalúa el cambio de la velocidad del sonido basándose en las señales.
- En algún otro modo de realización, se proporciona un sistema para evaluar una muestra biológica, comprendiendo el sistema: un transmisor configurado para emitir energía acústica a través de una muestra biológica que se ha extraído de un sujeto; un receptor configurado para detectar la energía acústica que se ha propagado a través de la muestra biológica después de que se haya alterado al menos una característica acústica de la muestra biológica; y un dispositivo informático acoplado de forma comunicativa al transmisor y al receptor, el dispositivo informático configurado para evaluar una velocidad de la energía acústica que se propaga a través de la muestra biológica basándose en el tiempo de vuelo de la energía acústica.
- El dispositivo informático se puede configurar para evaluar cambios de velocidad de la energía acústica para determinar un estado de fijación de la muestra biológica.
- El dispositivo informático se puede configurar para comparar la energía acústica emitida por el transmisor con la energía acústica correspondiente que se detecta por el receptor.
- El dispositivo informático se puede configurar para determinar un primer tiempo de vuelo de la energía acústica que se propaga a través de la muestra biológica, para determinar un segundo tiempo de vuelo de la energía acústica que se propaga a través de la muestra biológica y para comparar el primer tiempo de vuelo con el segundo tiempo de vuelo para determinar un cambio de velocidad de las ondas acústicas que se propagan a través de la muestra biológica.

5 El dispositivo informático se puede configurar para recuperar datos de fijación almacenados, para comparar un cambio de velocidad de la energía acústica que se propaga a través de la muestra biológica con los datos de fijación almacenados y para controlar un procedimiento de fijación que se realiza en la muestra biológica basándose en la comparación.

10 El dispositivo informático se puede configurar para evaluar al menos una de una amplitud de las ondas sonoras de la energía acústica, el eco provocado por las ondas sonoras, la intensidad de la energía acústica que se propaga a través de la muestra biológica, una temperatura de la muestra biológica, la densidad de la muestra biológica y una temperatura de un líquido de procesamiento para fijar la muestra biológica.

15 En otro ejemplo se proporciona un sistema para vigilar una muestra biológica, comprendiendo el sistema un recipiente con una cámara; un transmisor configurado para emitir ondas acústicas a través de una muestra biológica localizada en la cámara en respuesta a una señal de accionamiento; un receptor situado para detectar las ondas acústicas transmitidas a través de la muestra biológica localizada en la cámara, el receptor configurado para emitir una señal; y un dispositivo informático acoplado de forma comunicativa al transmisor, el dispositivo informático se configura para evaluar velocidades del sonido en la muestra biológica evaluando los cambios del tiempo de vuelo de las ondas acústicas.

20 El transmisor puede ser un emisor ultrasónico y el receptor puede ser un receptor ultrasónico.

25 El dispositivo informático puede incluir memoria que almacena datos, el dispositivo informático se configura para usar la evaluación de las velocidades del sonido en la muestra biológica y los datos almacenados por la memoria para determinar un estado de fijación de la muestra biológica.

30 El sistema puede comprender además un portamuestras que incluye un cuerpo principal y un espacio de recepción definido por el cuerpo principal, incluyendo el cuerpo principal una abertura, situándose la cámara adyacente a la abertura de modo que la energía acústica se propaga a través de la abertura y de la muestra biológica en el espacio de recepción cuando el transmisor se activa.

El sistema puede comprender una base de acoplamiento que sostiene el portamuestras en la cámara de modo que la muestra biológica esté sumergida al menos parcialmente en un fijador cuando el recipiente contiene el fijador.

35 En algún otro ejemplo, se proporciona un procedimiento de análisis de una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento etapas de transmitir energía acústica a través de al menos una parte de una muestra biológica; determinar un tiempo de vuelo de la energía acústica en la muestra biológica; evaluar un grado de fijación de la muestra biológica, si lo hay, basándose en el tiempo de vuelo de la energía acústica; realizar un procedimiento de fijación en la muestra biológica cuando el grado de fijación es menor que un grado de fijación diana; e incluir la muestra biológica en un material sin realizar un procedimiento de fijación en la muestra biológica cuando el grado de fijación es igual o superior al grado de fijación diana.

40 La etapa de evaluar el grado de fijación de la muestra biológica puede incluir comparar el tiempo de vuelo con un tiempo de vuelo de referencia.

45 La etapa de evaluar el grado de fijación de la muestra biológica puede incluir evaluar un cambio de una velocidad del sonido en la muestra biológica en comparación con un cambio de referencia de la velocidad del sonido, en el que el grado de fijación es igual o superior al grado de fijación deseado cuando el cambio de la velocidad del sonido es menor que el cambio de referencia de velocidad del sonido.

50 En otro ejemplo se proporciona un procedimiento para fijar una muestra biológica que se ha extraído de un sujeto, comprendiendo el procedimiento etapas de poner en contacto una muestra biológica con un fijador líquido para fijar al menos parcialmente la muestra biológica; transmitir ondas acústicas a través de al menos una parte de la muestra biológica mientras el fijador líquido fija la muestra biológica; y evaluar un cambio de velocidad de al menos algunas de las ondas acústicas que se propagan a través de la parte de la muestra biológica a medida que el fijador líquido fija la muestra biológica.

55 El procedimiento puede comprender además una etapa de sumergir la muestra biológica en el fijador líquido para poner en contacto la muestra biológica con el fijador líquido.

60 El procedimiento puede comprender además una etapa de detener la fijación de la muestra biológica basándose en la evaluación del cambio de velocidad.

La etapa de transmitir ondas acústicas a través de al menos la parte de la muestra biológica puede comprender transmitir las ondas a medida que el fijador líquido cambia un grado de fijación de la muestra biológica.

65

El procedimiento puede comprender además una etapa de retirar la muestra biológica del fijador líquido basándose en el grado de fijación de la muestra biológica.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS**

- 5 Se describen modos de realización y ejemplos no limitantes y no exhaustivos de alternativas con referencia a los siguientes dibujos. Los mismos números de referencia se refieren a partes o acciones similares en las diversas vistas, a menos que se especifique de otro modo.
- 10 La figura 1 es una vista isométrica en sección de un sistema de procesamiento que contiene un portamuestras con una muestra.
- La figura 2 es una vista lateral en sección transversal de los componentes del sistema de procesamiento de la figura 1.
- 15 La figura 3 es un diagrama de bloques de componentes de un analizador y un dispositivo informático.
- La figura 4 es un diagrama de flujo de un procedimiento ejemplar de procesamiento de una muestra.
- 20 La figura 5 es un gráfico de la fase de fijación frente al cambio del tiempo de vuelo.
- La figura 6 es una gráfica que muestra una relación de temporización entre una señal emitida y una señal recibida.
- La figura 7 es una vista ampliada de una parte de la señal emitida y una parte de la señal recibida.
- 25 La figura 8 es una vista detallada de una parte de la señal emitida y una parte correspondiente de la señal recibida.
- La figura 9 es una gráfica que muestra una relación de temporización entre una señal emitida, una señal recibida y una curva de comparación.
- 30 La figura 10A es una gráfica que muestra una relación de temporización entre una señal emitida y una señal recibida.
- La figura 10B es una gráfica que muestra una relación de temporización entre una señal emitida y una señal recibida.
- 35 La figura 11 es un gráfico de la diferencia de fase frente a la tensión del ángulo de fase y una gráfica que muestra el tiempo frente a la tensión del ángulo de fase con una progresión de fase esperada igual debido a la fijación.
- 40 La figura 12 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la tensión del ángulo de fase.
- La figura 13 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la tensión del ángulo de fase.
- La figura 14 es una gráfica que muestra la irregularidad de los datos de la figura 13.
- 45 La figura 15 es una gráfica de irregularidad generada usando un algoritmo suavizador y los datos de la figura 13.
- La figura 16 es una gráfica de curvas generada usando diferentes algoritmos para analizar datos ruidosos.
- 50 La figura 17 es un diagrama de bloques de un sistema de procesamiento.
- La figura 18 es una vista isométrica de un sistema de procesamiento que puede analizar muestras secuencialmente.
- La figura 19 es una vista parcial en alzado en sección transversal de un sistema de procesamiento que puede realizar múltiples tratamientos en muestras.
- 55 La figura 20 es una vista en alzado lateral de un sistema de procesamiento que puede realizar múltiples tratamientos en muestras.
- La figura 21 es una vista en alzado lateral de un sistema de procesamiento que puede procesar individualmente muestras de tejido.
- 60 La figura 22 es una vista isométrica de un analizador con un sistema de accionamiento giratorio.
- 65 La figura 23 es un sistema de procesamiento que puede fijar e incluir una muestra de tejido.

La figura 24 es un diagrama de flujo de un procedimiento ejemplar de procesamiento de una muestra.

La figura 25 es una vista isométrica de un analizador listo para recibir un portamuestras.

5 La figura 26 es una vista isométrica de un analizador con una matriz lineal de transmisores y una matriz lineal de receptores.

La figura 27 es una vista isométrica de un portamuestras.

10 La figura 28 es una vista isométrica de un portamuestras con transmisores y receptores.

La figura 29 es una vista en alzado lateral del portamuestras de la figura 28.

15 La figura 30 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la velocidad del sonido en el tejido y el cambio absoluto del TDV para el tejido bovino.

La figura 31 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la velocidad del sonido y el cambio relativo del TDV para el tejido bovino.

20 La figura 32 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV para el tejido bovino.

La figura 33 es una gráfica del tiempo de fijación frente al cambio del TDV y la amplitud de la señal para el tejido adiposo.

25 La figura 34 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV para el tejido hepático.

30 La figura 35 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV del tejido amigdalino humano.

La figura 36 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y los cambios del TDV para el tejido bovino.

35 La figura 37 es una gráfica del tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal para diferentes tipos de tejidos.

La figura 38 es una gráfica del tiempo de fijación frente al cambio del TDV para diferentes tipos de tejidos.

40 La figura 39 es una gráfica del tiempo frente a una señal de tiempo de vuelo para una muestra previamente remojada y una muestra fresca.

La figura 40 es una gráfica del tiempo frente a una señal de tiempo de vuelo para un procedimiento de fijación y deshidratación.

45 La figura 41 es una gráfica del tiempo frente a la amplitud de una señal de tiempo de vuelo para tejido insuficientemente fijado y tejido fijado.

La figura 42 es una gráfica del tiempo frente a la amplitud de la señal de tiempo de vuelo para una muestra de tejido sumergida durante diferentes períodos de tiempo en formol.

50

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

55 En la figura 1 se muestra un sistema de procesamiento 100 para procesar muestras. El sistema de procesamiento 100 incluye un portamuestras 110, un recipiente 140 y un analizador 114 situado en el recipiente 140. El analizador 114 incluye un transmisor 120 y un receptor 130. Un dispositivo informático 160 está acoplado de forma comunicativa al analizador 114.

60 En la figura 2 se muestra el recipiente 140 con una cámara 180 llena de un medio de procesamiento 170. El portamuestras 110, el transmisor 120 y el receptor 130 están sumergidos en el medio de procesamiento 170. Para fijar una muestra de tejido 150, el medio de procesamiento 170 puede ser un fijador que se difunde a través de la muestra 150.

65 Para analizar la muestra 150, el dispositivo informático 160 hace que el transmisor 120 emita energía que pasa a través de la muestra 150. El receptor 130 puede recibir la energía y puede enviar señales al dispositivo informático 160 en respuesta a la energía recibida. El dispositivo informático 160 analiza esas señales para vigilar el

procesamiento. Una vez que se completa el procesamiento, el portamuestras 110 se puede retirar cómodamente del recipiente 140 o se puede desactivar el medio de procesamiento 170.

La muestra 150 es una o más muestras biológicas. Una muestra biológica puede ser una muestra de tejido (por ejemplo, cualquier colección de células) extraída de un sujeto. En algunas disposiciones, se puede montar una muestra biológica en un portaobjetos de microscopio e incluye, sin limitación, una sección de tejido, un órgano, una sección de tumor, un frotis, una sección congelada, una preparación para citología o líneas celulares. Para obtener la muestra se puede usar una biopsia por incisión, una biopsia con aguja gruesa, una biopsia por excisión, una biopsia aspirativa, una biopsia por punción con aguja gruesa, una biopsia estereotáctica, una biopsia abierta o una biopsia quirúrgica. Se puede colocar una muestra de tejido recién extraída en el medio de procesamiento 170 dentro de un plazo adecuado para prevenir o limitar una cantidad apreciable de degradación de la muestra 150. En algunas disposiciones la muestra 150 se extirpa de un sujeto y se coloca en el medio 170 dentro de un plazo relativamente corto (por ejemplo, menos de aproximadamente 2 minutos, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas o similar). Por supuesto, la muestra de tejido se puede fijar lo antes posible después de extraerla del sujeto. La muestra 150 también se puede congelar o procesar de otro modo antes de la fijación.

Para analizar la muestra 150 usando energía acústica, el transmisor 120 puede emitir ondas acústicas. Las ondas acústicas pueden ser ondas infrasónicas, ondas sonoras audibles, ondas ultrasónicas o combinaciones de las mismas. La propagación de las ondas acústicas a través de la muestra 150 puede cambiar debido a cambios en la muestra 150. Si el procedimiento de fijación implica reticulación, las propiedades mecánicas (por ejemplo, un módulo elástico) de la muestra 150 pueden cambiar significativamente a medida que progresa la reticulación a través del tejido. El cambio del módulo elástico altera las características acústicas de la muestra 150. Las características acústicas incluyen, sin limitación, velocidades del sonido, características de transmisión, características de reflectancia, características de absorción, características de atenuación o similares. Para evaluar las características de transmisión, se mide un tiempo de vuelo (TDV) del sonido (por ejemplo, sonido audible, ultrasonido o ambos). El TDV es un tiempo de duración que tardan las ondas acústicas en propagarse una distancia a través de un objeto o sustancia. En algunos modos de realización, el TDV es el período de tiempo que tardan las ondas acústicas en propagarse a través de una muestra en comparación con el tiempo para propagarse a través del medio desplazado por la muestra. Además, el tiempo de vuelo del medio y del dispositivo de medición (por ejemplo, el soporte) se puede registrar antes de la inserción de la muestra y almacenar para posterior consulta de modo que se pueda usar para compensación de temperatura, pérdidas por evaporación, protocolos de compensación, modelado predictivo o similares. El grosor de la muestra 150 puede ser lo suficientemente grande como para producir un cambio medible en el TDV. En modos de realización de reflectancia, el TDV puede ser la duración del tiempo en que las ondas acústicas se propagan a través de una parte de la muestra de tejido. Por ejemplo, el TDV puede ser el período de tiempo en que las ondas acústicas se propagan dentro de una parte de la muestra de tejido. Por tanto, el TDV se puede calcular basándose en ondas acústicas que se propagan a través de toda la muestra, ondas acústicas reflejadas por la muestra de tejido o ambas.

La velocidad de las ondas acústicas que se propagan a través de la muestra 150 es en general igual a la raíz cuadrada de una proporción del módulo elástico (o rigidez) de la muestra 150 con respecto a la densidad de la muestra 150. La densidad de la muestra 150 puede permanecer en general constante y, por tanto, los cambios de la velocidad del sonido y los cambios del TDV se deben principalmente a cambios en el módulo elástico de la muestra. Si la densidad de la muestra 150 cambia en una cantidad significativa, la velocidad del sonido cambia y los cambios del TDV atribuibles a un cambio del módulo elástico se pueden determinar considerando la densidad cambiante de la muestra. Por tanto, se pueden analizar tanto las características estáticas como las dinámicas de la muestra 150.

El sistema de procesamiento 100 puede ser un sistema de circuito cerrado o un sistema de circuito abierto. En disposiciones de circuito cerrado, la energía acústica se transmite a través de la muestra 150 basándose en las señales de retroalimentación del receptor 130 y/o las señales de uno o más sensores configurados para detectar un parámetro (por ejemplo, temperatura, presión o cualquier otro parámetro de interés medible) y para transmitir (o enviar) señales indicativas del parámetro detectado. Basándose en esas señales, el sistema de procesamiento 100 puede controlar el funcionamiento del transmisor 120. De forma alternativa, el sistema de procesamiento 100 puede ser un sistema de circuito abierto en el que la energía acústica transmitida se establece, por ejemplo, por una entrada del usuario. Se contempla que el sistema de procesamiento 100 se pueda conmutar entre un modo de circuito cerrado y un modo de circuito abierto.

El portamuestras 110 puede ser portátil para transportarlo cómodamente entre diversas localizaciones. En un entorno de laboratorio, un usuario puede transportarlo manualmente entre estaciones de trabajo o entre equipos. El portamuestras 110 ilustrado tiene la forma de un casete con un cuerpo principal rígido 210 que rodea y contiene la muestra 150. El cuerpo principal 210 incluye una primera placa 220 y una segunda placa 230 separada de la primera placa 220 para definir un espacio de recepción o cámara 240. La muestra 150 se sitúa en el espacio de recepción 240. Las placas 220, 230 pueden tener aberturas u otros rasgos característicos que faciliten la transmisión de energía acústica. La conformación, tamaño y dimensiones del portamuestras 110 se pueden seleccionar basándose en la conformación, tamaño y dimensiones de la muestra 150. En diversas disposiciones, el portamuestras puede ser (o incluir) un casete, una gradilla, una cesta, una bandeja, un estuche, papel metalizado,

tela, malla o cualquier otro soporte portátil que pueda contener y transportar muestras. El portamuestras 110 puede ser un casete de biopsia estándar que permita el intercambio de líquidos.

Con referencia continua a las figuras 1 y 2, el transmisor 120 y el receptor 130 están fijamente acoplados a las paredes 247, 249 del recipiente 140 mediante ménsulas 250, 260, respectivamente. El recipiente 140 puede ser un depósito, una cubeta, un receptáculo, un cartucho, una cuba u otro envase para contener líquidos y puede incluir dispositivos de control de temperatura, una tapa, una cubierta, componentes hidráulicos (por ejemplo, válvulas, conductos, bombas, agitadores de líquidos, etc.) o similares. Para presurizar el medio de procesamiento 170, la cámara 180 puede ser una cámara de reacción presurizable. Adicionalmente, la cámara 180 puede funcionar bajo vacío para reducir la formación de burbujas de aire que impiden la transmisión del sonido y para facilitar la perfusión de líquidos en el portamuestras 110 para desplazar el aire atrapado.

Para minimizar, limitar o eliminar sustancialmente el ruido de la señal, el recipiente 140 puede estar hecho, en su totalidad o parcialmente, de uno o más materiales absorbentes de energía (por ejemplo, materiales absorbentes de sonido, materiales aislantes térmicos o similares). El tamaño y la conformación del recipiente 140 se pueden seleccionar para prevenir o eliminar sustancialmente condiciones no deseadas, tales como ondas estacionarias, ecos u otras condiciones que provocan ruido de la señal. Por ejemplo, si las ondas acústicas se reflejan en las superficies interiores del recipiente 140 y dan como resultado ruido de la señal, se puede incrementar el tamaño del recipiente 140.

El transmisor 120 puede incluir una amplia gama de diferentes tipos de elementos acústicos que pueden convertir energía eléctrica en energía acústica cuando se activan. Por ejemplo, un elemento acústico puede ser un único cristal piezoeléctrico que emite una única forma de onda. De forma alternativa, un elemento acústico puede incluir dos o más cristales piezoeléctricos que cooperan para emitir ondas que tienen diferentes formas de onda. Los elementos acústicos pueden generar ondas acústicas en respuesta a las señales de accionamiento del dispositivo informático 160 y pueden emitir al menos una de las ondas sonoras audibles, ondas ultrasónicas y ondas infrasónicas con diferentes tipos de formas de onda. Las ondas acústicas pueden tener formas de onda sinusoidales, formas de onda escalonadas, formas de onda pulsadas, formas de onda cuadradas, formas de onda triangulares, formas de onda en diente de sierra, formas de onda arbitrarias, formas de onda moduladas pulsadas, formas de onda no sinusoidales, formas de onda en rampa, formas de onda en ráfaga, formas de onda de compresión de impulsos (por ejemplo, formas de onda de compresión de impulsos moduladas pulsadas en ventana) o combinaciones de las mismas. En algunas disposiciones, los elementos acústicos son transductores que pueden emitir y detectar energía acústica (por ejemplo, energía acústica reflejada). Dichas disposiciones son muy adecuadas para evaluar la muestra basándose en ondas acústicas reflejadas. Por ejemplo, el transmisor 120 puede tener la forma de un transductor ultrasónico que transmite ondas acústicas a través de al menos una parte de la muestra de tejido 150. Al menos algunas de las ondas acústicas se pueden reflejar desde la muestra de tejido 150 y recibir por el transductor ultrasónico 120. Se puede usar una amplia gama de técnicas diferentes de procesamiento de señales (incluyendo técnicas de correlación cruzada, técnicas de autocorrelación, técnicas de análisis de eco, análisis de diferencias de fase, técnicas de integración, esquemas de compensación, técnicas de sincronización, etc.) para determinar un TDV de las ondas acústicas. El dispositivo informático 160 puede evaluar por tanto la energía acústica que se transmite a través de toda la muestra 150 o la energía acústica reflejada desde la muestra 150 o ambas.

Las ondas sonoras audibles se pueden extender en todas direcciones, mientras que las ondas ultrasónicas se pueden colimar en general y pueden reducir el ruido provocado por la reflectancia y potenciar la transmisión a través de la muestra 150. Como se usa en el presente documento, el término "ultrasonido" se refiere en general, sin limitación, a un sonido con una frecuencia mayor que aproximadamente 20.000 Hz (hercios). Para una fuente de ultrasonidos dada (por ejemplo, un emisor ultrasónico), cuanto mayor sea la frecuencia, menos divergirá la señal ultrasónica. La frecuencia de las señales ultrasónicas se puede incrementar para colimar suficientemente las señales para su transmisión eficaz a través del medio de procesamiento 170 y la muestra 150. Para analizar una muestra frágil se pueden usar ultrasonidos de frecuencia relativamente alta para minimizar, limitar o prevenir sustancialmente el daño a dicha muestra.

Adicionalmente o de forma alternativa, el transmisor 120 puede incluir, sin limitación, emisores de energía configurados para emitir ultrasonidos, radiofrecuencia (RF), energía lumínica (por ejemplo, luz visible, luz UV o similares), energía infrarroja, radiación, energía mecánica (por ejemplo, vibraciones), energía térmica (por ejemplo, calor) o similares. Los emisores lumínicos pueden ser diodos emisores de luz, láseres o similares. Los emisores de energía térmica pueden ser, sin limitación, calentadores (por ejemplo, calentadores resistivos), dispositivos de enfriamiento o dispositivos Peltier. Los emisores de energía pueden cooperar para enviar energía de forma simultánea o concurrente a la muestra 150 para vigilar una amplia gama de propiedades (por ejemplo, propiedades acústicas, propiedades térmicas y/o propiedades ópticas), para reducir los tiempos de procesamiento manteniendo el medio 170 a una temperatura deseada, potenciar la uniformidad del procesamiento, combinaciones de los mismos o similares.

El receptor 130 puede incluir, sin limitación, uno o más sensores configurados para detectar un parámetro y para transmitir una o más señales indicativas del parámetro detectado. El receptor 130 de las figuras 1 y 2 incluye al

menos un sensor configurado para detectar la energía acústica del transmisor 120. En otras disposiciones, el receptor 130 puede incluir uno o más sensores de RF, sensores ópticos (por ejemplo, sensores de luz visible, sensores UV o similares), sensores infrarrojos, sensores de radiación, sensores mecánicos (por ejemplo, acelerómetros), sensores de temperatura o similares. El receptor 130 puede incluir una pluralidad de diferentes tipos de sensores. Por ejemplo, un sensor puede detectar energía acústica y otro sensor puede detectar energía de RF.

El dispositivo informático 160 de la figura 1 está acoplado de forma comunicativa (por ejemplo, acoplado eléctricamente, acoplado de forma inalámbrica, acoplado de forma capacitiva, acoplado por inducción o similares) al transmisor 120 y al receptor 130. El dispositivo informático 160 puede incluir dispositivos de entrada (por ejemplo, una almohadilla táctil, una pantalla táctil, un teclado o similares), dispositivos periféricos, memoria, controladores, procesadores o unidades de procesamiento, combinaciones de los mismos o similares. El dispositivo informático 160 de la figura 1 es un ordenador, ilustrado como un ordenador portátil.

En la figura 3 se muestra el dispositivo informático 160 (ilustrado en línea discontinua) que incluye un generador de señales 270, una unidad de procesamiento 280 y una pantalla 290. El generador de señales 270 se puede programar para emitir señales de accionamiento. Las señales de accionamiento pueden tener una o más formas de onda sinusoidales, formas de onda escalonadas, formas de onda pulsadas, formas de onda cuadradas, formas de onda triangulares, formas de onda en diente de sierra, formas de onda arbitrarias, formas de onda moduladas pulsadas, formas de onda no sinusoidales, formas de onda en rampa, formas de onda en ráfaga o combinaciones de las mismas. La forma de onda se puede seleccionar basándose, por ejemplo, en una entrada del usuario, parámetros almacenados o la entrada de otro sistema (por ejemplo, una unidad de preparación de tejidos, una unidad de tinción, etc.). A modo de ejemplo, el generador de señales 270 puede incluir un generador arbitrario de funciones que puede emitir una pluralidad de formas de onda diferentes. Por ejemplo, el generador de señales 270 puede ser un generador arbitrario de señales de B&K Precision Corp. u otro generador arbitrario de señales.

El dispositivo informático 160 está acoplado de forma comunicativa a una unidad de procesamiento de tejidos que aplica incontables sustancias para preparar la muestra para su inclusión. El dispositivo informático 160 puede preparar un protocolo de preparación de tejidos que se usa por la unidad de procesamiento de tejidos. El protocolo de preparación de tejidos puede incluir una duración del tiempo de procesamiento para una sustancia particular, composición diana de una sustancia, temperatura de una sustancia particular, combinaciones de los mismos o similares.

La unidad de procesamiento 280 puede evaluar el cambio del TDV del sonido en la muestra 150 comparando, por ejemplo, las ondas acústicas emitidas por el transmisor 120 con las ondas acústicas detectadas por el receptor 130. Esta comparación se puede repetir incontables veces para vigilar el estado de fijación de la muestra 150. Por ejemplo, la unidad de procesamiento 280 determina un primer período de tiempo que tardan las ondas acústicas en propagarse a través de la muestra 150. La unidad de procesamiento 280 determina a continuación un segundo período de tiempo que tarda una onda acústica emitida posteriormente en propagarse a través de la muestra 150. El primer período de tiempo se compara con el segundo período de tiempo para determinar, sin limitación, un cambio de velocidad (por ejemplo, aceleración) de las ondas sonoras, un cambio absoluto y/o relativo del TDV, cambio de la distancia entre el transmisor 120 y el receptor 130, cambio de temperatura y/o densidad del medio de procesamiento 170 o combinaciones de los mismos. La unidad de procesamiento 280 puede usar diferentes tipos de análisis, incluyendo un análisis de desplazamiento de fase, un análisis de comparación de ondas acústicas u otros tipos de análisis numéricos.

Para almacenar información, el dispositivo informático 160 también puede incluir memoria. La memoria puede incluir, sin limitación, memoria volátil, memoria no volátil, memoria de solo lectura (ROM), memoria de acceso aleatorio (RAM) y similares. La información incluye, pero no se limita a, protocolos, datos (incluyendo bases de datos, bibliotecas, tablas, algoritmos, registros, registros de auditoría, informes, etc.), configuraciones o similares. Los protocolos incluyen, pero no se limitan a, protocolos de cocción, protocolos de fijación, protocolos de preparación de tejidos, protocolos de tinción, protocolos de acondicionamiento, protocolos de desparafinado, protocolos de deshidratación, protocolos de calibración, protocolos de ajuste de frecuencia, protocolos de descalcificación u otros tipos de rutinas. Se pueden usar protocolos que alteran o tienen un impacto en la densidad del tejido o en la transmisión del sonido para controlar los componentes del dispositivo informático 160, componentes del analizador 114, unidades de procesamiento de portaobjetos de microscopio, dispositivos de tinción, hornos/secadores o similares. Se pueden recopilar o generar datos analizando el portamuestras 110, el medio de procesamiento 170, la muestra 150, o se pueden introducir por el usuario.

El dispositivo informático 160 puede evaluar diferentes propiedades acústicas. La evaluación de las propiedades acústicas puede implicar comparar las características de velocidad del sonido de la muestra, comparar la aceleración del sonido en la muestra, analizar información de fijación almacenada y analizar el TDV. El análisis del TDV puede implicar, sin limitación, evaluar el TDV total, evaluar los cambios del TDV durante un período de tiempo (como se analiza anteriormente), evaluar las tasas de cambio del TDV, generar perfiles de TDV o similares. La información de fijación almacenada puede incluir, sin limitación, información sobre velocidades del sonido para diferentes tipos de tejidos, tasas de fijación, tiempo de fijación previsto, protocolos de compensación, porcentaje

de reticulación, perfiles de TDV, composiciones de tejidos, dimensiones de tejidos, algoritmos, formas de onda, frecuencias, combinaciones de los mismos o similares. El dispositivo informático 160 se configura para evaluar una velocidad del sonido de la energía acústica que se propaga a través de la muestra biológica basándose en el TDV y evaluar al menos uno del TDV, un cambio del TDV, amplitud de las ondas sonoras, una intensidad de las ondas sonoras, desplazamientos de fase, eco, una temperatura y/o densidad de la muestra 150 y una temperatura y/o densidad del medio de procesamiento 170.

El dispositivo informático 160 puede seleccionar, crear o modificar configuraciones de fijación, con o sin conocimiento previo de los antecedentes de la muestra, estado de fijación de la muestra o tipo de tejido para mejorar la fiabilidad y exactitud del diagnóstico, especialmente un diagnóstico avanzado. Las configuraciones de fijación incluyen, sin limitación, duración del tiempo de fijación (por ejemplo, tiempo de fijación mínimo, tiempo de fijación máximo, intervalos de tiempos de fijación), composición del medio de procesamiento y temperatura del medio de procesamiento. A modo de ejemplo, si la muestra 150 tiene un estado de fijación conocido, se puede seleccionar un protocolo de fijación apropiado basándose, al menos en parte, en el estado de fijación conocido. Si la muestra 150 tiene un estado de fijación desconocido, se usa el analizador 114 para obtener información sobre el estado de fijación. Por ejemplo, el analizador 114 puede obtener información sobre una muestra que ya está parcial o completamente fijada. La configuración del protocolo se puede seleccionar basándose, al menos en parte, en la información obtenida. Las configuraciones del protocolo pueden incluir configuraciones de preparación de tejidos, configuraciones de protocolos de fijación, configuraciones de protocolos de reactivos o similares. Se pueden seleccionar a continuación configuraciones de protocolos de reactivos (por ejemplo, tipos de colorantes IHQ/HIS, tiempos de tinción, etc.) para igualar/compensar el estado de fijación basándose, al menos en parte, en información del analizador 114. El analizador 114 puede analizar por tanto muestras no fijadas, parcialmente fijadas o completamente fijadas.

Para procesar múltiples muestras de tejido, el sistema de procesamiento 100 puede actualizar dinámicamente las configuraciones de fijación. Se pueden generar configuraciones de fijación analizando la muestra 150 ilustrada. Se puede procesar otra muestra extraída del mismo tejido biológico que la muestra 150 usando las nuevas configuraciones de fijación. De esta manera, el procedimiento de fijación se puede actualizar dinámicamente.

En la figura 4 se muestra un procedimiento ejemplar de fijar la muestra 150 para proteger la muestra 150 de, por ejemplo, putrefacción, autólisis o similares. En general, la muestra 150 se puede cargar en el sistema de procesamiento 100. El medio de procesamiento 170 se pone en contacto con la muestra 150 y comienza a fijarla. El analizador 114 vigila el procedimiento de fijación. Después de que la muestra 150 esté suficientemente fijada, se saca la muestra 150 del medio de fijación 170 para evitar cómodamente la fijación deficiente y la fijación excesiva. Los detalles de este procedimiento de fijación se analizan a continuación.

En la etapa 300 de la figura 4, la muestra 150 se carga en el portamuestras 110. Para abrir el portamuestras 110 se pueden separar las placas 220, 230. Las placas 220, 230 se pueden acoplar entre sí para sostener la muestra 150 holgadamente. Como ejemplo, el portamuestras puede ser un casete de tejido Cellsafe™ estándar para muestras de biopsia de Cellpath Ltd. u otros tipos compatibles con la transmisión acústica. El portamuestras cerrado 110 se baja manual o automáticamente al recipiente 140 y se sostiene en una base de acoplamiento 312 (véanse las figuras 1 y 2). La base de acoplamiento 312 puede ser una pinza, un mecanismo de agarre u otro componente adecuado para retener el portamuestras 110.

El medio de procesamiento 170 comienza a difundir a través de la muestra 150 para comenzar el procedimiento de fijación. Los procedimientos de fijación pueden implicar limitar o interrumpir la putrefacción, limitar o interrumpir la autólisis, estabilizar proteínas y proteger o conservar de otro modo las características del tejido, la estructura celular, la morfología del tejido o similares. El fijador puede incluir, sin limitación, aldehídos, agentes oxidantes, picratos, alcoholes o mercuriales u otra sustancia que puede conservar células o tejidos biológicos. Como ejemplo, el fijador podría ser formol tamponado neutro (FTN). En algunos procedimientos de fijación, el medio 170 es un fijador que provoca la reticulación de la muestra 150. Algunos fijadores pueden no provocar reticulación.

En 310, el analizador 114 transmite energía acústica a través de la muestra 150. El generador de señales 270 (véase la figura 3) puede emitir una señal de accionamiento al transmisor 120 que, a su vez, emite energía acústica que en última instancia se transmite a través de la muestra 150.

En 320, el receptor 130 detecta la energía acústica y emite señales del receptor al dispositivo informático 160 basándose en la energía acústica detectada. Las señales del receptor se pueden o no procesar (por ejemplo, amplificar, modular o similares).

En 330, el dispositivo informático 160 analiza las señales del receptor. El dispositivo informático 160 puede controlar el sistema de procesamiento 100 para potenciar la fiabilidad del procesamiento, reducir los tiempos de procesamiento, mejorar la calidad del procesamiento o similares. Por ejemplo, la temperatura del medio de procesamiento 170 de la figura 2 se puede controlar para potenciar la difusión del medio 170 para reducir los tiempos de procesamiento.

Una vez que la muestra de tejido 150 alcanza un estado de fijación deseado, el portamuestras 110 se retira (por ejemplo, manual o automáticamente) del baño de medio. La muestra fijada 150 se puede incluir, seccionar y teñir sin realizar pruebas que provoquen malgasto de muestra.

5 El sistema de procesamiento 100 de las figuras 1 y 2 puede incluir incontables dispositivos térmicos, dispositivos mecánicos, sensores o bombas. Los dispositivos térmicos pueden regular la temperatura del medio 170 y pueden incluir uno o más calentadores, dispositivos de enfriamiento, dispositivos Peltier o similares. Los dispositivos mecánicos pueden incluir, sin limitación, agitadores (por ejemplo, agitadores de líquidos), dispositivos mezcladores, vibradores o similares. Los sensores pueden ser, sin limitación, sensores acústicos, sensores de movimiento, sensores químicos, sensores de temperatura, sensores de viscosidad, sensores ópticos, sensores de flujo, sensores de posición, sensores de presión u otros tipos de sensores. Los sensores se pueden situar en diversas localizaciones alrededor de la cámara 180.

15 Las mediciones del TDV se pueden usar para vigilar los procedimientos de fijación. Los cambios teóricos del TDV se pueden calcular basándose en las distancias entre los componentes del sistema de procesamiento 100, las dimensiones de la muestra 150, una longitud de un trayecto sonoro 313 (véase la figura 2) a lo largo del cual se propaga la energía acústica y las propiedades acústicas del medio de fijación 170 y del portamuestras 110. El dispositivo informático 160 puede analizar valores calculados para determinar configuraciones de fijación, tales como configuraciones iniciales de fijación.

20 En la tabla 1 a continuación se muestran los cambios teóricos calculados del TDV basados en la velocidad del sonido en el agua (1.482 m/s), la velocidad del sonido en el tejido muscular sin fijar (1.580 m/s) y la velocidad del sonido en el tejido muscular fijado (1.600 m/s). Los cálculos teóricos se pueden comparar con los valores medidos para modificar el procedimiento de fijación. Los cálculos teóricos se pueden usar para determinar las configuraciones iniciales del procedimiento de fijación. Las configuraciones iniciales pueden incluir formas de onda, amplitud de la energía acústica, frecuencia de la energía acústica, temperaturas de procesamiento o similares.

TABLA 1

Trayecto sonoro	Dimensión	Distancia [mm]	TDV [us]	TDV después de la fijación [us]
transmisor -> casete/muestra	D1	20	29,6	
muestra	D2	4	6,32	6,4
muestra -> portamuestras	D3	1	1,48	
portamuestras -> receptor	D4	25	37	
TOTALES		50	74,4	74,48
			delta [ns]	80

30 En la figura 2 se muestra la distancia  $D_1$  desde el transmisor 120 hasta la muestra 150, la distancia  $D_2$  entre superficies opuestas de la muestra 150, la distancia  $D_3$  desde la muestra 150 hasta la superficie exterior de la segunda placa 230 y la distancia  $D_4$  desde el portamuestras 110 hasta el receptor 130. Las velocidades del sonido y las densidades de los tipos de tejidos comunes son bien conocidas en la técnica. Estos valores conocidos se pueden usar para calcular el cambio del TDV y determinar las configuraciones iniciales de fijación. Debido a que las velocidades del sonido dependen de la temperatura del medio y la distancia del canal de medición puede depender de los coeficientes de expansión térmica de los componentes relacionados, se puede realizar una medición de referencia del TDV del medio y del canal de medición a una temperatura dada del medio y del entorno de prueba. Esta medición de referencia se puede usar para compensar las mediciones del TDV de la muestra.

40 El TDV total se puede determinar por los tiempos de propagación individuales de las ondas sonoras que se propagan en primer lugar a través de una parte del medio 170 durante el tiempo "t1" a través de la distancia  $D_1$ , seguido del tiempo "t2" a medida que las ondas sonoras se propagan a través de la distancia  $D_2$  y finalmente el tiempo "t3" a medida que las ondas sonoras se propagan por las distancias restantes  $D_3$  y  $D_4$ . Por tanto, el TDV total =  $t_1+t_2+t_3$ . Los cambios del TDV total se pueden medir y relacionar con el estado de fijación y, por tanto, se relacionan principalmente o solo con el tiempo "t2". La información de un trayecto sonoro sin obstáculos (por ejemplo, un trayecto sonoro sin la inserción de una muestra como referencia) se puede usar para identificar la variación del TDV total debido, por ejemplo, a cambios del medio 170 (por ejemplo, cambios de temperatura, cambios de densidad, etc.).

50 Los diferentes tipos de tejidos pueden tener diferentes características acústicas. La figura 5 es un gráfico ejemplar no limitante de la fase de fijación frente al cambio de un TDV. Se puede generar una curva 340 analizando una muestra. Los diferentes tipos de tejidos pueden generar diferentes tipos de curvas, como se analiza a continuación en relación con las figuras 30-38. El dispositivo informático 160 puede correlacionar las diferentes curvas con diferentes tipos de tejidos. Para procesar una muestra fresca se puede seleccionar una curva correspondiente al mismo tipo de tejido que la muestra fresca o a uno similar. El dispositivo informático 160 puede proporcionar un

protocolo de procesamiento apropiado basado en la curva. El protocolo puede incluir, sin limitación, un protocolo de fijación, un protocolo de preparación de tejidos, un protocolo de inclusión, un protocolo de descalcificación, un protocolo de tinción o combinaciones de los mismos. También se puede obtener información mientras se realiza el protocolo para modificar el protocolo o seleccionar otro protocolo. A modo de ejemplo, la curva 340 se puede usar para determinar, al menos en parte, cuándo retirar una muestra de un medio de fijación.

Se pueden usar técnicas de ajuste de curvas usando polinomios, funciones trigonométricas, funciones logarítmicas, funciones exponenciales, interpolaciones (por ejemplo, interpolaciones segmentarias) y combinaciones de los mismos para generar la curva 340 que se aproxima a los datos recopilados. Algunas técnicas ejemplares de ajuste de curvas no limitantes se analizan en relación con las figuras 13-16.

En una fase de fijación inicial  $FP_0$  en la figura 5, la muestra no fijada 150 se expone al medio de procesamiento 170. Las partes más externas de la muestra 150 comienzan a reticular. A medida que la fase de fijación se incrementa de  $FP_0$  a  $FP_1$ , el cambio del TDV se incrementa gradualmente con respecto a la fase de fijación. De  $FP_1$  a  $FP_2$ , la reticulación se aproxima a las regiones interiores de la muestra 150. El cambio del TDV no es lineal con respecto a la fase de fijación. A medida que la fase de fijación se aproxima a  $FP_2$ , la tasa de cambio del cambio del TDV comienza a disminuir rápidamente. De  $FP_2$  a  $FP_3$ , la muestra 150 se satura hasta que puede haber una sobresaturación en aproximadamente  $FP_3$ . Al aproximarse a  $FP_3$ , la pendiente de la curva 340 continúa disminuyendo a medida que se aproxima a cero, correspondiente a cuando la muestra 150 puede correr riesgo de fijación excesiva. El procedimiento de fijación se puede controlar basándose, por ejemplo, en la pendiente de la curva 340, un cambio mínimo del TDV, un cambio máximo del TDV, combinaciones de los mismos o similares.

Se puede usar un algoritmo predictivo de la fijación para determinar un tiempo de procesamiento deseado para lograr un nivel de fijación deseado. El sistema informático 160 puede almacenar y seleccionar algoritmos predictivos de fijación basados en la cantidad de reticulación deseada. Si el medio de fijación 170 provoca reticulación a una tasa no lineal, se puede seleccionar un algoritmo predictivo de fijación no lineal. Por ejemplo, la reticulación podría presentar un declive exponencial, por lo que se puede usar una curva de declive exponencial para estimar un final del tiempo de procesamiento. El nivel deseado de reticulación se puede seleccionar basándose en el tipo de tejido, el análisis que se va a realizar, el tiempo de almacenamiento esperado u otros criterios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la curva predictiva se puede usar para determinar un tiempo de detención previsto para el cual la reticulación debe estar completa en aproximadamente un 99 %.

Se puede usar un algoritmo de Levenberg-Marquardt u otro tipo de algoritmo no lineal para generar una curva de mejor ajuste apropiada. En algunos protocolos predictivos, el algoritmo de Levenberg-Marquardt usa un valor inicial para generar una curva. Un esquema de amortiguación-desamortiguación puede producir la siguiente iteración. En la publicación "Damping-Undamping Strategies for the Levenberg-Marquardt Nonlinear Least-Squares Method" de Michael Lampton se describen esquemas ejemplares no limitantes de amortiguación-desamortiguación. Cuanto más cerca de la curva real del valor inicial, más probable es que el algoritmo proporcione la curva de mejor ajuste deseada. En algunos protocolos se usa una pluralidad de valores en el conjunto de datos (por ejemplo, un primer valor, un valor medio y un último valor) para producir una curva exponencial que se ajuste a los tres valores. Los valores iniciales se pueden seleccionar basándose en los valores conocidos para muestras de tejido similares. Después de realizar el procedimiento iterativo se genera una curva de mejor ajuste. La curva de mejor ajuste se puede usar para determinar el estado previsto de la muestra en diferentes tiempos durante el procesamiento. Esto puede ser útil para desarrollar una pauta para incrementar el rendimiento del procesamiento, especialmente si el sistema de procesamiento permite el procesamiento individual, como se analiza en relación con la figura 21.

En la figura 6 se muestra una relación de temporización entre una señal 360 del transmisor 120 y una señal detectada 380. La señal 360 puede tener un número suficiente de ráfagas de señal para evaluar los cambios de fase de las ondas que entran y salen de la muestra 150 a una distancia particular. A modo de ejemplo, las ondas acústicas 370 de la señal 360 se ilustran como una ráfaga de impulsos y pueden ser una ráfaga sinusoidal de 1 MHz con 53 ciclos, una tasa de repetición de 5,3 ms y una amplitud de 7,4 V. También se pueden usar otras ondas acústicas con diferentes ráfagas de impulsos, números de ciclos, tasas de repetición, amplitudes, etc. La señal detectada 380 corresponde a la señal recibida por el receptor 130. Una ráfaga de impulsos 390 corresponde a la ráfaga de señal 370.

En las figuras 7 y 8 se muestra la relación entre la ráfaga de señal 370 y las ondas acústicas recibidas 390. Un cambio del TDV, si lo hay, se puede determinar basándose en una comparación de las ondas 370, 390. Si el TDV no cambia, no habrá desplazamiento de fase entre las ondas 370, 390 con el tiempo. Si hay un cambio del TDV, habrá un desplazamiento de fase con el tiempo. Por ejemplo, en la quinta onda 392 hay un retraso o desplazamiento de fase de aproximadamente 38,28  $\mu$ s, medido frente a la señal de referencia 370. A medida que una muestra se somete a fijación, la velocidad del sonido en la mayoría de los tipos de tejido (por ejemplo, tejidos musculares, tejidos conectivos, etc.) se incrementa típicamente. Sin embargo, algunos tejidos adiposos provocarán una disminución de la velocidad del sonido durante la fijación. El sistema 100 puede detectar una diferencia relativa de ángulo de fase resultante de un desplazamiento de fase provocado por una llegada temprana o tardía del paquete de impulsos 390.

En la figura 9 se muestra la relación de las ondas emitidas 393, las ondas recibidas 394 y una curva de comparación 391. La curva de comparación 391 muestra diferencias de fase, ilustradas como una salida de tensión analógica, que reflejan una diferencia de fase integrada acumulada de una comparación (por ejemplo, una comparación sincrónica) de dos paquetes de ondas 395, 397. La diferencia de fase integrada se puede usar para determinar cuándo evaluar una diferencia de fase entre las dos ondas 393, 394 o qué parte de las ondas 393, 394 comparar.

Se puede comunicar al dispositivo informático (por ejemplo, un sistema de captación de datos) un punto desencadenante, indicado por una línea discontinua 398. El punto desencadenante 398 se puede seleccionar basándose en un punto de asentamiento, tasa de cambio o similar de la curva 394. Un sistema de captación electrónica de datos del sistema 160 puede analizar las ondas 393, 394 en el punto desencadenante y puede tener una resolución de alrededor de 1 ns o mejor (basándose en +/-1 DE en  $n = 7$  paquetes de impulsos captados) en modo de transmisión sombreada. Se pueden seleccionar incontables puntos desencadenantes a lo largo de la curva 391 basándose en la cantidad de muestreo deseada.

En las figuras 10A y 10B se muestran relaciones de ángulo de fase basadas en la frecuencia de las ondas salientes. En la figura 10A, una señal saliente en ráfaga 395a, una señal recibida en ráfaga 397a y una relación inicial de fase  $\emptyset 1$  provocada por la señal 397a que se propaga a través de la muestra 150. En la figura 10B se muestra una onda saliente en ráfaga 395b emitida a una frecuencia 2 mayor que la frecuencia 1 de la onda 395a de la figura 10A. La onda saliente 395b de la figura 10B tiene una longitud de onda reducida en comparación con la onda emitida 395a. Como tal, la relación de fase  $\emptyset 1$  es diferente de la relación de fase  $\emptyset 2$ . Debido a que el TDV depende principalmente o solo de la distancia de propagación y de la densidad del medio o de la muestra, la relación de fase se puede configurar libremente seleccionando la frecuencia (u otras características) de las ondas salientes. En consecuencia, el sistema informático 160 puede seleccionar la frecuencia de la onda saliente basándose en una relación de fase deseada.

Las frecuencias y las relaciones de fase resultantes se pueden correlacionar para determinar cómo los cambios de la frecuencia saliente darán como resultado cambios de la relación de fase, que a su vez se pueden usar para vigilar la muestra 150. Un protocolo de vigilancia puede incluir, sin limitación, emitir una pluralidad de ondas con diferentes frecuencias para generar una pluralidad de relaciones de fase. Se puede conseguir una comparación (por ejemplo, una comparación ampliada de intervalos de fase) vigilando de forma adaptativa la progresión del ángulo de fase. Las frecuencias salientes se pueden cambiar (por ejemplo, cambiar escalonadamente) por el generador de señales 270 para mantener la relación de fase en el intervalo favorable. El cambio de ángulo de fase depende linealmente del cambio de frecuencia y, por lo tanto, se puede agregar sucesivamente como un incremento absoluto del TDV a cualquier cambio adicional observado por la comparación de fases por sí misma. Debido a que la mayoría de las reacciones que se vigilan están en un intervalo de tiempo de varias decenas de minutos, se puede lograr fácilmente un cambio de frecuencia adaptativo.

La longitud de onda base para un transductor ultrasónico puede dar como resultado un límite de detección de fase. Por ejemplo, el transductor ultrasónico 120 puede emitir una señal a una frecuencia de aproximadamente 4 MHz, 0-180 grados, en aproximadamente el intervalo de 125 ns. Diferentes receptores ultrasónicos pueden proporcionar un intervalo de ángulo de fase mayor, pero la resolución de profundidad para el grosor diana puede estar limitada a muestras más gruesas. Para mayores diferencias de ángulo de fase (por ejemplo, mayor de 180 grados), la tensión integrada se puede invertir en polaridad, o repetirse para diferencias de ángulo de fase mayores de 360 grados. Debido a que la vigilancia de la fijación se puede fundamentar en cambios relativos del ángulo de fase, el ángulo de fase inicial se puede optimizar con una diana, tal como variando la longitud de onda base en el generador arbitrario de funciones 170 para establecer una configuración inicial con una relación de fase favorable, por ejemplo, el punto 399 en el gráfico de la figura 11. En la figura 11 también se muestran diferencias de fase que proporcionan alta sensibilidad. Otros procedimientos se pueden no fundamentar en mediciones de comparación de fase y en su lugar utilizar excitación modulada pulsada y procedimientos de correlación o convolución para calcular el TDV absoluto con precisión y resolución similares.

Se puede utilizar una amplia gama de técnicas de compensación para analizar las mediciones del TDV. Una técnica de compensación para desplazamientos de fase relativamente grandes durante la vigilancia del TDV se fundamenta en los principios de reducción. Un principio de reducción matemática puede usar, por ejemplo, múltiples frecuencias de excitación discretas (= exploraciones de longitud de onda) enviadas en sucesión de ráfagas a la misma localización diana. Un cambio en el tiempo,  $\Delta T$ , puede representar el retardo temporal real entre cuando se envía una onda y cuando se recibe la onda. Se puede emitir una pluralidad de ondas de diferentes longitudes de onda,  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ . Las ondas recibidas se pueden comparar con las ondas salientes para determinar los cambios de fase correspondientes,  $\Delta\theta_{\lambda_1}, \Delta\theta_{\lambda_2}, \dots, \Delta\theta_{\lambda_n}$ . El dispositivo informático 160 puede reducir el valor real de  $\Delta T$  a un subconjunto de valores que es mucho más pequeño que el conjunto de todos los valores posibles para  $\Delta T$ . Si hay un intervalo de exploraciones de longitud de onda,  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ , y sus correspondientes cambios de fase,  $\Delta\theta_{\lambda_1}, \Delta\theta_{\lambda_2}, \dots, \Delta\theta_{\lambda_n}$ , el dispositivo informático 160 puede usar cada lectura para reducir adicionalmente un  $\Delta T$  estimado hasta que solo haya un valor  $\Delta T$  factible.

El cambio en la fase  $\Delta\theta_\lambda$  se puede medir a una frecuencia dada,  $\lambda$ . Debido a que puede haber muchos valores para  $\Delta T$  que proporcionarían el mismo  $\Delta\theta_\lambda$ , el  $\Delta T$  se puede estimar o predecir basándose, al menos en parte, en un  $\Delta\theta_\lambda$ .

específico, ya que la mayoría de los valores de  $\Delta T$  no proporcionarían un  $\Delta\theta_\lambda$  dado (el verdadero valor de  $\Delta T$  satisface la ecuación  $\Delta T = N/(2\lambda) + \Delta\theta_\lambda$  para algún número entero  $N$ ). Se puede usar un programa para al menos reducir el verdadero valor de  $\Delta T$  a un subconjunto de valores que es mucho más pequeño que el conjunto de todos los valores posibles para  $\Delta T$  basándose en un  $\Delta T$  estimado de un  $\Delta\theta_\lambda$  específico. El dispositivo informático 160 puede generar un intervalo de exploraciones de longitud de onda,  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ , y sus correspondientes cambios de fase,  $\Delta\theta_{\lambda_1}, \Delta\theta_{\lambda_2}, \dots, \Delta\theta_{\lambda_n}$ , como se detalla anteriormente.

Se puede usar un algoritmo interactivo para determinar  $\Delta T$  y se puede usar para minimizar o evitar problemas asociados con la resolución algebraica de  $\Delta T$  (por ejemplo, problemas atribuibles a la naturaleza ruidosa de las mediciones del TDV). En algunos algoritmos interactivos, se estima o predice un  $\Delta T$ . Se puede determinar un  $\Delta\theta_\lambda$  teórico para ese  $\Delta T$  y se puede comparar con los  $\Delta\theta_\lambda$  medidos para asignar una función de penalización. La función de penalización puede ser la suma de las diferencias al cuadrado entre los  $\Delta\theta_\lambda$  teóricos y los  $\Delta\theta_\lambda$  medidos. El verdadero valor de  $\Delta T$  puede ser el minimizador de la función de penalización. El procedimiento para minimizar esta función se puede determinar usando diferentes técnicas, tales como un barrido de valores o una búsqueda binaria. Adicionalmente o de forma alternativa se podría usar un descenso de gradiente, el procedimiento de Newton (incluyendo el algoritmo de Gauss-Newton) o el procedimiento de Levenberg-Marquardt. También se pueden utilizar otros algoritmos, si es necesario o deseado. En algunos protocolos, se pueden descartar uno o más valores fuera de intervalo (por ejemplo, valores  $<0,2$  y/o valores  $>1,5$ ). Los valores fuera de intervalo se pueden seleccionar basándose en criterios correspondientes a las características de la muestra de tejido.

Se puede usar un algoritmo de detección de fase para comparar una onda saliente con una onda recibida correspondiente. Un tipo de algoritmo de detección de fase es un algoritmo de ampliación del intervalo que involucra múltiples longitudes de onda de cambios de ángulo de fase para mediciones de velocidad acústica. Cuando la velocidad de las ondas acústicas cambia significativamente, el dispositivo informático 160 puede basar las comparaciones de ondas en un período diferente de la onda en la que se inició, dando como resultado un cambio repentino de un TDV que se incrementa a un TDV que disminuye o dando como resultado un cambio repentino de un TDV que disminuye a un TDV que se incrementa. El cambio repentino es atribuible a la comparación de diferentes fases, lo que da lugar de este modo a datos artificiales. Se puede evaluar la tasa de cambios del TDV para determinar si los cambios del TDV son cambios artificiales debido a dichas comparaciones fuera de fase. Por ejemplo, la segunda derivada de la curva del TDV se puede usar para determinar si un TDV máximo local o un TDV mínimo local es un cambio natural del TDV o un cambio artificial del TDV.

En la figura 12 se muestra un gráfico del tiempo frente a la señal del TDV. Una curva 405 disminuye gradualmente en 408 hasta un mínimo local 409. La curva 405 se incrementa a continuación en 410 hasta un máximo local artificial 411. El TDV real continúa incrementándose gradualmente, como se indica por la curva discontinua 412. El pico 411 se genera basándose en una comparación fuera de fase. La curva 405 en 413 continúa disminuyendo en un tiempo mayor que 260 basándose en la comparación fuera de fase. Como se muestra en la figura 12, hay una diferencia significativa entre el TDV real 412 y el TDV artificial 413.

Se pueden identificar mediciones artificiales para evitar el pico 411. A modo de ejemplo, la figura 13 es un gráfico del tiempo frente al TDV con datos ruidosos. El TDV se incrementa de un tiempo = 0 minutos a aproximadamente  $t = 55$  minutos. El TDV disminuye gradualmente de 55 minutos a aproximadamente 150 minutos. El TDV comienza a incrementar de repente a aproximadamente 150 minutos. Un programa puede determinar si el cambio repentino del TDV es exacto o artificial.

En la figura 14 se muestra una gráfica generado usando diferenciación numérica (por ejemplo, procedimientos de diferencia finita) de los datos de la figura 13 que incrementan la proporción señal/ruido dando como resultado la curva de irregularidad 414 que no es adecuada para determinar si los cambios del TDV son naturales o artificiales. El pico en el tiempo de aproximadamente 155 corresponde a cambios artificiales de un TDV que disminuye a un TDV que se incrementa basándose en una comparación entre fases diferenciales de ondas. Basándose en los numerosos picos grandes de la figura 14, puede ser difícil determinar con exactitud si un pico corresponde a un cambio artificial o a uno natural del TDV.

En la figura 15 se muestra la irregularidad de la curva ruidosa de dos picos de la figura 13 usando un algoritmo suavizador, tal como un algoritmo suavizador de variación total. El algoritmo suavizador de variación total se puede usar para suavizar los datos sin elaborar de la figura 13 antes de generar la curva de irregularidad. Un programa de compensación puede reconocer que el cambio del tiempo de vuelo a aproximadamente  $t = 150$  es artificial y volver a comparar las diferentes fases de las ondas para asegurar que la tendencia general del tiempo de vuelo a medida que  $t$  se aproxima a 150 se mantenga en general. El pico grande 416 a 150 minutos se puede identificar cómodamente en la figura 15, mientras que el pico natural es apenas identificable. Se puede usar un programa de compensación para compensar el pico 416. Dichos programas de compensación pueden incluir, sin limitación, un algoritmo algebraico u otro tipo de algoritmo de compensación.

El ruido se puede reducir sin eliminar los datos deseados. Un procedimiento de reducción del ruido que no suaviza demasiado los datos (por ejemplo, las cúspides) se analiza en "Numerical Differentiation of Noisy, Nonsmooth Data" de Rick Chartrand, publicado por el Laboratorio Nacional de Los Álamos, 13 de diciembre de 2005. El

procedimiento es un ejemplo de un suavizador de variación total que suaviza el ruido mientras que conserva las cúspides verdaderas, minimizando, eliminando o limitando de este modo solo el ruido no deseado. En la figura 16 se muestra una gráfica de datos 417, una primera curva suavizada 418 (mostrada en línea discontinua) y una segunda curva suavizada 419. Se eliminan numerosas cúspides de la gráfica de datos 417 en la primera curva suavizada 418 que se generó usando un algoritmo de diferenciación numérica diseñado para eliminar picos/valles agudos. La segunda curva 419 se generó usando un algoritmo suavizador de variación total que conserva las cúspides verdaderas. Por tanto, la segunda curva 419 es muy adecuada para identificar señales de TDV inexactas (por ejemplo, picos/valles artificiales) en el tiempo de 49 minutos en comparación con la primera curva suavizada 418.

El movimiento del tejido dentro de un portamuestras puede dar lugar a mediciones inexactas. Si la muestra de tejido 150 se mueve dentro del portamuestras 110, el cambio en la posición de la muestra puede alterar significativamente las mediciones para vigilar la reticulación, los cambios de densidad de la muestra o similares. Promediar, comparar o analizar de otro modo los datos obtenidos de uno o más analizadores, como se analiza en relación con la figura 18, se pueden usar para compensar dicho movimiento. El dispositivo informático 160, por ejemplo, puede incluir diferentes tipos de algoritmos que usan datos obtenidos para una pluralidad de analizadores. Si el tejido se desplaza dentro del portamuestras (por ejemplo, cuando se sacude un casete o se mueve un casete rápidamente a través del medio), se puede tener en cuenta el movimiento del tejido en relación con el casete para evitar cambios atribuibles a la migración del tejido.

Los analizadores de tejidos descritos en el presente documento también pueden analizar muestras de tejido después de la fijación. Por ejemplo, el analizador de tejidos 114 de las figuras 1 y 2, o un analizador de tejidos modificado, puede obtener información sobre una muestra de tejido incluida en un material, una sección montable cortada (por ejemplo, una tira cortada de tejido incluido) o similar. Por tanto se puede obtener información sobre la muestra antes de la fijación/procesamiento, durante la fijación/procesamiento y después de la fijación/procesamiento. Las muestras se pueden analizar incontables veces durante el procesamiento para asegurar que la muestra esté preparada apropiadamente para su examen. A continuación se describe un procedimiento para analizar tejido fijado con respecto a una muestra incluida.

La muestra 150 puede ser un bloque de material de inclusión que contiene una muestra de tejido. El material de inclusión puede tener propiedades mecánicas que pueden facilitar el seccionado. Los materiales para la inclusión incluyen, pero no se limitan a, parafina, resina (por ejemplo, resinas plásticas), polímeros, agarosa, nitrocelulosa, gelatina, mezclas de los mismos o similares. La parafina es una sustancia sólida blanca o en general incolora, insoluble en agua, que es resistente a muchos reactivos. La parafina puede ser una mezcla de hidrocarburos, principalmente de la serie alcalina obtenida del petróleo. Se puede usar una amplia gama de diferentes mezclas de hidrocarburos similares para hacer parafina, y estas mezclas pueden ser sólidas, semisólidas y/u oleosas. Las propiedades acústicas de estos tipos de materiales de inclusión se pueden conocer o se pueden determinar usando el analizador 114. Se puede analizar la velocidad del sonido que se propaga a través del bloque (incluyendo el tejido) para seleccionar un protocolo apropiado que se va a realizar con la muestra de tejido. Una amplia gama de variables diferentes (por ejemplo, dimensiones del bloque, grado de fijación del tejido, temperatura del bloque, temperatura del tejido, etc.) pueden afectar a la velocidad del sonido. Aunque la densidad del material de inclusión puede tener un impacto en la velocidad del sonido, las mediciones del TDV pueden proporcionar información importante sobre las propiedades del tejido, el estado de fijación del tejido, el procedimiento de impregnación usado para incluir el tejido o similares. La contribución a la velocidad del sonido por el tejido se puede aislar de la contribución a la velocidad del sonido del material de inclusión para evaluar las propiedades del tejido.

Después del análisis, la muestra incluida se puede cortar en secciones montables, colocarse en un portaobjetos de microscopio y a continuación secarse. Un microtomo puede cortar la muestra en secciones delgadas montables, por ejemplo, cortes del orden de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros de grosor. Cada sección puede incluir una parte de la muestra de tejido y algo del material de inclusión. Se pueden usar diferentes técnicas para transferir las muestras de tejido al portaobjetos de microscopio. En algunas disposiciones, las secciones cortadas se hacen flotar sobre agua para extender o aplanar las secciones. Si las secciones son trozos de tejido incluido en parafina, las secciones se pueden hacer flotar en un baño tibio para mantener las secciones en configuraciones en general planas, reduciendo o previniendo de este modo que se plieguen, se arruguen o se doblen. Se inserta un portaobjetos de microscopio en el baño tibio. Se usa una superficie anterior del portaobjetos para recoger las muestras de tejido.

Se pueden aplicar reactivos a las muestras de tejido. La composición del reactivo, tiempos de procesamiento o volumen de reactivo se pueden seleccionar basándose en la información obtenida por el sistema de procesamiento 100. Se pueden seleccionar protocolos de tinción para las muestras de tejido incluidas con información limitada o sustancialmente desconocida sobre la muestra de tejido 150. Incluso las muestras de tejido archivadas se pueden combinar con reactivos adecuados. Los reactivos incluyen, sin limitación, colorantes, agentes humectantes, sondas, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, etc.), líquidos de recuperación de antígenos (por ejemplo, soluciones de recuperación de antígenos de base acuosa o no acuosa, tampones de recuperación de antígenos, etc.), o similares. Los colorantes incluyen, sin limitación, tintes, colorantes de hematoxilina, colorantes de eosina, conjugados de anticuerpos o ácidos nucleicos con marcadores detectables

tales como haptenos, enzimas o restos fluorescentes, u otros tipos de sustancias para impartir color y/o para potenciar el contraste.

5 El analizador 114 se puede usar para determinar si la muestra 150 se ha fijado y, en caso afirmativo, el grado de fijación. Si la muestra 150 no se ha fijado, la muestra 150 se puede fijar. Si la muestra 150 está fijada apropiadamente, la muestra 150 se puede retirar del baño fijador o se puede desactivar el fijador. La desactivación del fijador 170 se puede lograr diluyendo el fijador, intercambiando líquidos, inactivando el fijador o similares.

10 Si la muestra 150 se ha dejado en el fijador 170 durante un período de tiempo ampliado, puede estar fijada. Las muestras a menudo se dejan involuntariamente en fijadores, por ejemplo, durante la noche. En dichos casos, la muestra puede no necesitar ninguna fijación adicional. El analizador 114 puede analizar las velocidades del sonido características de la muestra 150 y comparar la velocidad del sonido característica medida con una velocidad del sonido típica para el tipo de tejido de la muestra 150. Basándose en la comparación, el dispositivo informático 160 puede determinar el grado de fijación, si lo hay, de la muestra 150. Por ejemplo, si la velocidad del sonido no cambia una cantidad umbral dentro de un marco temporal esperado, la muestra 150 ya está fijada. Por tanto, la muestra 150 se puede retirar del baño de fijación o se puede detener el procedimiento de fijación para evitar una fijación excesiva. A modo de otro ejemplo, las características medidas se pueden comparar con los valores almacenados (por ejemplo, características de la velocidad del sonido del tejido fijado) para determinar el grado de fijación. Si la muestra 150 ya está fijada, la velocidad del sonido característica corresponderá a la velocidad del sonido del tejido fijado.

25 En la figura 17 se muestra un sistema de procesamiento 420 con un dispositivo informático 426 configurado para realizar comparación de señales, por ejemplo, captando y analizando cambios de velocidad de fase ultrasónica. El dispositivo informático 426 puede vigilar la perfusión, equilibrio térmico, contracción alcohólica, evaporación, fijación, combinaciones de los mismos o similares. El dispositivo informático 420 es similar al dispositivo informático 160 analizado en relación con la figura 3, excepto como se detalla a continuación.

30 Un generador de funciones 421 puede enviar señales a un dispositivo de sincronización 423 y a un transmisor 429. Un controlador 422 envía señales al dispositivo de sincronización 423 y a un mecanismo de colocación 430. El mecanismo de colocación 430 sitúa una muestra entre el transmisor 429 y un receptor 431 basándose, al menos en parte, en las señales del controlador 422.

35 El dispositivo de sincronización 423 puede sincronizar señales basándose en desplazamientos de fase, frecuencias emitidas/recibidas, comparaciones de señales o similares y emite señales a un sistema de captación 424. El sistema de captación 424 puede ser un sistema de captación de datos que se fundamenta en un reloj interno o externo. Por ejemplo, el sistema de captación 424 puede ser un Omega DAC 3000 vendido por Omega Engineering, Inc. o un tipo de dispositivo similar. También se pueden usar otros tipos de sistemas de captación, si es necesario o deseado.

40 Un acondicionador de señal 425 recibe la salida del generador de funciones 421 y la salida del receptor 431. Un comparador de fase/proporción analógico o digital 432 emite señales a un integrador 433 (por ejemplo, un integrador digital, un integrador analógico, etc.), que a su vez emite señales al sistema de captación 424. El acondicionador de señal 425 puede incluir otros componentes, circuitos, unidades de procesamiento de señal tales como DSP, FPGA, dispositivos de digital a analógico, dispositivos de analógico a digital, amplificadores (por ejemplo, amplificadores de ganancia), detectores de fase de ganancia RF/IF o similares.

50 Una unidad informática 434 recibe señales del sistema de captación 424 y puede incluir bases de datos de desplazamiento de frecuencia/fase para correlacionar desplazamientos o convoluciones de fase para la excitación modulada pulsada a estados de fijación, mapas de control, datos de fijación, protocolos o similares. La unidad informática 434 puede controlar los componentes del sistema informático 420. A modo de ejemplo, el generador de funciones 421 y el controlador 422 se pueden controlar para vigilar y procesar automáticamente la muestra 435.

55 El sistema 420 puede realizar mediciones de velocidad ultrasónica basándose en las diferencias de fase observadas entre el paquete de impulsos transmitido (por ejemplo, 100-300 ondas de longitud de onda constante) y el paquete de impulsos recibido después de la exposición al tejido de muestra 435. Las diferencias de fase se pueden medir como una diferencia de ángulo de fase absoluta con respecto a la longitud de onda de la frecuencia base del paquete de impulsos (por ejemplo, 0 grados a 360 grados).

60 En la figura 18 se muestra un sistema de procesamiento 450 que incluye un aparato de transporte 460 configurado para mover sucesivamente los portamuestras 470a, 470b, 470c, 470d (conjuntamente 470) a un analizador 480. El aparato de transporte 460 incluye brazos 520a, 520b, 520c, 520d (conjuntamente 520) que se extienden hacia afuera desde un miembro 490. Los portamuestras 470 se transportan por los respectivos brazos 520. El portamuestras 470a se muestra en el analizador 480. Para mover el portamuestras 470d al analizador 480, el miembro 490 se gira (por ejemplo, en el sentido de las agujas del reloj indicado por las flechas 496) alrededor de un eje de rotación 498 hasta que el portamuestras 470d se encuentre entre un transmisor 500 y un receptor 502 del analizador 480. Un mecanismo de colocación en forma de un motor de accionamiento 504 puede girar el

miembro 490 basándose en la retroalimentación del analizador 480. Un dispositivo informático, por ejemplo, puede controlar el motor 504 en respuesta a las señales del analizador 480. El motor 504 puede ser un motor de accionamiento, motor de pasos o similar.

5 Un fijador (no mostrado en la figura 18) contenido en un recipiente 488 puede fijar las muestras en los portamuestras 470. De forma ventajosa, cuando un trayecto entre el transmisor 500 y el receptor 502 no está obstruido, las características acústicas del medio se pueden evaluar para determinar cualquier cambio de la velocidad del sonido debido al medio. A continuación, el sistema de procesamiento 100 se puede recalibrar. Si la distancia entre el transmisor 500 y el receptor 502 es de aproximadamente 50 milímetros, se pueden enviar señales cada pocos milisegundos porque el tiempo de propagación total puede ser de aproximadamente 40  $\mu$ s. La frecuencia de la energía acústica transmitida, las propiedades focales de los transmisores y la geometría y las dimensiones de los transmisores se pueden seleccionar para lograr un tiempo de propagación total deseado. Se pueden enviar incontables señales a intervalos regulares o irregulares para determinar cualquier cambio de procesamiento que pueda afectar a los datos recopilados.

15 Las muestras se pueden vigilar individualmente mientras todas las muestras se someten a fijación. El sistema de procesamiento 450 también puede tener incontables analizadores 480. Por ejemplo, el sistema de procesamiento 450 puede tener analizadores que estén separados entre sí de modo que los portamuestras 470 se envíen sucesivamente a los analizadores. Los analizadores pueden tener diferentes tipos de componentes para evaluar diferentes propiedades de las muestras.

25 En la figura 19 se muestra un sistema de procesamiento 560 para procesar automáticamente muestras en diferentes líquidos. Las muestras se pueden procesar en lotes de modo que cada lote de muestras se procese usando el mismo protocolo. El sistema 560 incluye un aparato de accionamiento 570 con un carril 580 y un aparato de transporte 586 móvil a lo largo del carril 580. El aparato de transporte 586 incluye una varilla móvil verticalmente 588 conectada a un carro 590. El carro 590 se puede deslizar a lo largo del carril 580 para mover el aparato de transporte 586 entre los recipientes 592a, 592b.

30 Para mover el aparato de transporte 586 ilustrado al recipiente 592b, el carro 590 eleva el aparato de transporte 586 desde una posición bajada 593, como se indica mediante una flecha 594. Una vez que el aparato de transporte 586 está fuera del recipiente 592a, el carro 590 se puede mover a lo largo del carril 580, como se indica mediante las flechas 595. Una vez que el aparato de transporte elevado 586 está por encima del recipiente 592b, el carro 590 baja el aparato de transporte 586 en el recipiente 592b. De esta manera, los portamuestras transportados por el aparato de transporte 586 se pueden sumergir en medio de procesamiento en los recipientes 592a, 592b. En algunas disposiciones, el recipiente 592a contiene un fijador, y el medio de procesamiento del recipiente 592b es un agente de limpieza.

40 Se pueden usar incontables recipientes con el sistema de procesamiento 560 ilustrado. En la figura 20 se muestra un ejemplo del sistema de procesamiento 560 con recipientes 592a, 592b, 592c, 592d (conjuntamente 592). Un carro 590 puede transportar las muestras secuencialmente a los recipientes 592, que pueden contener una amplia gama de diferentes tipos de medios de procesamiento, incluyendo fijadores, agentes de limpieza (por ejemplo, xilina o similares), infiltraciones, agentes de deshidratación, reactivos o similares. El sistema de procesamiento 560 ilustrado incluye una unidad de preparación de tejidos 597 que comprende los recipientes 592b, 592c, 592d.

45 El recipiente 592a puede contener un fijador en el que se fijan las muestras. Después de la fijación, las muestras se pueden enviar secuencialmente a los recipientes 592b, 592c, 592d, cada uno de los cuales contiene un medio de preparación de tejidos, tal como un agente de deshidratación, un agente de limpieza, un agente de infiltración o similares. El dispositivo informático 160 puede generar un protocolo de preparación de tejidos usado para procesar las muestras en el recipiente 592b, que contiene un agente de deshidratación, tal como alcohol. La muestra de tejido se puede tratar con un agente de limpieza en el recipiente 592c. La muestra se puede tratar con un agente de infiltración en el recipiente 592d. El protocolo de preparación de tejidos puede incluir la duración de los tiempos de procesamiento en el medio de procesamiento, la composición del medio de procesamiento, la temperatura del medio de procesamiento o similares. Por supuesto, diferentes muestras con diferentes tipos de tejidos, dimensiones, etc. se pueden procesar durante diferentes períodos de tiempo. Como tal, se pueden generar diferentes protocolos de preparación de tejidos para diferentes tipos de tejidos para asegurar que las muestras se preparen adecuadamente para su inclusión.

60 En la figura 21 se muestra un sistema de procesamiento 550 para procesar muestras automáticamente y cargarlas con acceso aleatorio. El procesamiento STAT puede reducir el tiempo de diagnóstico para muestras de alta prioridad. El sistema de procesamiento 550 incluye un aparato de accionamiento 552 con un carril 553 y un dispositivo de manipulación, ilustrado como un robot de manipulación de 3 ejes 554, móvil a lo largo del carril 553. El robot de manipulación de 3 ejes 554 incluye un elevador 556 para transportar portamuestras a estaciones, ilustradas como los recipientes 555a, 555b, 555c (conjuntamente 555). Los portamuestras se pueden cargar en cualquier momento desde un mecanismo de alimentación 557a (ilustrado en línea discontinua) al recipiente 555a. Cada recipiente 555 incluye un mecanismo giratorio de colocación 561 para situar muestras secuencialmente en un canal de un analizador 559. Las muestras se pueden vigilar para asegurar una fijación apropiada. Se pueden

cargar nuevas muestras automáticamente en cualquier momento. A diferencia de las operaciones por lotes analizadas en relación con las figuras 18-20, una vez que se procesa una muestra, se puede retirar del recipiente mientras se procesan otras muestras.

5 Se pueden colocar portamuestras en el primer recipiente de procesamiento 555a que contiene formol frío o formol tibio. Las muestras se pueden alimentar secuencialmente a través de un canal de medición (por ejemplo, un canal de medición ultrasónica del TDV) para rastrear la progresión de la reacción en el recipiente 555a. Una vez que se completa un procedimiento de muestra de tejido, el robot de manipulación 554 puede retirar el portamuestras con la muestra procesada y moverlo a la siguiente estación de procesamiento 555b. La manipulación individual de los  
10 portamuestras puede permitir la fijación más rápida de las muestras que se van a trasladar antes y eludir las muestras de fijación más lenta, proporcionando de este modo tiempos de procesamiento personalizados optimizados por cada muestra individual. Esto incrementa el rendimiento total del sistema 550.

15 A modo de ejemplo, un portamuestras que transporta un tejido adiposo se puede procesar usando un protocolo de preparación de tejido adiposo y otro portamuestras que transporta tejido muscular se puede procesar usando un protocolo de preparación de tejido muscular. Los diferentes protocolos pueden proporcionar diferentes tiempos de procesamiento, diferentes ondas (por ejemplo, diferentes frecuencias, diferentes formas de onda, etc.), diferentes algoritmos de compensación o similares. Se puede seleccionar un protocolo basándose en los requisitos de tratamiento de la muestra individual debido a las variaciones de tamaño, tipo de muestra de tejido, antecedentes  
20 de muestras de tejido y/u otras características de las muestras. Si el tamaño/material de la muestra cambia, se puede seleccionar otro protocolo por el operario y/o seleccionar automáticamente por un sistema informático.

25 La información recopilada de las muestras se puede usar para procesar muestras posteriores. La información del tiempo de procesamiento obtenida de una muestra se puede usar para determinar *a priori* los tiempos de procesamiento para la siguiente estación o vigilancia (por ejemplo, vigilancia del TDV ultrasónico). El portamuestras puede incluir información (por ejemplo, código legible por máquina) que puedan leer lectores en los recipientes 555a-c. Una vez que se completa el procesamiento, las muestras se pueden infundir con parafina y se pueden descargar en una cola de salida 557b. Las muestras procesadas se pueden recoger en horarios cómodos.

30 En la figura 22 se muestra un sistema de procesamiento 556 que proporciona acceso aleatorio a muestras de tejido. El sistema de procesamiento 556 incluye un mecanismo de colocación de carrusel 557. Un elevador 558 puede sujetar y transportar portamuestras o muestras entre las estaciones de procesamiento 558a-j, ilustradas como recipientes abiertos.

35 En la figura 23 se muestra una estación 562 con una única cámara de reacción cerrada 563 y un sistema de colocación en forma de un mecanismo de accionamiento mecánico 564. Una bomba 566 puede intercambiar medios. Un sistema de válvula/multiplexor 567 acopla hidráulicamente los recipientes 567a-d. Adicionalmente o de forma alternativa, se pueden usar uno o más dispositivos de vacío para transportar líquidos entre recipientes. Se pueden usar incontables bombas multiplexoras, sistemas de válvulas, dispositivos de vacío, conductos,  
40 dispositivos térmicos, recipientes u otros dispositivos hidráulicos para manejar el medio de procesamiento.

45 La figura 24 es un diagrama de flujo de un sistema de flujo de trabajo 568. En general, el sistema de flujo de trabajo 568 se usa para rastrear muestras con la identificación del sujeto correspondiente desde la intervención quirúrgica hasta el procesamiento del tejido. La información obtenida de las muestras se puede incluir en los registros del sujeto y puede facilitar la generación de informes (por ejemplo, informes usados para el diagnóstico, vigilancia de pacientes, facturación, etc.), una pista de auditoría (por ejemplo, una pista de auditoría de etapas de manipulación de muestras), un registro de parámetros de procesamiento (por ejemplo un registro que se podría imprimir y como registro de calidad al final del procesamiento) o similares.

50 Las muestras se pueden vigilar mediante una etiqueta RFID activa (o pasiva) incluida o acoplada de otro modo al portamuestras. Una vez que se adquiere la muestra, se puede transferir al portamuestras específico. En algunos protocolos, la muestra se puede almacenar en un recipiente enfriado (~4 °C) con formol tamponado neutro al 10 % en volumen. Tras su entrada en el portamuestras y en el recipiente, la etiqueta RFID se puede programar, tal como pasando ante un dispositivo de comunicación (por ejemplo, un dispositivo lector/escritor) para rastrear el tiempo y  
55 permitir la asociación de la ID del paciente con la identificación única del dispositivo RFID. De forma alternativa, se podría usar un esquema de código de barras con una base de datos vinculada u otro código legible por máquina, si fuera necesario o deseado.

60 En 569, se extrae una muestra de un sujeto. La muestra puede ser una muestra de tejido extraída de un sujeto usando una aguja, una herramienta de biopsia o similar y puede ser una sección de tejido, un órgano, una sección de tumor, un frotis, una sección congelada, una preparación para citología o líneas celulares. Para obtener la muestra se puede usar también una biopsia por incisión, una biopsia con aguja gruesa, una biopsia por excisión, una biopsia aspirativa, una biopsia por punción con aguja gruesa, una biopsia estereotáctica, una biopsia abierta o una biopsia quirúrgica.  
65

En 571, la muestra se carga en un portamuestras con código legible por máquina. El código legible por máquina puede ser cualquier tipo de simbología óptica, patrón magnético o señal electromagnética o electrostática que tenga contenido informativo. Por ejemplo, el contenido informativo puede estar relacionado con la identidad de la muestra, el origen de la muestra, la cadena de custodia de la muestra, las instrucciones para procesar una muestra, información con respecto a las características de una muestra, resultados de la prueba para una muestra, imágenes de la muestra y similares.

El sistema de flujo de trabajo 568 puede incluir incontables dispositivos de comunicación que pueden leer y/o escribir información. Un dispositivo de comunicación puede ser cualquier tipo de máquina que pueda descifrar, traducir o interpretar la información contenida en un código legible por máquina, por ejemplo, un dispositivo que convierte el código en comandos para realizar un procedimiento automatizado o presentar la información en una forma legible por el ser humano o interpretable por el ser humano. Un dispositivo de comunicación puede ser un lector compatible con uno o más tipos diferentes de código legible por máquina, tal como simbologías ópticas, códigos de barras y similares. Los ejemplos de simbologías ópticas incluyen caracteres, códigos de barras y glifos de datos. Los ejemplos particulares de códigos de barras incluyen códigos de barras lineales, códigos de barras multidimensionales tales como simbologías apiladas en 2D y simbologías matriciales en 2D, y códigos de barras compuestos tales como simbologías de espacio reducido. Ejemplos aún más particulares de simbologías ópticas 2D incluyen PDF417, matriz de datos, *maxicode*, *vericode*, *codablock*, código azteca, código 16K y código QR. Los lectores de códigos de barras para estas e incontables otras simbologías ópticas son bien conocidos. Donde el código legible por máquina comprende caracteres (por ejemplo, caracteres alfanuméricos, tales como texto en inglés y números arábigos), el lector de códigos puede ser un lector óptico de caracteres (LOC). Las bandas magnéticas son solo un ejemplo de un dispositivo que puede almacenar información en forma de patrón magnético. Un ejemplo de un código electromagnético es una etiqueta RFID. Las etiquetas RFID incluyen típicamente una antena metálica pequeña y un chip de silicio, y pueden ser activas o pasivas. Los lectores de códigos RFID son bien conocidos, e incluyen típicamente una antena y un transceptor que recibe información de la etiqueta RFID. El contenido de información de una etiqueta RFID puede ser fijo o modificable. De forma alternativa, el dispositivo de comunicación puede ser un lector de códigos que incluye una cámara CCD y la cámara CCD se puede usar para la detección simultánea de muestras y la lectura de un código de barras o caracteres. Otros ejemplos de códigos legibles por máquina que se pueden usar incluyen rejillas de difracción de Bragg y códigos de micro o nanobarras (tales como patrones espaciales y espectrales de partículas fluorescentes o patrones espaciales de partículas magnéticas).

En 573, la muestra se puede pretratar para facilitar el procesamiento posterior. La muestra se puede pretratar con formol u otros medios. Los pretratamientos se analizan en relación con las figuras 39-42.

En 575, la muestra se puede enviar a un sistema de procesamiento y se somete a un procedimiento de fijación. Un usuario puede seleccionar la configuración basándose en la configuración del sistema de procesamiento. La muestra se puede vigilar durante la fijación. Los tiempos de procesamiento, los antecedentes de fijación, las características del tejido u otra información histológica se pueden usar para ajustar el procesamiento y asegurar el procesamiento apropiado del tejido histológico.

En 577, el tejido se puede preparar para su examen o almacenamiento. La muestra se puede incluir, seccionar y transferir a un portaobjetos de microscopio para su posterior procesamiento y análisis, tal como tinción, inmunohistoquímica o hibridación *in situ*. Para seccionar una muestra de tejido para su examen con microscopio óptico se puede cortar una tira de tejido relativamente delgada de una muestra de tejido grande de modo que se pueda transmitir luz a través de la tira delgada de tejido. Un microtomo puede cortar la muestra en secciones delgadas, por ejemplo, cortes del orden de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros de grosor. Cada sección puede incluir una parte de la muestra de tejido y algo del material de inclusión. El microtomo y cualquier otro equipo (por ejemplo, una estación de tinción, una estación de inclusión, un horno, etc.) usados en el sistema 556 pueden incluir dispositivos de comunicación para leer y/o escribir información en el portamuestras.

La muestra de tejido se puede transferir a un portaobjetos de microscopio, que puede incluir un código legible por máquina. En algunas disposiciones, las secciones cortadas se hacen flotar sobre agua para extender o aplanar las secciones. Si las secciones son trozos de tejido incluido en parafina, las secciones se pueden hacer flotar en un baño tibio para mantener las secciones en configuraciones en general planas, reduciendo o previniendo de este modo que se plieguen, se arruguen o se doblen. Se inserta un portaobjetos de microscopio en el baño tibio. Se usa una superficie anterior del portaobjetos para recoger las muestras de tejido. Para examinar múltiples muestras de tejido (por ejemplo, un conjunto de muestras de tejido, cada una extraída en una localización diferente de un sujeto) usando un único portaobjetos, se puede hacer flotar secuencialmente una pluralidad de las muestras de tejido sobre el portaobjetos. Estos portaobjetos húmedos se secan a continuación con el secador de portaobjetos y se cubren con un cubreobjetos.

En la figura 25 se muestra un analizador 598 que incluye una unidad transmisora 599 con una matriz de transmisores 600a, 600b, 600c, 600d (conjuntamente 600) y una unidad receptora 601 con una matriz de receptores 602a, 602b, 602c, 602d (conjuntamente 602). Los transmisores 600 están alineados con los respectivos

receptores 602. Los pares de transmisores 600 y receptores 602 pueden vigilar diferentes secciones de una muestra 604. El número de transmisores/receptores, las posiciones de los transmisores/receptores y la resolución espacial del analizador 598 se pueden seleccionar basándose en el tamaño de la muestra 604. Para ampliar la resolución espacial para cilindros tisulares relativamente pequeños, los diámetros focales de los transmisores 600 pueden ser relativamente pequeños. Por ejemplo, los diámetros focales pueden estar en un intervalo de aproximadamente 2 milímetros a aproximadamente 5 milímetros. También son posibles otros intervalos de diámetros focales. Otros medios de ajuste de las propiedades focales pueden incluir, sin limitación, lentes acústicas o aberturas frente a los transmisores/receptores. Los diámetros focales de los transmisores 600 se pueden solapar para asegurar que se analice toda la muestra 604. De forma alternativa, los diámetros focales de los transmisores 600 pueden estar separados entre sí.

Para analizar la muestra 604, se puede trasladar un portamuestras 606 a través de un hueco 608 entre la unidad transmisora 599 y la unidad receptora 601. En algunas disposiciones, el portamuestras 606 se traslada a través del hueco 608 usando un aparato de transporte. En otras disposiciones, el portamuestras 606 se inserta manualmente en el hueco 608.

En la figura 26 se muestra un analizador 620 con una unidad transmisora 621 y una unidad receptora 623. La unidad transmisora 621 incluye los transmisores 622a, 622b, 622c, 622d (conjuntamente 622). La unidad receptora 623 incluye los receptores 624a, 624b, 624c, 624d (conjuntamente 624). La matriz lineal de transmisores 622 y la matriz lineal de receptores 624 ilustrados pueden explorar una muestra 630.

Se pueden usar diferentes combinaciones de transmisores y receptores para proporcionar diferentes trayectos sonoros a través de muestras de tejido. Como se muestra, un transmisor 640 se puede comunicar con un receptor 642 de modo que los trayectos sonoros entre los transmisores 622 y los receptores 624 son en general perpendiculares a un trayecto sonoro entre el transmisor 640 y el receptor 642. Por tanto, se pueden realizar mediciones en diferentes direcciones. Dichas disposiciones son muy adecuadas para analizar muestras con propiedades anisótropas. Se puede seleccionar el número, tipos, orientaciones y posiciones de los transmisores/receptores basándose en las características de la muestra.

En la figura 27 se muestra un portamuestras 700 que incluye placas 710, 712 que están separadas y en general paralelas entre sí. Las aberturas 702, 704 facilitan el envío de ondas acústicas a una muestra de tejido. Se puede intercalar una muestra entre las placas 710, 712 y sostenerla en una configuración sustancialmente plana. La energía acústica se puede propagar en general perpendicular a las placas 710, 712 y puede pasar a través de las aberturas alineadas 702, 704.

Los elementos de barrera 714, 716 pueden bloquear las aberturas 702, 704, respectivamente. Cada uno de los elementos de barrera 714, 716 puede incluir, sin limitación, una malla, un material perforado, una red, una rejilla, una pantalla, papel metalizado, tela o cualquier otra estructura o material a través del cual las ondas acústicas se puedan propagar con una atenuación mínima, limitada, o sustancialmente nula. Los elementos de barrera 714, 716 pueden mantener por tanto la muestra dentro del portamuestras 700. Los elementos de barrera 714, 716 también pueden ser permeables para asegurar que una cantidad suficiente de la muestra se ponga en contacto con el medio de procesamiento.

En las figuras 28 y 29 se muestra un portamuestras 800 que en general es similar al portamuestras 700, excepto como se detalla a continuación. En la figura 29 se muestra el portamuestras 800 que contiene una muestra 810. El portamuestras 800 incluye transmisores 802a, 802b, 802c, 802d (conjuntamente 802) y receptores 804a, 804b, 804c, 804d (conjuntamente 804). Los transmisores 802 y los receptores 804 se pueden poner en contacto o estar cerca de la muestra 810 para minimizar la atenuación de la señal y otros problemas asociados a menudo con la transmisión a través de distancias relativamente grandes, y para minimizar o limitar la atenuación atribuible al medio de procesamiento (por ejemplo, si se forma un hueco entre la muestra 810 y las paredes del portamuestras 800).

Los transmisores 802 y los receptores 804 se pueden acoplar a un cuerpo principal 812. En determinadas disposiciones, los transmisores 802 y los receptores 804 están permanentemente acoplados o integrados al cuerpo principal 812. En otras disposiciones, los transmisores 802 y los receptores 804 están acoplados de forma desmontable al cuerpo principal 812 para permitir que los componentes se intercambien o retiren para su inspección, mantenimiento o similares. Para facilitar el contacto físico entre la muestra 810 y el medio de procesamiento, el portamuestras 800 puede tener incontables aberturas y puede estar hecho de un material permeable o semipermeable.

El portamuestras de tejido 700 de la figura 27 y el portamuestras de tejido 800 de las figuras 28 y 29 se pueden usar con el sistema de procesamiento 100 de las figuras 1 y 2, el sistema de procesamiento 450 de la figura 18, los sistemas de procesamiento 560 de las figuras 18-20, el sistema de procesamiento 550 de la figura 21, etc. Por tanto, los sistemas de procesamiento se pueden configurar para recibir una amplia gama de diferentes tipos de portamuestras con o sin transmisores o receptores, sensores, aberturas o similares.

En las figuras 30-36 se muestran mediciones generadas de un sistema de procesamiento que analiza muestras. En las figuras 30 y 31 se muestran mediciones realizadas con FTN a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C). Se usó un baño caliente de FTN para obtener las mediciones de las figuras 32-35. Se pueden usar baños calientes para reducir los tiempos de fijación. En la figura 36 se muestra una serie de control negativa en agua.

En referencia a la figura 30, se cortó músculo bovino en trozos de aproximadamente 4 mm a 5 mm de grosor y se fijó en incrementos de tiempo de aproximadamente menos de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas. Se midió el TDV mientras el fijador se mantuvo a temperatura ambiente. Como se muestra, se observó un cambio de la velocidad del sonido equivalente de aproximadamente 1.580 m/s a aproximadamente 1.610 m/s.

En la figura 31 se muestra el tiempo de fijación frente a la velocidad del sonido y el cambio relativo del TDV. Las mediciones se obtuvieron usando una muestra de músculo bovino con un grosor de aproximadamente 4 mm. Se usó vigilancia en línea para vigilar la fijación en un baño de FTN durante aproximadamente 21 horas. Se observó un cambio de la velocidad del sonido equivalente de aproximadamente 1.520 m/s a aproximadamente 1.580 m/s.

En la figura 32 se muestra el tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV en un baño caliente de formol tamponado neutro (FTN). Se cortó una muestra de tejido de tejido muscular bovino perpendicularmente a sus fibras. La muestra de tejido tenía un grosor de aproximadamente 4 mm y se fijó en un baño caliente de FTN. El baño de FTN se mantuvo a una temperatura de aproximadamente 47 °C con un control de aproximadamente +/-1 °C.

En la figura 33 se muestra el tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV de tejido adiposo en un baño caliente de FTN. El tejido adiposo tenía un grosor de aproximadamente 4 mm. El baño de FTN caliente se mantuvo a una temperatura de aproximadamente 47 °C con un control de temperatura de aproximadamente +/-1 °C.

En la figura 34 se muestra el tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV de tejido hepático en un baño caliente de FTN. Se fijó una muestra de tejido hepático con un grosor de aproximadamente 4 mm en el baño caliente de FTN mantenido aproximadamente a 47 °C con un control de temperatura de aproximadamente +/-1 °C.

En la figura 35 se muestra el tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV de tejido de amígdalas humanas en un baño caliente de FTN. La muestra de tejido se fijó usando un baño de FTN caliente mantenido a aproximadamente 47 °C con un control de temperatura de aproximadamente +/-1 °C.

En la figura 36 se muestra el tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal y el cambio del TDV de tejido muscular bovino en un baño de control negativo de agua desionizada. La muestra de tejido tenía un grosor de aproximadamente 4 mm. El baño se calentó y se mantuvo aproximadamente a 47 °C con un control de temperatura de aproximadamente +/-1 °C.

Se usaron dos protocolos para analizar diferentes tipos de tejido. En un protocolo se fijaron diferentes muestras durante diferentes duraciones de tiempos y se mantuvieron aproximadamente a temperatura ambiente. Se midió la amplitud de la señal en estrecha sucesión. En el otro protocolo se vigilaron continuamente las mismas muestras y se mantuvieron a temperaturas elevadas hasta que los niveles de las señales alcanzaron una situación estable.

Ambos protocolos produjeron resultados similares, proporcionando el procesamiento a temperatura elevada una fijación más rápida. Las mediciones (por ejemplo, mediciones de la velocidad del sonido) a temperaturas mayores están sujetas a más fluctuaciones debido a los gradientes de temperatura en el medio entre el transmisor y el receptor y los efectos de calentamiento del tejido de muestra y el portamuestras, que se introdujeron inicialmente a temperatura ambiente y se tuvieron que equilibrar. En otro protocolo, una muestra y un portamuestras se calentaron brevemente (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos) externamente a aproximadamente 47 °C antes de insertarlos en el canal de medición con resultados similares.

Los resultados de las mediciones del TDV y la atenuación de la señal se muestran en las figuras 37 y 38 para la comparación entre diferentes tipos de tejido. En la figura 37 se muestra el tiempo de fijación frente a la amplitud de la señal para carne de bovino en agua (que sirve como control negativo) y grasa, carne de bovino, hígado y amígdalas en un fijador. El fijador se mantuvo a una temperatura de aproximadamente 50 °C. Hay un incremento de la amplitud recibida en el tejido adiposo. Esto se puede deber a mejores capacidades de transmisión, cambios de la densidad, combinaciones de los mismos o similares debido a la perfusión del fijador y la reticulación resultante.

En la figura 38 se muestra el tiempo de fijación frente al cambio del TDV para diferentes tipos de tejido mantenidos a aproximadamente 50 °C. El tejido adiposo respondió con un declive exponencial del cambio de la velocidad del sonido durante la fijación. Esto se puede deber a un coeficiente de temperatura negativo de la grasa y a los efectos del calentamiento del tejido debido a las pruebas a temperatura elevada. El tejido muscular respondió con un crecimiento exponencial del cambio de la velocidad del sonido debido principalmente a la reticulación. El cambio

de crecimiento también se puede incrementar debido a las temperaturas elevadas. Las figuras 30 y 31 muestran un incremento similar de aproximadamente 60 ns a aproximadamente 100 ns (o aproximadamente 60 m/s de velocidad del sonido) observado a temperatura ambiente, y puede estar relacionado con la fijación.

- 5 En la tabla 2 a continuación se muestran las velocidades del sonido en diferentes tipos de muestras. Las muestras tenían un grosor de 4 mm y se fijaron con un fijador mantenido a aproximadamente 47 °C.

TABLA 2

Tipo de tejido	Velocidad sin fijar a 47 °C [m/s]	Velocidad fijada a 47 °C [m/s]	Cambio de la velocidad del sonido [m/s]	Cambio de la amplitud de la señal [%]
Grasa (bovina)	1.687	1.387	-308	+381 %
Músculo (bovino)	1.618	1.681	+63	-58 %
Hígado (ternera)	1.767	1.737	-30	-38 %
Amígdala (humana)	1.672	1.702	+30	+27 %

10 Si se conoce el tipo de tejido de una muestra, los cambios de la velocidad del sonido (por ejemplo, incrementos de la velocidad del sonido, disminuciones de la velocidad del sonido o combinaciones de los mismos) se pueden usar para determinar el tipo de tejido. Por ejemplo, si una muestra de un tipo de tejido desconocido tiene una velocidad sin fijar de aproximadamente 1.687 m/s y la velocidad del sonido disminuye a medida que se fija el tejido, se puede concluir que el tejido puede ser tejido adiposo bovino. Por supuesto, la velocidad del sonido sin fijar del tejido se puede comparar con la velocidad del sonido fijada para determinar el tipo de tejido con un alto grado de exactitud. Los diferentes tipos de muestras de tejido tienen diferentes velocidades del sonido características.

15 Las muestras se pueden pretratar para facilitar la fijación (por ejemplo, potenciar la uniformidad de la fijación, reducir el tiempo de fijación, etc.) y/o la vigilancia. En algunos protocolos, una muestra se puede remojar en medio para gestionar los efectos de la perfusión a través de la muestra. Si la muestra se fija usando formol, la muestra se puede remojar previamente en formol para asegurar una difusión suficiente de formol en las regiones interiores de la muestra sin cantidades sustanciales de reticulación. En la figura 39 se muestra el tiempo frente a una señal del TDV para diferentes muestras de tejido. La muestra de tejido previamente remojada se sumergió en formol frío a 4 °C durante aproximadamente 2 horas. La muestra previamente remojada se sumergió a continuación en un baño de formol a alta temperatura (por ejemplo, un baño de FTN al 10 % a aproximadamente 45 °C) para provocar la reticulación y acelerar el procedimiento de fijación. La curva con remojo previo muestra que la señal del TDV disminuye gradualmente a medida que se fija la muestra. Si la muestra se procesa con solución de glicerol, la muestra se puede remojar previamente en solución de glicerol u otro tipo de medio con características similares a las características de la solución de glicerol.

20 El remojo previo minimiza, limita o elimina sustancialmente los efectos del desplazamiento del agua que cambia significativamente las características acústicas de la muestra de tejido. Una comparación de la curva con remojo previo y la curva sin remojo previo muestra que el remojo previo limita o elimina sustancialmente los cambios del TDV atribuibles a que la perfusión del medio provoca el desplazamiento del agua de menor densidad en el tejido. El incremento inicial de los datos de comparación de fase para el tejido sin remojo previo se puede provocar por la perfusión del medio (por ejemplo, perfusión de formol) en el tejido, que desplaza de este modo el agua de menor densidad con formol de mayor densidad (por ejemplo, debido a los fosfatos que contiene). La fase de desplazamiento va seguida típicamente de la fase de reticulación, como se indica por la señal del TDV que disminuye o se incrementa rápidamente. Se puede vigilar una amplia gama de diferentes tipos de procedimientos de perfusión de líquidos porque la mayoría de los medios de procesamiento provocan un cambio de densidad de la muestra.

25 Los cambios de temperatura de las muestras de tejido pueden afectar a las mediciones del TDV. Las muestras pueden estar a una temperatura que en general es igual a la temperatura del medio para minimizar, limitar o eliminar sustancialmente los cambios del TDV atribuibles a los cambios de densidad provocados por los cambios de temperatura. Si la muestra está a una temperatura diferente de la temperatura del medio, se puede tener en cuenta el equilibrio térmico porque el equilibrio térmico se puede lograr dentro de unos pocos minutos después de la inmersión en la solución tibia. Por ejemplo, si una muestra a 4 °C se sumerge en un baño de formol tibio (por ejemplo, un baño a 45 °C), la muestra puede alcanzar el equilibrio térmico en menos de aproximadamente cinco minutos. Basándose en el tamaño y las características del tejido (por ejemplo, características térmicas), se puede estimar el tiempo para alcanzar el equilibrio térmico.

30 Los procedimientos que provocan cambios en la estructura del tejido se pueden vigilar usando las mediciones del TDV. Por ejemplo, un procedimiento de deshidratación puede provocar cambios mecánicos medibles en el tejido. En la figura 40 se muestra el tiempo frente a la señal del TDV para una amígdala humana. El procesamiento de deshidratación provoca cambios significativos en el TDV mayores que los cambios del TDV provocados por la fijación. La amígdala humana se deshidrató usando una solución de etanol al 70 % en volumen y se deshidrató

además usando una solución de etanol al 100 % en volumen. Las señales del TDV que se muestran en la figura 40 se generaron usando algoritmos de detección de fase que cubren múltiples longitudes de onda.

En otros protocolos de deshidratación, el tejido se expone a concentraciones graduales de alcohol, para eliminar en primer lugar los tampones fosfato con una mezcla de etanol al 70 %/agua, seguido de etapas adicionales en etanol al 95 % y al 100 % en volumen para deshidratar además el tejido fijado. El tejido se puede someter a una contracción sustancial (por ejemplo, más de un 10 % de su volumen original). La cantidad de contracción se puede determinar usando mediciones del TDV. La contracción del tejido se puede detectar mediante la vigilancia del TDV debido al cambio resultante en la muestra de tejido (por ejemplo, endurecimiento del tejido, contracción del tejido, etc.).

La vigilancia se puede usar para evaluar si las muestras se procesan apropiadamente. En la figura 41 se muestra el tiempo frente a las señales del TDV de un procedimiento de deshidratación con alcohol. La deshidratación con alcohol se puede fundamentar en una reticulación suficiente establecida durante el procedimiento de fijación. La compresión del tejido resultante durante los procedimientos de deshidratación se puede conocer empíricamente por producir efectos tisulares más disruptivos (tales como desgarro y contracción de células y núcleos) cuando se omite la etapa de fijación o es demasiado corta. En la figura 41 se muestran diferencias en la señal del TDV en alcohol al 70 % en volumen de tejido insuficientemente fijado frente al tejido fijado apropiadamente. El tiempo global del procedimiento del tejido sin fijar en alcohol es significativamente mayor y los cambios observados del TDV son mucho mayores que en el tejido fijado (después de 24 horas de fijación estándar).

Las muestras se pueden procesar sucesivamente en diferentes medios para potenciar las mediciones del TDV. Se puede realizar un primer procedimiento de deshidratación en un medio de preacondicionamiento. Por ejemplo, una muestra se puede sumergir en un baño de alcohol al 70 % en volumen durante aproximadamente 15 minutos. La muestra parcialmente deshidratada se somete a continuación a un segundo procedimiento de deshidratación que implica sumergir la muestra parcialmente deshidratada en un baño de alcohol al 100 % en volumen. Como se muestra en la figura 42, el preacondicionamiento produce una respuesta del TDV mucho mayor en el baño de alcohol al 100 % en comparación con una muestra procesada en un baño de alcohol al 70 % durante aproximadamente 2 horas. La respuesta en la compresión del tejido es probablemente mucho mayor cuando se omite o se realiza durante muy poco tiempo la etapa de alcohol al 70 %.

Se pueden usar protocolos de compensación para minimizar, limitar o eliminar sustancialmente el ruido no deseado provocado por los factores ambientales. Los factores ambientales pueden incluir, sin limitación, cambios de temperatura debido a la temperatura ambiente, pérdidas por evaporación, cambios en la densidad del medio (por ejemplo, debido a reacciones químicas) o similares. Si la temperatura del medio fluctúa, la densidad del medio también puede fluctuar y dar lugar a ruido en las mediciones del TDV. Un dispositivo térmico (por ejemplo, un dispositivo de calentamiento/enfriamiento) puede mantener el medio dentro de un intervalo de temperatura deseado o a una temperatura deseada. Adicionalmente, un recipiente que contiene el medio se puede aislar térmicamente para minimizar o limitar los cambios de temperatura.

Los recipientes se pueden cerrar para evitar pérdidas por evaporación para minimizar, limitar o evitar sustancialmente la deriva. La evaporación del medio puede dar como resultado un cambio gradual del TDV con el tiempo. Por ejemplo, un cambio total del TDV de aproximadamente 25 nanosegundos puede resultar de aproximadamente 15 horas de evaporación. Se pueden colocar tapas o cubiertas en los recipientes para evitar o limitar la evaporación. De forma alternativa o adicionalmente, se puede bombear medio a un recipiente para mantener una característica deseada del medio.

Se pueden usar esquemas de compensación para minimizar, limitar o eliminar substancialmente las influencias ambientales usando un canal de referencia (es decir, una posición donde se toman datos, pero el tejido o el casete no están en la ruta del haz). Los valores de los datos en esta posición se pueden restar de los valores en las posiciones diana.

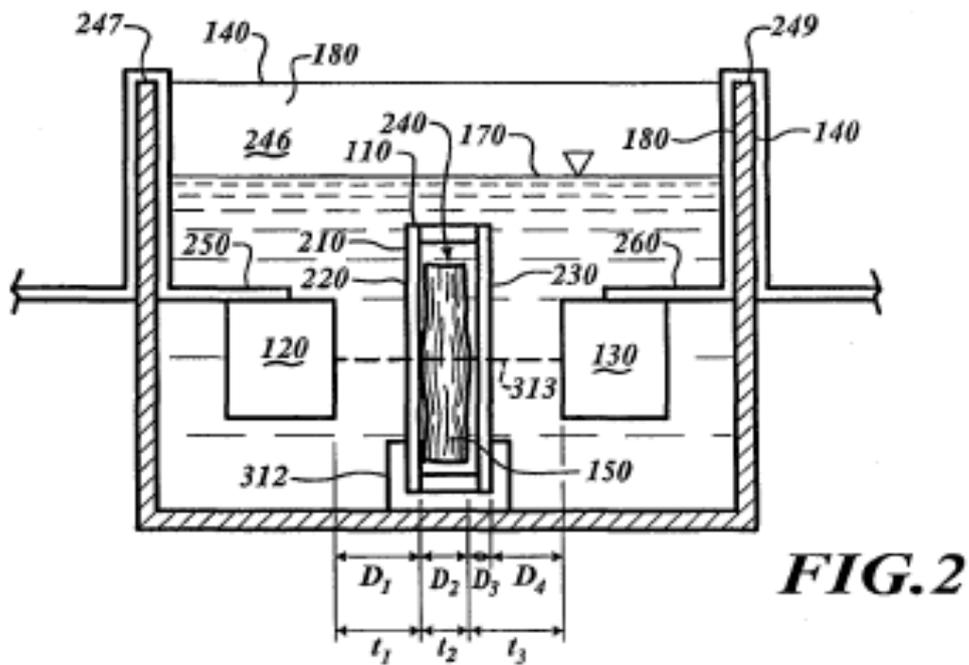
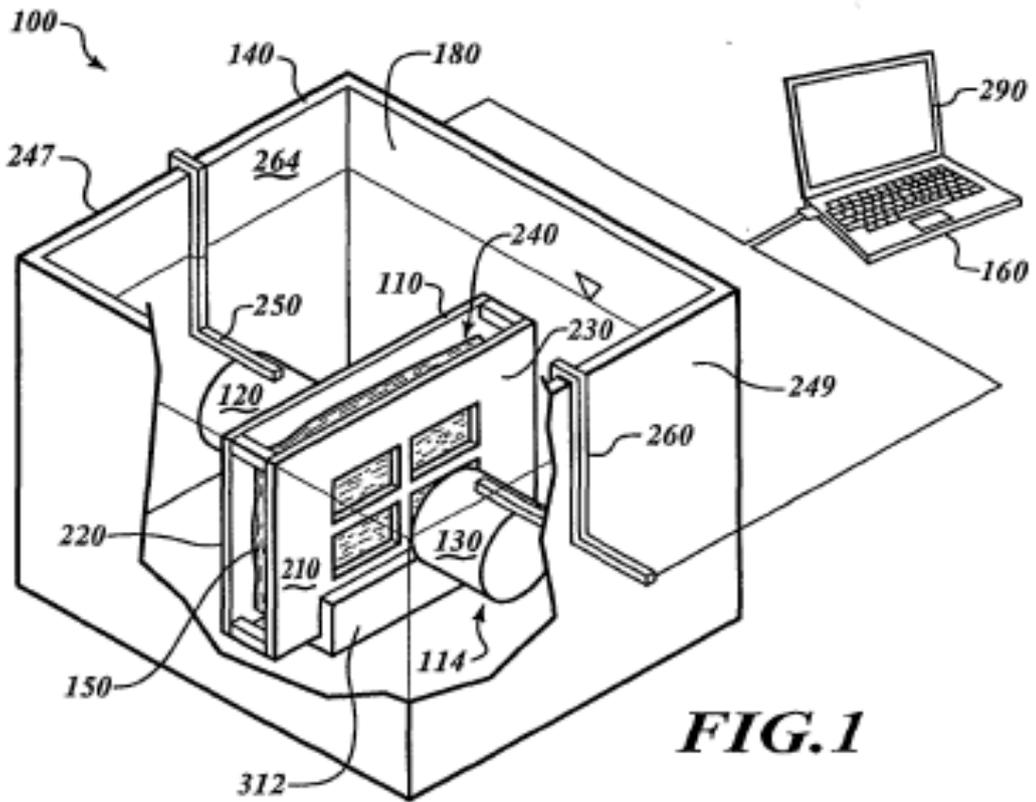
Se puede usar una amplia gama de rutinas de procesamiento de señales para analizar las señales analizadas en el presente documento. Se pueden utilizar rutinas de filtrado, rutinas de compresión (por ejemplo, rutinas de compresión de impulsos verdaderos), rutinas de correlación cruzada, recuperación de señales de autocorrelación (especialmente en entornos ruidosos) o similares. El procesamiento de señales es especialmente muy adecuado cuando las muestras se encuentran en recipientes relativamente pequeños en los que puede haber ondas estacionarias, reflejos y ecos. Se pueden seleccionar por tanto rutinas de procesamiento de señales para mejorar significativamente las proporciones señal/ruido.

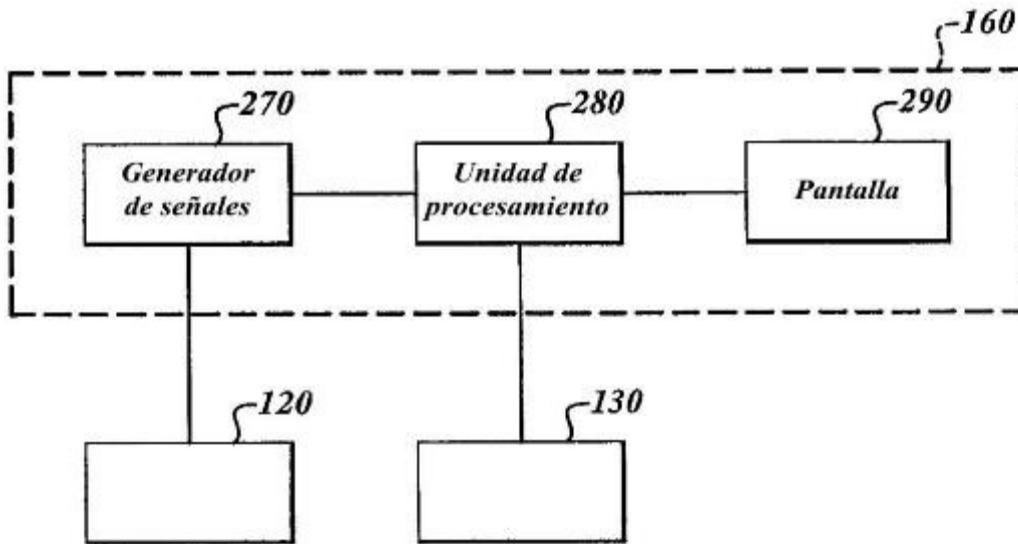
Cabe destacar que, como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a un analizador que incluye "un transmisor" incluye un único transmisor, o dos o más transmisores. Cabe destacar también que el término "o" se emplea en general en su sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo.

**REIVINDICACIONES**

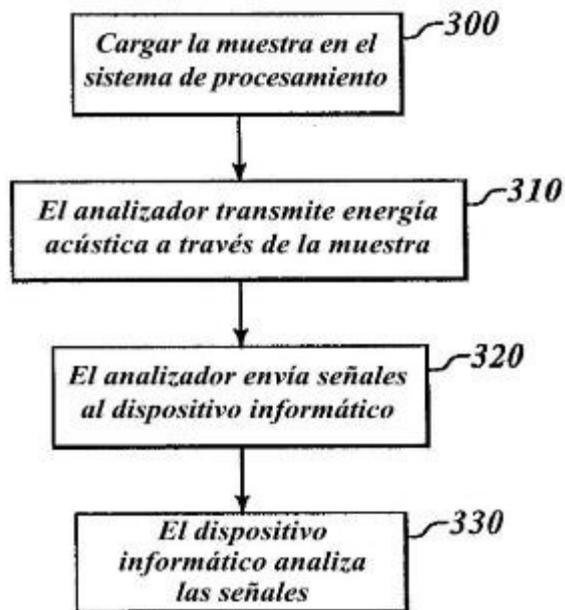
1. Un procedimiento de evaluación de una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento
- 5 - realizar un procedimiento histológico en una muestra biológica (150), en el que la muestra biológica (150) se ha extraído de un sujeto para alterar la muestra biológica (150); y
- vigilar un estado de la muestra biológica (150) basándose en el tiempo de vuelo de las ondas acústicas transmitidas a través de al menos una parte de la muestra biológica (150) mientras se realiza el procedimiento histológico en la muestra biológica (150).
- 10
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la vigilancia del estado de la muestra biológica incluye:
  - evaluar un cambio de velocidad de al menos algunas de las ondas acústicas que se propagan a través de la parte de la muestra biológica después de realizar al menos una parte del procedimiento.
- 15
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - generar un protocolo de tinción basándose en el estado de la muestra biológica.
- 20
4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - realizar un procedimiento histológico en la muestra biológica basándose en el estado de la muestra biológica, en el que el estado es al menos uno de un estado de densidad y un estado de fijación.
- 25
5. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además transmitir las ondas acústicas a través de un grosor de la muestra biológica.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - reflejar al menos algunas de las ondas acústicas de la muestra biológica;
  - recibir las ondas acústicas reflejadas; y
- 30
- evaluar las ondas acústicas que penetran en la muestra biológica y las ondas acústicas reflejadas para evaluar el cambio de velocidad.
- 35
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la vigilancia del estado de la muestra biológica comprende:
  - determinar un desplazamiento de fase entre una señal emitida para generar las ondas acústicas transmitidas y una señal recibida de las ondas acústicas que se han propagado a través de la muestra biológica.
- 40
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - determinar un cambio en un tiempo de vuelo de las ondas acústicas provocado por el procedimiento, en el que el procedimiento es un procedimiento de fijación.
- 45
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - almacenar información sobre un cambio de velocidad de las ondas acústicas; y
  - realizar un procedimiento en otra muestra biológica basándose en la información almacenada.
- 50
10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - almacenar información;
  - comparar un cambio de velocidad de las ondas acústicas con la información almacenada; y
- 55
- controlar el procedimiento histológico basándose en la comparación entre el cambio de velocidad de las ondas acústicas y la información almacenada.
- 60
11. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - analizar datos usando al menos uno de un algoritmo de compensación y un algoritmo suavizador.
- 65

12. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- realizar un procedimiento en una pluralidad de muestras biológicas;
- 5
- obtener al menos una característica de velocidad del sonido para cada una de las muestras biológicas;
  - correlacionar las características de velocidad del sonido con las muestras biológicas respectivas;
  - almacenar las características de velocidad del sonido correlacionadas; y
- 10
- realizar el procedimiento histológico en la muestra biológica basándose en al menos una de las características de velocidad del sonido almacenadas.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- 15
- realizar un procedimiento de fijación en la muestra biológica para fijar al menos una parte de la muestra biológica;
  - evaluar un cambio de la velocidad del sonido que se propaga a través de la muestra biológica usando las ondas acústicas que se propagan a través de la muestra biológica después de realizar al menos una parte del procedimiento de fijación; y
  - ajustar el procedimiento de fijación basándose en la evaluación del cambio de la velocidad del sonido.
- 20
14. Un sistema de procesamiento (100) para evaluar una muestra biológica (150), comprendiendo el sistema de procesamiento (100):
- 25
- un transmisor (120) configurado para emitir energía acústica a través de una muestra biológica (150) que se ha extraído de un sujeto;
- 30
- un receptor (130) configurado para detectar la energía acústica que se ha propagado a través de la muestra biológica (150) después de que al menos una característica acústica de la muestra biológica (150) se ha alterado debido a la realización de un procedimiento histológico en la muestra biológica (150); y
- 35
- un dispositivo informático (160) acoplado de forma comunicativa al transmisor (120) y al receptor (130), caracterizado por que el dispositivo informático (160) se configura para evaluar una velocidad de la energía acústica que se propaga a través de la muestra biológica (150) basándose en un tiempo de vuelo de la energía acústica.
- 40
15. El sistema de la reivindicación 14, en el que el dispositivo informático se configura para evaluar cambios de velocidad de la energía acústica para determinar un estado de fijación de la muestra biológica.

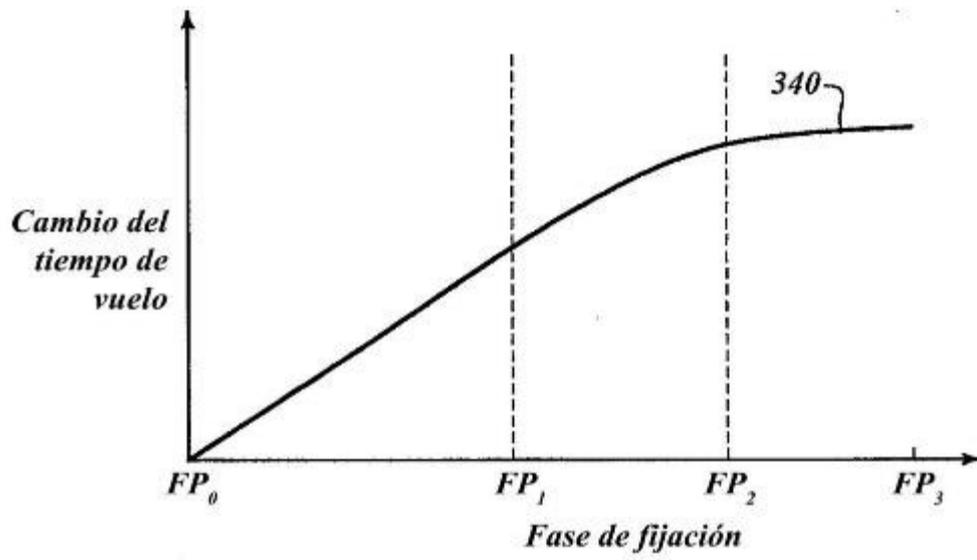




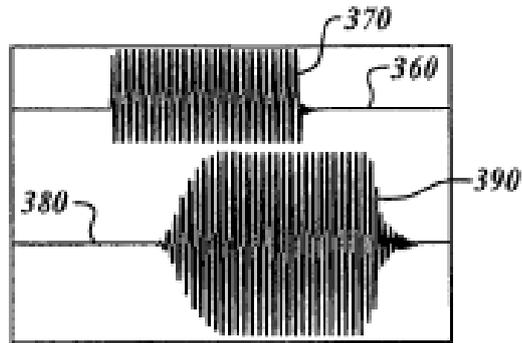
**FIG.3**



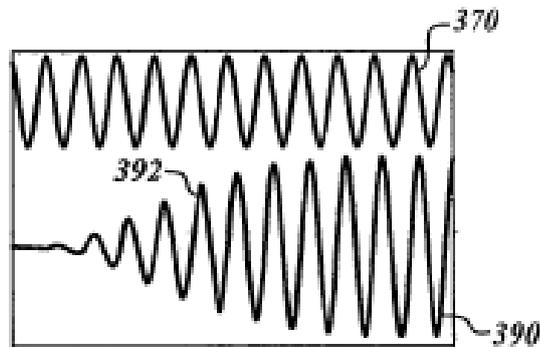
**FIG.4**



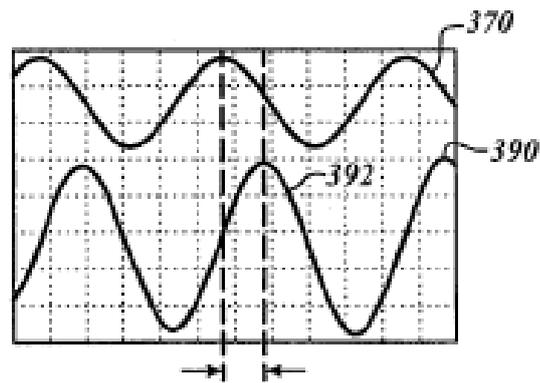
**FIG.5**



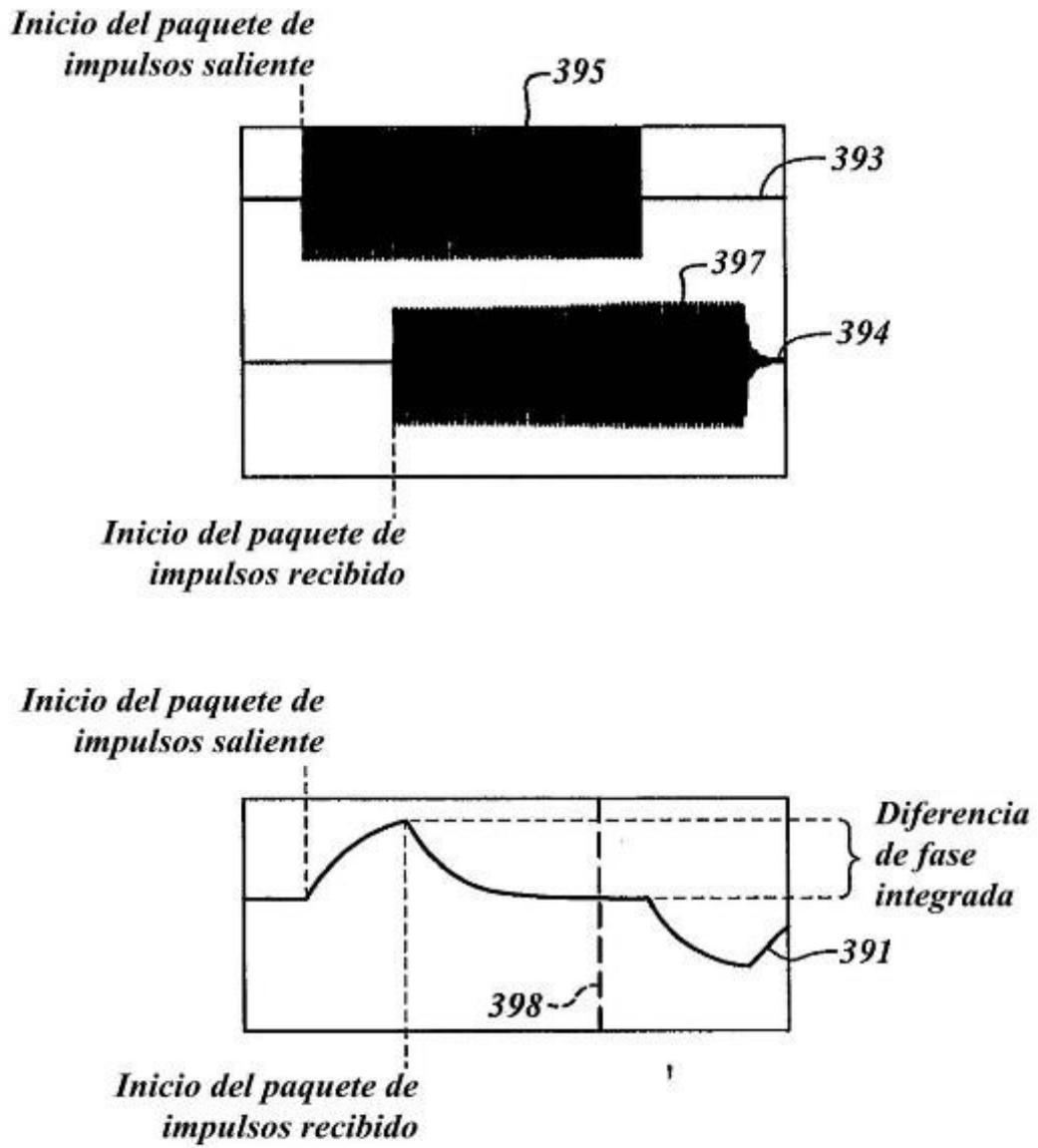
**FIG. 6**



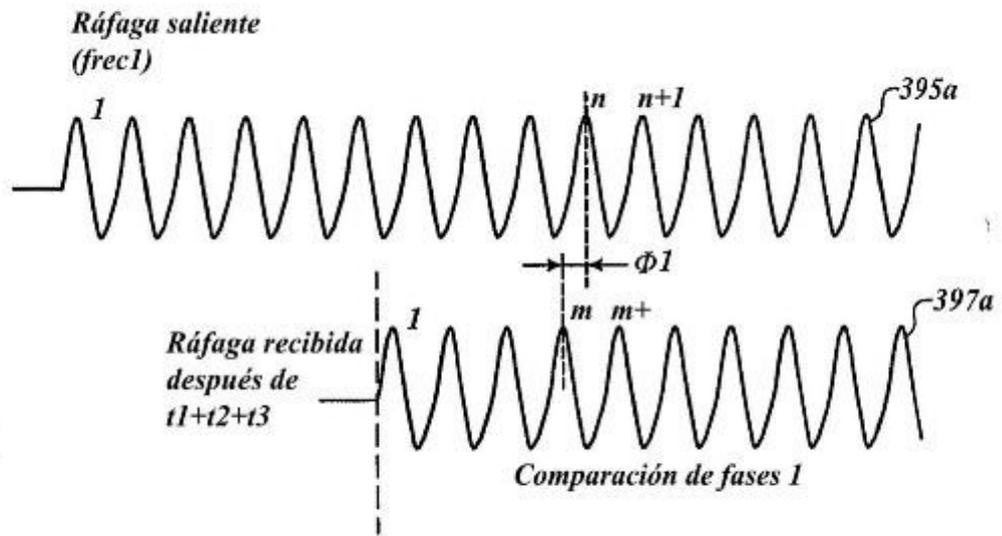
**FIG. 7**



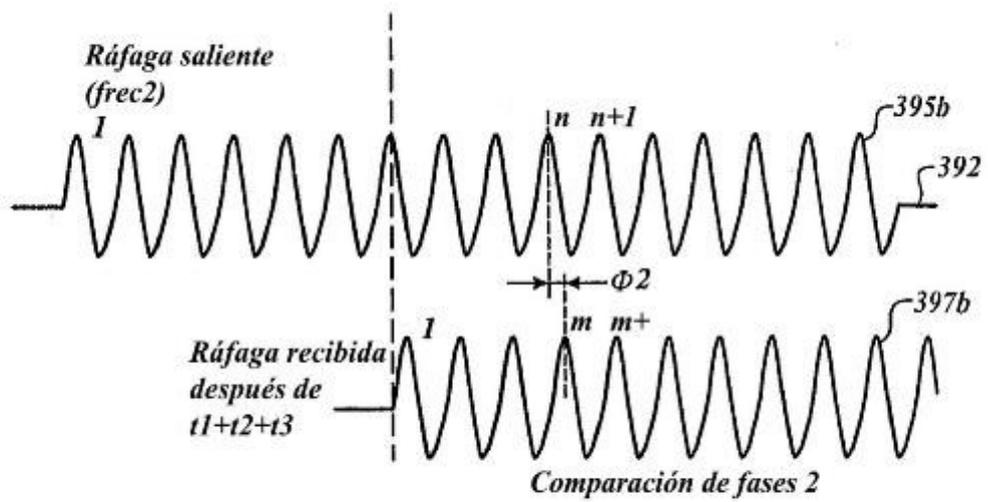
**FIG. 8**



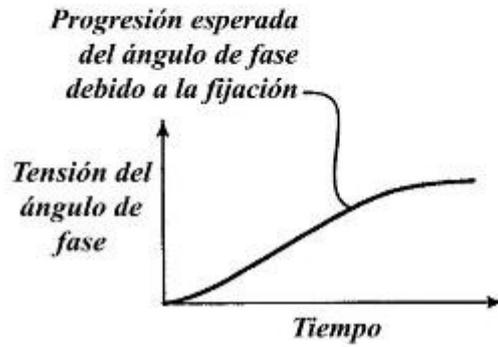
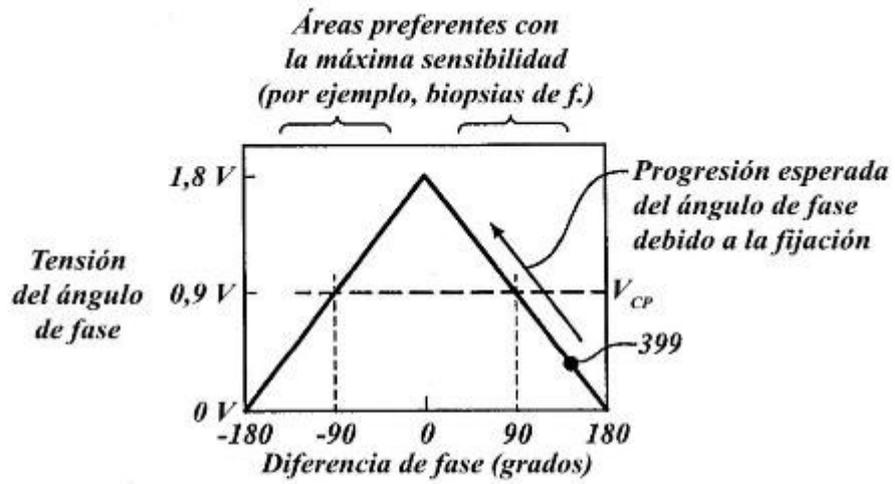
**FIG.9**



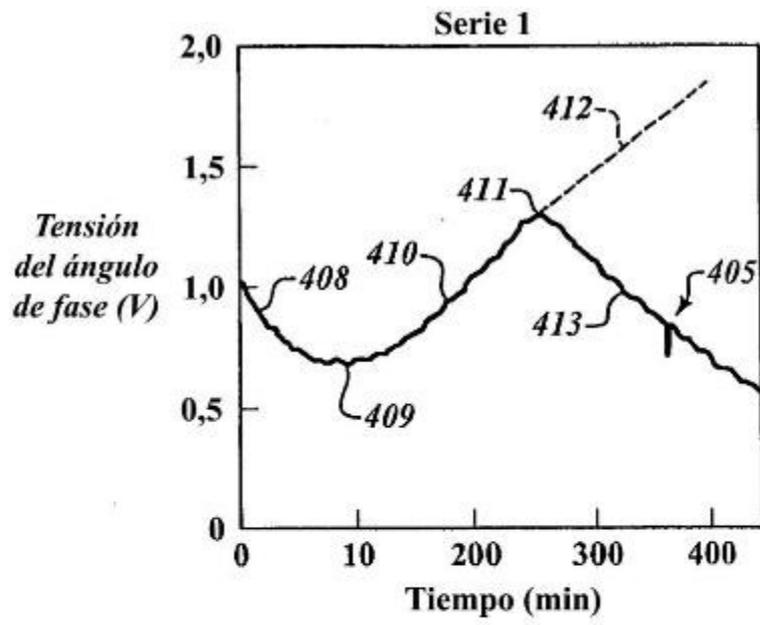
**FIG.10A**



**FIG.10B**

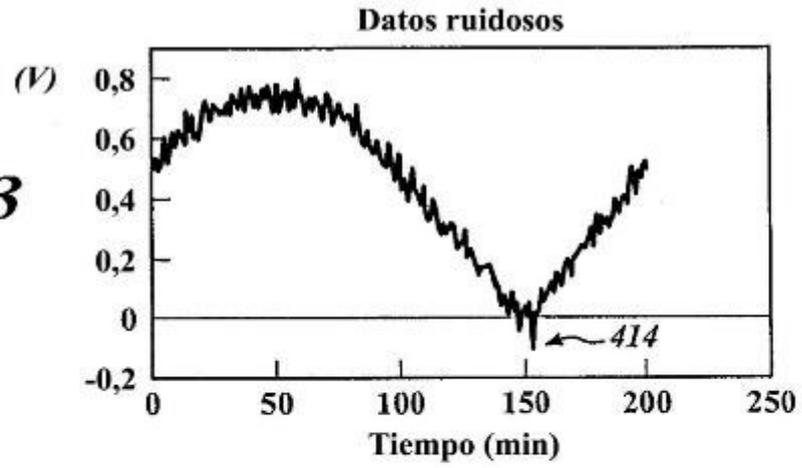


**FIG.11**

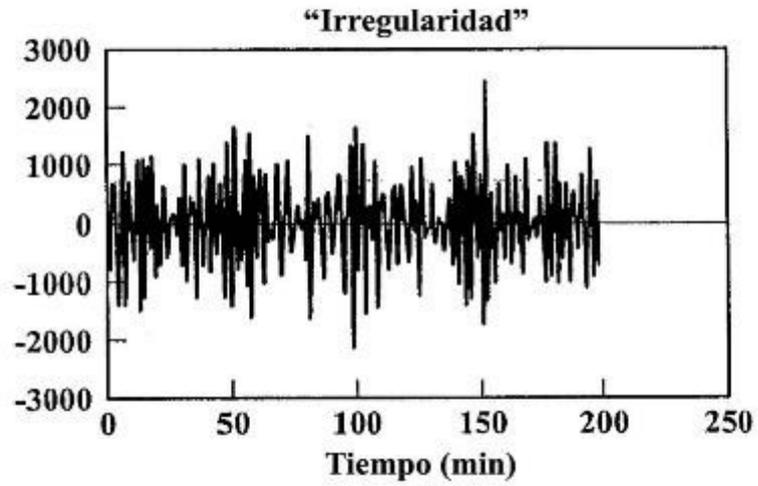


**FIG. 12**

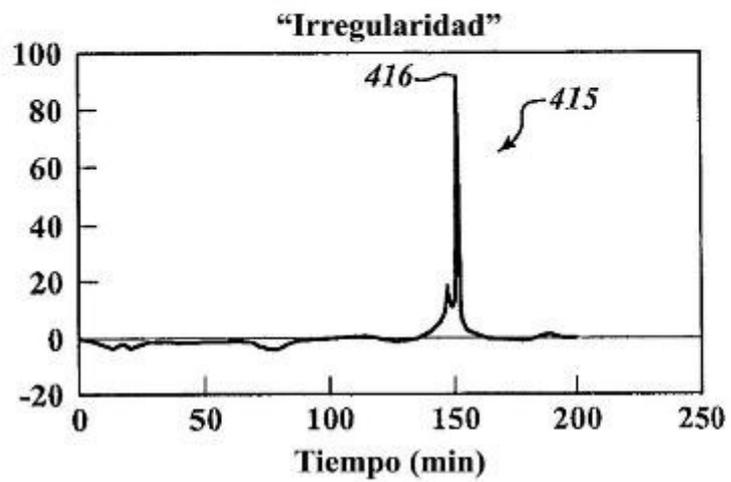
**FIG.13**

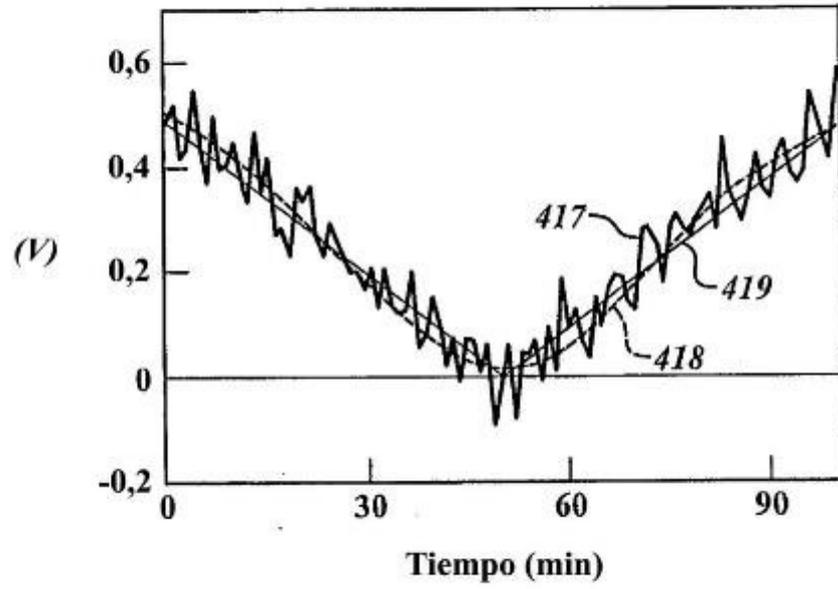


**FIG.14**



**FIG.15**





**FIG.16**

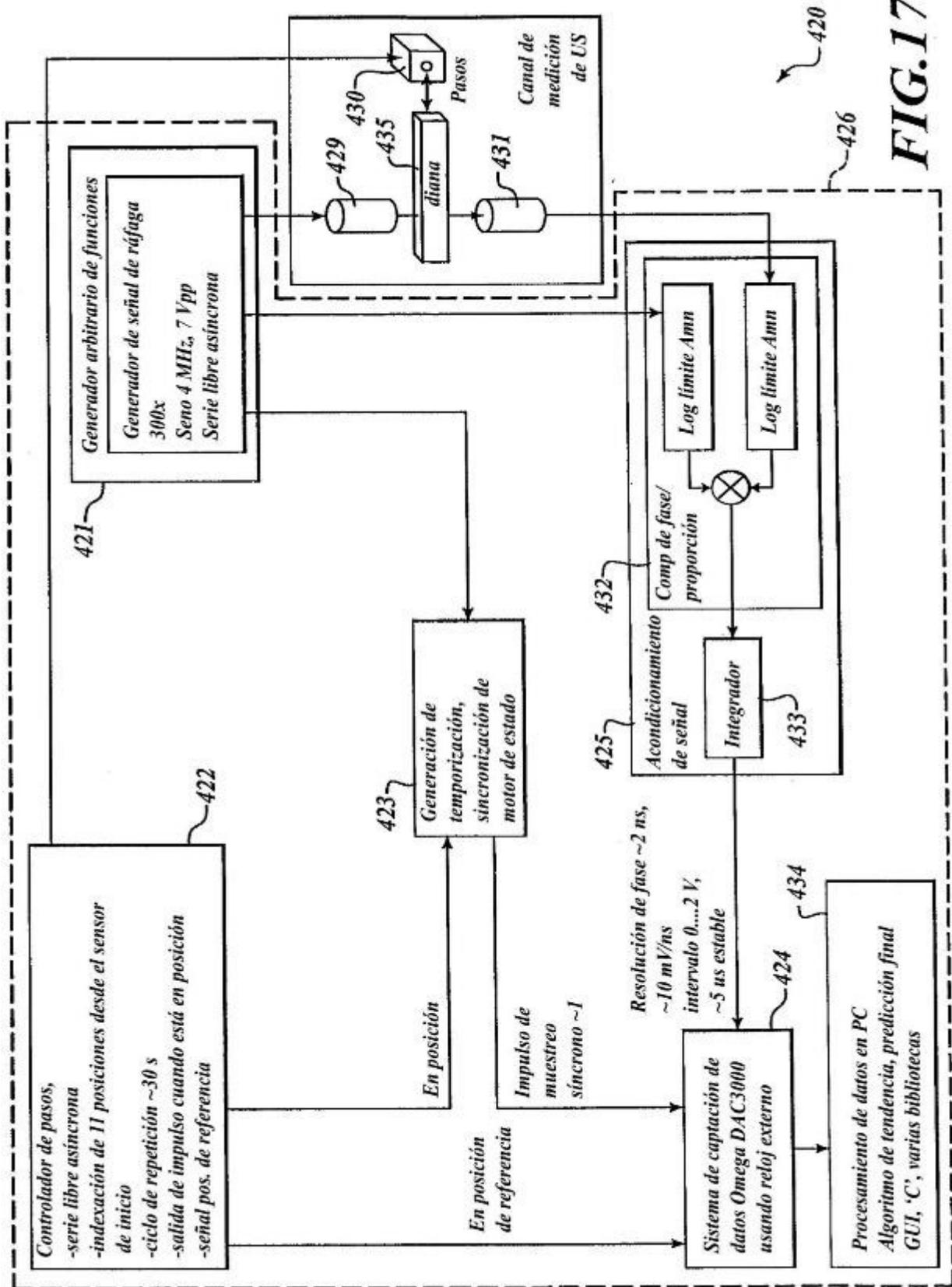
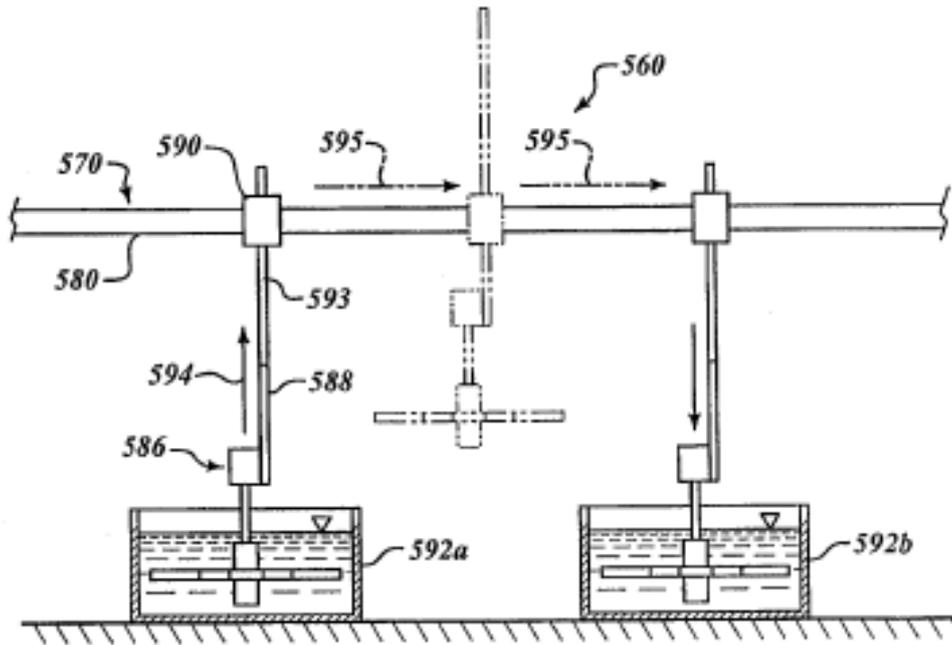
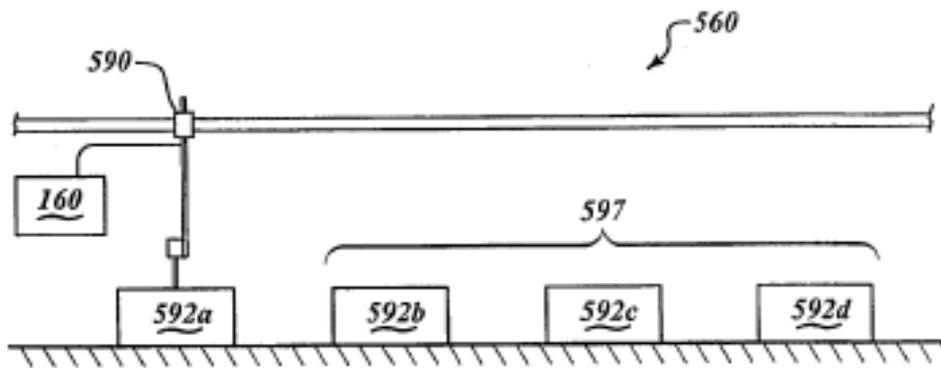


FIG. 17

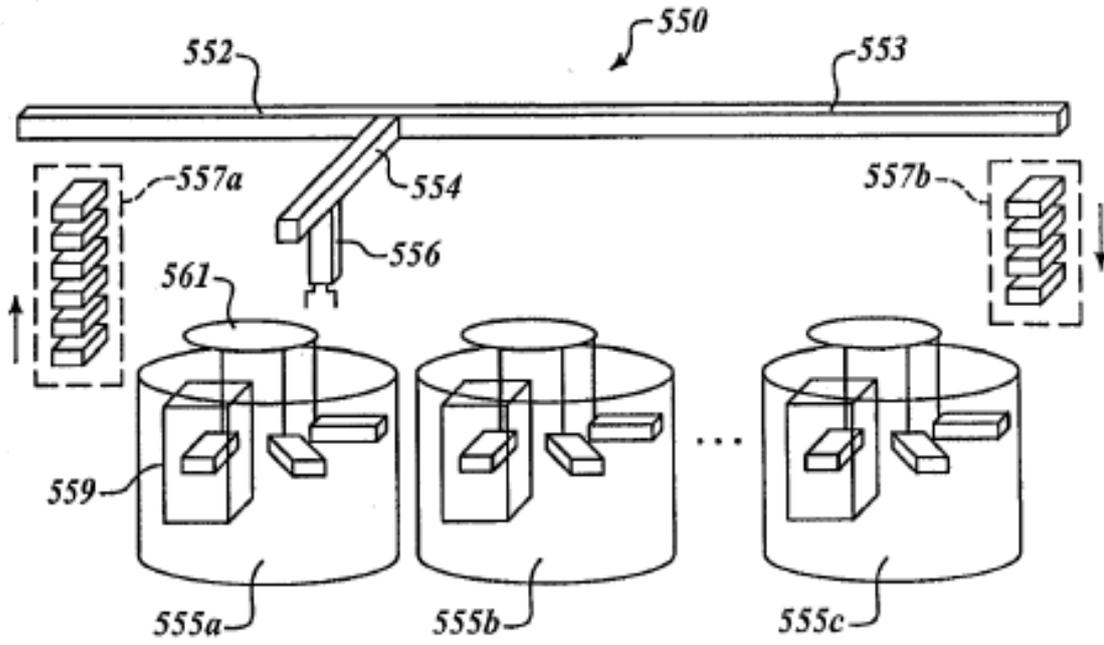




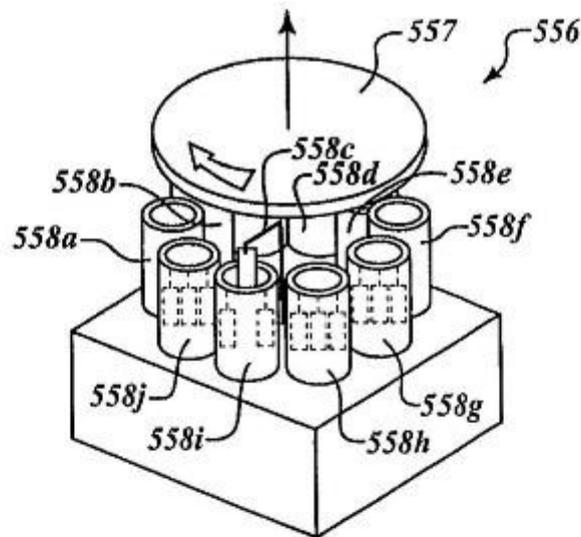
**FIG. 19**



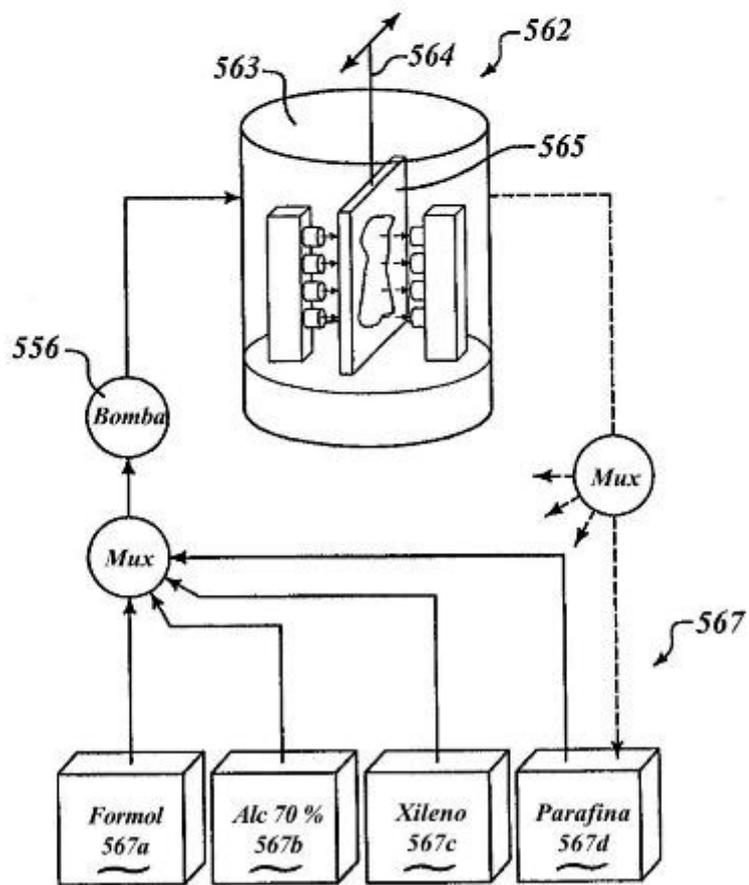
**FIG. 20**



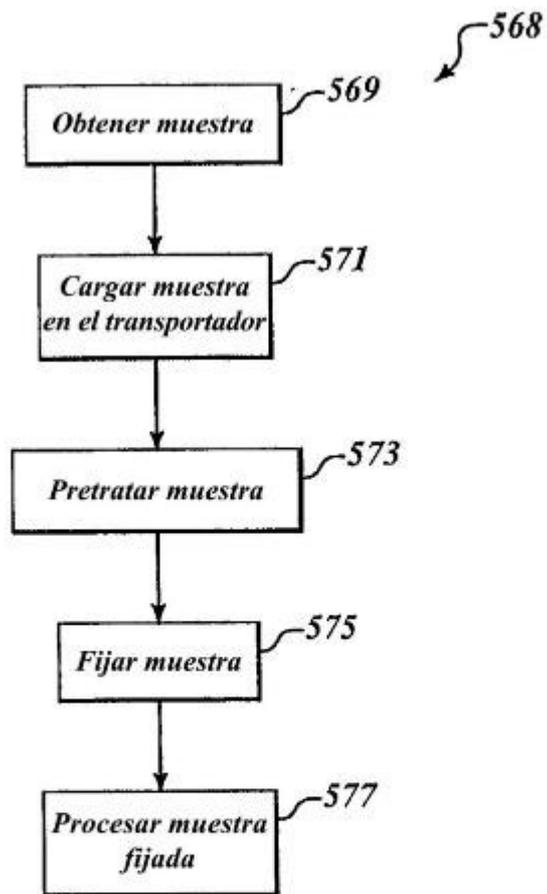
**FIG. 21**



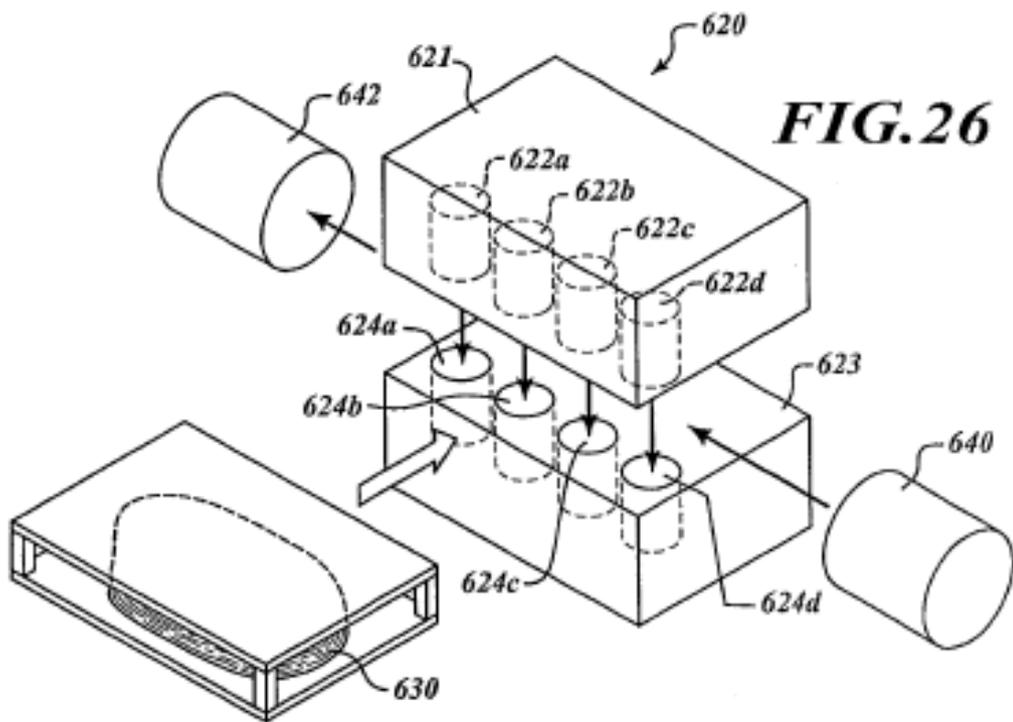
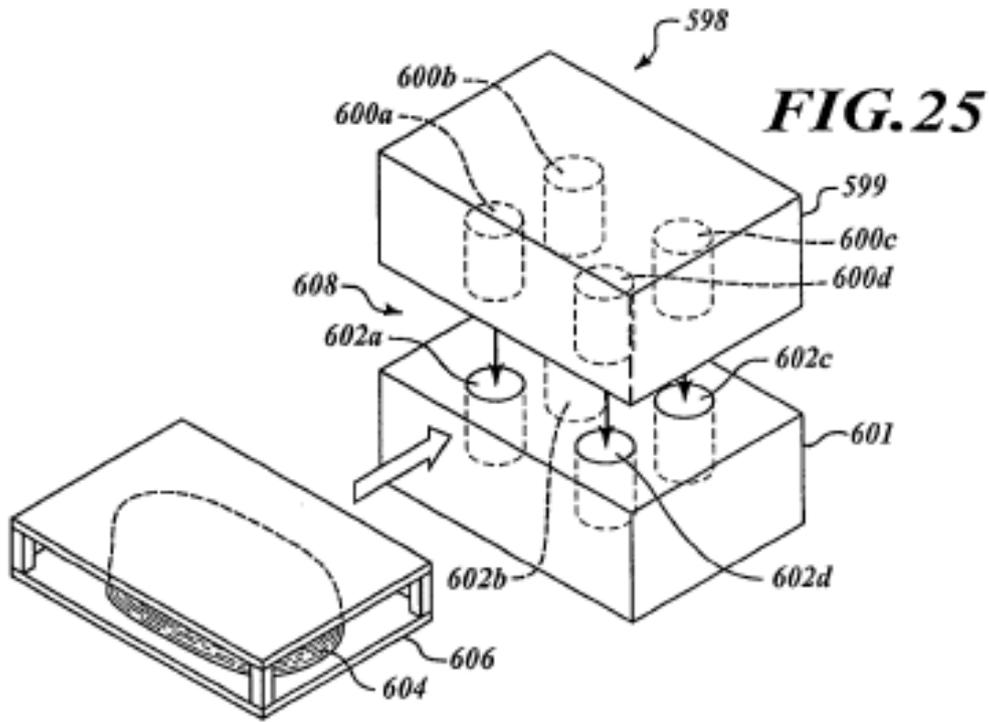
**FIG. 22**

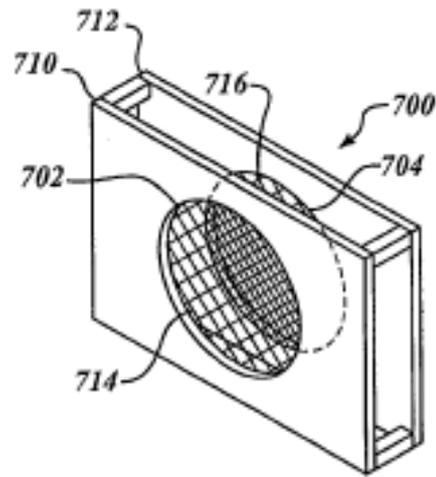


**FIG. 23**

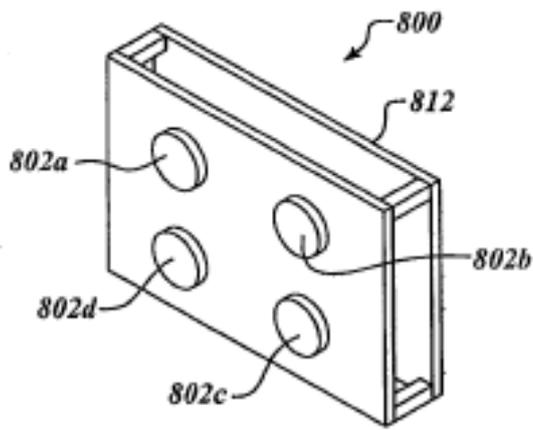


**FIG.24**

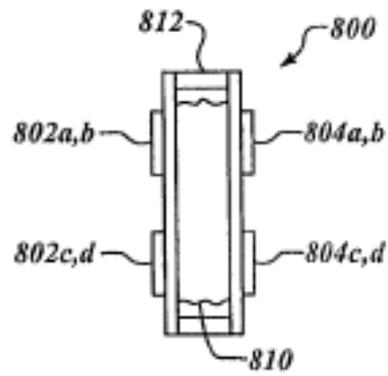




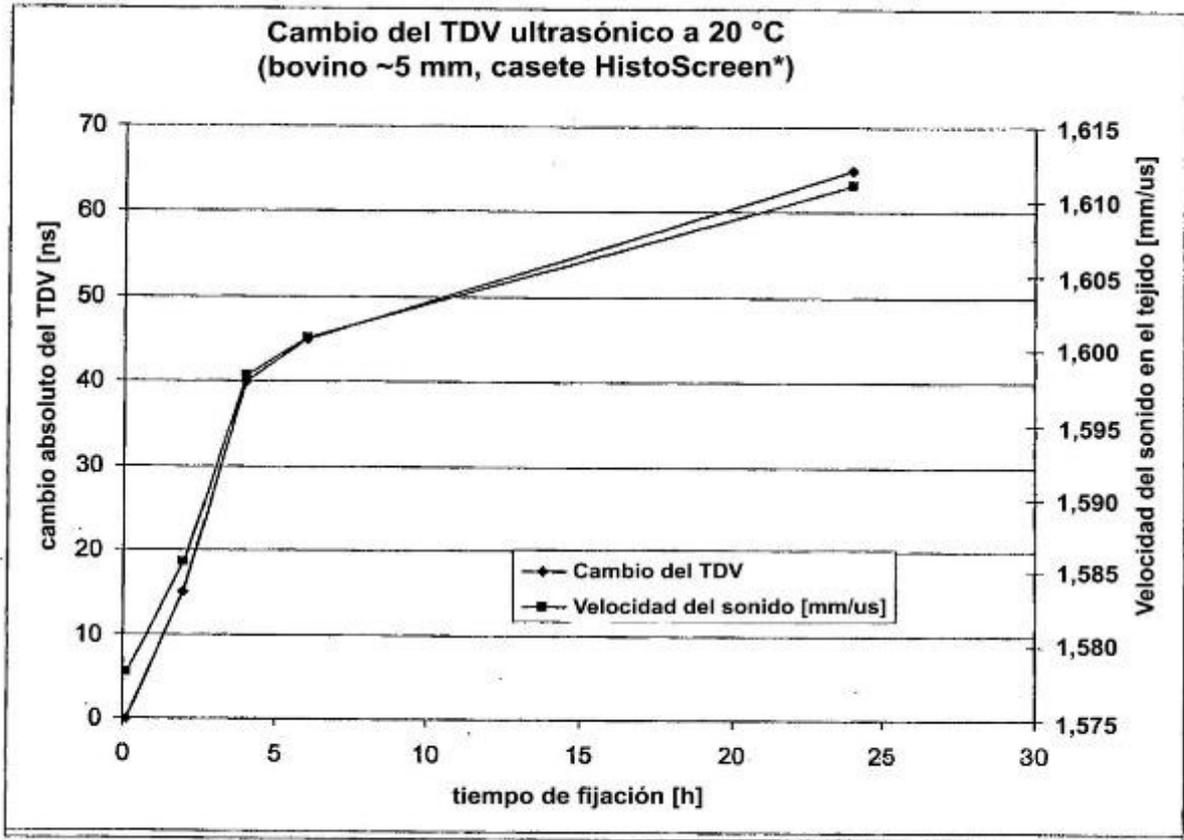
**FIG. 27**



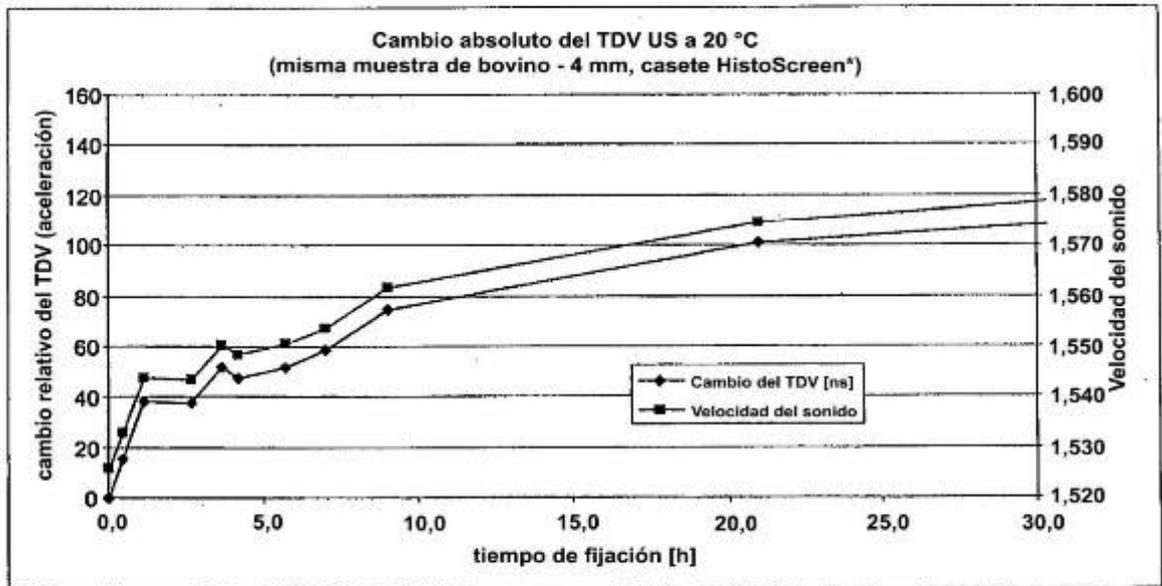
**FIG. 28**



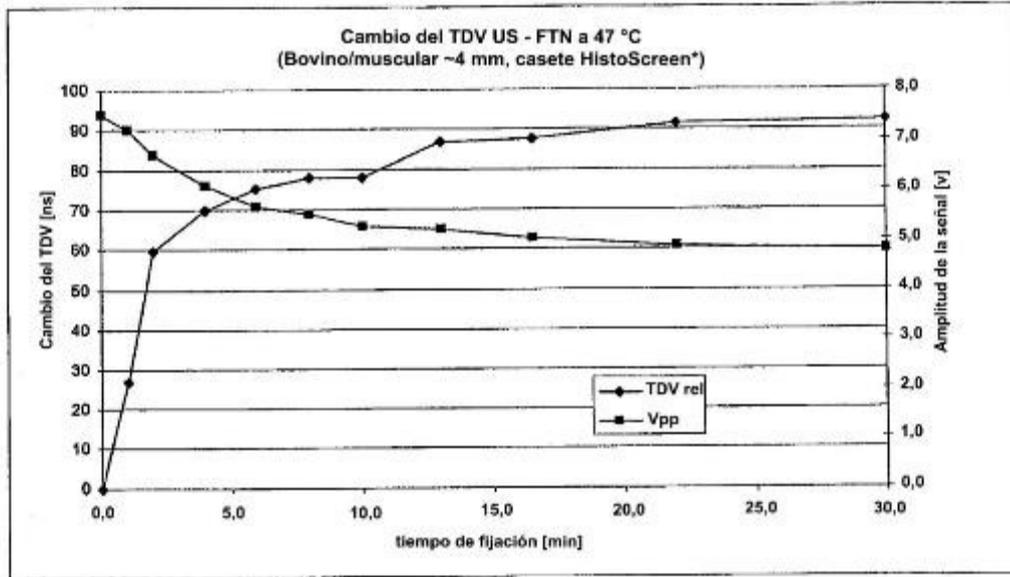
**FIG. 29**



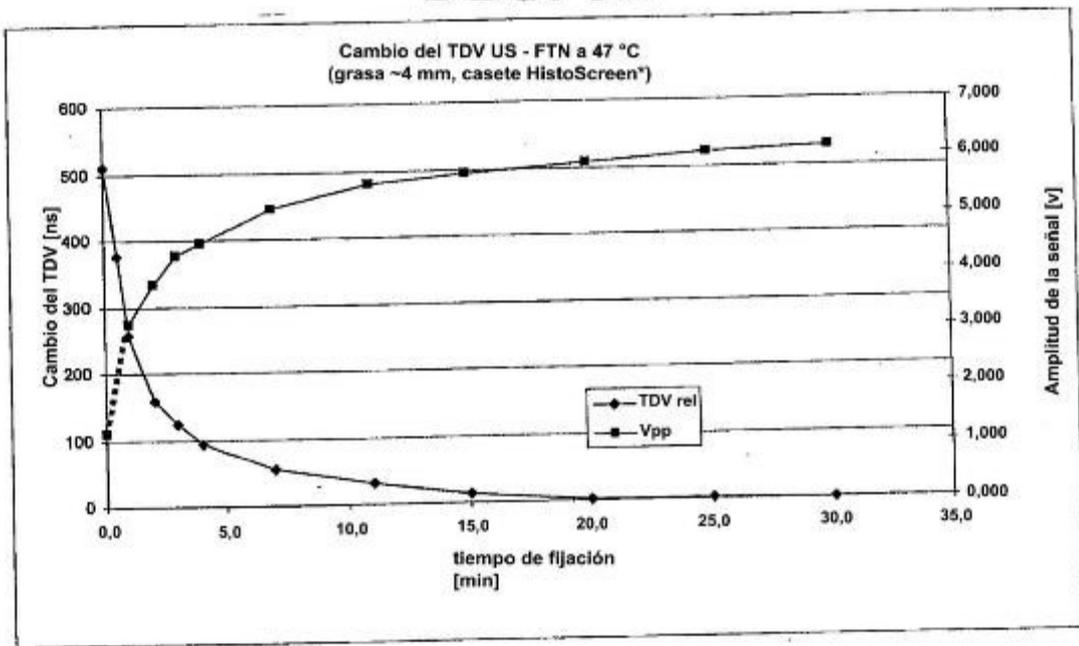
**FIG. 30**



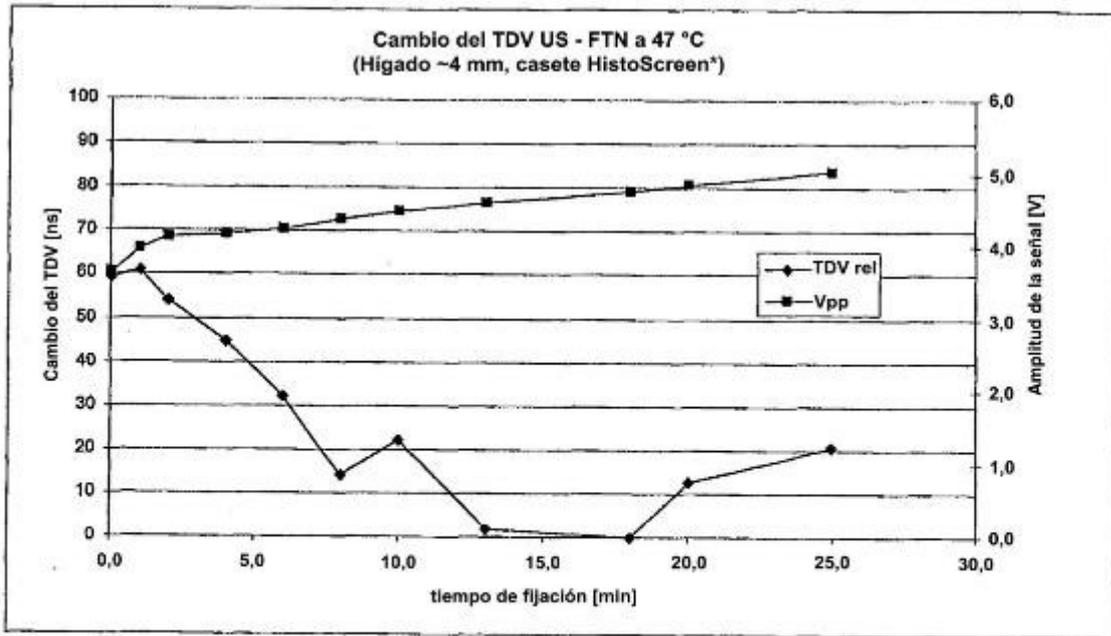
**FIG. 31**



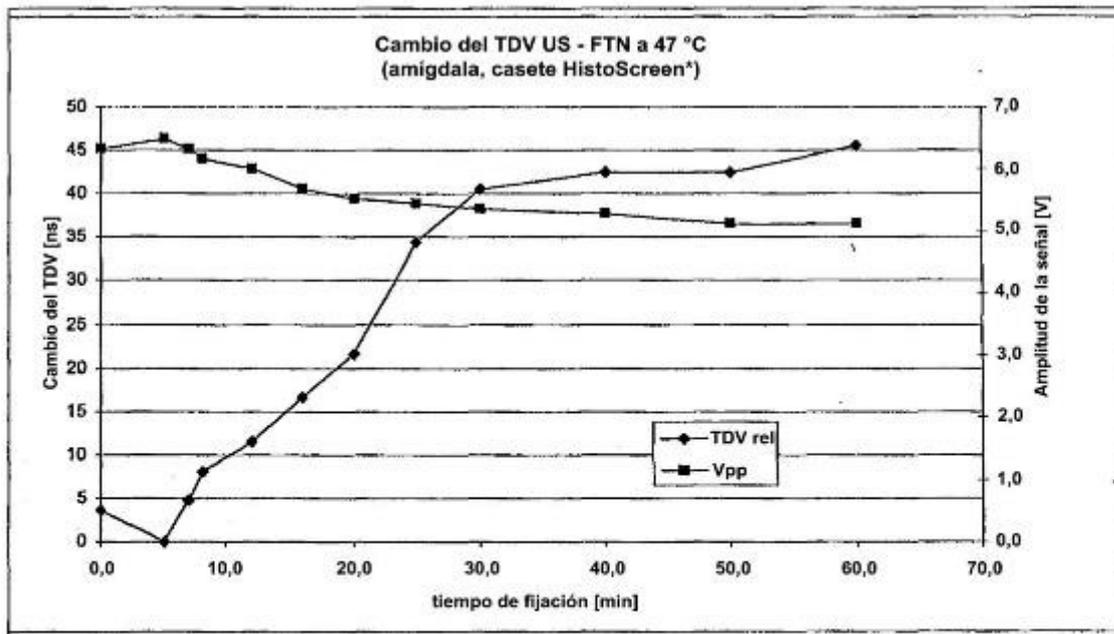
**FIG. 32**



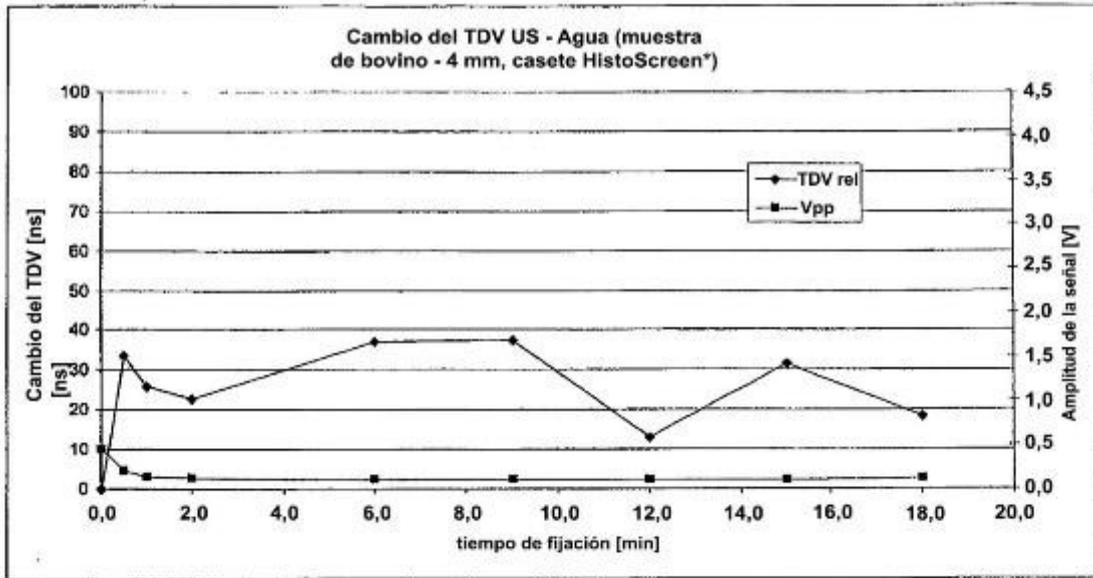
**FIG. 33**



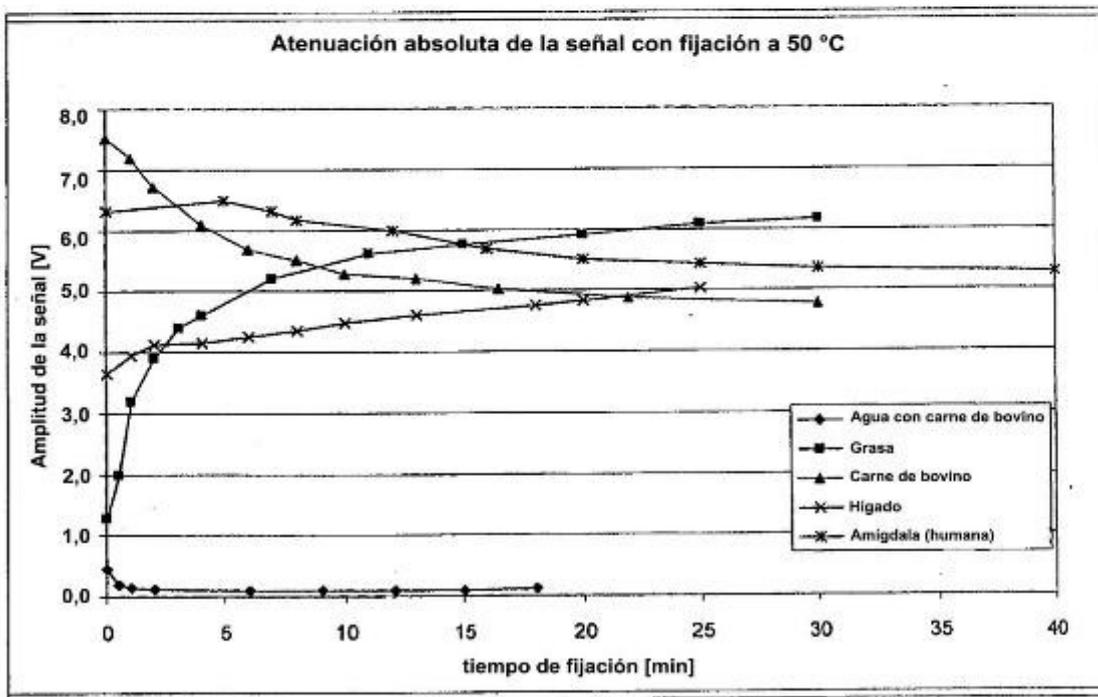
**FIG. 34**



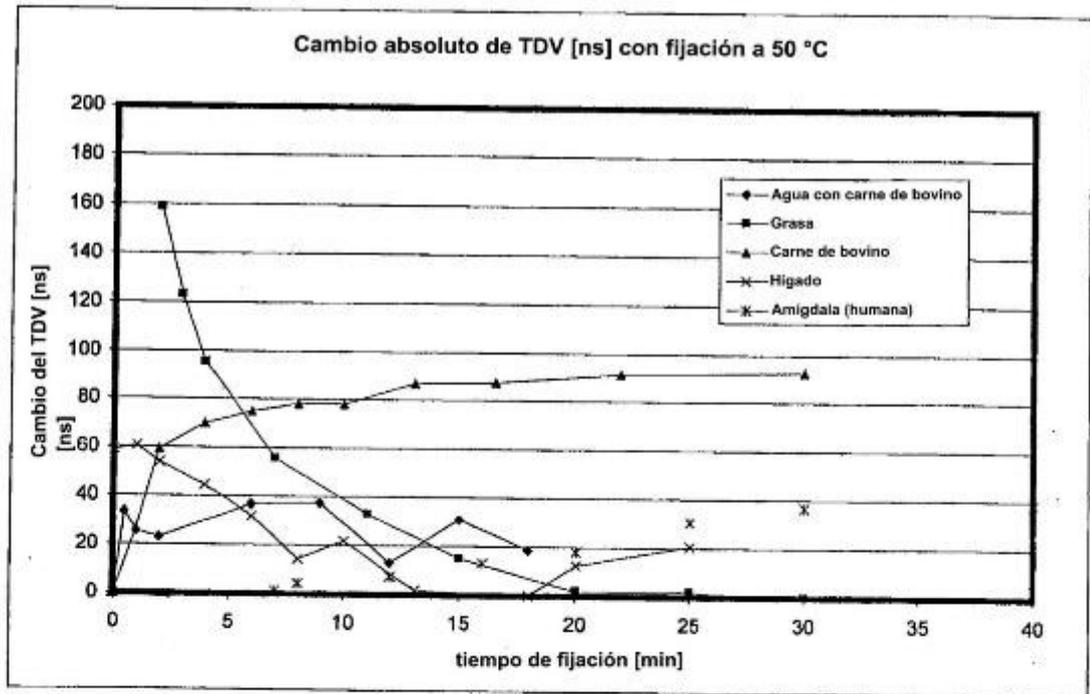
**FIG. 35**



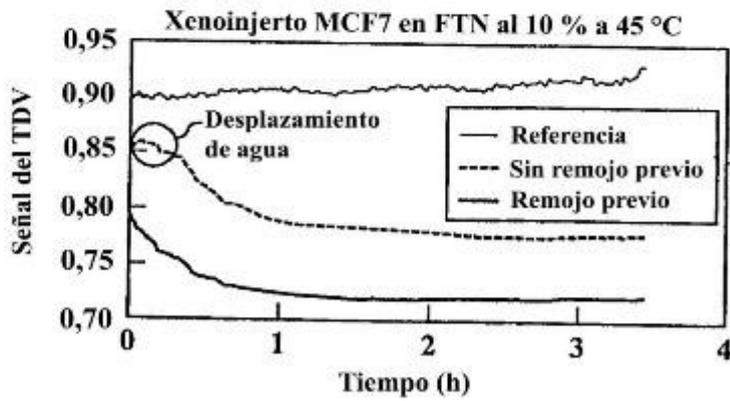
**FIG. 36**



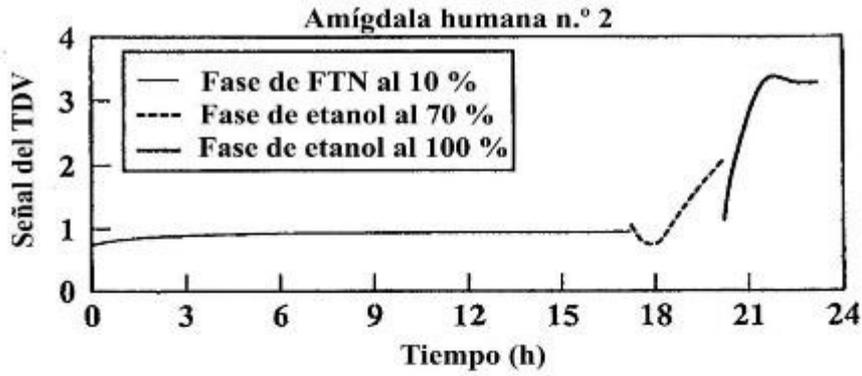
**FIG. 37**



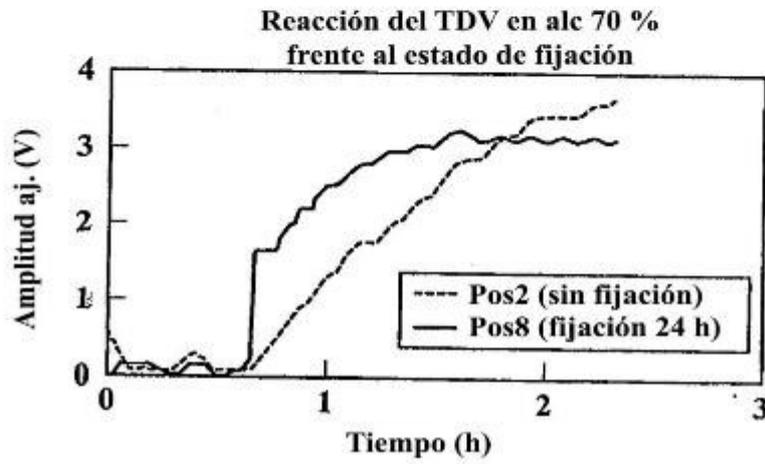
**FIG. 38**



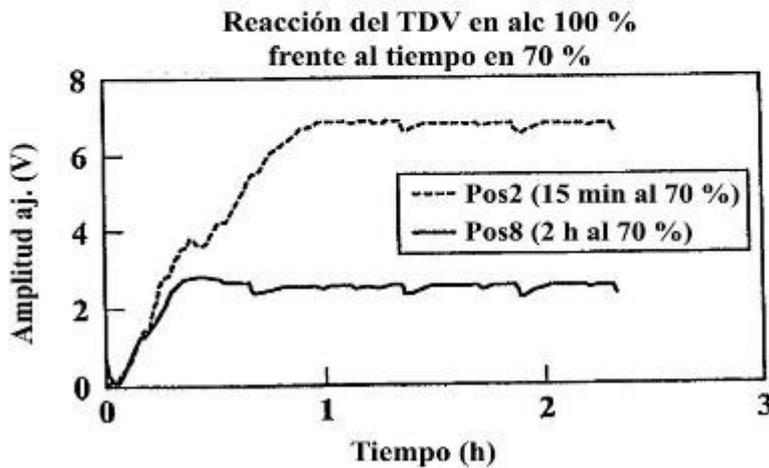
**FIG. 39**



**FIG.40**



**FIG.41**



**FIG.42**