

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 770**

51 Int. Cl.:

G06T 7/00 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2015 PCT/US2015/000331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2015 E 15828788 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3241181**

54 Título: **Análisis de vasos en imágenes multiplexadas**

30 Prioridad:

29.12.2014 US 201462097419 P
15.12.2015 US 201562267714 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2021

73 Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (50.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

72 Inventor/es:

YUAN, QUAN;
FUCHS, ANGELIKA;
CHUKKA, SRINIVAS;
FERNANDEZ, GERARDO y
LITTLE, ELIZABETH

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 804 770 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análisis de vasos en imágenes multiplexadas

5 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN OBJETO

La presente divulgación proporciona sistemas y soluciones automatizadas para detectar y clasificar estructuras vasculares en imágenes multiplexadas.

10 ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN OBJETO

La angiogénesis es el proceso con el que se forman nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis, también llamada neovascularización, se produce normalmente durante la embriogénesis y el desarrollo, y se produce en organismos completamente desarrollados durante la cicatrización y el desarrollo placentario. Además, se produce angiogénesis en diversas afecciones patológicas, incluyendo en enfermedades oculares, tales como retinopatía diabética y degeneración macular debidas a neovascularización; en afecciones asociadas con inflamación tisular, tales como artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal; y en cáncer, donde la formación de vasos sanguíneos en el tumor en crecimiento proporciona oxígeno y nutrientes a las células tumorales, además de proporcionar una vía por medio de la que las células tumorales metastatizan por todo el cuerpo.

Para crecer, un tumor debe experimentar un cambio angiogénico. Se requiere que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) induzca este cambio angiogénico. VEGF y los genes en la vía de VEGF se consideran mediadores importantes de la progresión del cáncer. La microvascularización en el microentorno tumoral puede reflejar la generación de nuevos microvasos inducida por el tejido canceroso para extraer nutrientes para mantener el crecimiento tumoral. Además, la densidad de microvasos es indicativa del crecimiento tumoral.

La importancia de esta vía en el crecimiento y metástasis de las células cancerosas ha dado lugar al desarrollo de agentes antiangiogénesis para su uso en el tratamiento del cáncer. Estos tratamientos incluyen, bevacizumab, pegaptanib, sunitinib, sorafenib y vatalanib. La identificación de los pacientes que pueden responder al tratamiento con dichos agentes es una etapa importante en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

El documento WO 02/076282 A2 (TISSUEINFORMATICS INC [EE. UU.] - "Method for quantitative analysis of blood vessel structure") describe un análisis geométrico cuantitativo que posibilita la medición de varios rasgos característicos de imágenes de tejidos, incluyendo perímetro, área y otras métricas. Los resultados de medición se introducen en una base de datos relacional donde se pueden analizar estadísticamente y comparar a través de los estudios.

SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN OBJETO

La presente divulgación divulga un dispositivo informático para la identificación y clasificación de vasos que comprende uno o más procesadores y al menos una memoria, almacenando la al menos una memoria instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores: detecte uno o más vasos en cada una de una pluralidad de imágenes de canal de vaso, en el que cada uno del uno o más vasos detectados puede ser un vaso grande, un vaso largo y estrecho o un vaso pequeño; clasifique el uno o más vasos detectados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos; y/o identifique una maduración de cada uno del uno o más vasos detectados.

La detección de vasos grandes puede comprender identificar luces que tengan regiones interiores con valor de intensidad de pixel baja rodeadas por contornos con valor de intensidad de pixel alta. La identificación de luces que tienen regiones interiores con valor de intensidad de pixel baja rodeadas por contornos con valor de intensidad de pixel alta puede comprender evaluar contrastes entre regiones oscuras en las imágenes de canal de vaso y regiones comparativamente más claras en las imágenes de canal de vaso. En algunos modos de realización, la detección de vasos grandes comprende determinar un límite de la luz identificada. El límite de la luz identificada se puede determinar (a) disponiendo un rayo en un centro aproximado de la luz identificada, teniendo cada rayo una pluralidad de brazos que se extienden radialmente desde un centro del rayo, (b) evaluando las intensidades de pixel a lo largo de cada brazo y las intensidades de pixel en el centro del rayo, (c) reteniendo el rayo, si cumple con los valores umbral de contraste (por ejemplo, valores umbral de contraste determinados empíricamente); y (d) generando un polígono con contorno en base al rayo retenido (por ejemplo, donde el polígono generado se aproxima a los límites de la luz identificada).

La detección de vasos largos y estrechos puede comprender (i) detectar estructuras localmente lineales (por ejemplo, líneas) en una pluralidad de regiones solapantes en una imagen de canal de vaso; y (ii) agrupar la estructura local detectada de las regiones solapantes que cumplen con un umbral de afinidad. La agrupación de aquellas estructuras localmente lineales detectadas de las regiones solapantes que cumplen con el umbral de afinidad puede comprender (i) calcular una afinidad entre dos estructuras locales adyacentes en la región solapante evaluando una distancia y un ángulo entre las dos estructuras locales adyacentes y (ii) comparar la afinidad calculada con el umbral de afinidad.

Se puede generar un polígono con contorno a partir de las estructuras agrupadas para representar geoméricamente los vasos.

5 La detección de vasos pequeños puede comprender (i) generar una máscara binaria que comprenda píxeles en los que sus intensidades sean mayores que las intensidades de fondo circundantes; (ii) conectar píxeles dentro de la máscara binaria generada; y (iii) evaluar si un tamaño de los píxeles conectados cumple con un tamaño umbral de vaso pequeño. La generación de la máscara binaria puede comprender (a) seleccionar píxeles entre una pluralidad de píxeles en una imagen de canal de vaso; (b) medir un valor medio de intensidades de píxeles que rodean a cada uno de los píxeles seleccionados; (c) restar el valor medio medido respectivo de intensidades de píxeles que rodean a los píxeles seleccionados de un valor de intensidad de cada uno de los píxeles seleccionados respectivos; (d) comparar los valores restados con un umbral de intensidad de fondo; y (e) añadir aquellos píxeles en los que sus intensidades con valores restados sobrepasen la intensidad de fondo con respecto a la máscara binaria. Los píxeles dentro de la máscara binaria generada se pueden conectar usando un procedimiento de marcado de componentes conectadas. Se puede generar un polígono con contorno a partir de las componentes conectadas.

Además, la clasificación del uno o más vasos detectados puede comprender identificar vasos solapantes en cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso. Además, aquellos vasos detectados que no se solapan se pueden clasificar en base a señales de tinción o de biomarcador en las imágenes de canal de vaso. Se pueden proporcionar instrucciones para estimar una maduración de un vaso detectado. La estimación de la maduración de un vaso detectado puede comprender evaluar una diferencia en las intensidades de pixel medias entre un anillo interior generado y un anillo exterior generado dispuestos alrededor del vaso detectado. Los anillos interior y exterior generados pueden comprender píxeles en los que sus intensidades correspondan a señales de tejido teñido con un anticuerpo anti-músculo liso. Además, se pueden proporcionar instrucciones para detectar núcleos.

25 Un aspecto de la presente divulgación es un procedimiento implementado por ordenador para detectar y analizar vasos que comprende detectar uno o más vasos en cada una de una pluralidad de imágenes de canal de vaso, en el que cada uno del uno o más vasos detectados puede ser un vaso grande, un largo y vaso estrecho, o un vaso pequeño; clasificar el uno o más vasos detectados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos; y/o identificar una maduración de cada uno del uno o más vasos detectados.

En algunos modos de realización, la detección de vasos grandes comprende identificar luces que tienen regiones interiores con valor de intensidad de pixel baja rodeadas por contornos con valor de intensidad de pixel alta. En algunos modos de realización, la identificación de luces que tienen regiones interiores con valor de intensidad de pixel baja rodeadas por contornos con valor de intensidad de pixel alta comprende evaluar contrastes entre regiones oscuras en las imágenes de canal de vaso y regiones comparativamente más claras en las imágenes de canal de vaso. En algunos modos de realización, la detección de vasos grandes comprende determinar un límite de la luz identificada. En algunos modos de realización, el límite de la luz identificada se determina (a) disponiendo un rayo en un centro aproximado de la luz identificada, teniendo cada rayo una pluralidad de brazos que se extienden radialmente desde un centro del rayo, (b) evaluando las intensidades de pixel a lo largo de cada brazo y las intensidades de pixel en el centro del rayo, (c) reteniendo el rayo que cumple con los valores umbral de contraste; y (d) generando un polígono con contorno en base al rayo retenido.

45 En algunos modos de realización, la detección de vasos largos y estrechos comprende (i) detectar líneas locales en una pluralidad de regiones solapantes en las imágenes de canal de vaso; y (ii) agrupar las líneas locales detectadas de las regiones solapantes que cumplen con un umbral de afinidad. En algunos modos de realización, la agrupación de las líneas locales detectadas de las regiones solapantes que cumplen con el umbral de afinidad comprende (i) calcular una afinidad entre dos líneas locales adyacentes en la región solapante evaluando una distancia y un ángulo entre las dos líneas locales adyacentes y (ii) comparar la afinidad calculada con el umbral de afinidad. En algunos modos de realización, se genera un polígono con contorno a partir de las líneas agrupadas.

En algunos modos de realización, la detección de vasos pequeños comprende (i) generar una máscara binaria que comprenda píxeles en los que sus intensidades sean mayores que las intensidades de fondo circundantes; (ii) conectar píxeles dentro de la máscara binaria generada; y (iii) evaluar si un tamaño de los píxeles conectados cumple con un tamaño umbral de vaso pequeño. En algunos modos de realización, la generación de la máscara binaria comprende (i) seleccionar píxeles entre una pluralidad de píxeles; (ii) medir un valor medio de intensidades de píxeles que rodean a cada uno de los píxeles seleccionados; (iii) restar el valor medio medido respectivo de intensidades de píxeles que rodean a los píxeles seleccionados de un valor de intensidad de cada uno de los píxeles seleccionados respectivos; (iv) comparar los valores restados con un umbral de intensidad de fondo; y (v) añadir aquellos píxeles en los que sus intensidades con valores restados sobrepasen la intensidad de fondo con respecto a la máscara binaria. En algunos modos de realización, los píxeles dentro de la máscara binaria generada se conectan usando un procedimiento de marcado de componentes conectadas. En algunos modos de realización, se usan las componentes conectadas para generar un polígono con contorno.

65 En algunos modos de realización, la clasificación del uno o más vasos detectados comprende identificar vasos solapantes en cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso. En algunos modos de realización, aquellos

vasos detectados que no se solapan se clasifican en base a señales de tinción. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además estimar una maduración de un vaso detectado. En algunos modos de realización, la estimación de la maduración de un vaso detectado comprende evaluar una diferencia en las intensidades de pixel medias entre los anillos interior y exterior dispuestos alrededor del vaso detectado. En algunos modos de realización, los anillos interior y exterior comprenden píxeles en los que sus intensidades corresponden a señales de tejido teñido con un anticuerpo anti-músculo liso. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además detectar núcleos.

Otro aspecto de la presente divulgación es un dispositivo informático para la identificación y clasificación de vasos que comprende uno o más procesadores y al menos una memoria, almacenando la al menos una memoria instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores (i) ejecute instrucciones en al menos uno de un módulo de detección del rasgo característico de rayo, un módulo de detección del rasgo característico de línea y un módulo de detección de vasos pequeños para detectar uno o más vasos en cada una de una pluralidad de imágenes de canal de vaso; (ii) ejecute instrucciones en un módulo de clasificación de vasos para clasificar el uno o más vasos detectados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos; y/o (iii) ejecute instrucciones en un módulo de determinación de la maduración para determinar una maduración del uno o más vasos detectados. En algunos modos de realización, el dispositivo informático ejecuta además instrucciones en un módulo de detección nuclear para identificar núcleos celulares.

Además, se divulga un analizador de piezas, comprendiendo el analizador de piezas (i) un dispositivo informático para la identificación y clasificación de vasos que comprende uno o más procesadores y al menos una memoria, almacenando la al menos una memoria instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores: detecte uno o más vasos en cada una de una pluralidad de imágenes de canal de vaso, en el que cada uno del uno o más vasos detectados puede ser un vaso grande, un vaso largo y estrecho o un vaso pequeño; clasifique el uno o más vasos detectados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos; e identifique una maduración de cada uno del uno o más vasos detectados; y (ii) un aparato de formación de imágenes.

Además, se divulga un dispositivo informático para la identificación y clasificación de vasos, comprendiendo el dispositivo informático uno o más procesadores y al menos una memoria, almacenando la al menos una memoria instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores (i) asocie un límite de una luz detectada en una imagen con un primer tipo de vaso, comprendiendo la imagen al menos un canal de vaso; y (ii) asocie una pluralidad de estructuras localmente lineales observadas en una correspondiente pluralidad de regiones de la imagen con un segundo tipo de vaso; en el que el primer tipo de vaso representa vasos que tienen un diámetro grande; y en el que el segundo tipo de vaso representa vasos largos y estrechos.

Además, se divulga un dispositivo informático para la identificación y clasificación de vasos que comprende uno o más procesadores y al menos una memoria, almacenando la al menos una memoria instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores genere un primer polígono representativo de un primer vaso detectado en una imagen de canal de vaso sanguíneo derivada de una imagen multiplexada; genere un segundo polígono representativo de un segundo vaso detectado en una imagen de canal de vaso linfático derivada de la imagen multiplexada; y combine la imagen de canal de vaso sanguíneo y la imagen de canal de vaso linfático; en el que, al determinar que el primer polígono generado se solapa con el segundo polígono generado por un factor umbral de solapamiento, se clasifique tanto el primer como segundo polígonos generados como un vaso linfático; y en el que, al determinar que el primer polígono generado no se solapa con el segundo polígono generado por un factor umbral de solapamiento, se clasifique el primer polígono generado como un vaso sanguíneo y el segundo polígono generado como un vaso puramente linfático.

Además, se divulga un dispositivo informático para la identificación y clasificación de vasos, comprendiendo el dispositivo informático uno o más procesadores y al menos una memoria, almacenando la al menos una memoria instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores detecte uno o más vasos grandes en un canal de vaso de una imagen en base a un rayo dispuesto dentro de la luz de vaso; detecte uno o más vasos estrechos en el canal del vaso en base a una agrupación de una pluralidad de líneas adyacentes en la imagen; y detecte uno o más vasos pequeños en base a una máscara binaria aplicada a la imagen.

Otro aspecto de la presente divulgación es un procedimiento implementado por ordenador para la identificación de vasos que comprende: analizar cada una de una pluralidad de imágenes digitales de una muestra de tejido para identificar vasos de al menos uno de tres tipos diferentes, el primer tipo, denominado vasos grandes, que comprende vasos que forman las estructuras del árbol arterial secundario y los vasos capilares; el segundo tipo, denominado vasos largos y estrechos, que comprende capilares sanguíneos o vasos recién formados, el tercer tipo, denominado vasos pequeños, que comprende arterias y venas maduras; analizar los vasos identificados para clasificar los vasos identificados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos; e identificar una maduración de cada uno del uno o más vasos detectados. En algunos modos de realización, la detección de vasos del primer tipo comprende: evaluar los contrastes de intensidad de una o más de la pluralidad de imágenes digitales para identificar regiones de píxeles de luz y las

regiones de píxeles de límite que satisfagan la condición de que: la región de píxeles de luz sea una región de píxeles en la que sus intensidades de pixel estén por debajo de las intensidades de pixel de las regiones de límite, las regiones de píxeles de luz y las de límite se encuentren en las mismas o en otras diferentes de la pluralidad de imágenes digitales, la región de píxeles de luz esté rodeada por la región de píxeles de límite, devolver una región de píxeles de luz identificada rodeada por una región de píxeles de límite como un vaso grande identificado.

En algunos modos de realización, la detección del límite de la luz identificada se determina: (a) disponiendo un rayo en un centro aproximado de la luz identificada, teniendo cada rayo una pluralidad de brazos que se extienden radialmente desde un centro del rayo, (b) evaluando las intensidades de pixel a lo largo de cada brazo y las intensidades de pixel en el centro del rayo, (c) reteniendo selectivamente el rayo en caso de que cumpla con los valores umbral de contraste; y (d) generando un polígono con contorno a partir del rayo retenido. En algunos modos de realización, la retención del rayo que cumple con los valores umbral de contraste comprende, para al menos una de las imágenes digitales: identificar el valor de intensidad del centro del rayo; identificar la mediana de los valores de intensidad máxima de todos los brazos y el valor de intensidad del centro del rayo; identificar la mediana de los valores de intensidad mínima de todos los brazos y el valor de intensidad del centro del rayo; determinar i) si la mediana de todos los valores de intensidad máxima es al menos un primer umbral (T1) mayor que el valor de intensidad en el centro del rayo; determinar ii) si la mediana de todos los valores de intensidad mínima es, como máximo, un segundo umbral (T2) menor que el valor de intensidad en el centro del rayo; y, en caso de que la determinación i) y ii) se devuelva como verdadera, selectivamente retener y usar el rayo para generar el polígono con contorno.

En algunos modos de realización, el rayo para generar el polígono con contorno comprende: en cada uno de los brazos del rayo, identificar el pixel que tiene el valor de intensidad más alta; y conectar los píxeles identificados para formar el polígono.

En algunos modos de realización, la detección de vasos del segundo tipo comprende: (i) detectar secciones de líneas en una pluralidad de regiones solapantes en al menos una de las imágenes digitales; y (ii) agrupar las secciones de líneas detectadas de las regiones de imagen solapantes que cumplen con un umbral de afinidad entre sí, realizándose preferentemente la agrupación en un procedimiento de agrupamiento aglomerativo; y (iii) devolver las líneas agrupadas como un vaso detectado del segundo tipo. En algunos modos de realización, la agrupación comprende: (i) calcular una afinidad entre dos secciones de líneas adyacentes en la región solapante evaluando una distancia y un ángulo entre las dos secciones de líneas adyacentes y (ii) comparar la afinidad calculada con un umbral de afinidad para agrupar selectivamente aquellas de las secciones de líneas en un grupo en el que su afinidad entre sí sobrepase el umbral de afinidad. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además generar un polígono con contorno a partir de los segmentos de líneas agrupadas.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además identificar la entropía de píxeles contenidos en el vaso identificado del segundo tipo; comparar la entropía determinada con un umbral de entropía y descartar el vaso identificado del segundo tipo de vaso en caso de que la entropía determinada sea mayor que el umbral de entropía; o identificar la intensidad promedio de píxeles contenidos en un área de imagen que se encuentre más lejos del vaso identificado que un umbral de distancia; comparar la intensidad promedio determinada con un umbral de intensidad y descartar el vaso identificado del segundo tipo de vaso en caso de que la intensidad promedio determinada sea mayor que el umbral de intensidad.

En algunos modos de realización, la detección de vasos del tercer tipo comprende (i) generar una máscara binaria que comprenda píxeles en los que sus intensidades sean mayores que las intensidades de pixel de fondo circundantes; (ii) conectar píxeles dentro de la máscara binaria generada; y (iii) evaluar si un tamaño de los píxeles conectados cumple con un tamaño umbral de vaso pequeño.

En algunos modos de realización, la generación de la máscara binaria comprende, para al menos una de las imágenes digitales: (i) seleccionar píxeles entre una pluralidad de píxeles en la al menos una imagen digital; (ii) medir un valor medio de intensidades de píxeles que rodean a cada uno de los píxeles seleccionados; (iii) restar el valor medio medido respectivo de intensidades de píxeles que rodean a los píxeles seleccionados de un valor de intensidad de cada uno de los píxeles seleccionados respectivos; (iv) comparar los valores restados con un umbral de intensidad de fondo; y (v) añadir aquellos píxeles en los que sus intensidades con valores restados sobrepasen el umbral de intensidad de fondo con respecto a la máscara binaria. En algunos modos de realización, los píxeles dentro de la máscara binaria generada se conectan usando un procedimiento de marcado de componentes conectadas. En algunos modos de realización, la clasificación del uno o más vasos detectados comprende: identificar vasos solapantes en cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso, analizar los valores de intensidad de pixel de los vasos detectados que no se solapan para clasificar el vaso como vaso sanguíneo o vaso linfático, correlacionándose las intensidades de pixel con la intensidad de tinción de una tinción que tiñe selectivamente un biomarcador que sea específico para vasos sanguíneos o bien vasos linfáticos.

En algunos modos de realización, la identificación de la maduración de cada uno del uno o más vasos detectados comprende: superponer cada vaso identificado con una estructura de anillos concéntricos que comprende un anillo interior y uno exterior, siendo el anillo interior adyacente al anillo exterior, siendo el anillo interior un anillo interior de un círculo que tiene el radio esperado de un vaso maduro, siendo el anillo exterior un anillo exterior de dicho círculo;

5 mapear la estructura de anillos concéntricos con respecto a una de las imágenes digitales, correlacionándose las intensidades de pixel de dicha una imagen digital con la intensidad de tinción de una tinción que tiñe selectivamente un biomarcador que es específico para tejido de músculo liso; identificar los valores de intensidad media de píxeles en el anillo interior mapeado en la una imagen digital; identificar los valores de intensidad media de píxeles en el anillo exterior mapeado en la una imagen digital; determinar una diferencia en los valores de intensidad de pixel media entre los anillos interior y exterior; y donde la diferencia determinada sobrepasa un umbral de maduración de vaso, lo que devuelve que dicho vaso es maduro.

10 En general, el objetivo de los algoritmos de análisis de imágenes para la detección de vasos, tales como en preparaciones de tejido canceroso, es detectar estructuras de vaso sanguíneo y clasificarlas en las categorías de macrovasos, vasos linfáticos y microvasos. En una imagen multiplexada, el aspecto de la imagen de tanto los macro- como los microvasos puede ser bastante variable (por ejemplo, lejos de su aspecto ideal esperado) y, por tanto, problemático para la detección y clasificación automatizadas. En algunas imágenes de preparaciones de tejido, algunas luces de macrovaso pueden parecer demasiado grandes o los límites celulares pueden estar fragmentados y/o incompletos. Además, las formas irregulares, en particular, para vasos grandes, hacen que sea difícil encontrar modelos adecuados para compararlas y clasificar así los vasos. De forma similar, los microvasos pueden estar ocluidos por el tejido conectivo circundante y/u otras estructuras celulares. Además, los microvasos pueden no tener una forma cerrada bien formada o poseer un interior de luz cerrada. Los procedimientos de detección de vasos comúnmente disponibles en la literatura existente están diseñados principalmente para identificar formas regulares, tales como formas elípticas, de determinado tamaño. De forma alternativa, los procedimientos de la técnica anterior se pueden basar en identificar las estructuras de luz, tales como espacios vacíos blancos o aquellos llenos de glóbulos sanguíneos coloreados de forma distinta, y, a continuación, asignar el límite de la luz como vasos sanguíneos. A menudo se encuentra que estos procedimientos son inadecuados para manipular la variabilidad de aspectos vasculares en las imágenes y son propensos a errores en la detección y clasificación de las estructuras de macro- y microvasos. La presente divulgación tiene en cuenta la variabilidad de aspectos de los vasos e identifica los vasos grandes, vasos largos y estrechos y vasos pequeños y clasifica además los vasos identificados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos. Por lo tanto, los solicitantes han desarrollado un procedimiento superior de detección y clasificación de vasos, y, además, para estimar una maduración de dichos vasos detectados y/o clasificados. Dicha una determinación de la maduración, además de los otros datos derivados en el presente documento, puede permitir un tratamiento superior, tal como con la administración de un agente antiangiogénesis apropiado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La FIG. 1A ilustra un sistema (que no forma parte de la invención reivindicada) para el análisis de vasos en imágenes multiplexadas, que incluye un ordenador y un aparato de formación de imágenes.

La FIG. 1B ilustra un sistema para el análisis de vasos en imágenes multiplexadas, de acuerdo con un modo de realización ejemplar de la presente divulgación objeto.

40 La FIG. 2 ilustra un procedimiento para el análisis de vasos, de acuerdo con un modo de realización ejemplar de la presente divulgación objeto.

La FIG. 3 ilustra un procedimiento para detectar vasos grandes, de acuerdo con un modo de realización ejemplar de la presente divulgación objeto.

45 Las FIGS. 4A-4D ilustran un procedimiento de detección del rasgo característico de rayo, de acuerdo con un modo de realización ejemplar de la presente divulgación objeto.

La FIG. 5 ilustra un procedimiento para detectar vasos largos y estrechos, de acuerdo con un modo de realización ejemplar de la presente divulgación objeto.

Las FIGS. 6A - 6C ilustran un procedimiento de detección del rasgo característico de línea, de acuerdo con un modo de realización ejemplar de la presente divulgación objeto.

55 La FIG. 6D ilustra el resultado de la agrupación de segmentos de línea e ilustra además que los grupos de líneas más pequeños que un umbral predeterminado se pueden ignorar.

La FIG. 7A ilustra un procedimiento para detectar vasos pequeños, de acuerdo con un modo de realización ejemplar de la divulgación objeto.

60 La FIG. 7B ilustra además un flujo de trabajo para la segmentación de vasos pequeños.

La FIG. 8 ilustra un procedimiento para clasificar vasos, de acuerdo con modos de realización ejemplares de la divulgación objeto.

65 La FIG. 9 ilustra un procedimiento para determinar una maduración de un vaso, de acuerdo con modos de realización

ejemplares de la divulgación objeto.

La FIG. 10 ilustra un procedimiento de determinación de la maduración, de acuerdo con modos de realización ejemplares de la divulgación objeto.

La FIG. 11 proporciona un flujo de trabajo para la segmentación de vasos largos y estrechos.

La FIG. 12 proporciona un flujo de trabajo de detección de vasos, donde el vaso y los canales descompuestos con ASMA (músculo liso) se muestran a lo largo de los vasos identificados superpuestos en la captura de imagen bruta.

La FIG. 13 proporciona un resultado (salida) de un flujo de trabajo de detección y clasificación de vasos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN OBJETO

La presente divulgación se dirige a procedimientos de identificación y análisis de vasos en imágenes multiplexadas. Los modos de realización divulgados en el presente documento describen (i) la detección de vasos, a saber, la identificación de vasos grandes, vasos largos y estrechos y vasos pequeños; (ii) la clasificación de los vasos identificados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos; y/o (iii) el análisis de una maduración de cada uno de los vasos detectados y/o clasificados. En algunos modos de realización, también se detectan células o núcleos y, cuando se combinan con la identificación, clasificación y análisis de los vasos, permite la colocación de células/núcleos y vasos.

Las estructuras vasculares en una preparación de tejido se pueden clasificar como se proporciona en el presente documento y como se describe por Less *et al.* "Microvascular Architecture in a Mammary Carcinoma: Branching Patterns and Vessel Dimensions," *Cancer Research*, 51, 265-273, 1 de enero de 1991.

Los vasos grandes, también llamados "macrovasos", pueden incluir arterias y venas maduras. Los vasos grandes aparecen en preparaciones de tejido o imágenes derivadas de muestras de tejido como que tienen una estructura curvilínea, elíptica y bien estructurada que tiene una capa de límite celular lineal que encierra regiones de luz blanca, y que tienen además una capa muscular protectora espesa y madura al alrededor de los mismos. Típicamente, los vasos grandes, que constituyen las arterias y venas maduras, tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 cm, con un espesor de pared de aproximadamente 1 mm.

Los vasos largos y estrechos, que forman las estructuras del árbol arterial secundario y los vasos capilares, tienen diámetros promedio que varían de aproximadamente 50 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros, con una capa muscular bastante delgada de aproximadamente 1 micrómetro.

Los microvasos son capilares sanguíneos o bien vasos recién formados pequeños que tienen un músculo liso delgado alrededor de los mismos. Los microvasos, que pueden constituir las estructuras vasculares de formación reciente dentro del microentorno tumoral, tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 8 a 12 micrómetros, rodeando a los mismos un músculo liso mínimo.

Una "imagen de canal de vaso", por ejemplo, es una imagen digital en la que sus valores de intensidad de pixel son indicativos de la cantidad de una tinción unida a un vaso o parte del mismo. La tinción usada para algunos canales de imagen puede ser, por ejemplo, específica para regiones específicas dentro o en proximidad espacial de un vaso, por ejemplo, regiones musculares que podrían rodear a un vaso. La tinción puede ser específica para un biomarcador particular que sea indicativo del estado de maduración de un vaso o del tipo de vaso.

Una "imagen de canal de vaso sanguíneo", por ejemplo, es una imagen digital en la que sus valores de intensidad de pixel son indicativos de la cantidad de tinción unida selectivamente a un vaso sanguíneo o parte del mismo.

Una "imagen de canal de vaso linfático", por ejemplo, es una imagen digital en la que sus valores de intensidad de pixel son indicativos de la cantidad de tinción unida selectivamente a un vaso linfático o parte del mismo.

Una "firma" de una estructura de tejido, por ejemplo, una "firma de una capa de músculo liso" como se usa en el presente documento, por ejemplo, es una firma espectral derivada de uno o más colorantes diferentes que se pueden solapar espectralmente. En una célula donde se colocan múltiples biomarcadores y, por tanto, son coexpresivos, la emisión fluorescente de los biomarcadores individuales se puede sumar con una contribución de composición (peso) que es proporcional a y característica para la expresión del/de los biomarcador(es) asociado(s).

Un "rasgo característico de línea local" o "segmento de línea" como se usa en el presente documento, por ejemplo, es un conjunto de píxeles dentro de una subregión (por ejemplo, una región de N x N píxeles) de una imagen digital que tiene una distribución de intensidad que indica que dichos píxeles probablemente son parte de una línea (que puede abarcar múltiples subregiones).

Como se usa en el presente documento, los términos en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes al plural a

menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

Los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y similares se usan de manera intercambiable y tienen el mismo significado. De forma similar, se usan de manera intercambiable "comprende", "incluye", "tiene" y similares y tienen el mismo significado. Específicamente, cada uno de los términos se define de forma consecuente con la definición común del derecho de patentes de Estados Unidos de "que comprende" y, por lo tanto, se interpreta como que es un término abierto que significa "al menos lo siguiente" y también se interpreta como que no excluye rasgos característicos, limitaciones, aspectos, etc. adicionales. Por tanto, por ejemplo, "un dispositivo que tiene los componentes a, b y c" significa que el dispositivo incluye al menos los componentes a, b y c. De forma similar, la frase: "un procedimiento que implica las etapas a, b y c" significa que el procedimiento incluye al menos las etapas a, b y c. Además, aunque las etapas y procedimientos se puedan esbozar en el presente documento en un orden particular, el experto en la técnica reconocerá que el orden de las etapas y procedimientos puede variar.

Una "imagen multicanal", "imagen múltiple" o "imagen multiplexada" como se usa en el presente documento engloba una imagen digital obtenida de una muestra de tejido biológico en la que se tiñen de forma simultánea diferentes estructuras biológicas, tales como vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejido muscular, con tinciones específicas, colorantes fluorescentes, puntos cuánticos, cromógenos, etc. (o cualquier combinación de los mismos), cada uno emitiendo fluorescencia o de otro modo siendo detectable en una banda espectral diferente, constituyendo así uno de los canales de la imagen multicanal.

"Múltiple", "multiplexado" o "multiplexación" se refiere a la detección de múltiples dianas en una muestra de forma coincidente, sustancialmente de forma simultánea o secuencial. La multiplexación puede incluir identificar y/o cuantificar múltiples ácidos nucleicos distintos (por ejemplo, ADN, ARN, ARNm, miARN) y polipéptidos (por ejemplo, proteínas) tanto individualmente como en cualquiera y todas las combinaciones.

Una "muestra de tejido" como se usa en el presente documento es cualquier muestra biológica que se obtiene de un cuerpo humano o animal para una anatomía patológica. Por ejemplo, una muestra de tejido se puede derivar de tejido de mama, tejido de pulmón, tejido de próstata, etc. y puede comprender muestras derivadas de tumores, sospechas de tumor o de tejido sano. Otros ejemplos de muestras y piezas de tejido y su preparación se divulgan en el presente documento. La muestra de tejido se puede tratar en un ensayo con una o más tinciones para asistir en la identificación de estructuras (por ejemplo, vasos, células, etc.) dentro de la muestra.

Una "imagen descompuesta" como se usa en el presente documento engloba una imagen escalar o con valor de gris obtenida para un canal de una imagen multicanal. Al descomponer una imagen multicanal se obtiene una imagen descompuesta por canal.

En la figura 1A, se muestra un dispositivo basado en ordenador (que no forma parte de la invención reivindicada) para detectar y/o analizar vasos en una imagen múltiple. El experto en la técnica apreciará que se pueden utilizar otros dispositivos o sistemas informáticos y que los sistemas informáticos descritos en el presente documento se pueden acoplar de forma comunicativa a componentes adicionales, por ejemplo, analizadores de piezas, escáneres o sistemas de formación de imágenes, equipos automatizados de preparación de preparaciones, etc. Algunos de estos componentes adicionales y los diversos ordenadores que se pueden utilizar se describen adicionalmente en el presente documento.

En general, el aparato de formación de imágenes 101 (o fuente de imágenes) puede incluir, sin limitación, uno o más dispositivos de captura de imagen. Los dispositivos de captura de imagen pueden incluir, sin limitación, una cámara (por ejemplo, una cámara analógica, una cámara digital, etc.), dispositivos ópticos (por ejemplo, una o más lentes, grupos de lentes de enfoque con sensor, objetivos de microscopio, etc.), sensores para la formación de imágenes (por ejemplo, un dispositivo de carga acoplada (CCD), un sensor para la formación de imágenes con semiconductor complementario de óxido de metal (CMOS) o similares), película fotográfica o similares. En modos de realización digitales, el dispositivo de captura de imagen puede incluir una pluralidad de lentes que cooperan para demostrar un enfoque instantáneo. Un sensor de imágenes, por ejemplo, un sensor CCD puede capturar una imagen digital de la pieza. En algunos modos de realización, el aparato de formación de imágenes 12 es un sistema de formación de imágenes de campo claro, un sistema de formación de imágenes multiespectrales (MSI) o un sistema de microscopía fluorescente, como es conocido por los expertos en la técnica. Se describen adicionalmente sistemas de formación de imágenes en el presente documento.

Con referencia a las figuras 1A y 1B, el sistema informático 107 puede incluir un ordenador de mesa, un ordenador portátil, una tableta o similares, circuitos electrónicos digitales, un microprograma, un equipo informático, una memoria 103, un medio de almacenamiento informático 103, un programa informático, un procesador (incluyendo un procesador programado 105) y/o similares. El sistema informático ilustrado 107 de la figura 1A es un ordenador con una pantalla o dispositivo de visualización y una torre. La torre puede almacenar imágenes digitales en forma binaria. Las imágenes también se pueden dividir en una matriz de píxeles. Los píxeles pueden incluir un valor digital de uno o más bits, definido por la profundidad de bits. La red 109 o una conexión directa interconecta el aparato de formación de imágenes 101 y el sistema informático 107. La red 109 puede incluir, sin limitación, una o más puertas de acceso, enrutadores,

puentes, combinaciones de los mismos o similares. La red 109 puede incluir uno o más servidores y uno o más sitios web que sean accesibles para usuarios y se pueden usar para enviar y recibir información que el sistema informático 107 puede utilizar. Un servidor puede incluir, sin limitación, una o más bases de datos asociadas para almacenar información (por ejemplo, imágenes digitales, algoritmos, protocolos de tinción, valores de corte para evaluaciones comparativas o similares). La red 109 puede incluir, pero no se limita a, redes de datos que usan el protocolo de control de transmisión (TCP), protocolo de datagramas de usuario (UDP), el protocolo de internet (IP) y otros protocolos de datos. El dispositivo (que no forma parte de la invención reivindicada) o sistema informático puede comprender además una salida en pantalla u otros medios de proporción de datos/salida a un usuario, operario o instrumento o procedimiento posterior.

Con referencia a las figuras 1B y 2, el dispositivo o sistema informático 107 (o procedimiento implementado por ordenador) comprende uno o más procesadores 105 y al menos una memoria 103, almacenando la al menos una memoria 103 instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores ejecute instrucciones para recibir imágenes de entrada 101 de una fuente, active un módulo de selección de región 111 para posibilitar la delineación automatizada o manual de la imagen de entrada en una o más regiones, active un módulo de descomposición 112 para descomponer una imagen múltiple en una pluralidad de canales (por ejemplo, imágenes de canal de vaso) (S212), active un módulo de detección de rayo 113 para detectar vasos grandes en cada una de una pluralidad de imágenes de canal de vaso (S213), active un módulo de detección del rasgo característico de línea 114 para detectar vasos largos y/o estrechos en cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso (S214), active un módulo de detección de vasos pequeños 115 para detectar vasos más pequeños en cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso (S215), active un módulo de clasificación de vasos 116 para clasificar cada uno de los vasos grandes, largos/estrechos y/o pequeños identificados como vasos sanguíneos, vasos linfáticos o vasos puramente linfáticos (S216), active un módulo de determinación de la maduración 117 para determinar aquellos vasos clasificados que sean maduros (S217), y active un módulo de detección nuclear 118 para detectar células y/o núcleos en cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso (S218). Cada uno de estos módulos se describe con más detalle en el presente documento. Se pueden utilizar módulos adicionales en el flujo de trabajo en algunos modos de realización. Por supuesto, el experto en la técnica reconocerá que cualquiera de las instrucciones, algoritmos y filtros descritos para su uso dentro de cada módulo se puede adaptar o cambiar en base a las tinciones que se detecten.

Los resultados de los módulos 111-118 (y las etapas S213 a S218, de la figura 2) se pueden emitir a un usuario u operario del terminal 107, o se pueden compilar en un informe generado por el procesador 105 y transmitir a otro ordenador a través de una red, o guardar en un archivo. Los resultados incluyen las salidas de cada módulo 111-118 (y las etapas S213-S218) y pueden incluir detalles, tales como localizaciones de vasos, formas de vasos, contornos de polígonos, tamaños de luces, categorías y tipos de vasos, maduraciones, densidades, tipos y localizaciones nucleares, y relaciones espaciales entre cada uno de estos rasgos característicos, para posibilitar otro análisis detallado de colocalización entre vasos y células. Además, se pueden realizar las operaciones descritas con referencia a las figuras 1B y 2 en cualquier orden concebible y no se limitan al orden mostrado en el presente documento. Por ejemplo, se pueden realizar varias operaciones en paralelo, tales como detección de vasos (por ejemplo, detectar vasos grandes, largos y estrechos y pequeños en operaciones paralelas) y detección nuclear, seguido de detección de la maduración.

Además, se pueden realizar las operaciones divulgadas en las mismas o diferentes regiones de la imagen, o en toda la imagen repetidamente, definiéndose regiones personalizadas en base a estructuras o rasgos característicos observados en la imagen, y ejecutándose operaciones separadas en paralelo en diferentes regiones, posibilitando un procesamiento eficaz de grandes cantidades de preparaciones fluorescentes múltiple.

Imágenes de entrada

En algunos modos de realización, las imágenes múltiple 101 se adquieren de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y como se describe en el presente documento. Las imágenes múltiple 101 se derivan de muestras de tejido, donde las muestras de tejido se han teñido, tal como con uno o más puntos cuánticos, fluoróforos, fluoróforos depositados por enzimas o tinciones cromógenas, o cualquier combinación de los mismos.

Para analizar y cuantificar la vascularización o microvascularización del cáncer, las muestras de tejido se pueden teñir con ensayos fluorescentes que incluyan uno o más biomarcadores específicos para vasos sanguíneos, vasos linfáticos y músculos lisos. Además, el tejido también se puede teñir para diferentes tipos de biomarcadores tumorales de núcleos y/o membranas celulares, junto con un marcador, tal como DAPI, para identificar estructuras nucleares. Los procedimientos para la tinción de una estructura de tejido y guía en la elección de las tinciones apropiadas para diversos propósitos se analizan, por ejemplo, en "Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)" y "Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987)".

En algunos modos de realización, tales como en una preparación fluorescente múltiple de una pieza de tejido, se tiñen de forma simultánea estructuras de núcleo y de tejido diferentes con colorantes fluorescentes específicos, cada uno emitiendo fluorescencia en una banda espectral diferente (a modo de ejemplo, los colorantes fluorescentes típicos

incluyen los colorantes Alexa Fluor® disponibles de Fisher Scientific).

En otros modos de realización, las tinciones se seleccionan de puntos cuánticos. Los puntos cuánticos nanocristalinos son partículas nanocristalinas semiconductoras y típicamente varían de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 nm de tamaño. Una variedad de puntos cuánticos que tienen diversas químicas de superficie y características de fluorescencia está disponible comercialmente de Invitrogen Corporation, Eugene, OR, o Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, CA (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138). Aún otros puntos cuánticos disponibles comercialmente incluyen aquellos proporcionados bajo la marca comercial Qdot™ de Life Technologies, Inc. Los modos de realización de trabajo ejemplares utilizan puntos cuánticos, tales como los nanocristales Qdot™ 565 y Qdot™ 655, donde el número usado en dicha nomenclatura se refiere a la longitud de onda aproximada de la emisión máxima de las nanopartículas. Por ejemplo, un nanocrystal Qdot™ 565 emite luz que tiene una longitud de onda de 565 nm y produce un color verde claro. Por tanto, se pueden seleccionar puntos cuánticos para proporcionar una señal detectable a una longitud de onda particular.

En algunos modos de realización, las imágenes múltiples comprenden señales 101 (y S201) correspondientes a tinciones específicas para diferentes tipos de vaso. En otros modos de realización, las imágenes múltiples comprenden señales correspondientes a tinciones específicas para vasos sanguíneos y/o vasos linfáticos. En otros modos de realización, las imágenes múltiples comprenden señales correspondientes a tinciones específicas para células endoteliales (por ejemplo, CD31) y/o células linfáticas. Aún en otros modos de realización, las imágenes múltiples comprenden señales correspondientes a tinciones específicas para tejido muscular o células musculares. En algunos modos de realización, se eligen las tinciones de modo que se puedan detectar las luces de vaso comparando regiones teñidas de forma oscura con regiones teñidas comparativamente de forma más clara.

En algunos modos de realización, la imagen múltiple comprende señales correspondientes a tinciones específicas para vasos sanguíneos, tales como CD31/34, que tiene una emisión fluorescente de banda estrecha centrada en aproximadamente 655 nm. En otros modos de realización, la imagen múltiple comprende señales correspondientes a tinciones específicas para vasos linfáticos, tales como podoplanina, que tiene una emisión fluorescente de banda estrecha centrada en aproximadamente 565 nm. Aún en otros modos de realización, la imagen múltiple comprende señales correspondientes a una tinción con anticuerpo anti-músculo liso (ASMA). Aún en otros modos de realización, la imagen múltiple comprende señales correspondientes a tinciones que identifican otros tipos de células o núcleos. En otros modos de realización, la imagen múltiple comprende señales correspondientes a 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir todos los núcleos en la imagen y cualquier autofluorescencia de tejido de fondo ruidosa que esté presente en las imágenes multiplexadas. Se cree que los núcleos teñidos con DAPI proporcionan un contexto celular y tisular para interpretar las imágenes.

Módulo de selección de región

Antes de la descomposición (S212), el módulo de selección de región 111 opcional posibilita la delineación automatizada o manual de la imagen múltiple 101 en una o más regiones. Esto posibilita que se realicen operaciones posteriores en las mismas o diferentes regiones de la imagen, posibilitando un procesamiento eficaz de imágenes múltiples. Por ejemplo, se puede imponer una cuadrícula sobre una imagen y se pueden muestrear estructuras dentro de una distancia de uno o más vértices de cuadrícula. Se pueden definir regiones personalizadas en base a estructuras o rasgos característicos observados en la imagen, ejecutándose procedimientos separados en paralelo para cada región. Las regiones personalizadas se pueden determinar automáticamente en base al análisis de imágenes, la heterogeneidad del tejido, etc., o se pueden seleccionar por el usuario. Por ejemplo, una imagen de campo claro de la pieza, tal como una imagen con hematoxilina y eosina, se puede ver y usar para anotar regiones específicas, tales como áreas tumorales. Las áreas identificadas se pueden usar para proporcionar un campo de visión para un escáner fluorescente. En otras palabras, una región seleccionada en una imagen de campo claro se puede escanear con mayor detalle por la fuente 101 para generar una imagen fluorescente múltiple de la(s) región/regiones seleccionada(s). Se pueden ejecutar operaciones separadas en paralelo en diferentes regiones, posibilitando un procesamiento eficaz de grandes cantidades de preparaciones múltiples, por ejemplo, preparaciones fluorescentes.

Descomposición de imágenes multiplexadas

Como etapa inicial, el sistema informático recibe una imagen multiplexada como entrada (S201), donde la imagen multiplexada comprende señales correspondientes a uno o más canales de tinción como se describe en el presente documento. Antes de otro procesamiento y análisis, en primer lugar esta imagen inicial se debe descomponer en sus canales constituyentes (S212), donde cada canal descompuesto corresponde a una tinción o señal particular. Las imágenes descompuestas se denominan a continuación en el presente documento "imágenes de canal" y se pueden usar como entrada para cada uno de los módulos de detección de vasos y de detección nuclear descritos en el presente documento.

A modo de antecedente, cada colorante fluorescente se emite con una firma espectral distinta en la banda espectral visible de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 780 nm, donde la intensidad de señal asociada que se emite desde una localización en el tejido es linealmente proporcional a la expresión de biomarcador de la estructura celular subyacente. Aunque distintas entre sí, las firmas espectrales de diferentes colorantes fluorescentes se pueden solapar

espectralmente. En una célula donde se colocan múltiples biomarcadores y, por tanto, son coexpresivos, la emisión fluorescente de los biomarcadores individuales se puede sumar con una contribución de composición (peso) que es proporcional a la expresión de biomarcador asociado. Por ejemplo, un colorante fluorescente puede estar emitiendo en el intervalo espectral de aproximadamente 480 a aproximadamente 520 nm, mientras que otro colorante fluorescente puede emitir en el intervalo espectral de aproximadamente 500 a aproximadamente 540 nm. Además, las preparaciones de tejido múltiple pueden autoemitir fluorescencia, que es una señal de fondo de emisión de tejido que no se asocia con ninguna expresión de biomarcador particular, y que contribuye con una componente "ruidosa" en la señal compuesta. Como ejemplo, la emisión ruidosa de autofluorescencia puede estar en el intervalo espectral de banda ancha de entre aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm. La señal espectral observada en cualquier localización dada en el tejido es una mezcla ponderada de las emisiones espectrales de los biomarcadores coexpresivos subyacentes y las emisiones espectrales de fondo ruidosas no deseadas.

En algunos modos de realización, se forman imágenes de la preparación de tejido múltiple fluorescente usando un sistema de formación de imágenes multiespectrales, tal como un sistema de microscopio fluorescente que se acopla a una cámara o a un escáner de preparaciones completo, de modo que se adquieran múltiples imágenes de canal. En un sistema múltiple típico, se adquieren imágenes de dieciséis a treinta canales. Cada imagen de canal adquirida es una medición de la señal de la preparación de tejido que se emite en un intervalo de filtro espectral de banda estrecha particular. Como ejemplo, una imagen de canal que corresponde a un intervalo de filtro espectral de aproximadamente 500 a aproximadamente 540 nm captura toda las señales que se emiten por el tejido en el intervalo espectral de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 540 nm.

La pila de imágenes multiespectrales producida por el sistema de formación de imágenes es una mezcla ponderada de las firmas espectrales de emisión fluorescente subyacentes asociadas con los biomarcadores individuales y componentes de ruido. En cualquier pixel particular, los pesos de composición son proporcionales a las expresiones de biomarcador de los biomarcadores colocados subyacentes en la localización particular en el tejido y el ruido de fondo en esa localización. Por tanto, los pesos de composición varían de pixel a pixel y la contribución de autofluorescencia desconocida. Los procedimientos de descomposición espectral divulgados en el presente documento descomponen el vector de valor de pixel multicanal en cada pixel en una colección de miembros o componentes finales de biomarcadores constituyentes y estiman las proporciones de los colorantes fluorescentes constituyentes individuales para cada uno de los biomarcadores. Por ejemplo, con un sistema multiespectral con dieciséis canales formando imágenes de una preparación de tejido de cinco biomarcadores, el vector multicanal adquirido de valores de pixel en un pixel será del vector de 16 valores y el número de componentes de descomposición que se va a resolver es seis, cinco correspondiendo a cada biomarcador y uno a la componente autofluorescente de fondo. En cada localización de píxeles, el procedimiento de descomposición espectral estima los pesos de seis componentes a partir del vector de 16 píxeles adquirido. Se cree que la descomposición espectral exacta de imágenes fluorescentes es clínicamente importante porque es una de las primeras etapas clave en el análisis de imágenes de histopatología múltiple.

Los procedimientos de descomposición son bien conocidos por los expertos en la técnica y cualquier procedimiento ahora conocido o descubierto más tarde se puede usar para "descomponer" imágenes múltiple en las imágenes de canal de vaso. En general, el procedimiento de descomposición extrae canales específicos de tinción para determinar las concentraciones locales de tinciones individuales usando espectros de referencia que son bien conocidos para los tipos estándar de combinaciones de tejido y tinción. Por ejemplo, cada pixel en una imagen de entrada puede comprender una mezcla de espectros de componentes, incluyendo uno o más puntos cuánticos que representan estructuras diana, además de señales de banda ancha, tales como DAPI y autofluorescencia, como se describe anteriormente. La descomposición puede usar espectros de referencia recuperados de una imagen de control o estimados a partir de la imagen en observación. La descomposición de las señales de componentes de cada pixel de entrada posibilita la recuperación y el análisis de canales específicos de tinción, tales como canales de vaso y canales de núcleo. Los términos "descomposición" y "desconvolución de colores" (o "desconvolución") o similares (por ejemplo, "desconvolucionar", "descomponer") se usan de manera intercambiable en la técnica.

Las imágenes múltiple se pueden descomponer usando descomposición lineal. La descomposición lineal se describe, por ejemplo, en Zimmermann "Spectral Imaging and Linear Unmixing in Light Microscopy" Adv Biochem Engin/Biotechnol (2005) 95:245-265 y en C. L. Lawson y R. J. Hanson, "Solving least squares Problems", PrenticeHall, 1974, capítulo 23, p. 161. En la descomposición de tinción lineal, el espectro medido ($S(\lambda)$) en cualquier pixel se considera una mezcla lineal de componentes espectrales de tinción y es igual a la suma de las proporciones o pesos (A) de cada firma espectral de referencia de fluoróforo individual ($R(\lambda)$) que se expresa en el pixel

$$S(\lambda) = A_1 \cdot R_1(\lambda) + A_2 \cdot R_2(\lambda) + A_3 \cdot R_3(\lambda) \dots A_i \cdot R_i(\lambda)$$

que se puede expresar más en general como en forma de matriz como

$$S(\lambda) = \sum A_i \cdot R_i(\lambda) \text{ o } S = R \cdot A$$

Si existen imágenes de M canales adquiridas y N fluoróforos individuales, las columnas de la matriz $M \times N$ R es la firma espectral de referencia conocida de los fluoróforos individuales y el vector $N \times 1$ A es el desconocido de las

proporciones de fluoróforos individuales y el vector $M \times 1$ S es el vector espectral multicanal medido en un pixel. En estas ecuaciones, la señal en cada pixel (S) se mide durante la adquisición de la imagen múltiple y los espectros de referencia para las tinciones conocidas se determinan normalmente en un procedimiento fuera de línea independiente a partir de piezas fluorescentes marcadas con solo una única tinción usando idénticas configuraciones del instrumento. Se convierte en un simple ejercicio de matriz de álgebra lineal para determinar las contribuciones de diversas tinciones (A_i) calculando su contribución a cada punto en el espectro medido. En algunos modos de realización, la solución se obtiene usando un enfoque de ajuste por mínimos cuadrados inverso que minimiza la diferencia de cuadrados entre los espectros medido y calculado resolviendo el siguiente conjunto de ecuaciones,

$$[\partial \sum_j \{S(\lambda_j) - \sum_i A_i \cdot R_i(\lambda_j)\}^2] / \partial A_i = 0$$

En esta ecuación, j representa el número de canales de detección e i es igual al número de tinciones. La solución de la ecuación lineal a menudo implica permitir una descomposición restringida para obligar a que los pesos (A) sumen la unidad.

Además, la descomposición se puede conseguir usando los procedimientos descritos en el documento WO2014/195193, titulado "Image Adaptive Physiologically Plausible Color Separation," presentado el 28 de mayo de 2014. En general, el documento WO2014/195193 describe un procedimiento de descomposición separando señales de componentes de la imagen de entrada usando vectores de referencia optimizados de forma iterativa. Además, los datos de imagen de un ensayo se pueden correlacionar con los resultados esperados o ideales específicos para las características del ensayo para determinar una métrica de calidad. En el caso de imágenes de baja calidad o escasas correlaciones frente a resultados ideales, se ajustan uno o más vectores de columna de referencia en la matriz R , y la descomposición se repite de forma iterativa usando vectores de referencia ajustados, hasta que la correlación muestre una imagen de buena calidad que coincida con los requisitos fisiológicos y anatómicos. La información anatómica, fisiológica y del ensayo se puede usar para definir reglas que se apliquen a los datos de imagen medidos para determinar la métrica de calidad. Esta información incluye cómo se tiñó el tejido, qué estructuras dentro del tejido se pretendía o no se pretendía teñir, y las relaciones entre las estructuras, tinciones y marcadores específicos para el ensayo que se está procesando. Un procedimiento iterativo da como resultado vectores específicos de tinción que pueden generar imágenes que identifican con exactitud estructuras de interés e información biológicamente pertinente, están libres de cualquier espectro ruidoso o no deseado y, por lo tanto, son aptos para el análisis. Los vectores de referencia se ajustan a dentro de un espacio de búsqueda. El espacio de búsqueda define un intervalo de valores que un vector de referencia puede tomar para representar una tinción. El espacio de búsqueda se puede determinar escaneando una variedad de ensayos de entrenamiento representativos que incluyen problemas conocidos o comunes, y determinando conjuntos de vectores de referencia de alta calidad para los ensayos de entrenamiento.

La descomposición se puede conseguir usando los procedimientos descritos en el documento WO2015/124772, titulado "Group Sparsity Model for Image Unmixing", presentado el 23 de febrero de 2015. En general, el documento WO2015/124772 describe la descomposición usando un marco de dispersión de grupo, en el que las fracciones de las contribuciones de tinción de una pluralidad de marcadores de colocalización se modelan dentro de un "mismo grupo" y las fracciones de las contribuciones de tinción de una pluralidad de marcadores de no colocalización se modelan en diferentes grupos, proporcionando información de colocalización de la pluralidad de marcadores de colocalización al marco de dispersión de grupo modelado, resolviendo el marco modelado usando un lasso de grupo para proporcionar una solución de mínimos cuadrados dentro de cada grupo, en el que la solución de mínimos cuadrados corresponde a la descomposición de los marcadores de colocalización, y proporcionando una solución dispersa entre los grupos que corresponde a la descomposición de los marcadores de no colocalización. Además, el documento WO2015124772 describe un procedimiento de descomposición que introduce datos de imagen obtenidos de la muestra de tejido biológico, que lee datos de referencia de una memoria electrónica, siendo los datos de referencia descriptivos del color de tinción de cada una de las múltiples tinciones, que lee datos de colocalización de la memoria electrónica, siendo los datos de colocalización descriptivos de los grupos de las tinciones, comprendiendo cada grupo tinciones que se pueden colocalizar en la muestra de tejido biológico, y formando cada grupo un grupo para el criterio de lasso de grupo, teniendo al menos uno de los grupos un tamaño de dos o por encima, y que calcula una solución del criterio de lasso de grupo para obtener la imagen descompuesta usando los datos de referencia como matriz de referencia. En algunos modos de realización, el procedimiento para descomponer una imagen puede comprender generar un modelo de dispersión de grupo en el que se asigna una fracción de una contribución de tinción de marcadores colocalizados dentro de un único grupo y se asigna una fracción de una contribución de tinción de marcadores no colocalizados dentro de grupos separados y resolver el modelo de dispersión de grupo usando un algoritmo de descomposición para proporcionar una solución de mínimos cuadrados dentro de cada grupo.

Detección de vasos

Después de la descomposición de la imagen múltiple (S_{212}), se detectan vasos (etapas S_{213} , S_{214} , S_{215}) en cada una de una pluralidad de imágenes de canal de vaso. En general, se pueden detectar tres tipos diferentes de vasos, incluyendo vasos grandes, vasos largos y estrechos y vasos pequeños. Para la detección de vasos grandes, se usa un módulo de detección del rasgo característico de rayo 113 para detectar regiones similares a "cuenca" que tienen regiones interiores con valor de intensidad de pixel baja y lisas rodeadas por contornos con valor de intensidad de pixel alta. Para la detección de vasos largos y estrechos, se usa un módulo de detección de línea 114 para identificar

partes locales de vasos largos y, a continuación, agruparlas por agrupamiento aglomerativo (descrito con más detalle en el presente documento). Para la detección de vasos pequeños, un módulo de detección de vasos pequeños 115 utiliza operaciones de filtrado por esfera rodante y con imágenes binarias para identificar vasos pequeños y/o compactos. Cada uno de estos módulos y procedimientos se describe en detalle en el presente documento. Por supuesto, el experto en la técnica reconocerá que no todos los tipos de vasos estarán presentes en todas las muestras de tejido, o en cualquier región de las mismas.

Los vasos se identifican en imágenes de canal de vaso sanguíneo e imágenes de canal de vaso linfático. En las imágenes de canal de vaso, idealmente existe una intensidad de pixel alta correspondiente que está en proporción a las contribuciones de tinción de vaso subyacente. Por otra parte, en localizaciones donde no existe ningún vaso presente, existen valores de intensidad de pixel muy baja que corresponden al valor promedio de fondo. Por ejemplo, en los canales de vaso sanguíneo, el vaso sanguíneo junto con los vasos linfáticos se muestran como contornos claros (debido a las tinciones utilizadas); mientras que en los canales de vaso linfático, solo los límites de vaso linfático se muestran como contornos claros (de nuevo, debido a las tinciones utilizadas).

Tras la identificación de los vasos en cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso, se proporcionan las salidas de cada uno de los módulos identificados anteriormente a un módulo de clasificación de vasos 116 para clasificar el uno o más vasos detectados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos; o a un módulo de determinación de la maduración 117.

Detección de vasos grandes

Después de que la imagen múltiple se recibe como entrada (S201) y la imagen se descompone en la pluralidad de imágenes del canal de vaso (S212), se detectan vasos grandes en cada una de las imágenes de canal de vaso usando un módulo de detección del rasgo característico de rayo 113. En algunos modos de realización, el módulo de detección del rasgo característico de rayo 113 emite un polígono con contorno que se proporciona al módulo de clasificación de vasos 116 para otro análisis. En general, el módulo de detección del rasgo característico de rayo identifica vasos grandes en cada una de las imágenes de canal de vaso detectando regiones similares a cuenca que tienen regiones interiores con intensidad baja y lisas rodeadas por contornos con valor alto.

Más específicamente, y con respecto a la FIG. 3, se pueden detectar una o más luces (S321) en cada una de las imágenes de canal de vaso identificando contrastes entre regiones oscuras de la imagen y regiones más claras que rodean a las regiones oscuras (o regiones comparativamente más claras). Los contrastes identificados se pueden evaluar frente a umbrales de contraste predeterminados entre los límites de vaso y la señal de fondo en las imágenes de canal de vaso descompuesto. En algunos modos de realización, se pueden identificar la presencia y localización de luces observando la imagen con tinción descompuesta asociada con un anticuerpo anti-músculo liso (ASMA), indicando una tinción con ASMA que un tejido muscular puede ser más intenso en el límite de una luz en comparación con el centro. Por ejemplo, en la imagen con ASMA, solo en las localizaciones de píxeles donde esté presente el músculo liso existirán valores de intensidad de pixel alta. En otras localizaciones, incluyendo aquellas donde no está presente músculo liso, los píxeles tienen un valor de fondo o un valor bajo.

Como se señala en el presente documento, idealmente una capa de músculo liso rodea a los vasos grandes y maduros, por tanto, se puede usar su firma (o señales de tinción indicativas de su firma) como un modo de facilitar la identificación de las estructuras de vaso encerradas por ellos. El umbral de valor de imagen apropiado (o "umbral de valor de intensidad de imagen") para detectar el límite del músculo liso se elige manualmente de un conjunto de imágenes de entrenamiento construyendo un histograma de las intensidades de pixel de ASMA de regiones en la capa exterior de los vasos grandes, que se identifican y anotan manualmente por un experto entrenado, tal como un anatomopatólogo u otro profesional médico, y se comparan frente a valores de píxeles de imagen con ASMA de todas las demás regiones de imagen. El contraste de intensidad ideal de la capa de ASMA se establece en la diferencia entre el valor de intensidad de pixel alta esperado de la región teñida con ASMA al valor de intensidad de pixel de fondo o baja. Estos valores umbral y de contraste elegidos se usan en todos los demás conjuntos de imágenes (para propósitos de detección de vasos grandes).

Tras la identificación de las luces en las imágenes de canal de vaso (S321), se distribuyen uno o más rayos dentro de cada luz identificada (S322). Cada rayo comprende una localización del centro (x,y) y un número de líneas que se extienden radialmente hacia afuera desde la localización del centro (a continuación en el presente documento "brazos"). Los brazos están igualmente espaciados entre sí, es decir, los brazos están distribuidos radialmente en un ángulo fijo entre sí. Por ejemplo, si 16 brazos se extienden desde un rayo, los brazos de ese rayo están distribuidos uniformemente en un ángulo de 22,5 grados entre sí.

A modo de ejemplo, la generación de rayos se ilustra en la FIG. 4A, que representa una imagen derivada de una muestra de tejido 430 y una luz 431. Un rayo 433 se dispone en la proximidad de un centro de la luz 431 y una pluralidad de brazos 434 se extiende radialmente hacia afuera desde el centro del rayo 433.

Se usan los siguientes parámetros de rayo por el módulo de detección del rasgo característico de rayo 113 en la identificación de vasos grandes:

(i) la posición de coordenadas de la localización del centro (x,y).

5 (ii) el número de brazos que se extienden desde la localización del centro. La compensación implicada en la elección del número de brazos es el tiempo de computación y la exactitud. Con un mayor número de brazos, se cree que la exactitud de la detección de vasos es alta, pero el tiempo de computación se incrementa linealmente con el número de brazos. En algunos modos de realización, el número de brazos seleccionados varía de aproximadamente 16 a aproximadamente 32. En otros modos de realización, se usa un mínimo de 16 brazos.

10 (iii) la longitud de cada brazo. La longitud del brazo se establece en un valor que corresponde a la distancia radial máxima de un vaso maduro que se espera que se identifique en la imagen. En algunos modos de realización, una longitud típica es de aproximadamente 1 mm, que corresponde a aproximadamente 200 píxeles en la imagen con un tamaño de pixel individual de aproximadamente 0,5 micrómetros en cada lado.

15 (iv) dos umbrales de contraste de intensidad (T1) y (T2). T1 es el umbral de la diferencia entre la mediana de los valores de intensidad máxima de todos los brazos y el valor de intensidad del centro del rayo. T2 es el umbral de la diferencia entre el valor del centro del rayo y la mediana de los valores de intensidad mínima de todos los brazos.

20 Para determinar empíricamente T1 y T2, se analizó un conjunto de imágenes de vasos grandes anotadas manualmente y el umbral de contraste T1 se estableció en el valor promedio de la diferencia absoluta entre el valor de intensidad máxima a lo largo del límite de vaso y el centro del vaso en estas imágenes. De forma similar, el umbral de contraste T2 se estableció en el valor promedio de la diferencia absoluta entre el valor del centro del rayo y la intensidad mínima de los píxeles encerrados dentro de los vasos. Sin pretender quedar vinculado a ninguna teoría particular, el objetivo de usar los dos umbrales es ser lo suficientemente sensible como para escoger todos los vasos válidos, pero, al mismo tiempo, lo suficientemente específico, de modo que se rechace cualquier detección de vasos falsa, debida a valores de intensidad de pixel alta de los artefactos de tinción y autofluorescencia. Se pretende que el umbral T1 seleccione los contornos de vaso intensos, mientras que se pretende que el umbral T2 seleccione regiones dentro de una región de luz, de valor de intensidad de pixel baja, que esté rodeada por contornos de vaso de intensidad de pixel alta (suprimiendo cualquier detección falsa en las regiones de imagen que tengan valores altos pero sin ninguna luz cerrada).

35 En algunos modos de realización, se puede disponer un rayo en un centro aproximado de la luz identificada, si se conoce (S322), o se puede disponer una pluralidad de rayos sustancialmente alrededor o cerca de un centro aproximado. Tras la disposición de los rayos, se recupera una intensidad de los píxeles a lo largo de longitud de cada brazo de cada rayo para determinar un límite de la luz (S323). En general, observando los contrastes entre los píxeles en una localización del centro del rayo y los píxeles a lo largo de cada brazo que se extiende radialmente, se puede determinar una posición límite de la luz, tal como comparando los contrastes observados y medidos con los umbrales de contraste (T1 y T2) (S324). Si los contrastes observados no satisfacen los umbrales de contraste de intensidad, la presunción es que la luz es un positivo falso y el rayo se descarta (S325) (es decir, no retenido para otro procesamiento y/o análisis). Por otra parte, si los contrastes de intensidad observados satisfacen los umbrales de contraste, el rayo se retiene para otro procesamiento (S326).

45 Más específicamente, se logra la observación de contrastes comparando los valores de intensidad de pixel a lo largo de cada brazo del rayo con respecto a valores de intensidad de pixel en una localización del centro del rayo. Este procedimiento se repite para todos los brazos para cada rayo. En algunos modos de realización, se calculan (identifican) valores de intensidad de pixel mínima y máxima a lo largo de cada brazo y también se identifica la localización de la intensidad de pixel máxima a lo largo de cada brazo. Luego, se computa una mediana de todos los valores de intensidad de pixel mínima y se compara con la intensidad de pixel promedio en el centro del rayo, promediada sobre una región de vecindad radial pequeña, por ejemplo, con un radio de 5 píxeles. De forma similar, se computa una mediana de todos los valores de intensidad de pixel máxima y se compara con la intensidad de pixel en el centro del rayo. Los rayos se retienen para otro procesamiento (S326) solo cuando se cumplen dos condiciones, a saber: (a) la mediana de todos los valores de intensidad máxima es al menos T1 mayor que el valor de intensidad en el centro; y (b) la mediana de todos los valores de intensidad mínima es, como máximo, T2 menor que el valor de intensidad en el centro. Si una o ambas de estas condiciones no se cumplen, el rayo se descarta (S325).

55 La FIG. 4D ilustra la evaluación de las intensidades de pixel de cada brazo. A modo de ejemplo, la FIG. 4D representa una matriz de píxeles 436, que tiene un tamaño de cuadrícula de 7 por 7 píxeles, donde se dispone un rayo en un pixel del centro 0. Ocho brazos 437 se extienden desde el pixel del centro 0, y cada brazo tiene tres píxeles de longitud. Los números en la cuadrícula indican los valores de píxeles de intensidad para cada pixel a lo largo de cada brazo, así como una intensidad de pixel en el área de centro. En este ejemplo particular, los valores de intensidad de pixel máxima a lo largo de cada uno de los brazos es 30. En consecuencia, la mediana de los valores de intensidad máxima es 30. Asimismo, los valores de intensidad de pixel mínima a lo largo de cada uno de los brazos es 10 y, por tanto, una mediana de los valores de intensidad mínima es 10. T1 se establece en un valor de 50 y T2 se establece en un valor de 20 (u otros valores predeterminados), en una escala de valores de 0 a 255 para proporcionar contornos de vaso válido. Esta mediana de los valores se compara, a continuación, con los umbrales de contraste T1 y T2 para determinar si un rayo es aceptable o no.

Tras la aceptación de un rayo, se genera un polígono con contorno, con lo que el polígono con contorno generado corresponde a los límites aproximados de un vaso grande. Las localizaciones de los valores de intensidad máxima en cada uno de los brazos que se extienden desde el centro del rayo válido, identificados en las etapas de procesamiento anteriores, constituyen los vértices del polígono con contorno. A modo de ejemplo, y con referencia a la FIG. 4B, el polígono con contorno 435 representa el límite de una luz detectada y se basa en las intensidades de pixel medidas en cada brazo del rayo 434. En algunos modos de realización, los puntos usados para determinar la forma de un polígono se derivan de los puntos a lo largo de cada brazo que tienen los valores de intensidad de pixel más alta.

Como se describe en el presente documento, se puede dispersar una pluralidad de rayos dentro de un centro aproximado de una luz. En consecuencia, al aceptar o descartar un rayo, se realiza una determinación en cuanto a si existe algún rayo adicional que se vaya a observar (S328). Si existen más rayos, a continuación, el siguiente rayo se selecciona (S327) y se repite el procedimiento de detección divulgado en el presente documento. Si no existen rayos adicionales, los polígonos con contorno generados se emiten como uno o más vasos candidatos (S329).

En algunos modos de realización, se puede aceptar una pluralidad de rayos dentro de una única luz como que cumplen con los requisitos de contraste umbral señalados anteriormente. En dicho caso, las localizaciones del centro de cada rayo aceptado se promedian para determinar un centro más preciso de la luz. Esto se ilustra en la FIG. 4C, que representa una serie de rayos 433, donde los rayos representados se pueden usar para determinar un centro más preciso. Solo a modo de ejemplo, el centro más preciso puede estar dentro de un interior de un perímetro definido por los rayos 433, en base a los promedios de las posiciones de coordenadas (x,y) de los rayos 433 existentes.

En algunos modos de realización, se puede insertar un rayo adicional en este centro más preciso, seguido de la generación de un polígono con contorno en base a los datos generados por el rayo adicional en el centro más preciso. En algunos modos de realización, el rayo adicional insertado en el centro más preciso comprende más brazos que los rayos dispuestos en el centro aproximado. De esta manera, se puede generar un polígono más preciso en base a datos calculados a partir de rayos que tienen más brazos. En vista de la presente divulgación, pueden resultar evidentes otras combinaciones de mediciones de rayos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, dependiendo de la calidad de la imagen y el aspecto del tejido, los parámetros para los rayos se pueden ajustar para una exactitud y velocidad de detección óptimas.

Detección de vasos largos y estrechos

En algunos modos de realización, se usa un módulo de detección del rasgo característico de línea 114 para detectar vasos largos y estrechos dentro de cada una de la pluralidad de imágenes de canal de vaso. Los vasos largos y estrechos identificados se emiten al módulo de clasificación de vasos 116. En general, el módulo de detección del rasgo característico de línea 114 detecta partes, estructuras o rasgos característicos de línea local, y agrupa aquellas partes, estructuras o rasgos característicos de línea usando un agrupamiento aglomerativo. Como se detalla además el presente documento, se pueden detectar rasgos característicos de línea local en cada una de una pluralidad de regiones en las imágenes de canal de vaso, agrupándose las líneas en regiones adyacentes que cumplen con criterios umbral específicos. Todas las líneas dentro de un grupo se pueden usar para definir conjuntamente un vaso candidato. Se puede generar una representación poligonal de los vasos largos conectando los centros de las líneas agrupadas como vértices del polígono. Cada una de estas etapas se describe con más detalle en el presente documento.

La FIG. 5 proporciona un diagrama de flujo que esboza las etapas para detectar vasos largos y estrechos, de acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación objeto. En algunos modos de realización, se pueden detectar rasgos característicos de línea local segmentando en primer lugar una imagen, o una región de la misma, en una pluralidad de regiones adyacentes (S540), donde las regiones adyacentes se pueden solapar entre sí. Por ejemplo, la imagen se puede segmentar en una pluralidad de regiones adyacentes y solapantes, teniendo cada región individual un tamaño de $N \times N$ píxeles. La cantidad de solapamiento puede variar, pero en algunos modos de realización la cantidad de solapamiento es aproximadamente la mitad del tamaño de cualquier región. Por ejemplo, si las regiones tienen las dimensiones de 16×16 píxeles, el solapamiento puede ser de aproximadamente 8 píxeles en cada dimensión. El procedimiento de segmentación (S540) se ilustra en la figura 6A, que muestra la segmentación de una imagen 650, o una región de la imagen, en una pluralidad de regiones adyacentes 652. Las regiones se pueden disponer sobre una línea detectada 651 y se pueden solapar entre sí, como se ilustra.

Tras la segmentación (S540), se detecta la línea local más intensa dentro de cada región, es decir, la línea local que tiene las intensidades de pixel más altas (S541). La línea local más intensa se puede detectar por consenso de muestreo aleatorio (RANSAC). RANSAC es un procedimiento iterativo que se usa para estimar parámetros de un modelo matemático a partir de un conjunto de datos que contiene valores atípicos. RANSAC es una técnica de remuestreo que genera soluciones candidatas usando el número mínimo de observaciones (puntos de datos) requeridas para estimar los parámetros del modelo subyacentes. En general, el algoritmo RANSAC básico usa las siguientes etapas: (i) seleccionar de forma aleatoria el número mínimo de puntos requeridos para determinar los parámetros del modelo; (ii) resolver los parámetros del modelo; (iii) determinar cuántos puntos del conjunto de todos los puntos se ajustan a una tolerancia predefinida; (iv) si la fracción del número de valores normales sobre el número total de puntos en el conjunto sobrepasa un umbral predefinido, reestimar los parámetros del modelo usando todos

los valores normales identificados y terminar; y (v) de lo contrario, repetir las etapas (i) a (iv) (un máximo de N veces). RANSAC se describe adicionalmente en "M.A. Fischler y R.C. Bolles. Random Sample Consensus: A paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. Communications of the ACM, 24(6):3 81-395, 1981".

5 La figura 6B ilustra la detección de la línea local más intensa 651 dentro de cada región 652. Dentro de la región 652, se ordenan los valores de intensidad de los píxeles y se selecciona el conjunto de píxeles que se encuentran por encima de un determinado umbral de percentil para la detección de líneas. En algunos modos de realización, se usa un umbral de percentil de aproximadamente un 90 % para seleccionar el conjunto de píxeles de intensidad intensa.

10 De forma alternativa, se puede usar un procedimiento de Otsu para determinar automáticamente un umbral, y las intensidades de pixel por encima de ese umbral se pueden seleccionar para la detección de líneas. Se usa el procedimiento de Otsu para determinar un umbral óptimo minimizando la varianza intraclase y es conocido por los expertos en la técnica. Más específicamente, se usa el procedimiento de Otsu para realizar automáticamente una umbralización de imágenes basada en agrupamiento o la reducción de una imagen de nivel de gris a una imagen binaria. El algoritmo supone que la imagen contiene dos clases de píxeles tras un histograma bimodal (píxeles de primer plano y píxeles de fondo). A continuación, calcula el umbral óptimo que separa las dos clases de modo que su dispersión combinada (varianza intraclase) sea mínima o equivalente (porque la suma de las distancias al cuadrado por pares es constante), de modo que su varianza intraclase sea máxima.

20 Después de la umbralización, para determinar la línea más intensa para aquellos píxeles que cumplen con los valores umbral, se utiliza el algoritmo RANSAC, descrito anteriormente, donde se hipotetizan varias líneas de diferentes orientaciones en base a todos los posibles emparejamientos de dos píxeles seleccionados de forma aleatoria, y, para cada línea, se computa la puntuación de línea como la suma de todos los valores de intensidad de todos los píxeles que se encuentran en la línea hipotetizada. En algunos modos de realización, los dos píxeles seleccionados de forma aleatoria se seleccionan del subconjunto de píxeles en los que su valor de intensidad esté por encima de un valor umbral elegido para seleccionar valores de intensidad alta de los vasos. De las puntuaciones computadas para todas las líneas hipotetizadas, la puntuación de línea más alta se selecciona como la línea más intensa para la región 652. Posteriormente, para la línea intensa detectada 651 en la región 652, se aproxima un segmento de línea 655. Los primer y segundo segmentos de línea 655 y 656 se pueden aproximar en base a su localización en las regiones adyacentes 652. Por ejemplo, las longitudes de los primer y segundo segmentos de línea 655 y 656 están limitadas por el tamaño de las regiones 652, y sus puntos de extremo se pueden aproximar en base a la línea detectada 651.

35 Tras la detección de las líneas más intensas en cada región (S541), se usa un procedimiento de agrupamiento aglomerativo para agrupar las líneas (S542). El agrupamiento aglomerativo es un procedimiento de agrupamiento ascendente bien conocido para agrupar puntos de datos cercanos en agrupamientos que tengan una diferencia mínima en la distancia de similitud definida entre cualquiera de dos puntos de datos, tal como la métrica de la distancia euclídea al cuadrado. En el contexto del agrupamiento de vasos, se agrupan un par de líneas o grupos de líneas que corresponden a vasos si la distancia euclídea entre dos líneas, especificada en términos de centros de línea y orientaciones de línea, es pequeña en comparación con la de todos los posibles emparejamientos de línea.

40 El agrupamiento aglomerativo se puede realizar usando los procedimientos conocidos en la técnica o como se proporciona a continuación:

45 Tomar $X = \{x_1, x_2, x_3, \dots, x_n\}$ como el conjunto de puntos de datos.

1) Empezar con el agrupamiento disjuncto que tiene el nivel $L(0)=0$ y el número de secuencia $m=0$.

50 2) Encontrar el par de agrupamientos de menor distancia en el agrupamiento actual, como el par (r), (s), de acuerdo con $d[(r),(s)] = \min d[(i),(j)]$, donde el mínimo está en todos los pares de agrupamientos en el agrupamiento actual.

3) Incrementar el número de secuencia: $m=m+1$. Fusionar los agrupamientos (r) y (s) en un único agrupamiento para formar el siguiente grupo m. Establecer el nivel de este agrupamiento en $L(m) = d[(r),(s)]$.

55 4) Actualizar la matriz de distancia, D, eliminando las filas y columnas correspondientes a los agrupamientos (r) y (s) y añadiendo una fila y columna correspondiente al agrupamiento recién formado. La distancia entre el nuevo agrupamiento, indicado como (r,s), y el antiguo agrupamiento (k) se define de esta manera: $d[(k), (r,s)] = \min (d[(k),(r)], d[(k),(s)])$.

60 5) Si todos los puntos de datos están en un agrupamiento, a continuación, detenerse; de lo contrario, repetir desde la etapa 2).

65 La etapa de comparar líneas no agrupadas se ilustra en la FIG. 6C, donde se comparan los dos segmentos de línea 655 y 656 para determinar una afinidad entre las dos líneas en base a un ángulo de orientación Θ y una distancia D. De hecho, cada línea está representada por el centro de línea y orientación en la que se usa una medida de afinidad entre las dos líneas 655 y 656. En algunos modos de realización, la afinidad entre dos líneas se puede representar

por $A=f(\Theta,D)$. Si la afinidad entre cualquiera de dos líneas coincide con o sobrepasa un umbral de afinidad (S543), o si el ángulo y la distancia satisfacen un umbral, se pueden asignar las dos líneas a un grupo asociado con un único vaso (S545). Los pares de líneas que no cumplen con los umbrales de afinidad simplemente se ignoran y se selecciona otro par de líneas monitoreando la siguiente región adyacente. La FIG. 6D ilustra la agrupación de segmentos de línea (670) e ilustra además que los grupos de líneas más pequeños que un umbral predeterminado se pueden ignorar (680). Los ejemplos de medidas de afinidad son la distancia euclídea entre los centros de líneas de intersección multiplicada por el coseno del ángulo de intersección entre ellas; o una métrica euclídea en los parámetros (x,y, teta) de cada línea; u otras métricas matemáticas que se pueden usar para cuantificar la distancia entre dos líneas, donde una distancia euclídea es la distancia "ordinaria" (es decir, en línea recta) entre dos puntos en un espacio euclídeo.

Más específicamente, se usa la afinidad de grupo entre líneas para agrupar las líneas en un enfoque ascendente de acuerdo con el procedimiento de agrupamiento aglomerativo (descrito anteriormente), donde se asigna cada línea local a un grupo en base a una afinidad entre las líneas. Por ejemplo, se pueden comparar dos líneas para determinar una afinidad entre ellas, y la afinidad se puede basar en una orientación de las líneas entre sí y distancias entre las líneas. En este procedimiento iterativo de fusión ascendente, las dos líneas o grupos con afinidad más baja se fusionan en cada iteración. Este procedimiento se ejecuta de forma recursiva fusionando cualquier línea no fusionada en el grupo fusionado, si la afinidad determinada para cualquiera de dos grupos de líneas no sobrepasa el umbral de afinidad (S543). Típicamente, el umbral de afinidad varía de aproximadamente 100 píxeles a aproximadamente 200 píxeles (o una longitud de línea que varía de aproximadamente 50 micrómetros a aproximadamente 100 micrómetros). Cualquiera de dos líneas que cumplan con el umbral de afinidad se puede asignar al mismo grupo (S545) y conectar o de otro modo combinar. Estas operaciones se ejecutan de forma recursiva para todas las líneas restantes en la región (S546) para determinar si pueden o no ser parte del grupo. Cuando ninguna línea adicional satisfaga la comparación umbral para el grupo particular, se puede repetir el procedimiento para que otra línea no agrupada comience el siguiente nuevo grupo. El procedimiento se repite hasta que no quede ninguna línea no agrupada más.

Cuando todas las líneas disponibles se agrupan para definir conjuntamente un vaso candidato, a continuación, el grupo se somete a un análisis de restricciones de calidad (S547). Por ejemplo, se puede determinar una calidad del vaso candidato observando un contorno de un polígono generado a partir de las líneas locales combinadas, y sumando los valores de píxeles de vaso candidato dentro de una distancia desde los puntos de contorno. Siendo la motivación la de para una línea de buena calidad, la intensidad de pixel promedio de todos los píxeles que encierra el polígono sería alta y similar a la de las intensidades de pixel en la línea. Para una línea de mala calidad, tal como debida a la introducción de rayas o artefactos de tinción en la imagen o fragmentaciones de líneas significativas sin ninguna intensidad alta contigua de una capa de vaso válido, las intensidades en píxeles que se extienden en ambos lados de las líneas tendrán valores muy bajos correspondientes al fondo. Si la intensidad promedio se encuentra por debajo de un umbral de restricciones de calidad, el contorno de vaso se puede rechazar (S548).

Una medida de calidad (S547) adicional incluye determinar una entropía bidimensional de píxeles dentro de una región del polígono con contorno generado y comparar la entropía con un umbral de entropía. En algunos modos de realización, la entropía se calcula determinando un histograma de valores de intensidad. La entropía de imagen se calcula derivando el histograma de valores de intensidad y calculando la probabilidad de que un pixel muestreado tenga el valor en cada intervalo de histograma. Por ejemplo, si existen 1000 píxeles en un polígono con contorno y 100 píxeles dentro del intervalo de intensidad 255, entonces existe una probabilidad de 1/10 de seleccionar un pixel que tenga el valor de 255 de forma aleatoria. El logaritmo en base 2 de esta probabilidad se computa y pondera por la probabilidad para computar la cantidad de información esperada para cualquier pixel muestreado en unidades de bits. Esta consideración permite informar de entropía de imagen en términos de una unidad definida, que aquí sería bits.

En algunos modos de realización, la entropía de imagen se puede calcular usando el siguiente pseudocódigo:

Calculadora de entropía de función (argumento=histograma)

Suma=0

Entropía=0

Para cada intervalo en el histograma: suma=suma+frecuencia de intervalo

Para cada intervalo en el histograma: Probabilidad=frecuencia de intervalo

Si la probabilidad > 0,99/suma:

entropía=entropía+(-1*probabilidad*(log(probabilidad)/log(2,0))

Devolver entropía

En algunos modos de realización, se define una pluralidad de umbrales, con lo que "0" indica entropía mínima y calidad

más alta y un valor máximo, por ejemplo, "100" indica entropía más alta y calidad más baja. En otros modos de realización, un umbral de entropía es de aproximadamente 11. Como reconocerán los expertos en la técnica, una entropía alta implica un desorden alto o falta de estructura en una región de imagen. Cuando el valor de entropía es alto, tal como al sobrepasar un límite umbral de entropía, el polígono con contorno en cuestión se puede clasificar como un vaso no estructurado (S549) en lugar de un vaso largo/estrecho. Por otra parte, cualquier polígono que cumpla con las restricciones de calidad se puede emitir (S549) de forma similar como vasos largos y estrechos. Se cree que el funcionamiento del módulo de detección del rasgo característico de línea 114 acelera cualquier análisis de vasos posterior, por ejemplo, reduciendo una imagen de múltiples millones de píxeles a una pluralidad de segmentos de línea.

Los modos de realización de la invención pueden permitir identificar secciones transversales de los vasos grandes y vasos pequeños y secciones longitudinales de los vasos largos y pequeños.

La FIG. 11 proporciona un flujo de trabajo para la detección de vasos grandes e ilustra una salida de un esquema de detección de vasos grandes. Por ejemplo, las líneas de borde locales se muestran en 1020 y se derivan de una imagen de entrada 1010 después de que las regiones se segmenten y las líneas se detecten. Tras la comparación de líneas no agrupadas, se vinculan aquellas que cumplan con los requisitos umbral, y la salida se muestra en 1030. En base a las líneas vinculadas, se generan polígonos (como se muestra en la imagen 1040). La imagen 1060 muestra los límites de vaso después de la segmentación de vasos (mostrada en 1050).

Detección de vasos pequeños

En algunos modos de realización, se pueden detectar vasos pequeños (S215) en cada una de las imágenes de canal de vaso con un módulo de detección de vasos pequeños 115. Los vasos pequeños identificados se emiten al módulo de clasificación de vasos 116. En general, el módulo de detección de vasos pequeños 115 realiza operaciones de filtrado por esfera rodante (para eliminar los fondos continuos lisos de las imágenes) y con imágenes binarias, para detectar vasos pequeños y compactos que de otro modo no se clasificarían como vasos grandes o vasos largos y estrechos. La resta de fondo por esfera rodante se describe en S.R. Sternberg, "Biomedical Image Processing," Computer, vol. 16, n.º 1, pp. 22-34, enero de 1983. Las operaciones novedosas modifican el procedimiento de esfera rodante tradicional determinando un valor medio de píxeles dentro de un radio predeterminado para lograr un resultado de alisado, y el resultado de alisado se umbraliza para obtener una máscara binaria de la imagen, o una región de la misma. La máscara binaria generada se agrupa en regiones usando marcado de componentes conectadas, y cada componente más grande que un tamaño umbral de vaso pequeño se emite como un vaso pequeño candidato.

Más específicamente, y con referencia a la figura 7A, los vasos pequeños se detectan recibiendo en primer lugar un canal de vaso descompuesto como entrada (S760) y seleccionando un pixel entre una pluralidad de píxeles en base a una intensidad del pixel. Por ejemplo, se pueden seleccionar todos los píxeles que tengan una intensidad que sobrepase un umbral particular. Luego, un fondo de una región alrededor del pixel seleccionado se resta (S762) midiendo un valor medio de los píxeles circundantes y alisando en un valor umbral de fondo. En algunos modos de realización, se usa una vecindad pequeña de 9x9 píxeles para medir el valor medio de los píxeles circundantes. Si el pixel resultante cumple con un valor umbral de fondo (S763), el pixel se añade a una máscara binaria (S765) y el siguiente pixel se procesa (S766). Por otra parte, si el pixel no cumple con el valor umbral de fondo, se descarta (S764), y el siguiente pixel, si hay, se procesa (S766). A modo de ejemplo, el valor umbral de fondo se establece en aproximadamente un 5 % del valor de percentil de los valores de intensidad.

La FIG. 7B ilustra además un flujo de trabajo para la determinación de vasos pequeños. La primera imagen, 770, representa un canal endotelial después del filtrado por esfera rodante. Tras la umbralización, se genera una máscara binaria (771, 772). La imagen 773 proporciona una salida donde se eliminan aquellos vasos que están cubiertos por vasos grandes detectados.

A continuación, se puede aplicar la máscara generada a la imagen de canal de vaso respectiva y se puede usar marcado de componentes conectadas para conectar píxeles dentro de la imagen enmascarada (S767). En general, el marcado de componentes conectadas escanea una imagen y agrupa sus píxeles en componentes en base a la conectividad de píxeles, es decir, todos los píxeles en una componente conectada comparten valores de intensidad de pixel similares y de algún modo están conectados entre sí. Una vez que se han determinado todos los grupos, cada pixel se marca con un nivel de gris o un color (marcado con color) de acuerdo con la componente a la que se le asignó. El marcado de componentes conectadas funciona escaneando una imagen, pixel por pixel (de arriba a abajo y de izquierda a derecha) para identificar regiones de píxeles conectadas, es decir, regiones de píxeles adyacentes que comparten el mismo conjunto de valores de intensidad V. En algunos modos de realización, se usa un algoritmo de componentes conectadas de vecindad de ocho.

La componente conectada resultante se compara con un tamaño umbral de vaso pequeño (S768), emitiéndose cada componente conectada más grande que el tamaño umbral de vaso pequeño como vaso pequeño candidato, y cualquier componente que no cumpla con el tamaño umbral de vaso pequeño se descarta (S769). En algunos modos de realización, el tamaño umbral de vaso pequeño es un radio que varía de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 50 micrómetros, lo que se traduce en una longitud de perímetro circunferencial de aproximadamente

100 píxeles a aproximadamente 800 píxeles. En otros modos de realización, el tamaño umbral de vaso pequeño es aproximadamente 1000 píxeles. Del grupo de componentes resultante, se elimina cualquier rasgo característico ya detectado por otras operaciones de detección de vasos (por ejemplo, detección de vasos grandes o detección de vasos largos y estrechos) y lo que queda son vasos pequeños, contingentes para satisfacer los requisitos umbral. (Véase la FIG. 7B).

Clasificación de vasos

En algunos modos de realización, se usa un módulo de clasificación de vasos 116 para clasificar los vasos detectados en cada una de las imágenes de canal de vaso (obtenidas de las etapas S213, S214 y S215) como que pertenecen a uno de los vasos sanguíneos o vasos linfáticos (o vasos puramente linfáticos). Dicha clasificación de los diferentes vasos proporciona un valor diagnóstico para los anatomopatólogos, además de las características de forma y localización de los vasos, como se describe en el presente documento.

Con referencia a la FIG. 8, el procedimiento empieza combinando las imágenes de canal de vaso correspondientes a los canales de vaso sanguíneo y a los canales de vaso linfático (S870), y evaluando las diferentes estructuras de vaso (por ejemplo, vasos grandes, vasos largos y estrechos o vasos pequeños) identificadas a partir de las etapas S213, S214 y S215, descritas en el presente documento (S871). Aquellas estructuras de vaso que no se solapan (S872) entre los diferentes canales de imagen se clasifican en base a sus firmas espectrales (S873), es decir, identificando tinciones correspondientes a vasos sanguíneos, vasos linfáticos o bien vasos puramente linfáticos.

Los vasos puramente linfáticos son los que aparecen solo en las imágenes de canal de vaso linfático. Por el contrario, los vasos linfáticos tienen una firma tanto en las imágenes de canal de vaso linfático como sanguíneo. Los vasos sanguíneos solo aparecen en las imágenes de canal de vaso sanguíneo. El experto en la técnica reconocerá que un vaso linfático se puede teñir tanto por (i) una combinación de tinciones de CD31 como CD34, que se usa típicamente para teñir vasos sanguíneos, y (ii) una combinación de tinciones de podoplanina, que se usa típicamente para teñir puramente vasos linfáticos. (La podoplanina es una mucoproteína transmembranaria (38 kD) reconocida por el anticuerpo monoclonal D2-40. La podoplanina se expresa selectivamente en el endotelio linfático, así como en linfangiomas, sarcomas de Kaposi y en un subconjunto de angiosarcomas con probable diferenciación linfática).

Aunque los vasos linfáticos se pueden teñir de forma cruzada como se señala anteriormente, los vasos sanguíneos, por otra parte, típicamente no se tiñen en presencia del marcador QD565. Por lo tanto, los vasos identificados como solapantes en ambos canales (S872) pueden provocar una determinación de que el vaso sea un vaso linfático (S874), dada la predisposición a la tinción cruzada. Por lo tanto, cualquier salida que se solape en al menos un factor umbral de solapamiento se puede considerar como vasos linfáticos que están teñidos con tinciones de "vaso sanguíneo". En algunos modos de realización, un vaso se puede clasificar como un vaso linfático si existe una similitud mayor que 0,33 entre dos vasos, tanto en el canal de vaso sanguíneo como linfático.

El experto en la técnica también reconocerá que los marcadores de vasos sanguíneos tienen señales más intensas que los marcadores linfáticos. Por lo tanto, en algunos modos de realización, se puede usar el contorno o forma del vaso del canal de vaso sanguíneo para definir un vaso linfático (S875). Además, un vaso puramente linfático es uno que no tiene ninguna tinción de vaso sanguíneo y, por lo tanto, se clasifica como tal (S873).

La secuencia particular de detectar en primer lugar vasos grandes/estrechos y largos/pequeños y, más tarde, realizar un agrupamiento para identificar vasos sanguíneos y vasos linfáticos puede ser ventajosa, ya que se ha observado que dicha secuencia específica es más exacta que, por ejemplo, los enfoques de clasificación que intentan distinguir dichos tres tipos de vaso diferentes y los dos tipos de tejido diferentes (tejido sanguíneo/linfático) al mismo tiempo.

Detección de la maduración de vaso

En algunos modos de realización, se puede usar un módulo de determinación de la maduración 117 para determinar si un vaso particular (identificado en las etapas S213, S214 y S215) es maduro o inmaduro, posibilitando diagnósticos precisos y detallados de tumores nuevos o en progresión. El experto en la técnica apreciará que los vasos inmaduros son indicativos de un tumor en crecimiento de gran malignidad y, por tanto, la identificación de aquellos vasos inmaduros puede ayudar a esclarecer el diagnóstico del tumor (y/o el tratamiento con un agente antiangiogénesis apropiado).

Con referencia a la FIG. 9, se selecciona en primer lugar un vaso identificado (S980). En algunos modos de realización, se genera un detector en forma de anillo (S981) para detectar el tejido muscular que rodea a los vasos. En algunos modos de realización, el músculo se tiñe usando un anticuerpo anti-músculo liso (ASMA) y se computan las intensidades de los píxeles en el tejido muscular teñido con ASMA.

En algunos modos de realización, el detector en forma de anillo generado funciona superponiendo dos anillos concéntricos, un anillo interior y un anillo exterior, sobre un vaso identificado, y calcula una intensidad de pixel media de tinción con ASMA en ambos anillos (S982). El típico tamaño de anillo se determina por el radio promedio de los vasos maduros y una región anular se establece en aproximadamente un 10 % del tamaño de radio del tamaño de

vaso maduro (siendo la justificación que solo los vasos maduros tienen ASMA al alrededor de los mismos).

Se compara una diferencia de las intensidades de pixel medias entre los anillos (S983) con un umbral de maduración de vaso para determinar si existe o no un anillo de ASMA. Puesto que las tinciones con ASMA se unen al tejido muscular, y una presencia notable de tejido muscular alrededor de un vaso indica que el vaso es maduro, una presencia de un anillo de ASMA puede desencadenar una determinación de que el vaso sea un vaso maduro (S984). En algunos modos de realización, el umbral de maduración de vaso varía de aproximadamente 0 a aproximadamente 1, un valor de 0 siendo indicativo de vasos inmaduros sin ninguna área fraccional del anillo que expresa la señal de ASMA, y un valor de 1 siendo indicativo de vasos completamente maduros con un anillo circunferencial completo que expresa la señal de ASMA. En otros modos de realización, el umbral de maduración es de aproximadamente 0,25.

La FIG. 10 ilustra el procedimiento de determinación de la maduración de vaso. Como se describe en el presente documento, un detector en forma de anillo que comprende un anillo exterior 1057 y un anillo interior 1058 se superpone en un vaso detectado 1051. Se calcula una intensidad de pixel media de ASMA en ambos anillos 1057 y 1058, y se compara una diferencia de las intensidades de pixel medias entre los anillos con un umbral de maduración de vaso para determinar si existe o no un anillo de ASMA.

Aquellos vasos que no se clasifican como maduros por detección con anillo de ASMA se evalúan además computando un valor de entropía de aquellos píxeles dentro de una región de un polígono con contorno generado del vaso (los polígonos con contorno generados como se describe en el presente documento) y comparando la entropía computada con un umbral de entropía de vaso (S985). Como se señala en el presente documento, un valor de entropía alta es significativo porque implica un desorden alto o una falta de estructura en la región. Un vaso que tenga un valor de entropía alta, tal como un valor de entropía que sobrepase el umbral de entropía, se puede clasificar como un vaso no estructurado (S986), no como un vaso sanguíneo, y se puede emitir en consecuencia. El análisis de maduración se aplica a todos los vasos restantes (S987) y el procedimiento se repite desde la selección del vaso (S980). Si no existen ningún vaso adicional para su análisis, entonces, la maduración de los vasos observados se emite (S989).

Detección de células y núcleos

En algunos modos de realización, las células y núcleos se detectan opcionalmente (S218) en cada una de las imágenes de canal de vaso con un módulo de detección nuclear 118, lo que permite la colocalización de vasos y células identificados. En algunos modos de realización, las muestras de tejido se han tratado con tinciones que identifican uno o más tipos de células o núcleos, por ejemplo, Ki-67, CD3, y los canales de imagen derivados de la imagen múltiple para estas tinciones se pueden usar en la identificación de células y núcleos.

En algunos modos de realización, el módulo de detección nuclear 118 identifica núcleos usando simetría radial para detectar centros de núcleos y, a continuación, clasifica los núcleos en base a la intensidad de las tinciones alrededor de los centros de las células. Por ejemplo, dado un canal de imagen descompuesto, se computa una magnitud de imagen a partir del canal, y se acumulan uno o más votos en cada pixel añadiendo el sumatorio de la magnitud dentro de una región seleccionada. Se puede usar el agrupamiento por desplazamiento medio para encontrar los centros locales en la región, representando los centros locales localizaciones nucleares reales. La simetría radial es una técnica conocida por los expertos en la técnica (véase Parvin, Bahram, *et al.* "Iterative voting for inference of structural saliency and characterization of subcellular events". Image Processing, IEEE Transactions el 16/3 (2007): 615-623).

La detección de núcleos en base a la votación de simetría radial se ejecuta en datos de intensidad de imagen en color y hace un uso explícito del conocimiento del dominio *a priori* de que los núcleos son manchas en forma elíptica con tamaños y excentricidades variables. Para conseguir esto, junto con las intensidades de color en la imagen de entrada, la información de gradiente de imagen también se usa en la votación de simetría radial y se combina con un procedimiento de segmentación adaptativa para detectar y localizar con precisión los núcleos celulares. Un "gradiente" como se usa en el presente documento, por ejemplo, es el gradiente de intensidad de un conjunto de píxeles calculado para un pixel particular teniendo en consideración un gradiente de valor de intensidad de un conjunto de píxeles que rodean a dicho pixel particular. Cada gradiente puede tener una "orientación" particular en relación con un sistema de coordenadas en el que sus ejes x e y se definen por dos bordes ortogonales de la imagen digital. Por ejemplo, la detección de semillas nucleares implica definir una semilla como un punto que se supone que se encuentra en el interior de un núcleo celular y sirve como punto de partida para localizar los núcleos celulares. La primera etapa es detectar los puntos semilla asociados con cada núcleo celular usando un enfoque altamente sólido en base a la simetría radial para detectar manchas en forma elíptica, estructuras que se asemejan a núcleos celulares. El enfoque de simetría radial opera sobre la imagen de gradiente usando un procedimiento de votación basado en núcleo. Se crea una matriz de respuesta de votación procesando cada pixel que acumula un voto a través de un núcleo de votación. El núcleo se basa en la dirección del gradiente computada en ese pixel particular y un intervalo esperado de tamaño de núcleo mínimo y máximo y un ángulo de núcleo de votación (típicamente en el intervalo $[\pi/4, \pi/8]$). En el espacio de votación resultante, las localizaciones máximas locales que tienen un valor de voto más alto que un valor umbral predefinido se guardan como puntos semilla. Las semillas no relacionadas se pueden descartar más tarde durante los procedimientos de segmentación o clasificación posteriores.

Los núcleos se pueden identificar usando otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se

puede computar una magnitud de imagen a partir de un canal de vaso, y a cada pixel alrededor de una magnitud especificada se le puede asignar un número de votos que se basa en un sumatorio de la magnitud dentro de una región alrededor del pixel. De forma alternativa, se puede realizar una operación de agrupamiento por desplazamiento medio para encontrar los centros locales dentro de una imagen de votación, que representan la localización real del núcleo. En otros modos de realización, se puede usar segmentación nuclear para segmentar todo el núcleo en base a los centros de los núcleos ahora conocidos por medio de operaciones morfológicas y umbralización local. Aún en otros modos de realización, se puede utilizar la segmentación basada en modelos para detectar núcleos (es decir, aprender el modelo de forma de los núcleos más cercana de un conjunto de datos de entrenamiento y usarlo como conocimiento anterior para segmentar los núcleos en la imagen de prueba).

Aunque la detección nuclear es opcional, es útil para analizar y cuantificar la vascularización de los tumores. Por ejemplo, dentro de cada vaso sanguíneo, pueden existir células epiteliales tumorales que pueden expresar determinados biomarcadores tumorales, tales como Ki67, células apópticas o hipóxicas. Por tanto, el vaso sanguíneo se puede subtipar además como que contiene las células epiteliales para un tipo biomarcador particular. Además, también es de interés evaluar la distancia más cercana de los microvasos con respecto a las células tumorales o las células tumorales de un subtipo particular, tales como Ki67, lo que es indicativo de una célula tumoral proliferativa.

Ejemplos

A modo de ejemplo, las FIGS. 12 y 13 ilustran los resultados (salida) de los flujos de trabajo de detección de vasos descritos en el presente documento. En las imágenes de la FIG. 13, "a" representa un vaso sanguíneo maduro; "b" representa un vaso sanguíneo inmaduro; "c" representa un vaso linfático; "d" representa un vaso puramente linfático; y "e" describe un elemento no estructurado.

Otros componentes para poner en práctica los modos de realización de la presente divulgación

El sistema informático de la presente divulgación puede estar vinculado a un aparato de procesamiento de piezas que pueda realizar uno o más procedimientos de preparación en la pieza de tejido. El procedimiento de preparación puede incluir, sin limitación, desparafinar una pieza, acondicionar una pieza (por ejemplo, acondicionamiento celular), teñir una pieza, realizar una recuperación de antígenos, realizar tinción inmunohistoquímica (incluyendo marcado) u otras reacciones, y/o realizar hibridación *in situ* (por ejemplo, SISH, FISH, etc.) tinción (incluyendo marcado) u otras reacciones, así como otros procedimientos para preparar piezas para microscopia, microanálisis, procedimientos de espectrometría de masas u otros procedimientos analíticos.

Una pieza puede incluir una muestra de tejido. La muestra de tejido puede ser cualquier sustancia (o material) líquida, semisólida o sólida en o sobre la que puede estar presente una diana. En particular, una muestra de tejido puede ser una muestra biológica o una muestra de tejido obtenida de un tejido biológico. El tejido puede ser una colección de células interconectadas que realizan una función similar dentro de un organismo. En algunos ejemplos, la muestra biológica se obtiene de un sujeto animal, tal como un sujeto humano. Una muestra biológica puede ser cualquier muestra sólida o líquida obtenida de, excretada por o secretada por cualquier organismo vivo, incluyendo, sin limitación, organismos unicelulares, tales como bacterias, levaduras, protozoos y amebas, entre otros, organismos multicelulares (tales como plantas o animales, incluyendo muestras de un sujeto humano sano o aparentemente sano o de un paciente humano afectado por una afección o enfermedad que se va a diagnosticar o investigar, tal como cáncer). Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un fluido biológico obtenido de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, el fluido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o fluido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una pieza de biopsia o necropsia, tal como una biopsia de tumor) o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o una célula cultivada) o un medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un extracto nuclear. En determinados ejemplos, una muestra es una muestra de control de calidad, tal como una de las muestras de corte de sedimento celular divulgadas. En otros ejemplos, una muestra es una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba es una célula, un corte histológico o de sedimento celular preparado a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es uno que está en riesgo o que ha contraído una afección o enfermedad particular. En algunos modos de realización, la pieza es tejido de mama.

El aparato de procesamiento de piezas puede aplicar fijadores a la pieza. Los fijadores pueden incluir agentes de reticulación (tales como aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de reticulación distintos a aldehído), agentes oxidantes (por ejemplo, iones y complejos metálicos, tales como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturalizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro mercuríco, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, metacarn, fluido de Bouin, fijador B5, fluido de Rossman y fluido de Gendre), microondas y fijadores diversos (por ejemplo, fijación por volumen excluido y fijación por vapor).

Si la pieza es una muestra incluida en parafina, la muestra se puede desparafinar usando fluido(s) de desparafinado

apropiado(s). Después de que el eliminador de desechos elimine el/los fluido(s) de desparafinado, se puede aplicar sucesivamente cualquier número de sustancias a la pieza. Las sustancias pueden ser para pretratamiento (por ejemplo, reticulación de proteínas, exposición a ácidos nucleicos, etc.), desnaturalización, hibridación, lavado (por ejemplo, lavado de restricción), detección (por ejemplo, unir una molécula visual o marcadora a una sonda),
 5 amplificación (por ejemplo, amplificación de proteínas, genes, etc.), contratinción, preparación de cubreobjetos o similares.

El aparato de procesamiento de piezas puede aplicar una amplia gama de sustancias a la pieza. Las sustancias incluyen, sin limitación, tinciones, sondas, reactivos, enjuagues y/o acondicionadores (a continuación en el presente documento denominados conjuntamente "tinciones"). Las sustancias pueden ser fluidos (por ejemplo, gases, líquidos o mezclas de gas/líquido), o similares. Los fluidos pueden ser disolventes (por ejemplo, disolventes polares, disolventes no polares, etc.), soluciones (por ejemplo, soluciones acuosas u otros tipos de soluciones) o similares. Los reactivos pueden incluir, sin limitación, tinciones, agentes humectantes, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, etc.), fluidos de recuperación de antígenos (por ejemplo, soluciones de recuperación de antígenos con base acuosa o no acuosa, tampones de recuperación de antígenos, etc.), o similares. Las sondas pueden ser un ácido nucleico aislado o un oligonucleótido sintético aislado, unido a un marcador detectable o molécula indicadora. Los marcadores pueden incluir isótopos radioactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas.

El aparato de procesamiento de piezas puede ser un aparato automatizado, tal como el instrumento BENCHMARK XT y el instrumento SYMPHONY comercializados por Ventana Medical Systems, Inc. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de una serie de patentes de Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo la pat. de EE. UU. n.ºs 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.ºs 20030211630 y 20040052685. De forma alternativa, las
 20 piezas se pueden procesar manualmente.

Después de que se procesen las piezas, un usuario puede transportar las preparaciones que contienen las piezas al aparato de formación de imágenes. El aparato de formación de imágenes puede ser un escáner de preparaciones para formador de imágenes de campo claro, un microscopio asociado con o que incluye un escáner o cámara espectral, o cualquier fuente que pueda capturar contenido de imagen en un intervalo de frecuencias, posibilitando la formación de imágenes hiperespectrales o fluorescentes. Un generador de imágenes de campo claro es el escáner de campo claro iScan Coreo™ comercializado por Ventana Medical Systems, Inc. El aparato de formación de imágenes puede ser un dispositivo de anatomía patológica digital como se divulga en la solicitud de patente internacional n.º: PCT/US2010/002772 (publicación de patente n.º: WO/2011/049608) titulada IMAGING SYSTEM AND TECHNIQUES o se divulga en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 61/533.114, presentada el 9 de septiembre de 2011, titulada IMAGING SYSTEMS, CASSETTES, AND METHODS OF USING THE SAME. El aparato de formación de imágenes puede incluir una cámara digital acoplada a un microscopio.

El sistema o aparato de formación de imágenes puede ser un sistema de formación de imágenes multiespectrales (MSI) o un sistema de microscopía fluorescente. El sistema de formación de imágenes usado aquí es un MSI. Un MSI, en general, equipa el análisis de piezas de anatomía patológica con sistemas de formación de imágenes basados en microscopio computarizados proporcionando acceso a la distribución espectral de una imagen a un nivel de pixel. Aunque existe una variedad de sistemas de formación de imágenes multiespectrales, un aspecto de funcionamiento que es común a todos estos sistemas es una capacidad de formar una imagen multiespectral. Una imagen multiespectral es una que captura datos de imagen a longitudes de onda específicas o a anchos de banda espectrales específicos a través del espectro electromagnético. Estas longitudes de onda se pueden distinguir por filtros ópticos o por el uso de otros instrumentos que pueden seleccionar un componente espectral predeterminado, incluyendo radiación electromagnética a longitudes de onda más allá del intervalo del intervalo de luz visible, tal como, por ejemplo, infrarrojo (IR).

Un MSI puede incluir un sistema de formación de imágenes óptico, conteniendo una parte del mismo un sistema espectralmente selectivo adaptable para definir un número predeterminado N de bandas ópticas discretas. El sistema óptico se puede adaptar para formar imágenes de una muestra de tejido, iluminada en transmisión con una fuente de luz de banda ancha en un detector óptico. El sistema de formación de imágenes óptico, que en un modo de realización puede incluir un sistema de aumento, tal como, por ejemplo, un microscopio, tiene un único eje óptico, en general, alineado espacialmente con una única salida óptica del sistema óptico. El sistema forma una secuencia de imágenes del tejido a medida que se ajusta o adapta el sistema espectralmente selectivo (por ejemplo, con un procesador informático) tal como para asegurar que las imágenes se adquieran en diferentes bandas espectrales discretas. El aparato puede contener adicionalmente una pantalla en la que aparezca al menos una imagen perceptible visualmente del tejido de la secuencia de imágenes adquiridas. El sistema espectralmente selectivo puede incluir un elemento ópticamente dispersivo como una rejilla de difracción, una colección de filtros ópticos, tales como filtros de interferencia de película delgada o cualquier otro sistema adaptado para seleccionar, en respuesta a una entrada del usuario o bien un comando del procesador preprogramado, una banda de paso particular del espectro de luz transmitida desde la fuente de luz a través de la muestra hacia el detector.

En una implementación alternativa, un sistema espectralmente selectivo define varias salidas ópticas correspondientes

a N bandas espectrales discretas. Este tipo de sistema absorbe la salida de luz transmitida desde el sistema óptico y redirige espacialmente al menos una parte de esta salida de luz a lo largo de N trayectorias ópticas espacialmente diferentes de tal modo que forme imágenes de la muestra en una banda espectral identificada en un sistema detector a lo largo de un trayectoria óptica correspondiente a esta banda espectral identificada.

5 Los modos de realización de la materia objeto y las operaciones descritas en la presente memoria descriptiva se pueden implementar en circuitos electrónicos digitales, o en un programa informático, microprograma o equipo informático, incluyendo las estructuras divulgadas en la presente memoria descriptiva y sus equivalentes estructurales, o en combinaciones de uno o más de ellos. Los modos de realización de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva se pueden implementar como uno o más programas informáticos, es decir, uno o más módulos de instrucciones de programa informático, codificados en un medio de almacenamiento informático para su ejecución por, o para controlar el funcionamiento del aparato de procesamiento de datos. Cualquiera de los módulos descritos en el presente documento puede incluir una lógica que se ejecuta por el/los procesador(es).

15 Como se describe anteriormente, los módulos incluyen una lógica que se ejecuta por el procesador 105. "Lógica", como se usa en el presente documento y por toda la presente divulgación, se refiere a cualquier información que tenga la forma de señales y/o datos de instrucción que se pueda aplicar para afectar al funcionamiento de un procesador. El programa informático es un ejemplo de dicha lógica. La lógica también puede comprender circuitos de equipo informático digitales y/o analógicos, por ejemplo, circuitos de equipo informático que comprendan las operaciones lógicas AND, OR, XOR, NAND, NOR y otras operaciones lógicas. La lógica se puede formar a partir de combinaciones de un programa informático y un equipo informático. En una red, se puede programar una lógica en un servidor o un complejo de servidores. Una unidad lógica particular no se limita a una única localización lógica en la red.

25 Un medio de almacenamiento informático puede ser, o se puede incluir en, un dispositivo de almacenamiento legible por ordenador, un sustrato de almacenamiento legible por ordenador, un dispositivo o matriz de memoria de acceso aleatorio o en serie, o una combinación de uno o más de ellos. Además, aunque un medio de almacenamiento informático no sea una señal propagada, un medio de almacenamiento informático puede ser una fuente o destino de instrucciones de programa informático codificadas en una señal propagada generada artificialmente. El medio de almacenamiento informático también puede ser, o se puede incluir en, uno o más componentes o medios físicos separados (por ejemplo, múltiples CD, discos u otros dispositivos de almacenamiento). Las operaciones descritas en la presente memoria descriptiva se pueden implementar como operaciones realizadas por un aparato de procesamiento de datos en datos almacenados en uno o más dispositivos de almacenamiento legibles por ordenador o recibidos de otras fuentes.

35 El término "procesador programado" engloba todas las clases de aparatos, dispositivos y máquinas para procesar datos, incluyendo a modo de ejemplo un microprocesador programable, un ordenador, un sistema en un chip, o múltiples, o combinaciones de los anteriores. El aparato puede incluir circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de compuerta programable en campo) o un ASIC (circuito integrado específico de aplicación). El aparato también puede incluir, además del equipo informático, un código que crea un entorno de ejecución para el programa informático en cuestión, por ejemplo, un código que constituye el microprograma del procesador, una pila de protocolos, un sistema de gestión de bases de datos, un sistema operativo, un entorno en tiempo de ejecución multiplataforma, una máquina virtual o una combinación de uno o más de ellos. El aparato y el entorno de ejecución pueden realizar diversas infraestructuras de modelos de computación diferentes, tales como servicios web, infraestructuras de computación distribuida y de computación en malla.

45 Un programa informático (también conocido como programa, aplicación de programa informático, orden o código) puede estar escrito de cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, lenguajes declarativos o procedimentales, y se puede emplear de cualquier forma, incluyendo como un programa independiente o como un módulo, componente, subrutina, objeto u otra unidad adecuada para su uso en un entorno informático. Un programa informático puede corresponder, pero no necesariamente, a un archivo en un sistema de archivos. Un programa se puede almacenar en una parte de un archivo que albergue otros programas o datos (por ejemplo, una o más órdenes almacenadas en un documento de lenguaje de marcado), en un único archivo dedicado al programa en cuestión o en múltiples archivos coordinados (por ejemplo, archivos que almacenan uno o más módulos, subprogramas o partes de código). Se puede emplear programa informático para ejecutarse en un ordenador o en múltiples ordenadores que se localicen en un sitio o se distribuyan a través de múltiples sitios y se interconecten por una red de comunicación.

60 Los procedimientos y flujos lógicos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden realizar por uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas informáticos para realizar acciones operando sobre datos de entrada y generando una salida. Los procedimientos y flujos lógicos también se pueden realizar por, y el aparato también se puede implementar como, circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de compuerta programable en campo) o un ASIC (circuito integrado específico de aplicación).

65 Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa informático incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores de propósito tanto general como especial, y uno cualquiera o más procesadores de cualquier clase de ordenador digital. En general, un procesador recibirá instrucciones y datos de una memoria de solo lectura o una

memoria de acceso aleatorio o ambas. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para realizar acciones de acuerdo con instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. En general, un ordenador también incluirá, o se acoplará de forma funcional para recibir datos o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar datos, por ejemplo, discos magnéticos, magnetoópticos o discos ópticos. Sin embargo, un ordenador no necesariamente tiene dichos dispositivos. Además, un ordenador se puede incluir en otro dispositivo, por ejemplo, un teléfono móvil, un asistente digital personal (PDA), un reproductor de audio o video móvil, una consola de juegos, un receptor de sistema de posicionamiento global (GPS) o un dispositivo de almacenamiento portátil (por ejemplo, una unidad *flash* de bus en serie universal (USB)), por nombrar solo algunos. Los dispositivos adecuados para almacenar instrucciones y datos de programa informático incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo, a modo de ejemplo, dispositivos de memoria de semiconductores, por ejemplo, EPROM, EEPROM y dispositivos de memoria *flash*; discos magnéticos, por ejemplo, discos duros internos o discos extraíbles; discos magnetoópticos; y discos CD-ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria se pueden complementar por, o incorporar en, circuitos lógicos de propósito especial.

Para proporcionar una interacción con un usuario, los modos de realización de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva se pueden implementar en un ordenador que tenga un dispositivo de visualización (por ejemplo, una pantalla LCD (pantalla de cristal líquido), LED (diodo emisor de luz) o pantalla OLED (diodo orgánico emisor de luz) para mostrar información al usuario, y un teclado y un dispositivo apuntador, por ejemplo, un ratón o una bola de seguimiento, mediante los que el usuario pueda proporcionar una entrada al ordenador. En algunas implementaciones, se puede usar una pantalla táctil para mostrar información y recibir una entrada de un usuario. También se pueden usar otras clases de dispositivos para proporcionar una interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede estar en cualquier forma de retroalimentación sensorial, por ejemplo, retroalimentación visual, retroalimentación auditiva o retroalimentación táctil; y la entrada del usuario se puede recibir en cualquier forma, incluyendo entrada acústica, de voz o táctil. Además, un ordenador puede interactuar con un usuario enviando documentos a y recibiendo documentos de un dispositivo que se usa por el usuario; por ejemplo, enviando páginas web a un navegador web en un dispositivo cliente de usuario en respuesta a solicitudes recibidas del navegador web.

Los modos de realización de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva se pueden implementar en un sistema informático que incluye un componente de soporte, por ejemplo, como un servidor de datos, o que incluye un componente de soporte lógico personalizado, por ejemplo, un servidor de aplicaciones, o que incluye un componente frontal, por ejemplo, un ordenador cliente que tiene una interfaz de usuario gráfica o un navegador web a través del que un usuario puede interactuar con una implementación de la materia objeto descrita en la presente memoria descriptiva, o cualquier combinación de uno o más de dichos componentes de soporte, de soporte lógico personalizado o frontales. Los componentes del sistema se pueden interconectar por cualquier forma o medio de comunicación de datos digitales, por ejemplo, una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), una interred (por ejemplo, internet) y redes de pares (por ejemplo, redes de pares *ad hoc*). Por ejemplo, la red 20 de la figura 1 puede incluir una o más redes de área local.

El sistema informático puede incluir cualquier número de clientes y servidores. En general, un cliente y servidor, en general, son remotos entre sí y típicamente interactúan a través de una red de comunicación. La relación del cliente y servidor surge en virtud de programas informáticos que se activan en los ordenadores respectivos y que tienen una relación cliente-servidor entre sí. En algunos modos de realización, un servidor transmite datos (por ejemplo, una página HTML) a un dispositivo cliente (por ejemplo, para propósitos de mostrar datos a y recibir una entrada de usuario de un usuario que interactúa con el dispositivo cliente). Los datos generados en el dispositivo cliente (por ejemplo, un resultado de la interacción del usuario) se pueden recibir del dispositivo cliente en el servidor.

DECLARACIÓN DE APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La presente divulgación tiene aplicabilidad industrial en el campo del diagnóstico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento implementado por ordenador para la identificación de vasos que comprende:

5 – analizar cada una de una pluralidad de imágenes digitales de una muestra de tejido para identificar vasos seleccionados de un grupo que consiste en tres tipos diferentes,

10 ○ el primer tipo, denominado vasos grandes, que comprende vasos que forman las estructuras del árbol arterial secundario y los vasos capilares, en el que la detección de vasos del primer tipo comprende:

10 ▪ evaluar los contrastes de intensidad de una o más de la pluralidad de imágenes digitales para identificar las regiones de píxeles de luz (431) y las regiones de píxeles de límite que satisfagan la condición de que:

15 • la región de píxeles de luz sea una región de píxeles en la que sus intensidades de pixel estén por debajo de las intensidades de pixel de las regiones de límite,

 • las regiones de píxeles de luz y las de límite se encuentren en las mismas o en otras diferentes de la pluralidad de imágenes,

20 • la región de píxeles de luz esté rodeada por la región de píxeles de límite, y

 ▪ devolver una región de píxeles de luz identificada rodeada por una región de píxeles de límite como un vaso grande identificado

25 ○ el segundo tipo, denominado vasos largos y estrechos, que comprende capilares sanguíneos o vasos recién formados, en el que la detección de vasos del segundo tipo comprende:

30 (i) detectar secciones de líneas (656, 655) en una pluralidad de regiones solapantes (652) en al menos una de las imágenes digitales; y

 (ii) agrupar las secciones de líneas detectadas de las regiones de imagen solapantes que cumplen con un umbral de afinidad entre sí, realizándose la agrupación en un procedimiento de agrupamiento aglomerativo; y

35 (iii) devolver las líneas agrupadas como un vaso detectado del segundo tipo,

○ el tercer tipo, denominado vasos pequeños, que comprende arterias y venas maduras, en el que la detección de vasos del tercer tipo comprende:

40 (i) generar una máscara binaria que comprenda píxeles en los que sus intensidades sean mayores que las intensidades de pixel de fondo circundantes;

 (ii) conectar píxeles dentro de la máscara binaria generada; y

45 (iii) evaluar si un tamaño de los píxeles conectados cumple con un tamaño umbral de vaso pequeño;

– analizar los vasos identificados para clasificar los vasos identificados como vasos sanguíneos o vasos linfáticos, en el que la clasificación del uno o más vasos detectados comprende:

50 ○ identificar vasos solapantes en cada una de una pluralidad de imágenes de canal de vaso;

55 ○ analizar los valores de intensidad de pixel de los vasos detectados que no se solapan para clasificar el vaso como vaso sanguíneo o vaso linfático, correlacionándose las intensidades de pixel con la intensidad de tinción de una tinción que tiñe selectivamente un biomarcador que sea específico para vasos sanguíneos o bien vasos linfáticos; e

60 – identificar una maduración de cada uno del uno o más vasos detectados, en el que identificar la maduración de cada uno del uno o más vasos detectados comprende evaluar una diferencia en las intensidades de pixel medias entre los anillos interior y exterior dispuestos alrededor del vaso detectado, en el que los anillos interior y exterior comprenden píxeles en los que sus intensidades corresponden a señales de tejido teñido selectivamente con un biomarcador que es específico para tejido de músculo liso.

2. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 1, en el que la detección del límite de la luz identificada se determina:

65 (a) disponiendo un rayo (433) en un centro aproximado de la luz identificada, teniendo cada rayo una pluralidad

de brazos (434, 437) que se extienden radialmente desde un centro del rayo,

(b) evaluando las intensidades de pixel a lo largo de cada brazo y las intensidades de pixel en el centro del rayo,

5 (c) reteniendo selectivamente el rayo donde cumple con los valores umbral de contraste; y

(d) generando un polígono con contorno (435) a partir del rayo retenido.

10 3. El procedimiento implementado por ordenador de una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que retener el rayo que cumple con los valores umbral de contraste comprende, para al menos una de las imágenes digitales:

– identificar el valor de intensidad del centro del rayo;

15 – identificar la mediana de los valores de intensidad máxima de todos los brazos y el valor de intensidad del centro del rayo;

– identificar la mediana de los valores de intensidad mínima de todos los brazos y el valor de intensidad del centro del rayo;

20 – determinar i) si la mediana de todos los valores de intensidad máxima es al menos un primer umbral (T1) mayor que el valor de intensidad en el centro del rayo;

25 – determinar ii) si la mediana de todos los valores de intensidad mínima es, como máximo, un segundo umbral (T2) menor que el valor de intensidad en el centro del rayo; y

– en caso de que la determinación i) y ii) se devuelva como verdadera, selectivamente retener y usar el rayo para generar el polígono con contorno.

30 4. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 2 o 3, en el que usar el rayo para generar el polígono con contorno comprende:

– en cada uno de los brazos del rayo, identificar el pixel que tiene el valor de intensidad más alta; y

35 – conectar los píxeles identificados para formar el polígono.

5. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 4, en el que la agrupación comprende:

40 (i) calcular una afinidad entre dos secciones de líneas adyacentes en la región solapante evaluando una distancia y un ángulo entre las dos secciones de líneas adyacentes y

(ii) comparar la afinidad calculada con un umbral de afinidad para agrupar selectivamente aquellas de las secciones de líneas en un grupo en el que su afinidad entre sí sobrepase el umbral de afinidad.

45 6. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 4 o 5, que comprende además generar un polígono con contorno a partir de los segmentos de líneas agrupadas.

50 7. El procedimiento implementado por ordenador de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende además:

– identificar la entropía de píxeles contenidos en el vaso identificado del segundo tipo; comparar la entropía determinada con un umbral de entropía y descartar el vaso identificado del segundo tipo de vaso en caso de que la entropía determinada sea mayor que el umbral de entropía, en el que una entropía alta implica un desorden alto o falta de estructura en una región de imagen; o

55 – identificar la intensidad promedio de píxeles contenidos en un área de imagen que se encuentra más lejos del vaso identificado que un umbral de distancia; comparar la intensidad promedio determinada con un umbral de intensidad y descartar el vaso identificado del segundo tipo de vaso en caso de que la intensidad promedio determinada sea mayor que el umbral de intensidad.

60 8. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 7, en el que la generación de la máscara binaria comprende, para al menos una de las imágenes digitales:

(i) seleccionar píxeles entre una pluralidad de píxeles en la al menos una imagen digital;

65 (ii) medir un valor medio de intensidades de píxeles que rodean a cada uno de los píxeles seleccionados;

- (iii) restar el valor medio medido respectivo de intensidades de píxeles que rodean a los píxeles seleccionados de un valor de intensidad de cada uno de los píxeles seleccionados respectivos;
- 5 (iv) comparar los valores restados con un umbral de intensidad de fondo; y
- (v) añadir aquellos píxeles en los que sus intensidades con valores restados sobrepasen el umbral de intensidad de fondo con respecto a la máscara binaria.
- 10 9. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 8, en el que los píxeles dentro de la máscara binaria generada se conectan usando un procedimiento de marcado de componentes conectadas.
10. El procedimiento implementado por ordenador de una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la identificación de la maduración de cada uno del uno o más vasos detectados comprende:
- 15 – superponer cada vaso identificado (1051) con una estructura de anillos concéntricos que comprende un anillo interior (1058) y uno exterior (1057), siendo el anillo interior adyacente al anillo exterior, siendo el anillo interior un anillo interior de un círculo que tiene el radio esperado de un vaso maduro, siendo el anillo exterior un anillo exterior de dicho círculo;
- 20 – mapear la estructura de anillos concéntricos con respecto a una de las imágenes digitales, correlacionándose las intensidades de pixel de dicha una imagen digital con la intensidad de tinción de una tinción que tiñe selectivamente un biomarcador que es específico para tejido de músculo liso;
- 25 – identificar los valores de intensidad media de píxeles en el anillo interior mapeado en la una imagen digital;
- identificar los valores de intensidad media de píxeles en el anillo exterior mapeado en la una imagen digital;
- determinar una diferencia en los valores de intensidad de pixel media entre los anillos interior y exterior; y
- 30 – donde la diferencia determinada sobrepasa un umbral de maduración de vaso, lo que devuelve que dicho vaso es maduro.
- 35 11. Un sistema de análisis de imágenes para la identificación y clasificación de vasos que comprende uno o más procesadores (105) y al menos una memoria, almacenando la al menos una memoria instrucciones legibles por ordenador no transitorias para su ejecución por el uno o más procesadores para provocar que el uno o más procesadores realice un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 40

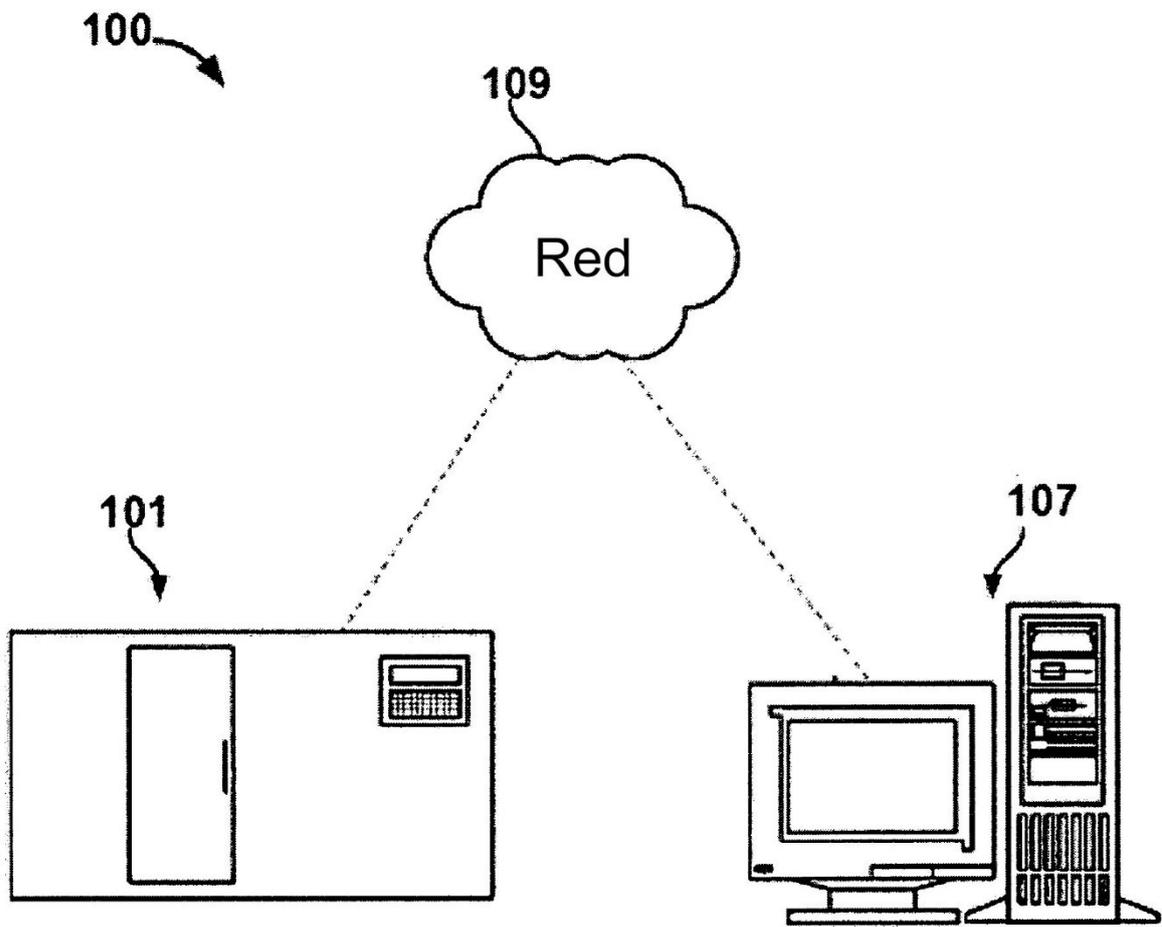


FIG. 1A

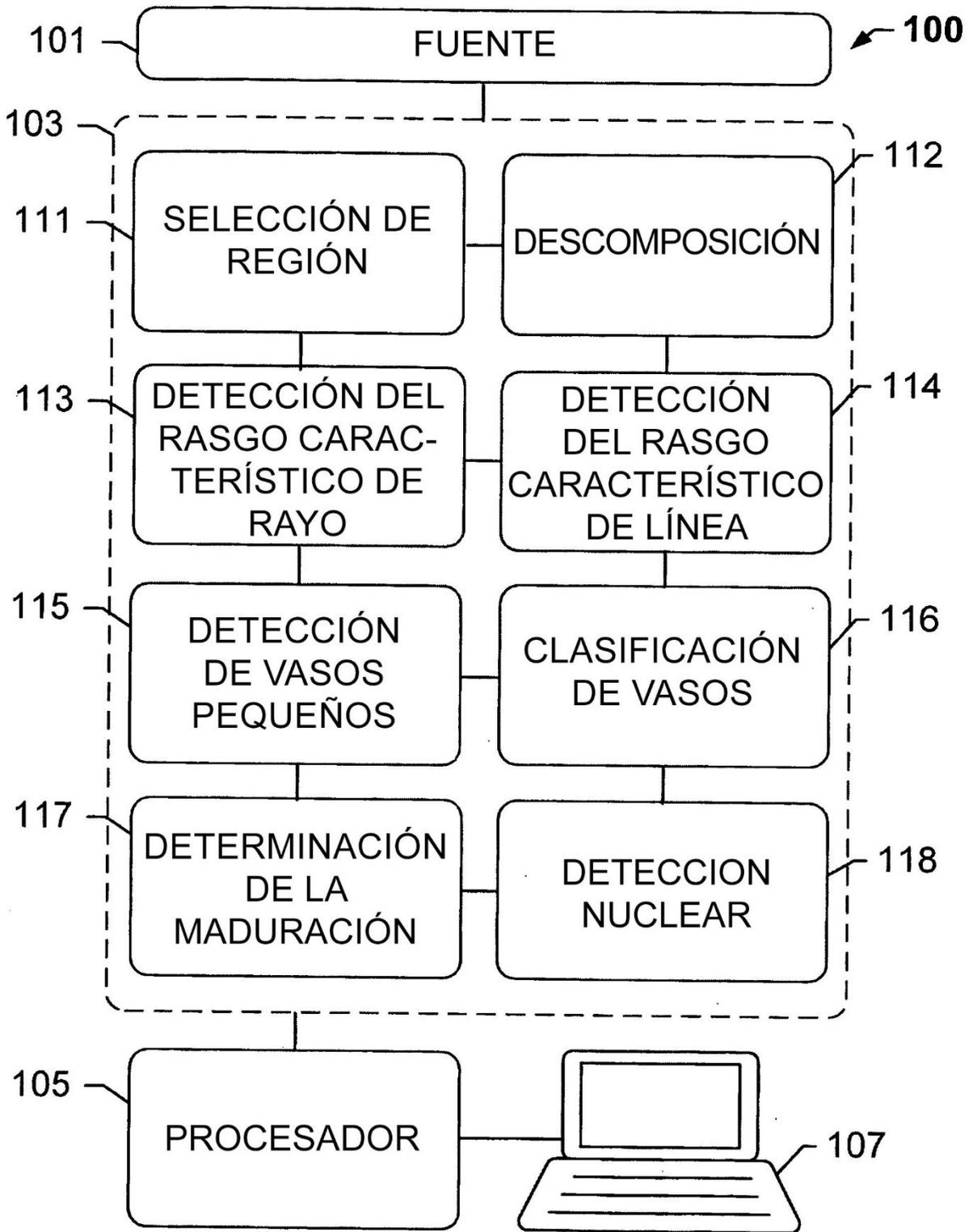


FIG. 1B

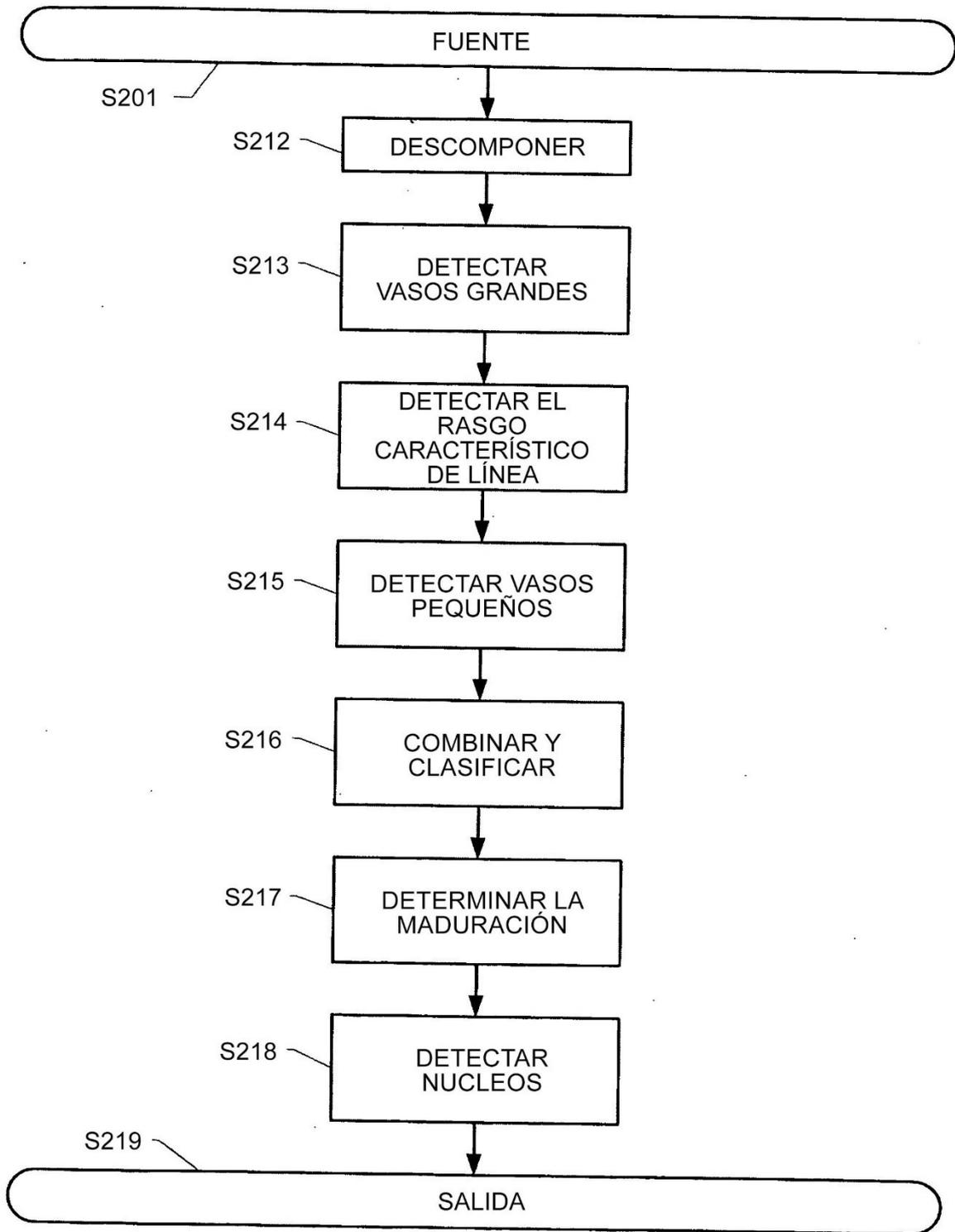


FIG. 2

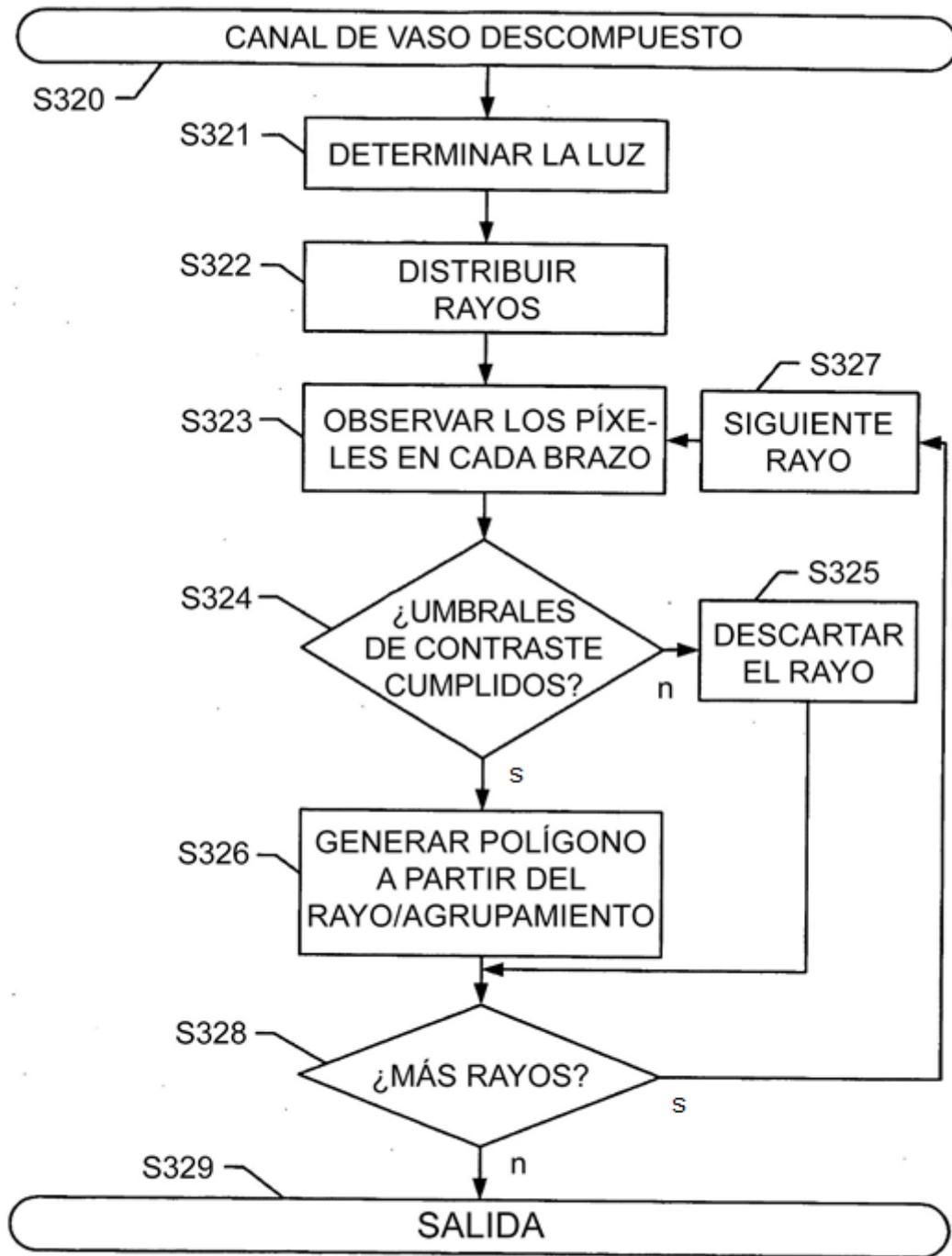


FIG. 3

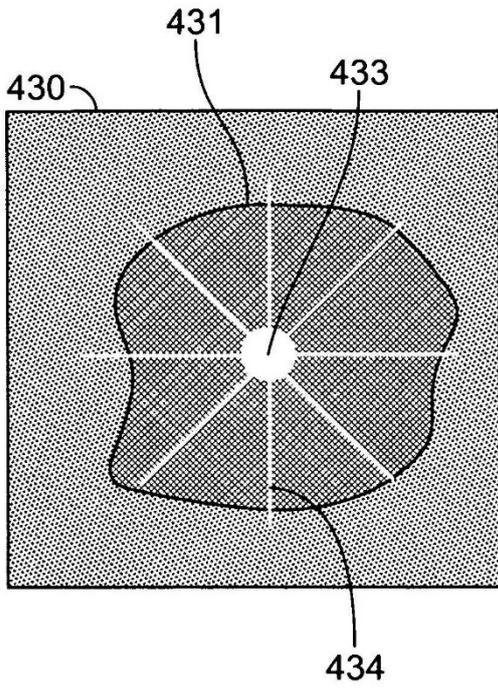


FIG. 4A

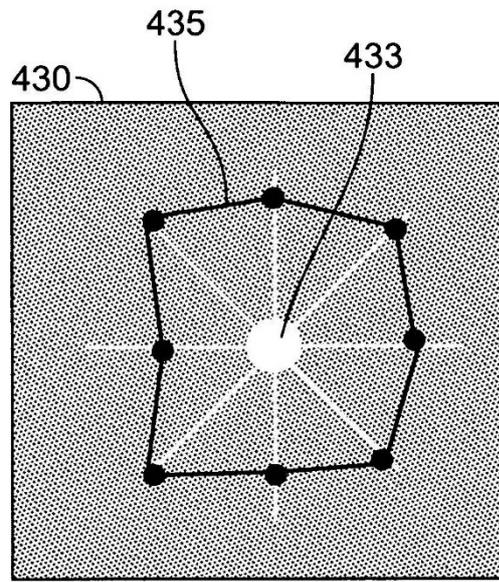


FIG. 4B

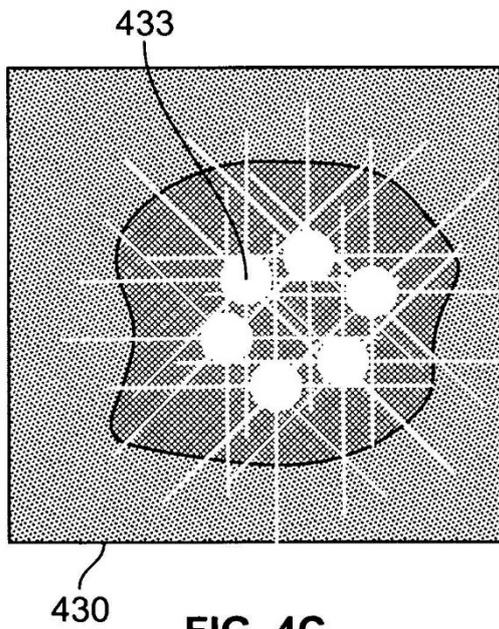


FIG. 4C

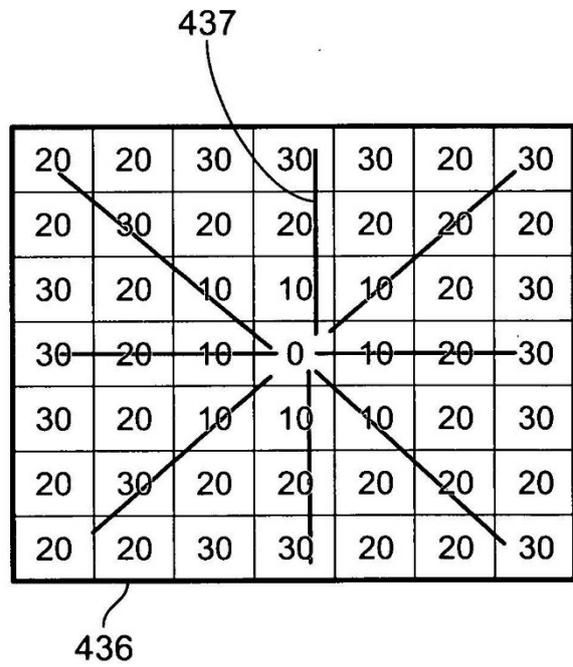


FIG. 4D

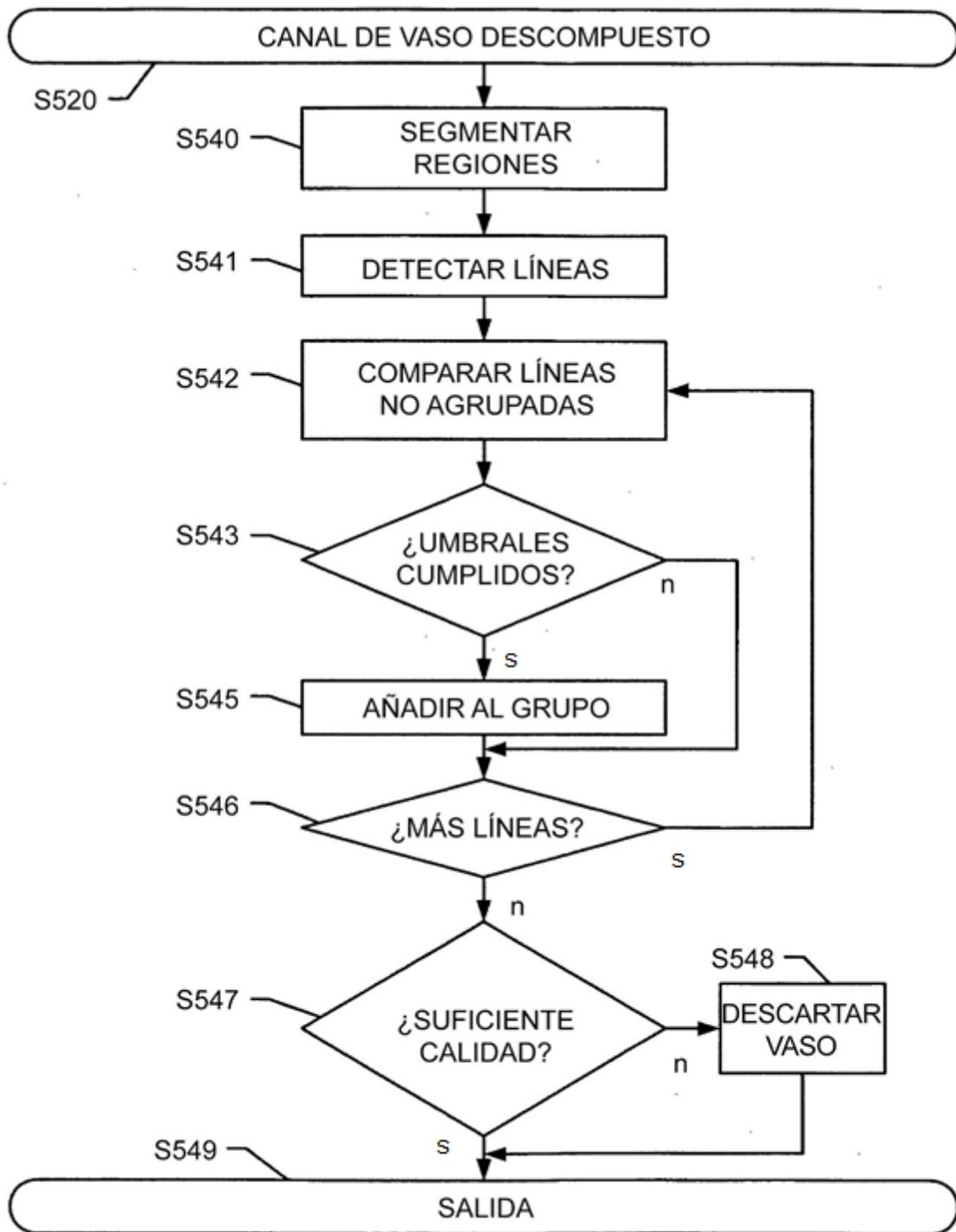


FIG. 5

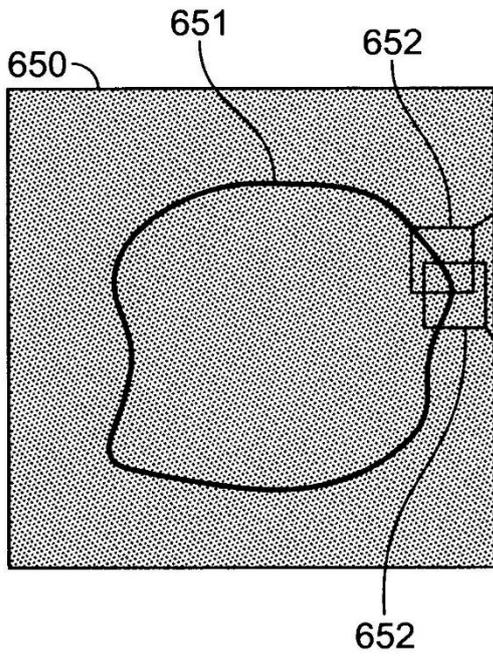


FIG. 6A

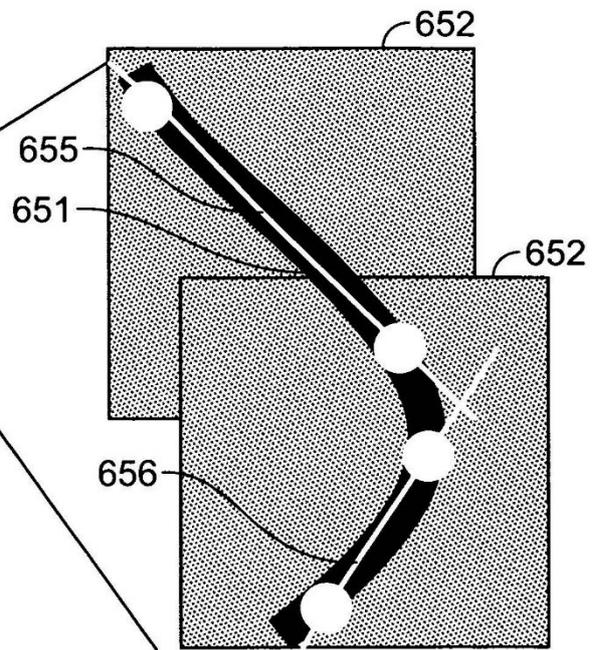


FIG. 6B

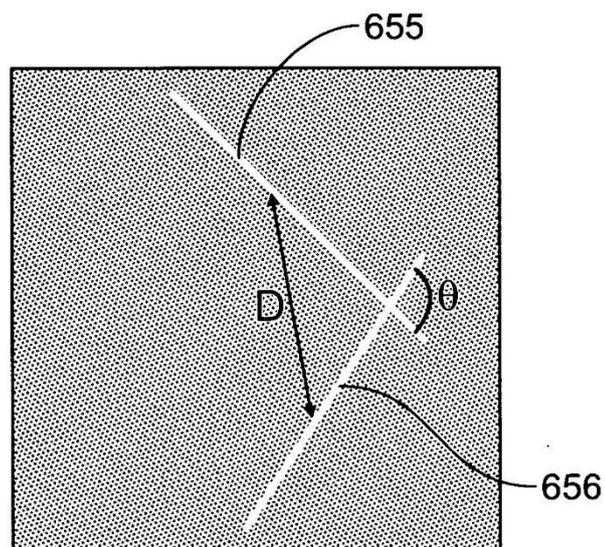


FIG. 6C

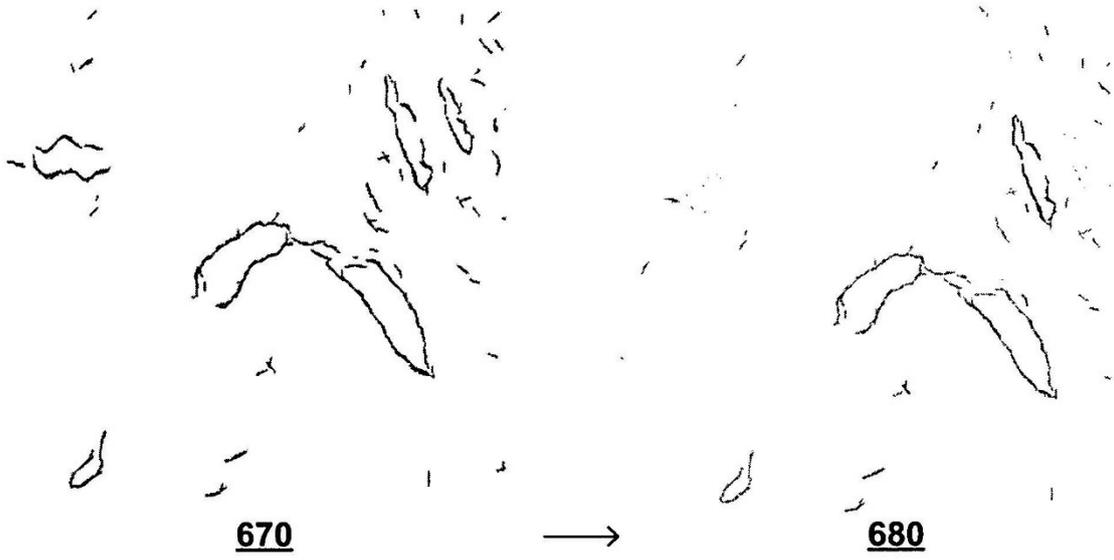


FIG. 6D

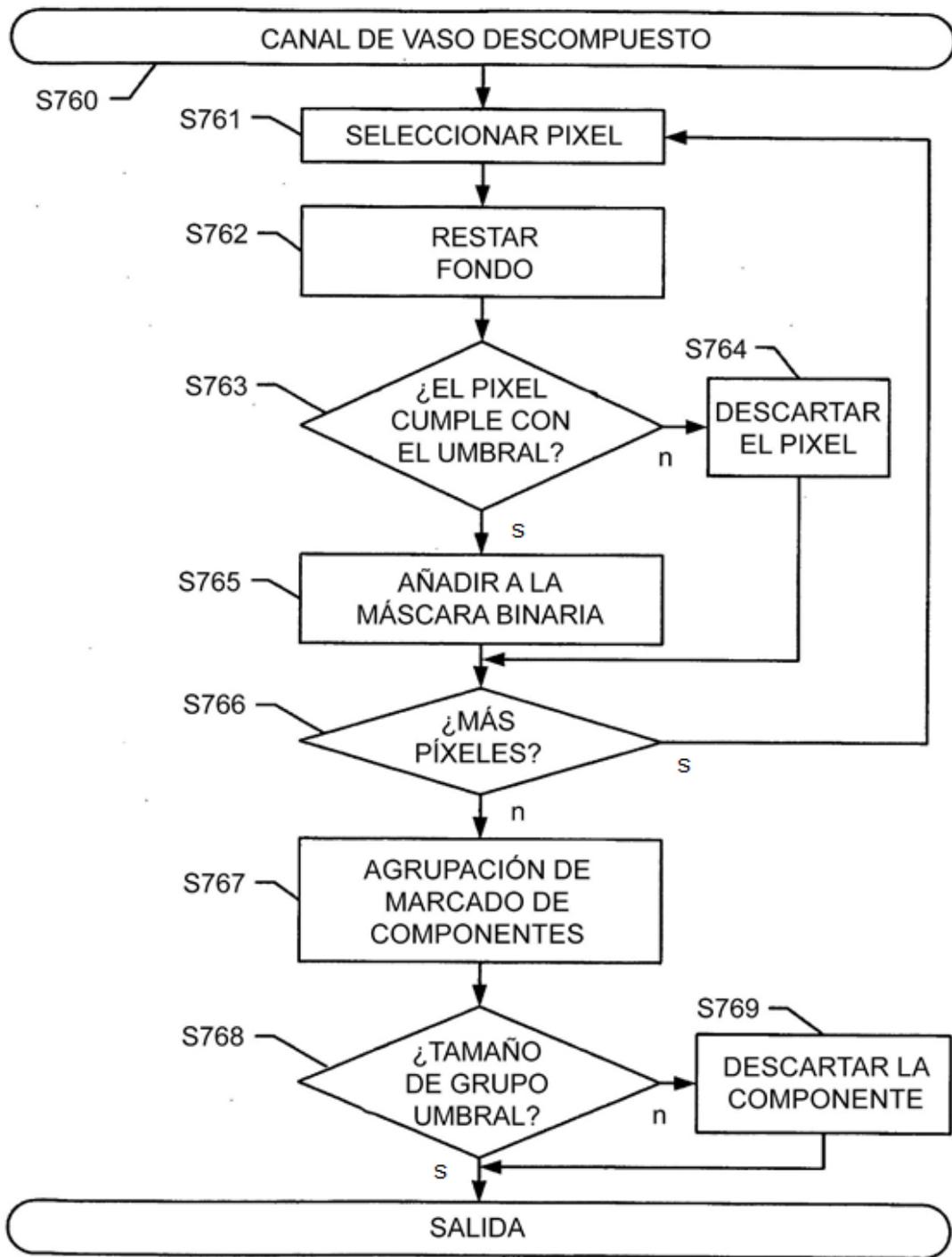


FIG. 7A

Segmentación de vasos pequeños

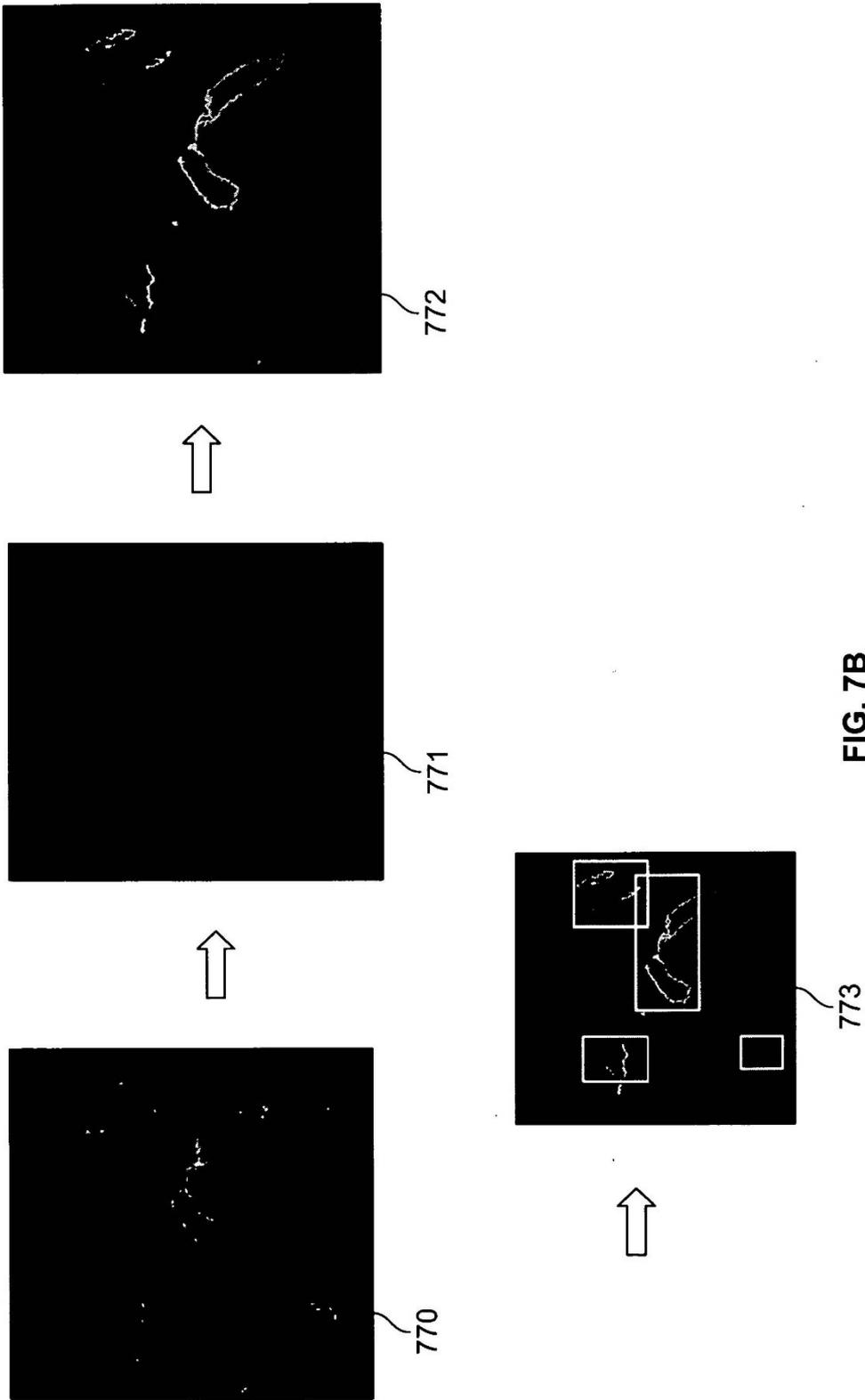


FIG. 7B

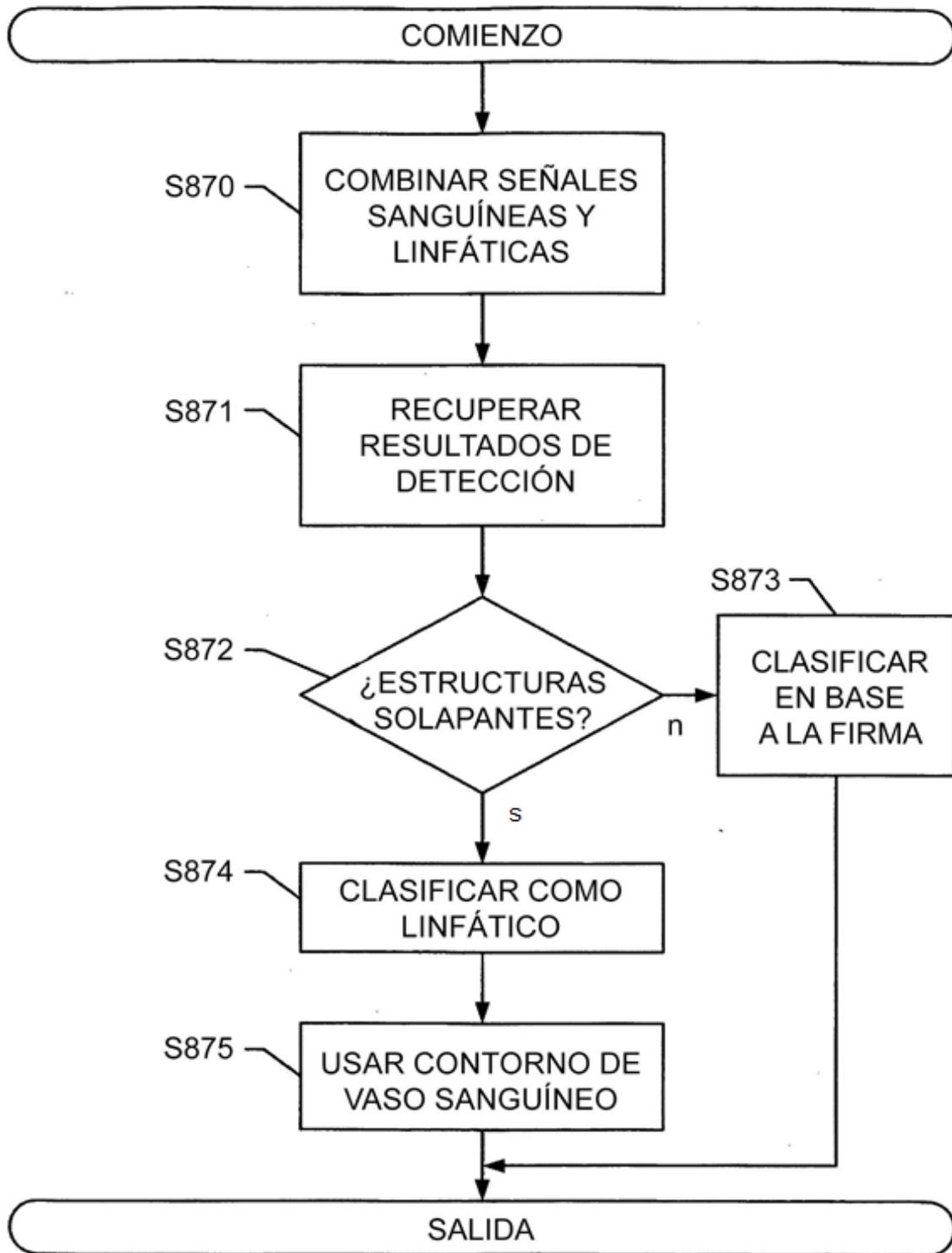


FIG. 8

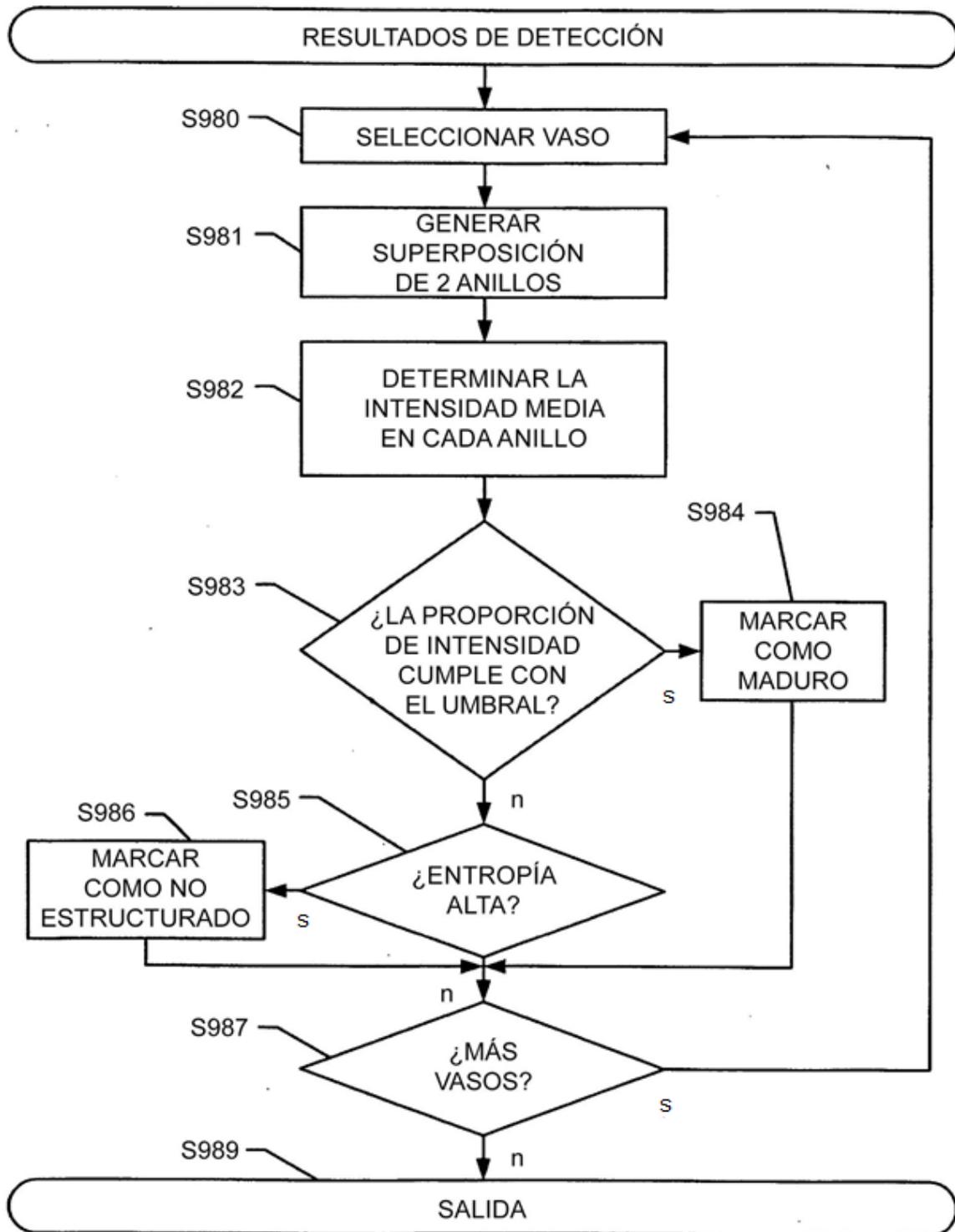


FIG. 9

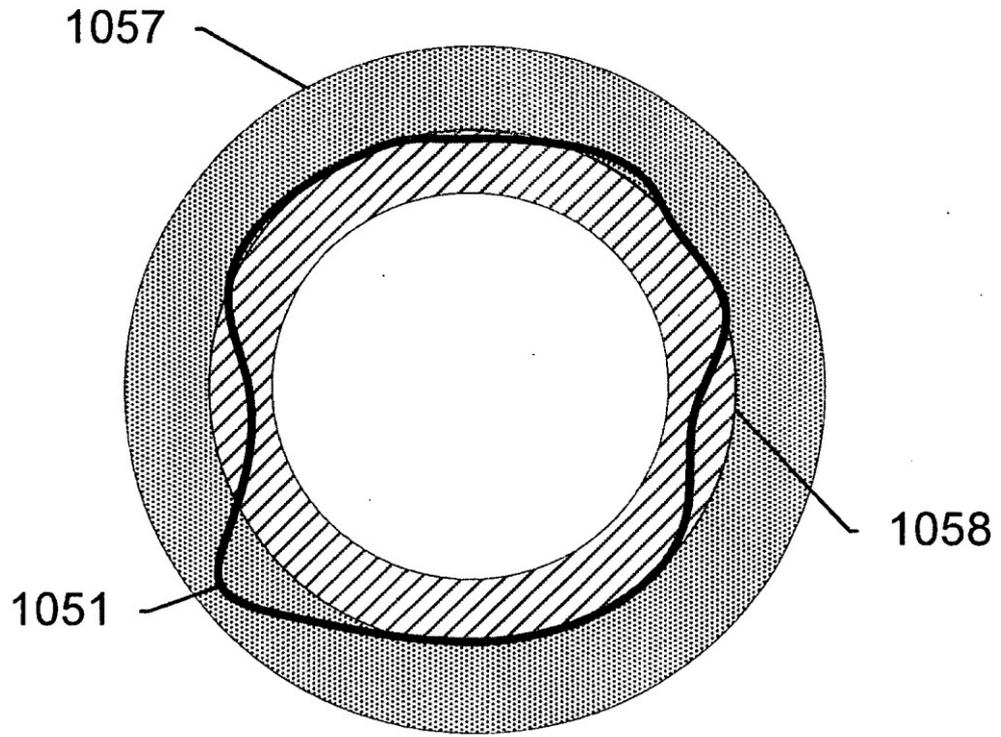


FIG. 10

Segmentación de vasos largos

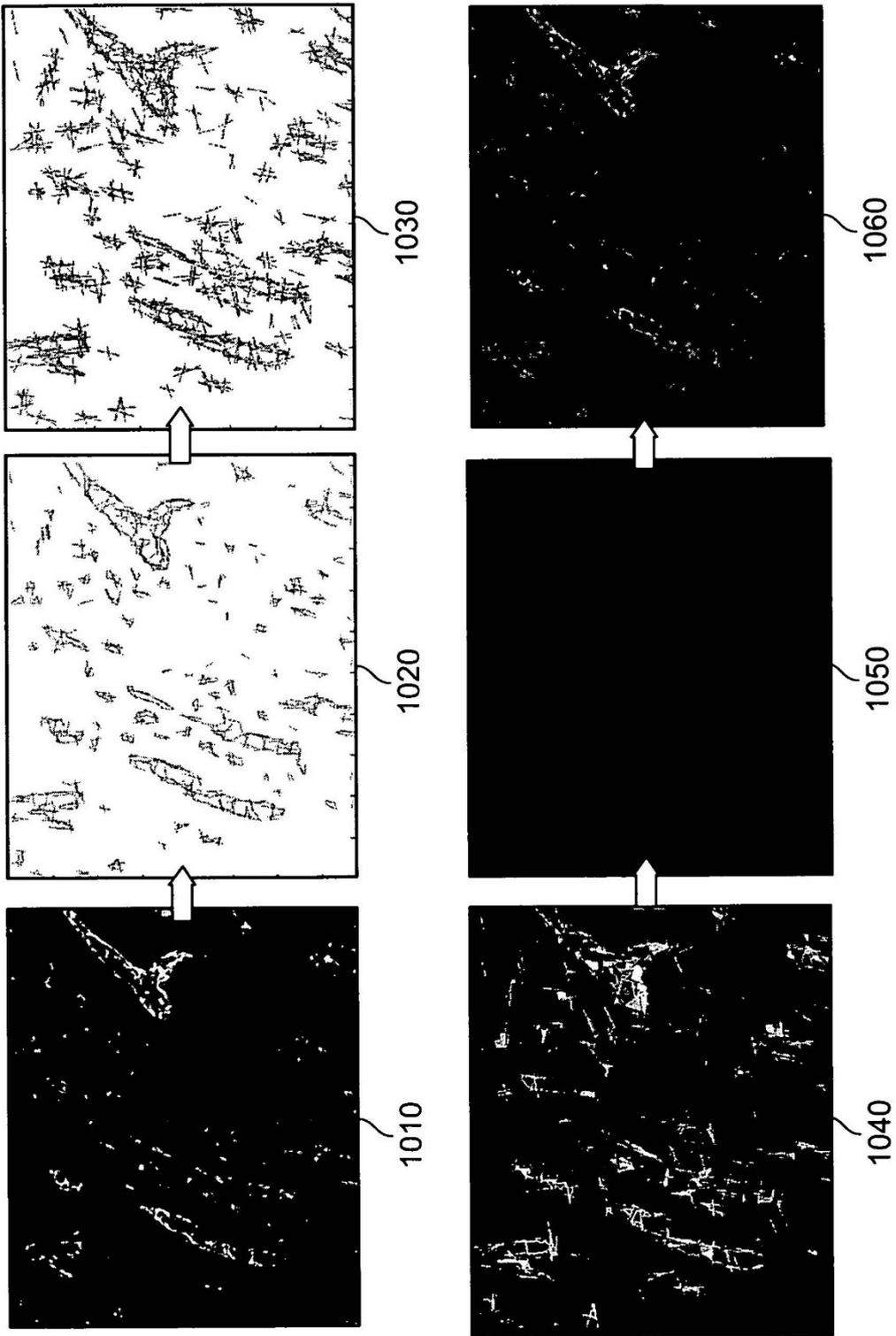


FIG. 11

Flujo de trabajo de identificación de vasos



FIG. 12

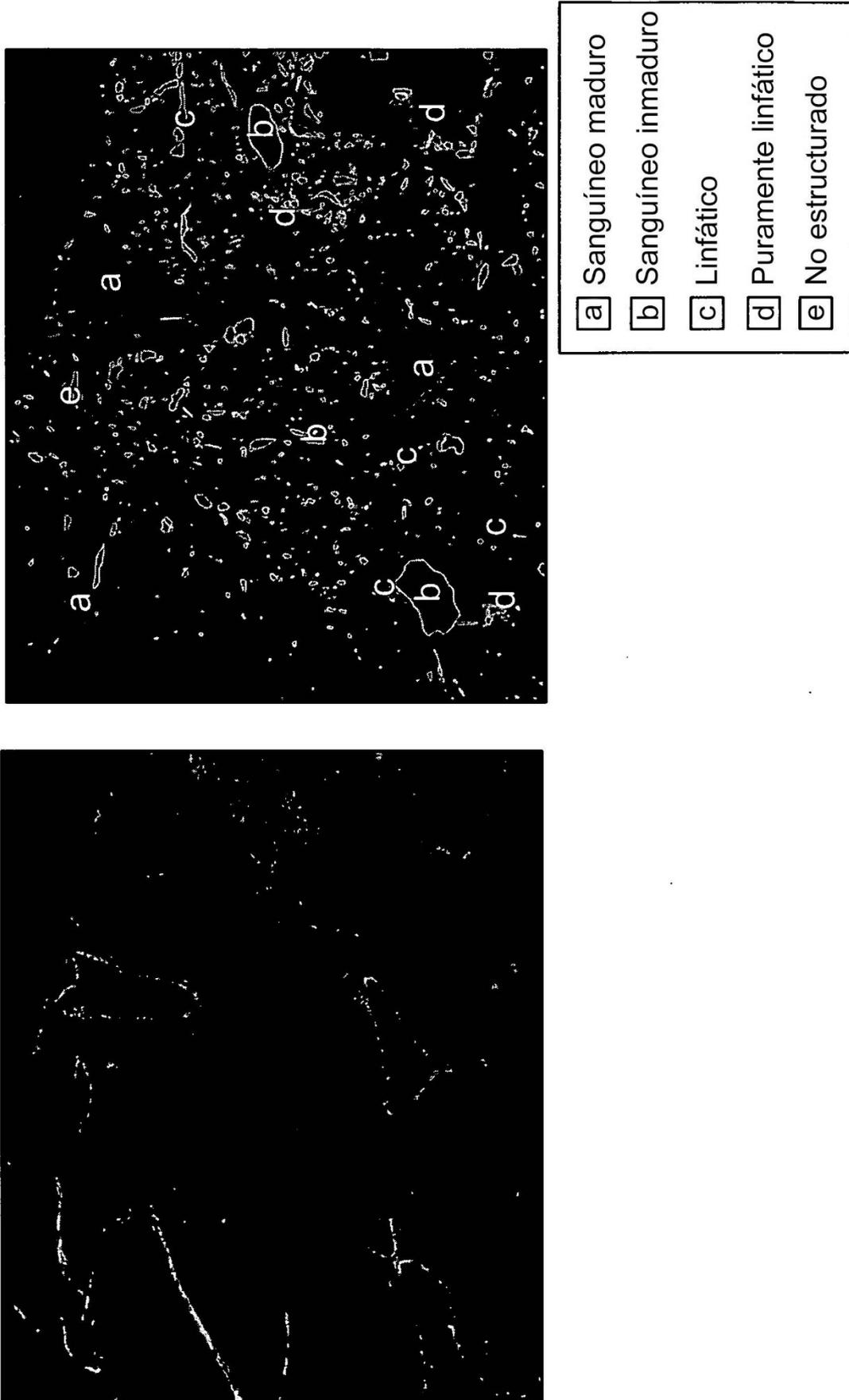


FIG. 13