

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/072543 A1

(43) Fecha de publicación internacional
23 de mayo de 2013 (23.05.2013) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
G06T 9/00 (2006.01) *G06K 9/00* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070796
- (22) Fecha de presentación internacional:
15 de noviembre de 2012 (15.11.2012)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201131840
15 de noviembre de 2011 (15.11.2011) ES
- (71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Avda. María Luisa s/n, Palacio-Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (ES).
- (72) Inventores: **ESCUADERO CUADRADO, Luis María**; Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Campus Hospital Universitario, Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **MONTERO SÁNCHEZ, Adoración**; Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Campus Hospital Universitario, Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **PARADAS LÓPEZ, Carmen**; Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Campus Hospital Universitario, Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **RIVAS INFANTE, Eloy**; Hospital Universitario, Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **PASCUAL BRAVO, Alberto**; Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Campus Hospital Universitario, Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, E-41013 Sevilla (ES).
- (74) Mandatario: **ILLESCAS TABOADA, Manuel**; C/ Recoletos, 13 5º Izda, E-28001 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING USEFUL INFORMATION FOR THE DIAGNOSIS OF NEUROMUSCULAR DISEASES

(54) Título : MÉTODO PARA OBTENER INFORMACIÓN ÚTIL PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES

(57) Abstract: Method for obtaining useful information for the diagnosis of neuromuscular diseases. The invention describes a method for obtaining, on the basis of a patient biopsy, new parameters that allow objective diagnosis of different neuromuscular diseases and the degree to which these affect the patient, comprising: -staining the biopsy sample in order to highlight type-I muscle fibres, type-II muscle fibres and endomysium; - obtaining an image of the biopsy sample after staining; - dividing the image into segments to identify the outlines of the muscle fibres; - forming a network in which the muscle fibres constitute nodes and the contacts between muscle fibres constitute the connections between the nodes; - forming a vector characteristic of the biopsy sample, the elements of which are chosen from geometric parameters of the fibres and parameters of the network constructed; - and comparing control and affected biopsy samples by means of ACP using, in each case, the characteristic vector selected.

(57) Resumen: Método para obtener información útil para el diagnóstico de enfermedades neuromusculares. La invención describe un método para obtener, a partir de la biopsia de un paciente, nuevos parámetros que permiten diagnosticar de manera objetiva diferentes enfermedades neuromusculares y su grado de afectación al paciente, que comprende: -teñir la biopsia para resaltar fibras musculares tipo I, fibras musculares tipo II y endomisio; -obtener una imagen de la biopsia tras la tinción; -segmentar la imagen para identificar los contornos de las fibras musculares; -formar una red donde las fibras musculares constituyen nodos y los contactos entre fibras musculares constituyen las uniones entre los nodos; -formar un vector característico de la biopsia cuyos elementos se eligen entre parámetros geométricos de las fibras y parámetros de la red construida; y -comparar biopsias control y afectas por medio de ACP utilizando en cada caso el vector característico seleccionado.

WO 2013/072543 A1

MÉTODO PARA OBTENER INFORMACIÓN ÚTIL PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES

OBJETO DE LA INVENCION

5

El objeto de la presente invención es un método para obtener, a partir de la biopsia de un paciente, un conjunto de nuevos parámetros que permiten, mediante un estudio histológico comparativo, diagnosticar de manera objetiva diferentes enfermedades neuromusculares y su grado de afectación al paciente. Además, el método puede realizarse de manera automática por ordenador.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

El músculo esquelético constituye el músculo voluntario y está innervado por las neuronas motoras del sistema nervioso somático. El músculo esquelético está constituido por células tubulares muy largas, también denominadas fibras musculares, cuyos diámetros oscilan entre 10 y 100 micras y que contienen muchos núcleos ubicados en la periferia de la célula. Las fibras musculares están separadas unas de otras por una red de tejido conectivo laxo compuesto de fibras de colágeno y reticulares denominado endomisio. A su vez, las fibras musculares se agrupan formando fascículos, que están rodeados por un tejido conectivo denominado perimisio.

20

25

Las fibras musculares pueden ser de dos tipos normalmente denominados tipo I y tipo II, estando dispuestos ambos tipos de fibras según un mosaico desordenado a lo largo de los fascículos (Helliwell, 1999; O'Ferrall and Sinnreich, 2009; Pette and Staron, 2000). El tipo de fibra muscular depende de la naturaleza de la neurona motora que la inerva:

30

Fibras tipo I: Contienen una isoforma de miosina que utiliza ATP a baja velocidad. Son fibras de contracción lenta.

Fibras tipo II: Contienen una isoforma de miosina que utiliza ATPasa a alta velocidad. Son fibras de contracción rápida.

5 El diagnóstico de las enfermedades neuromusculares está principalmente basado en la caracterización histológica y la evaluación morfológica de secciones de muestras musculares, normalmente biopsias del músculo esquelético (Dubowitz and Sewry, 2006). Para este diagnóstico, es de vital importancia la determinación del tamaño y de las proporciones entre los dos tipos de fibras, así como el tamaño de las fibras de colágeno, ya que el tipo
10 de problema en los componentes de la conexión muscular (neurona motora-axón-músculo) se refleja en un patrón característico de la sección muscular.

Principalmente se pueden distinguir tres patrones característicos correspondientes a dos grupos de enfermedades:

15

1) Miopatía con origen en el propio músculo

a. Patrón distrófico: Se caracteriza por un aumento de endomisio debido a la aparición de fibrosis. Las fibras adquieren una morfología más redondeada. La afectación suele ser homogénea dentro
20 del músculo, y afecta a todos los músculos. No es frecuente la selectividad de afectación entre fibras tipo I y tipo II.

b. Patrón no distrófico: Las fibras adquieren también una morfología más redondeada, aunque sin aumento de endomisio. Se observa una mayor disparidad entre los tamaños de las fibras

25

2) Patología neuromuscular con origen en el sistema nervioso periférico

c. Patrón de atrofia neurógena: Gran cantidad de fibras normales a simple vista, aunque aparecen pequeños grupos sin patrón
30 específico de células pequeñas. Puede afectar más a unos músculos que a otros. Puede presentar selectividad en la afectación de fibras tipo I y tipo II, aunque no ocurre siempre. Pueden aparecer reinervaciones, lo

cual elimina el mosaico. En casos muy avanzados, pueden aparecer principios de fibrosis.

Actualmente, la evaluación morfológica de las biopsias o secciones musculares para realizar el diagnóstico es realizada visualmente por médicos especialistas denominados patólogos. Es fácil apreciar que existe un elevado grado de subjetividad en estos diagnósticos basados en la interpretación visual de los patólogos, pudiendo aparecer diferencias en los diagnósticos en función del grado de formación, de la experiencia o de la pericia de cada patólogo. Además, actualmente los patólogos son capaces de determinar la presencia o ausencia de una determinada enfermedad y de estimar el grado de afectación o de evolución en el paciente, pero no pueden cuantificarlo.

Recientemente se ha descubierto la utilidad de aplicar la teoría de redes a la caracterización de la organización de los tejidos. La teoría de redes se ha utilizado ampliamente para analizar diversos tipos de procesos o sistemas biológicos complejos a diferentes escalas, desde interacciones entre moléculas hasta interacciones entre especies. Sin embargo, su aplicación a nivel de individuo o de grupos de células ha sido limitada hasta la publicación del artículo "Epithelial organisation revealed by a network of cellular contacts", de Luis M. Escudero et al. (Escudero et al., 2011). El método descrito en este artículo está basado en el análisis de las imágenes de tejidos la mosca *Drosophila* y de pollo, que están básicamente constituidas por simples células poligonales de diferentes tamaños según el tipo de epitelio. De este análisis se obtienen una serie de parámetros fundamentalmente basados en el tamaño, forma y conectividad de dichas células, construyéndose un vector característico de cada muestra. Se descubre entonces que el vector característico de cada muestra permite identificar cambios en el epitelio como consecuencia de la mutación de un gen, diferenciar entre tejidos de uno u otro organismo, e incluso identificar diferentes estados de crecimiento de un mismo organismo, todo ello de forma automática y objetiva.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un método que aplica los recientes descubrimientos relacionados con la teoría de redes para obtener nuevos parámetros específicos capaces de caracterizar una biopsia de tejido de músculo esquelético de un paciente. La comparación del vector característico correspondiente a la biopsia del paciente con el vector característico correspondiente a una biopsia control permitirá determinar de un modo objetivo la existencia de posibles enfermedades musculares. Es más, en función de la diferencia entre unos parámetros y otros, será posible incluso determinar el grado de afectación del paciente.

El método está desarrollado específicamente para el tejido de músculo esquelético que, como se ha mencionado anteriormente, está formado por fibras musculares alargadas agrupadas en fascículos. Cada fibra se interpreta como un nodo de la red, mientras que los contactos entre fibras constituyen las uniones entre los nodos de la red. El método de la invención reconoce dos tipos de nodos según si la fibra muscular es de tipo I o de tipo II, y además tiene en cuenta el colágeno almacenado en forma de endomisio en las fronteras entre fibras.

Según un primer aspecto de la invención, el método para obtener información útil para el diagnóstico de enfermedades neuromusculares a partir de una biopsia de tejido de músculo esquelético comprende los siguientes pasos:

- 1) Realizar una tinción de la biopsia para resaltar las fibras musculares tipo I, las fibras musculares tipo II y el endomisio.

El objeto de la tinción es poder identificar visualmente en la muestra los dos tipos de fibras musculares (tipo I y tipo II), así como el endomisio. En principio, se podría aplicar cualquier tipo de tinción capaz de conseguir este

propósito, aunque preferentemente se aplican preparaciones de dos anticuerpos que tiñen de colores diferentes dos elementos de entre los tres mencionados. Es decir, se tiñen dos de ellos de colores diferentes, quedando el color del tercero sin modificar.

5

Más concretamente, en una realización preferida de la invención se aplica un primer anticuerpo que actúa contra la proteína colágeno VI para teñir el endomisio de un primer color (verde) y un segundo anticuerpo que actúa contra la cadena pesada de la isoforma lenta de la miosina (concretamente sMyHC) para teñir las fibras musculares tipo I de un segundo color (rojo). Las fibras musculares tipo II, que no han sido teñidas, se mantienen de un color oscuro cercano al negro.

10

2) Obtener una imagen de la biopsia tras la tinción.

15

Para obtener la imagen se utiliza preferentemente un microscopio de fluorescencia, normalmente conectado a un ordenador. La imagen se obtiene de una zona de la biopsia carente de artefactos causados durante la preparación de la misma. El resultado es una imagen que contiene fundamentalmente un mosaico de fibras musculares de color rojo (tipo I) y negro (tipo II) separadas por bandas de color verde (endomisio).

20

3) Segmentar la imagen para identificar los contornos de las fibras musculares.

25

Se lleva a cabo a continuación un paso de segmentación para separar de un modo claro las diferentes fibras musculares del endomisio. En principio, se podrían utilizar diferentes técnicas resegmentación conocidas en la técnica, aunque en una realización preferida de la invención se aplica la transformada de Watershed.

30

Esta técnica requiere del diseño de marcadores que identifiquen las fibras que deseamos segmentar mediante la aplicación de distintos operadores de morfología matemática. El objetivo es encontrar los mínimos locales de la imagen que indiquen la presencia de fibras musculares, para después aplicar la Transformada Watershed que ya sí identificará de una manera exacta el contorno de cada fibra. Para evitar que algunos capilares se confundan con dichas fibras, se aplican condiciones de color, basadas en los planos R (rojo), G (verde) y en el plano B cuando se realiza una ecualización del histograma

5

10

4) Formar una red donde las fibras musculares constituyen nodos y los contactos entre fibras musculares constituyen las uniones entre los nodos.

15

Una vez realizada la segmentación, se identifican las fibras y se representa la imagen como un grafo formado por nodos (las fibras musculares) y uniones entre esos nodos (cada fibra/nodo está unida a las fibras/nodos vecinos, es decir, aquellos que están en contacto con ella).

20

Además, puesto que existen fibras de tipo I y fibras de tipo II, también existirán nodos de tipo I y nodos de tipo II. La información acerca del tipo de nodo se utilizará para determinar diferentes parámetros de red, según se describirá más adelante en este documento. Por ejemplo, permitirá calcular cuántos vecinos de tipo I tiene una fibra de tipo II, el tamaño medio de las fibras de tipo I, y otros parámetros similares.

25

Según una realización preferida de la invención, este paso comprende además representar gráficamente la biopsia como un grafo formado por los nodos y las uniones entre nodos, estando los nodos ubicados en el centro de masa de cada fibra.

30

5) Formar un vector característico de la biopsia cuyos elementos se eligen entre parámetros geométricos de las fibras y parámetros de red.

Por último, se construye un vector característico que comprende al menos un parámetro de red o parámetro geométrico de las fibras.

En una realización preferida de la invención, los parámetros del vector característico se eligen entre la siguiente lista de 26 parámetros:

5

1	Área media de las fibras
2	Desviación típica del área de las fibras
3	Número medio de vecinos de cada fibra
4	Desviación típica del número de vecinos de cada fibra
5	Área media de las fibras tipo I
6	Desviación típica del área de las fibras tipo I
7	Área media de las fibras tipo II
8	Desviación típica del área de las fibras tipo II
9	Desviación típica del número de vecinos de las fibras tipo I
10	Desviación típica del número de vecinos de las fibras tipo II
11	Número medio de vecinos tipo I de las fibras tipo I
12	Número medio de vecinos tipo II de las fibras tipo I
13	Número medio de vecinos tipo I de las fibras tipo II
14	Número medio de vecinos tipo II de las fibras tipo II
15	Media del cociente $A1/A2$
16	Desviación típica del cociente $A1/A2$
17	Dimensión media del eje mayor de las fibras
18	Dimensión media del eje menor de las fibras
19	Media de la relación de ejes
20	Desviación típica de la relación de ejes
21	Media de la envoltura convexa
22	Desviación típica de la envoltura convexa
23	Ángulos medios
24	Desviación típica de los ángulos
25	Media cociente área fibra/ área media fibras vecinas
26	Desviación típica cociente área fibra/ área media fibras vecinas

Más preferentemente, se pueden añadir además los siguientes parámetros a los anteriores, de modo que número de parámetros total alcanza 82.

27	Media de la relación con los vecinos del eje mayor
28	Desv. típica de la relación con los vecinos del eje mayor
29	Media de la relación con los vecinos del eje menor
30	Desv. típica de la relación con los vecinos del eje menor
31	Media de la relación con los vecinos de la relación entre ejes
32	Des. típica de la relación con los vecinos de la relación entre ejes
33	Media de la relación con los vecinos de la envoltura convexa
34	Des. típica de la relación con los vecinos de la envoltura convexa
35	Media de la relación con los vecinos de ángulos medios
36	Desv. típica de la relación con los vecinos ángulos medios
37	Media de la relación con los vecinos de la relación A1/A2
38	Desv. típica de la relación con los vecinos de la relación A1/A2
39	Media de la Suma de los pesos
40	Desv. típica de la Suma de los pesos
41	Media de los pesos de las fibras tipo I
42	Desv. típica de los pesos de las fibras tipo I
43	Media de los pesos de las fibras tipo II
44	Desv. típica de los pesos de las fibras tipo II
45	Media del "clustering coefficient"
46	Desv. típica del "clustering coefficient"
47	Media del "clustering coefficient" fibras tipo II
48	Desv. típica del "clustering coefficient" fibras tipo II
49	Media del "clustering coefficient" fibras tipo II
50	Desv. típica del "clustering coefficient" tipo II
51	Media de la excentricidad
52	Desv. típica de la excentricidad
53	Media de la excentricidad de las fibras tipo II

54	Desv. típica de la excentricidad de las fibras tipo II
55	Media de la excentricidad de las fibras tipo II
56	Desv. Típica de la excentricidad de las fibras tipo II
57	Media de la "Betweenness Centrality"
58	Desv. típica de la "Betweenness Centrality"
59	Media de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
60	Desv. típica de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
61	Media de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
62	Desv. típica de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
63	Media de la distancia
64	Desv. típica de la distancia
65	Media de la distancia de las fibras tipo II_fibras tipo II
66	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II_fibras tipo II
67	Media de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo II
68	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo II
69	Media de la distancia de las fibras fibras tipo II a las fibras tipo II
70	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo II
71	Media de la distancia de las fibras tipo I a las fibras tipo I
72	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo I
73	Radio
74	Diámetro
75	Eficiencia
76	Coeficiente de Pearson
77	Conectividad algebraica
78	Metrica_s
79	"Assortativity"
80	Densidad de conexiones
81	"Transitivity"
82	Modularidad maximizada

donde:

- Cociente $A1/A2$: área de cada fibra tras la segmentación partida por el área de la fibra tras la expansión proporcional

- Eje mayor/menor: es el eje mayor/menor de la elipse que tiene el mismo segundo momento central normalizado que la fibra.

5 - Relación de ejes: es la relación entre el eje mayor y eje menor de una fibra, entendiendo como tales los ejes mayor y menor de la elipse que tiene el mismo segundo momento central normalizado que la fibra.

- Envoltura convexa: Proporción de píxeles de la envoltura convexa que también pertenecen a la fibra, entendiendo por envoltura convexa el polígono convexo más pequeño posible que contiene a la fibra.

- Ángulos: ángulo que forma el eje mayor con el eje x.

- Media de la suma de los pesos: es la media de la suma de la distancia en píxeles entre el centro de cada célula y los centros de las células vecinas.

10 - Media del "clustering coefficient": cuantifica cómo de interconectado está con sus vecinos. Proporción entre los enlaces conectados con sus vecinos dividido entre el número de enlaces existentes en un clique en el que la conectividad es máxima.

- Media de la excentricidad: media de los valores máximos de las longitudes mínimas de los caminos desde una célula a cualquier otra.

20 - Media de la "betweenness centrality": es la fracción entre todos los caminos de longitud mínima que pasan por una célula y el número total de caminos de longitud mínima que comienzan en esa célula.

- Media de la distancia: longitud (en píxeles) del camino más corto entre todos los pares de células.

25 - Radio: el menor camino más corto.

- Diámetro: el mayor camino más corto.

- Eficiencia: inversa de la media de los caminos más cortos.

- Coeficiente de Pearson: coeficiente de Pearson del grafo.

30 - Conectividad algebraica: segundo autovalor más pequeño no nulo de la matriz laplaciana.

- Métrica_s: Suma de los productos de los grados entre dos células, entendiendo como grado el número de vecinos.

- "Assortativity": coeficiente de Pearson del grado entre nodos conectados.

- Densidad de conexiones: fracción entre el número de conexiones entre las células y el número total de conexiones posibles.

5 - "Transitivity": probabilidad de que células adyacentes a otra estén conectadas.

- Modularidad maximizada: es un estadístico que cuantifica el grado por el cual un grafo puede subdividirse en grupos claramente diferenciados.

10 De este modo, es posible elegir un subgrupo de estos parámetros que tenga capacidad discriminatoria con relación a enfermedades musculares concretas, como miopatías o patologías neuromusculares, construyéndose así un vector característico que permite determinar, a través de la comparación con al menos un vector característico control correspondiente o equivalente a la
15 biopsia de un individuo sano, no sólo la presencia de dichas enfermedades musculares, sino incluso su grado de afectación al paciente. En otras palabras, de todo el grupo de parámetros propuesto se descartan aquellos que no proporcionan información relevante que pueda servir para diferenciar entre tejidos sanos y tejidos afectados, por ejemplo porque su valor es constante en
20 todas las muestras.

En una realización preferida de la invención, la selección del subgrupo de parámetros que formará el vector característico se puede realizar utilizando los métodos SFS (Sequential Forward Selection) y SBS (Sequential Backward
25 Selection) mediante una red neuronal Fuzzy-ARTMAP.

Una vez seleccionado un subgrupo de los parámetros anteriores para formar un vector característico, es necesario realizar la comparación entre al menos un vector característico correspondiente a un paciente y al menos un
30 vector característico control. Esto se puede realizar empleando diversos métodos matemáticos y estadísticos conocidos en la técnica, aunque en una realización preferida de la invención se utiliza el Análisis de la Componente

Principal (ACP, o Principal Component Analysis por sus siglas en inglés) o Redes Neuronales Artificiales (RNA).

El vector característico control puede obtenerse a través de la biopsia de un individuo cuyo estado es conocido, es decir, que se sabe que está sano o enfermo. Nótese además que no es necesario tener un único vector característico del paciente que se está evaluando y un único vector característico control, sino que es posible construir un grupo de vectores característicos del paciente a partir de una o varias biopsias y compararlo con un grupo de vectores característicos control correspondientes a individuos de características conocidas, preferentemente sanos.. Además, en el presente documento, el término “vector característico control” puede hacer referencia no sólo a un vector característico correspondiente a una biopsia real de un individuo, sino también a un vector característico formado por elementos considerados umbral entre valores normales y valores alterados. Por ejemplo, sería posible determinar, a través de estudios de individuos sanos y enfermos, un conjunto de valores umbral de los parámetros descritos anteriormente correspondientes a la frontera entre valores normales y valores potencialmente correspondientes a la presencia de enfermedades musculares.

20

En otra realización preferida de la invención, la selección del subgrupo de parámetros que formará el vector característico se realiza buscando aquel subgrupo de parámetros que maximiza el valor de un descriptor ACP de tipo Calinski-Harabasz. El descriptor ACP utilizado da una idea de la bondad con la cual un subgrupo determinado de parámetros consigue separar un grupo de vectores (correspondiente a la muestra del paciente) de otro grupo de vectores (correspondiente al control). Brevemente, el descriptor ACP utilizado en este documento se define como sigue:

25

$$W = \sum_{i=1}^k \sum_{l=1}^{N_i} (x_i(l) - \bar{x}_i)(x_i(l) - \bar{x}_i)^T$$

$$B = \sum_{i=1}^k N_i(\bar{x}_i - \bar{x})(\bar{x}_i - \bar{x})^T$$

$$T = W + B = \sum_{l=1}^k (x(l) - \bar{x})(x(l) - \bar{x})^T$$

$$\text{Ratio PCA} = \text{trace}(B/W)$$

5 donde dado un conjunto $X = \{x(1), \dots, x(N)\}$ de N objetos y una partición de dichos datos en k subgrupos inconexos, N_i es el número de objetos asignados al subgrupo i_{th} , $x_i(l)$ es el l_{th} objeto asignado a ese subgrupo, \bar{x}_i es el vector n -dimensional de las muestras de ese sub-grupo (centroide del subgrupo) y \bar{x} es el vector n -dimensional de las todas las muestras (centroide de los datos). Así, las matrices W y B se suman para obtener la matriz T de dispersión del conjunto de datos. Se puede esperar que subgrupos compactos y separados tengan valores bajos de W y valores altos de B . En consecuencia, cuanto mejor sea la partición de los datos, mayor será el valor de la relación entre B/W que constituye el descriptor ACP.

15

En consecuencia, el método propuesto se basa fundamentalmente en probar diferentes combinaciones de parámetros hasta obtener un subgrupo de parámetros que maximice el valor de dicho descriptor ACP. Esto se puede hacer de diferentes modos, aunque en una realización preferente de la invención se implementa mediante los siguientes pasos:

20

- Calcular el descriptor ACP para cada combinación posible de dos parámetros.

25

- Añadir, a las diez mejores combinaciones de dos parámetros obtenidos en el paso anterior (es decir, aquellos diez subgrupos que presenten una mayor relación B/W), un tercer parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible.

- Añadir, a las cinco mejores combinaciones de tres parámetros calculadas en el paso anterior, un cuarto parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible.

5 - Añadir, a las dos mejores combinaciones de cuatro parámetros calculadas en el paso anterior, un quinto parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible.

- Añadir, a la mejor combinación de cinco parámetros calculada en el paso anterior, un sexto parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible.

10 - Añadir sucesivamente, a la mejor combinación de seis parámetros calculada en el paso anterior, un parámetro adicional.

- Elegir la combinación de parámetros que presente el máximo valor del descriptor ACP.

15 Este método se lleva a cabo sucesivamente, aunque preferentemente sólo se evalúan combinaciones de entre uno y siete parámetros, ya que un subgrupo formado por más de siete parámetros podría producir inestabilidad en los posteriores análisis de ACP.

20 Es evidente que el método descrito puede llevarse a cabo por medio de un programa de ordenador, y por tanto la invención también se extiende igualmente a los programas de ordenador, particularmente a programas de ordenador situados en una portadora, que están adaptados para que un ordenador lleve a la práctica la invención. El programa puede tener la forma de
25 código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa.

30

Por ejemplo, la portadora podría incluir un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM, una memoria ROM de

semiconductor, o un disco duro. La portadora puede ser también una portadora transmisible, por ejemplo, una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar
5 constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio.

Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que está incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar,
10 o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 muestra un ejemplo de biopsia muscular de un paciente antes
15 de realizar la tinción.

La Fig. 2 muestra una biopsia similar a la de la Fig. 1 una vez teñida con anticuerpos contra la proteína colágeno VI y con anticuerpos contra la cadena pesada de la isoforma lenta de la miosina.

La Fig. 3 muestra la biopsia de la Fig. 2 una vez terminada la
20 segmentación.

La Fig. 4 muestra un detalle de la biopsia de la Fig. 3 una vez formada la red.

La Fig. 5 es una gráfica donde cada punto corresponde al vector característico de un paciente con distrofia (círculos) o de un individuo sano (cuadrados). Cada círculo, que corresponde a un individuo con distrofia,
25 presenta unos números que indican el grado de afectación según un neuropatólogo experto.

REALIZACIÓN PREFERIDA DE LA INVENCION

30

Se describe a continuación con mayor detalle un ejemplo de aplicación del método de la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas. El

método se realiza en su mayor parte de forma automática por ordenador, de modo que se consigue una mayor velocidad y repetitividad de los resultados en comparación con el método habitual en que el patólogo determina visualmente la presencia o ausencia de enfermedades musculares.

5

El primer paso consiste en la adquisición de biopsias de tejido muscular de un paciente, que posteriormente son procesadas mediante los métodos estándar de congelación y corte con criostato. La Fig. 1 muestra el aspecto que presenta un ejemplo de biopsia antes de proceder a su tinción.

10

A continuación, las biopsias reciben una tinción inmunohistoquímica con un protocolo de tinción de fluorescencia estándar. Como se ha descrito anteriormente, se realizan tinciones dobles, añadiendo un anticuerpo secundario diferente para cada anticuerpo primario. El resultado son preparaciones teñidas a la vez con dos anticuerpos, uno que detecta el endomisio y el otro que detecta las fibras de tipo I. Concretamente, en este ejemplo las biopsias se tiñen con un primer anticuerpo contra la proteína colágeno VI para identificar el endomisio, que queda teñido de color verde, y con un segundo anticuerpo específico contra la cadena pesada de la isoforma lenta de la miosina, en concreto el sMyHC, para identificar las fibras tipo I, que quedan teñidas de color rojo.

15
20

Una vez terminada la tinción, se adquiere una imagen de la biopsia utilizando un microscopio de fluorescencia. La imagen se obtiene de una parte de la biopsia que no tenga ningún artefacto debido a la preparación. Además, normalmente las imágenes se adquieren siempre con la misma resolución y tamaño.

25

Puesto que actualmente la Ley de Patentes 11/1986 no permite el uso de colores en las figuras, la imagen adquirida por el microscopio de fluorescencia ha debido representarse en blanco y negro. En la Fig. 2, el gris corresponde a las fibras tipo I, el negro corresponde a las fibras tipo II, y las

30

bandas casi blancas que separan unas fibras de otras corresponden al endomisio. Sin embargo se debe entender que, en este ejemplo concreto, la tinción aplicada provoca que las fibras tipo I aparezcan realmente de color rojo, las fibras tipo II de color negro y el endomisio de color verde.

5

Una vez adquirida la imagen, comienza el proceso de segmentación que permitirá identificar de un modo preciso los contornos de las diferentes fibras, tanto del tipo I como del tipo II. Una vez identificados los contornos de las fibras, se considerará endomisio todo lo que no sea fibra

10

La segmentación se realiza empleando la técnica Watershed, utilizando marcadores para conseguir una correcta segmentación de las fibras musculares con esta técnica. El objetivo de los marcadores es identificar la presencia de todas las fibras existentes en la imagen. Se lleva a cabo mediante el empleo de operadores morfológicos, que se detallan a continuación.

15

En primer lugar, se binariza el plano verde, poniendo a un valor de 1 aquellos píxeles que formen regiones conexas con un valor de intensidad constante menor que un umbral y cuyos bordes estén formados por píxeles con mayor valor de intensidad. El resto de los píxeles de la imagen adquieren un valor de 0.

20

A continuación se eliminan aquellas regiones con un área menor que un umbral. Se realiza una reconstrucción morfológica que permite rellenar huecos, entendiendo por huecos aquellas regiones de píxeles con valor 0 rodeados de regiones con valor 1. Se continúa con una apertura. Por último se realiza una erosión, para evitar que regiones con valor 1 que identifiquen a distintas fibras estén en contacto.

25

30

Con el fin de no segmentar capilares como fibras se aplican varias condiciones de color a las regiones con valor 1. Estas regiones tienen que cumplir que su valor medio de intensidad en el plano G (plano Verde) sea

menor que un umbral, y por otra parte que su valor de intensidad en el plano R (plano Rojo) sea menor que un umbral y su valor medio del plano G cuando se ecualiza su histograma sea mayor que un umbral.

5 Después de aplicar estos operadores y condiciones, se obtienen los marcadores, que son aquellas regiones con valor 1 resultantes en la imagen binaria, y que identifican la presencia de fibras. La transformada Watershed se aplica a estos marcadores junto al gradiente del plano verde obteniendo la segmentación precisa de los contornos de las fibras musculares. El resultado
10 se muestra en la Fig. 3, donde los contornos de las fibras musculares aparecen en color blanco, mientras que las propias fibras y el endomisio siguen teniendo los mismos tonos descritos anteriormente con relación a la Fig. 2.

A continuación, se determina cuáles son las fibras vecinas de cada fibra
15 de la imagen. Para ello, se procesa la imagen segmentada de la Fig. 2 expandiendo por igual la superficie detectada de cada fibra hasta contactar con las expansiones de las fibras vecinas. Se realiza mediante la aplicación directa de la Transformada Watershed a la imagen binaria obtenida a partir de los marcadores encontrados.

20

El paso siguiente consiste en la creación de una red o grafo representativo de la biopsia, donde los nodos corresponden a las diferentes fibras y las uniones conectan cada fibra con sus fibras vecinas.

25 Esta red se representa según se muestra en la Fig. 4, donde las líneas grises de un color más claro representan los contornos de las diferentes fibras/nodos de la red, mientras que las líneas más oscuras (casi negras) representan las uniones entre unos nodos/fibras y otros. Los nodos propiamente dichos están representados por las intersecciones entre varias
30 líneas oscuras, y están ubicados en el centro de masa de las fibras/nodos correspondientes. Aunque no se ha representado gráficamente en la Fig. 4, se

entiende que la red creada comprende nodos de dos tipos, que corresponden a los dos tipos de fibras (tipo I y tipo II).

Una vez formada la red, resulta sencillo calcular diferentes parámetros, bien de tipo geométrico o bien parámetros de red, con el objeto de caracterizar la biopsia y permitir su comparación con determinados umbrales obtenidos empíricamente o con los parámetros correspondientes a biopsias control. Por ejemplo, se puede determinar el área de las diferentes fibras, la longitud de sus ejes, el número de vecinos que tiene cada fibra, etc. Para hacer esto, previamente se selecciona una región de interés (ROI) que cumpla las siguientes condiciones:

- Tiene siempre el mismo tamaño y forma
- Excluye posibles artefactos de la preparación
- Las fibras de los límites exteriores de la ROI deben estar rodeadas al menos por dos hileras adicionales de células.

15

A continuación, es posible seleccionar un subconjunto de parámetros, que en este ejemplo se eligen de entre los 26 u 82 parámetros mencionados anteriormente, para construir el vector característico de la muestra. Este subconjunto se selecciona empleando, por ejemplo, los métodos SFS (Sequential Forward Selection) y SBS (Sequential Backward Selection) mediante una red neuronal Fuzzy-ARTMAP, con el propósito de conseguir un vector característico capaz de discriminar entre biopsias sanas y biopsias afectadas por alguna miopatía primaria (distrófica o no distrófica) o atrofia neurógena.

25

La Fig. 5 muestra un ejemplo donde el vector característico seleccionado está formado por las características 19 (media de la relación de ejes), 23 (ángulos medios) y 25 (media cociente área fibra/ área media fibras vecinas) de la tabla anterior. A continuación, se ha aplicado la técnica de Análisis de Componente Principal (ACP) para representar un primer grupo de 16 biopsias correspondientes a individuos sanos (representados por cuadrados negros) y un segundo grupo de 20 biopsias correspondientes a pacientes con distrofias

30

musculares (representados por círculos negros). Todas las biopsias pertenecen a cuádriceps de personas de entre 2 y 15 años de edad.

El análisis ACP es un método objetivo que utiliza los valores de las características seleccionadas para realizar la comparación entre dos grupos o más de imágenes. Como resultado, se obtiene una proyección en dos o tres dimensiones que maximiza la dispersión cada una de las imágenes. Esta visualización permite la cuantificación de las diferencias entre grupos formados por cada tipo de datos. Cada imagen o punto de la Fig. 5 corresponde, por tanto, al vector característico de un paciente con distrofia o de un individuo sano. Se aprecia cómo ambos grupos aparecen separados en la Fig. 5, quedando los cuadrados correspondientes a individuos sanos principalmente a la izquierda de la gráfica y los círculos correspondientes a individuos con distrofias principalmente a la derecha de la gráfica.

Además, se descubre que la distancia entre los vectores correspondientes a pacientes afectados de distrofia (círculos) y el centro de masas de los vectores correspondiente a individuos sanos (cuadrados) se correlaciona con el grado de afectación al paciente. Para comprobarlo, un neuropatólogo experto realizó, sin conocer el resultado del análisis anterior, evaluaciones del grado de afectación de cada biopsia de los pacientes con distrofia. Se asignó a cada biopsia una gradación de entre 1-4, correspondiendo el grado 1 a una biopsia poco afectada por la distrofia y el grado 4 a una biopsia muy afectada por la distrofia.

En la Fig. 5 se puede ver que en la mayoría de los casos la evaluación del grado de afectación realizada por el patólogo, que se muestra como un número junto a cada círculo correspondiente a pacientes con distrofias musculares, se correlaciona directamente con la distancia entre dicho punto y el centro de masas del grupo de cuadrados correspondientes a pacientes control. Es decir, básicamente cuanto más a la derecha se encuentra el círculo correspondiente al vector característico, mayor es el grado de afectación de la

distrofia correspondiente a esa biopsia. Se demuestra así que el método de análisis de imagen aporta datos útiles para el diagnóstico de enfermedades musculares de una forma rápida, automática y objetiva.

- 5 Para una entrada (una biopsia) nueva a este sistema, también es posible estimar la clase a la que ésta pertenece empleando el método KNN (K vecinos más cercanos, o nearest neighbours según sus siglas en inglés). En ese caso, se calcula la distancia entre los vectores característicos ya almacenados y el nuevo vector característico de la nueva biopsia, y se seleccionan los k ejemplos
- 10 más cercanos. La nueva biopsia es clasificada con la clase que más se repite en los k vectores seleccionados.

REFERENCIAS

- Dubowitz, V., and Sewry, C.A. (2006). Muscle Biopsy: A Practical Approach (Elsevier).
- 5 • Escudero, L.M., da F. Costa, L., Kicheva, A., Briscoe, J., Freeman, M., and Babu, M.M. (2011). Epithelial organisation revealed by a network of cellular contacts. Nature Communications. In press.
- Helliwell, T.R. (1999). Muscle: Part 1 - Normal structure and function. Current Orthopaedics 13, 33-41.
- 10 • Mitiche, A., and Ben Ayed, I. (2010). Variational and Level Set Methods in Image Segmentation. (Springer).
- O'Ferrall, E.K., and Sinnreich, M. (2009). The role of muscle biopsy in the age of genetic testing. Curr Opin Neurol 22, 543-553.
- Pette, D., and Staron, R.S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc Res Tech 50, 500-509.
- 15 • Calinski & Harabasz (1974) Communications in Statistics 3:1-27.
- Sánchez-Gutierrez, D., Sáez, A., Pascual, A., Escudero, L.M.* The emergence of significant differences in proliferating epithelia. In preparation.

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener información útil para el diagnóstico de enfermedades neuromusculares a partir de una biopsia de tejido de músculo esquelético, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

5 - realizar una tinción de la biopsia para resaltar las fibras musculares tipo I, las fibras musculares tipo II y el endomisio;

- obtener una imagen de la biopsia tras la tinción;

10 - segmentar la imagen para identificar los contornos de las fibras musculares;

- formar una red donde las fibras musculares constituyen nodos y los contactos entre fibras musculares constituyen las uniones entre los nodos; y

- formar un vector característico de la biopsia cuyos elementos se eligen entre parámetros geométricos de las fibras y parámetros de red.

15

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paso de tinción de la muestra comprende aplicar preparaciones de dos anticuerpos que tiñen de colores diferentes dos elementos de entre: las fibras musculares tipo I, las fibras musculares tipo II y el endomisio.

20

3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, donde un primer anticuerpo actúa contra la proteína colágeno VI para teñir el endomisio de un primer color y un segundo anticuerpo actúa contra la cadena pesada de la isoforma lenta de la miosina para teñir las fibras musculares tipo I de un segundo color.

25

4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el anticuerpo contra la cadena pesada de la isoforma lenta de la miosina es sMyHC.

30

5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso de obtención de una imagen de la biopsia teñida se

lleva a cabo utilizando un microscopio de fluorescencia en una zona de la biopsia carente de artefactos causados durante la preparación de la misma.

5 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso de segmentación comprende el cálculo de marcadores morfológicos para fibras musculares y la aplicación de la Transformada Watershed.

10 7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el paso de formación de la red comprende identificar los vecinos de las fibras musculares mediante la expansión del contorno de cada fibra aplicando directamente la Transformada Watershed a los marcadores morfológicos para fibras musculares.

15 8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso de formación de la red comprende además representar gráficamente la biopsia como un grafo formado por nodos y uniones entre nodos, estando los nodos ubicados en el centro de masa de cada fibra.

20

9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los parámetros del vector característico se eligen del siguiente grupo:

1	Área media de las fibras
2	Desviación típica del área de las fibras
3	Número medio de vecinos de cada fibra
4	Desviación típica del número de vecinos de cada fibra
5	Área media de las fibras tipo I
6	Desviación típica del área de las fibras tipo I
7	Área media de las fibras tipo II
8	Desviación típica del área de las fibras tipo II

9	Desviación típica del número de vecinos de las fibras tipo I
10	Desviación típica del número de vecinos de las fibras tipo II
11	Número medio de vecinos tipo I de las fibras tipo I
12	Número medio de vecinos tipo II de las fibras tipo I
13	Número medio de vecinos tipo I de las fibras tipo II
14	Número medio de vecinos tipo II de las fibras tipo II
15	Media del cociente A1/A2
16	Desviación típica del cociente A1/A2
17	Dimensión media del eje mayor de las fibras
18	Dimensión media del eje menor de las fibras
19	Media de la relación de ejes
20	Desviación típica de la relación de ejes
21	Media de la envoltura convexa
22	Desviación típica de la envoltura convexa
23	Ángulos medios
24	Desviación típica de los ángulos
25	Media cociente área fibra/ área media fibras vecinas
26	Desviación típica cociente área fibra/ área media fibras vecinas

10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho grupo comprende además los siguientes parámetros:

27	Media de la relación con los vecinos del eje mayor
28	Desv. típica de la relación con los vecinos del eje mayor
29	Media de la relación con los vecinos del eje menor
30	Desv. típica de la relación con los vecinos del eje menor
31	Media de la relación con los vecinos de la relación entre ejes
32	Des. típica de la relación con los vecinos de la relación entre ejes
33	Media de la relación con los vecinos de la envoltura convexa
34	Des. típica de la relación con los vecinos de la envoltura convexa
35	Media de la relación con los vecinos de ángulos medios

36	Desv. típica de la relación con los vecinos ángulos medios
37	Media de la relación con los vecinos de la relación A1/A2
38	Desv. típica de la relación con los vecinos de la relación A1/A2
39	Media de la Suma de los pesos
40	Desv. típica de la Suma de los pesos
41	Media de los pesos de las fibras tipo I
42	Desv. típica de los pesos de las fibras tipo I
43	Media de los pesos de las fibras tipo II
44	Desv. típica de los pesos de las fibras tipo II
45	Media del "clustering coefficient"
46	Desv. típica del "clustering coefficient"
47	Media del "clustering coefficient" fibras tipo II
48	Desv. típica del "clustering coefficient" fibras tipo II
49	Media del "clustering coefficient" fibras tipo II
50	Desv. típica del "clustering coefficient" tipo II
51	Media de la excentricidad
52	Desv. típica de la excentricidad
53	Media de la excentricidad de las fibras tipo II
54	Desv. típica de la excentricidad de las fibras tipo II
55	Media de la excentricidad de las fibras tipo II
56	Desv. Típica de la excentricidad de las fibras tipo II
57	Media de la "Betweenness Centrality"
58	Desv. típica de la "Betweenness Centrality"
59	Media de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
60	Desv. típica de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
61	Media de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
62	Desv. típica de la "Betweenness Centrality" de las fibras tipo II
63	Media de la distancia
64	Desv. típica de la distancia
65	Media de la distancia de las fibras tipo II_fibras tipo II
66	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II_fibras tipo II

67	Media de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo II
68	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo II
69	Media de la distancia de las fibras fibras tipo II a las fibras tipo II
70	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo II
71	Media de la distancia de las fibras tipo I a las fibras tipo I
72	Desv. típica de la distancia de las fibras tipo II a las fibras tipo I
73	Radio
74	Diámetro
75	Eficiencia
76	Coefficiente de Pearson
77	Conectividad algebraica
78	Metrica_s
79	"Assortativity"
80	Densidad de conexiones
81	"Transitivity"
82	Modularidad maximizada

11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende comparar al menos un vector característico con al menos un vector característico control correspondiente o equivalente a una biopsia de tejido de un individuo de características conocidas.

5

12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los parámetros del vector característico se eligen utilizando los métodos SFS y SBS mediante una red neuronal Fuzzy-ARTMAP.

10

13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la comparación del al menos un vector característico con el al menos un vector característico control se realiza utilizando la técnica de Análisis de la Componente Principal (ACP).

15

14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde los parámetros del vector característico se eligen buscando aquel subgrupo de parámetros que maximiza el valor de un descriptor ACP de tipo Calinski-Harabasz.

5

15. Método de acuerdo con la reivindicación 14, donde el descriptor ACP se define según la ecuación:

$$\text{Ratio PCA} = \text{trace}(B/W)$$

donde:

$$10 \quad B = \sum_{i=1}^k N_i (\bar{x}_i - \bar{x})(\bar{x}_i - \bar{x})^T \quad W = \sum_{i=1}^k \sum_{l=1}^{N_i} (x_i(l) - \bar{x}_i)(x_i(l) - \bar{x}_i)^T$$

16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-15, donde la selección del subgrupo de parámetros que componen el vector característico comprende los siguientes pasos:

- 15
- calcular el descriptor ACP para cada combinación de dos parámetros;
 - añadir, a las diez mejores combinaciones de dos parámetros calculadas en el paso anterior, un tercer parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible;
 - añadir, a las cinco mejores combinaciones de tres parámetros calculadas en el paso anterior, un cuarto parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible;
 - 20 - añadir, a las dos mejores combinaciones de cuatro parámetros calculadas en el paso anterior, un quinto parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible;
 - 25 - añadir, a la mejor combinación de cinco parámetros calculada en el paso anterior, un sexto parámetro y calcular el descriptor ACP para cada combinación posible;
 - añadir sucesivamente, a la mejor combinación de seis parámetros calculada en el paso anterior, un parámetro adicional; y
 - 30 - elegir la combinación de parámetros que presente el máximo valor del descriptor ACP.

17. Método de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende evaluar combinaciones de entre uno y siete parámetros.

5 18. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde un vector característico formado por los parámetros 19 (media de la relación de ejes), 23 (ángulos medios) y 25 (media cociente área fibra/área media fibras vecinas) permite determinar la presencia y grado de afectación de distrofia muscular.

10 19. Programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

15 20. Programa de ordenador según la reivindicación 19, incorporado en medios de almacenamiento.

21. Programa de ordenador según la reivindicación 19, soportado en una señal portadora.

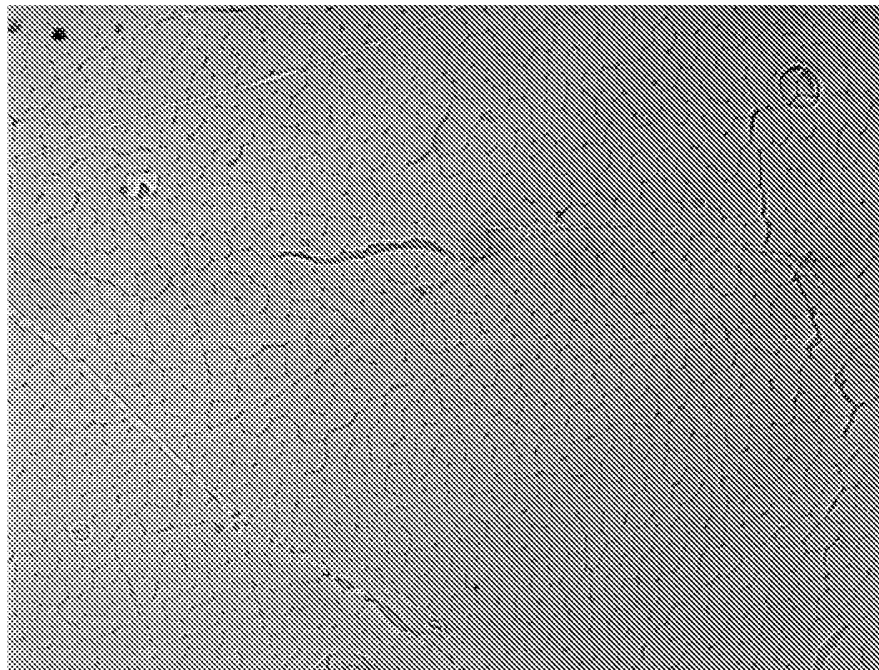


FIG. 1

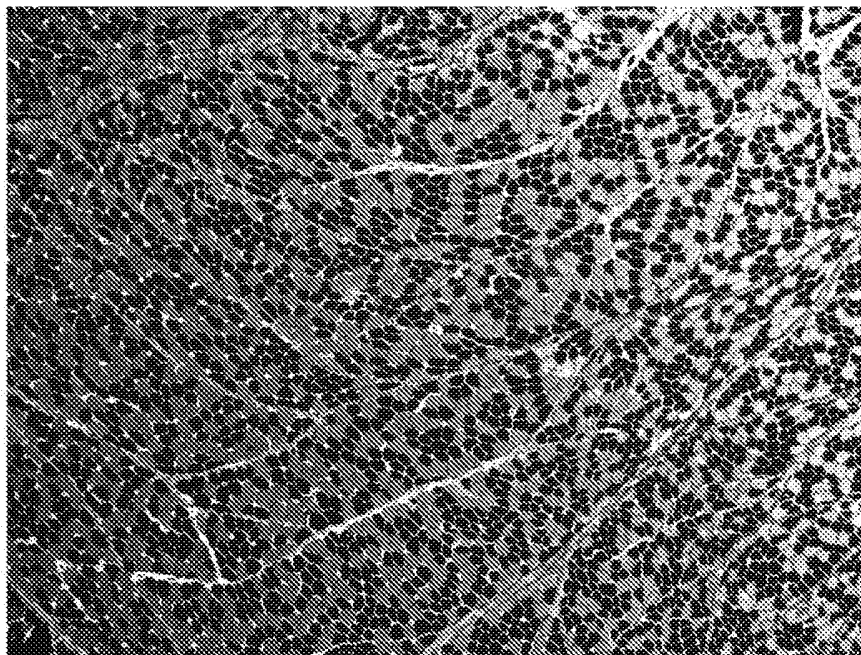


FIG. 2

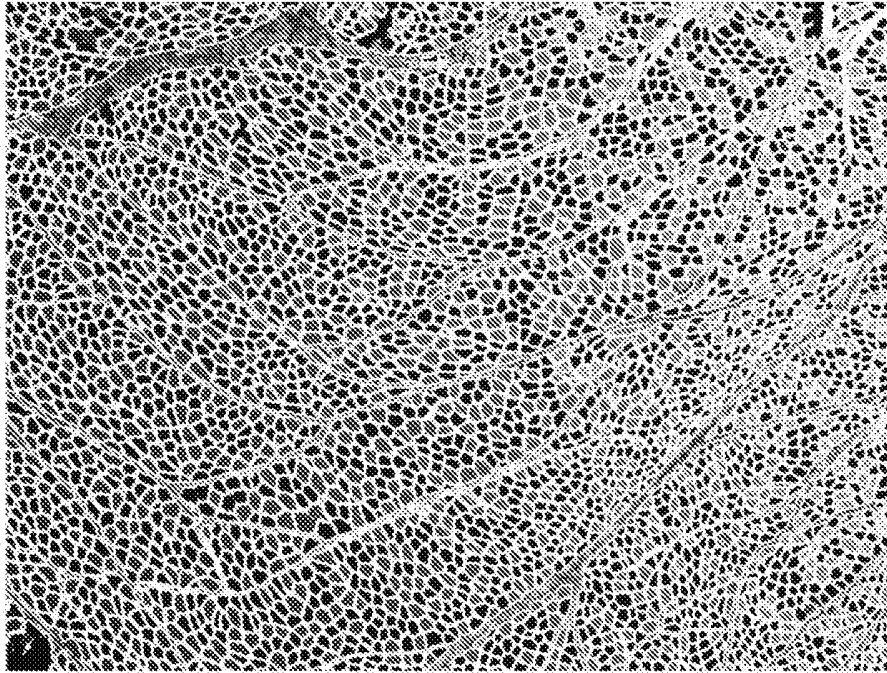


FIG. 3

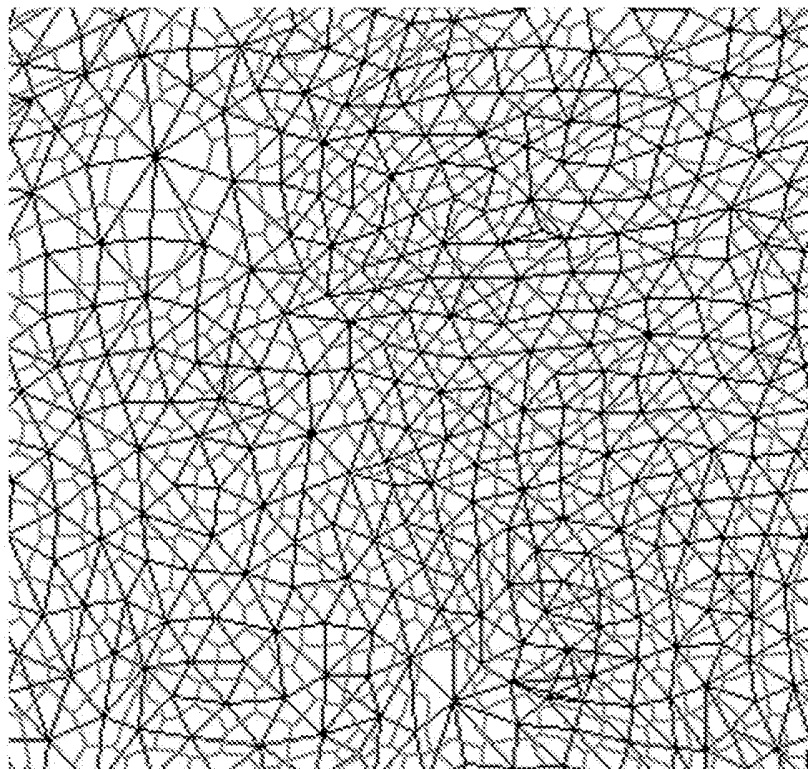


FIG. 4

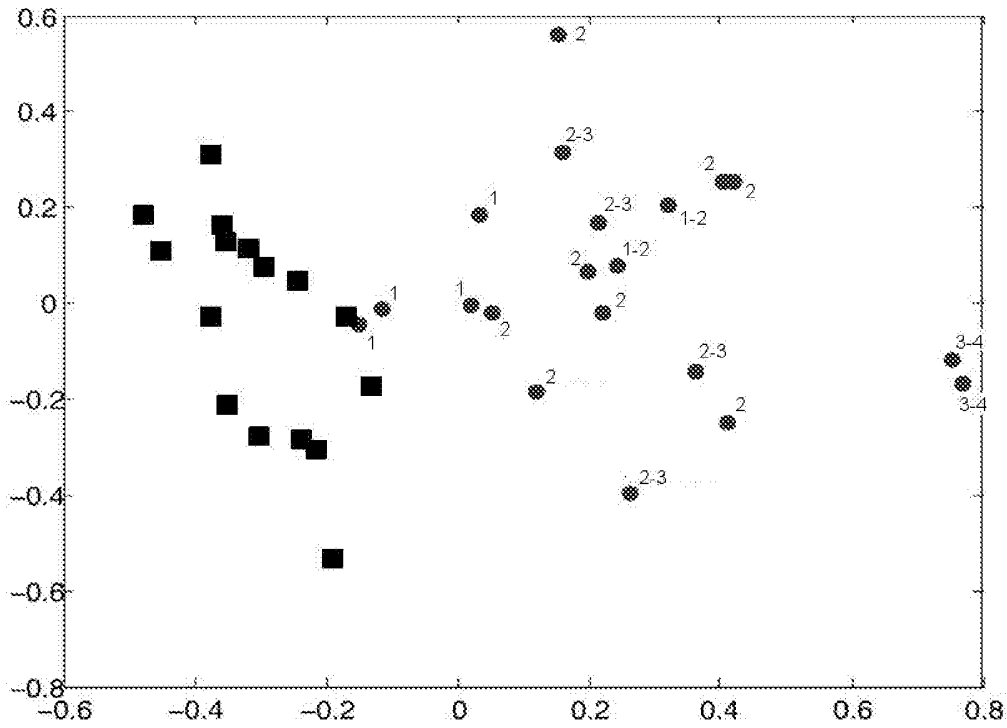


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070796

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G06T9/00 (2006.01)

G06K9/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G06T, G06K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, TXTEN, XPAIP, XPESP, XPESP2, XPIEE, XPI3E, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, Internet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GARTON, F. et al. Validation of an automated computational method for skeletal muscle fibre morphometry analysis. <i>Neuromuscular Disorders</i> , 01-08-2010, Vol. 20, No. 8, pages 540 - 547, ISSN 0960-8966, <DOI: 10.1016/j.nmd.2010.06.012>	1-11, 19-21
Y	ESCUADERO LUIS M et al. Epithelial organisation revealed by a network of cellular contacts. <i>Nature Communications</i> , 08/11/2011, Vol. 2, pages 1- 7, <DOI:10.1038/ncomms1536>	1-11, 19-21
A	SERTEL, O. et al. Microscopic image analysis for quantitative characterization of muscle fiber type composition. <i>Computerized medical imaging and graphics</i> , Vol. 35, No. 7, 27-01-2011, pages 616 - 628, ISSN 0895-6111 <DOI:10.1016/j.compmedimag.2011.01.009>	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04/03/2013

Date of mailing of the international search report
(07/03/2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
A. Figuera González

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: +34 91 349 53 04

Telephone No. +34 91 3495516

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070796

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BARRERA, J. et al. Morphological operators characterized by neighborhood graphs. Computer Graphics and Image Processing, 1997. Proceedings., X Brazilian Symposium on Campos do Jordao, Brazil, 14 -17 of October of 1997, pages 179 - 186, <DOI: 10.1109/SIGRA.1997.625172></p>	1

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070796

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G06T9/00 (2006.01)

G06K9/00 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G06T, G06K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, TXTEN, XPAIP, XPESP, XPESP2, XPIEE, XPI3E, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, Internet

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	GARTON, F. et al. Validation of an automated computational method for skeletal muscle fibre morphometry analysis. <i>Neuromuscular Disorders</i> , 01-08-2010, Vol. 20, No. 8, páginas 540 - 547, ISSN 0960-8966, <DOI: 10.1016/j.nmd.2010.06.012>	1-11, 19-21
Y	ESCUADERO LUIS M et al. Epithelial organisation revealed by a network of cellular contacts. <i>Nature Communications</i> , 08/11/2011, Vol. 2, páginas 1- 7, <DOI:10.1038/ncomms1536>	1-11, 19-21
A	SERTEL, O. et al. Microscopic image analysis for quantitative characterization of muscle fiber type composition. <i>Computerized medical imaging and graphics</i> , Vol. 35, No. 7, 27-01-2011, páginas 616 - 628, ISSN 0895-6111 <DOI:10.1016/j.compmedimag.2011.01.009>	1

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
04/03/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
07 de marzo de 2013 (07/03/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: +34 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Figuera González
Nº de teléfono +34 91 3495516

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070796

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	<p>BARRERA, J. et al. Morphological operators characterized by neighborhood graphs. Computer Graphics and Image Processing, 1997. Proceedings., X Brazilian Symposium on Campos do Jordao, Brazil, 14 -17 de octubre de 1997, páginas 179 - 186, <DOI: 10.1109/SIGRA.1997.625172></p>	1