

(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 2010/103144 A1

(43) Fecha de publicación internacional
16 de septiembre de 2010 (16.09.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61B 5/00 (2006.01) G06T 5/40 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/000102

(22) Fecha de presentación internacional:
12 de marzo de 2010 (12.03.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200900752 13 de marzo de 2009 (13.03.2009) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA; C/Jordi Girona, 31, E-08034 Barcelona (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): BENITEZ IGLESIAS, Raúl [ES/ES]; C/Jordi Girona, 31, E-08034 Barcelona (ES). ÁLVAREZ LACALLE, Enrique [ES/ES]; c/Jordi Girona, 31, E-08034 Barcelona (ES). HOVE MADSEN, Leif [DK/ES]; C/Serrano, 117, E-28006 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (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, 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 DETECTING LOCAL EVENTS OF INTRACELLULAR CALCIUM RELEASE

(54) Título : MÉTODO DE DETECCIÓN DE EVENTOS LOCALES DE LIBERACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

(57) Abstract: It comprises the realisation of the following stages: • Acquisition of a sequence of bidimensional images of a given section of one or more cells, including information relating to intracellular calcium activity, • Normalisation of said images, • Realisation of statistical analysis of the spatial-temporal distribution of pixels in said sequence of normalised images to establish some regions of interest, and determination that said regions of interest are candidates to contain a local intracellular calcium release event of interest, and • Realisation of the following stages, automatically and prior to said statistical analysis: • Detection of total calcium release events in one or more images of said succession of images, and • Realisation of said statistical analysis solely on images wherein total calcium release events have not been detected.

(57) Resumen: Comprende realizar las siguientes etapas: • Adquirir una secuencia de imágenes bidimensionales de una sección determinada de una o más células, incluyendo información relativa a actividad de calcio intracelular. • Normalizar dichas imágenes. • Realizar un análisis estadístico de la distribución espacio-temporal de píxeles en dicha secuencia de imágenes normalizadas, para determinar unas regiones de interés, y determinar que dichas regiones de interés son candidatas a contener un evento local de liberación de calcio intracelular de interés; y • Realizar las siguientes etapas, automáticamente y de manera previa a dicho análisis estadístico. • Detectar eventos globales de liberación de calcio en una o más de las imágenes de dicha sucesión de imágenes; y • Realizar dicho análisis estadístico solamente sobre las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio.

WO 2010/103144 A1

Método de detección de eventos locales de liberación de calcio intracelular

Sector de la técnica

La presente invención concierne en general a un método de detección de eventos locales de liberación de calcio intracelular, que comprende realizar un análisis estadístico de la distribución espacio-temporal de píxeles en una secuencia de imágenes de una sección de una célula, y en particular a un método que comprende realizar una preselección automática de las imágenes sobre las que realizar dicho análisis estadístico para evitar la posible influencia distorsionadora que puedan tener unos eventos globales de liberación de calcio.

Estado de la técnica anterior

Son conocidas diversas propuestas relativas a la detección de eventos locales de liberación de calcio intracelular, en particular para detectar espículas de calcio. En general se utilizan marcadores fluorescentes en combinación con técnicas de microscopía láser confocal para detectar las espículas de calcio, aunque otras técnicas, tal como la utilización de cámaras CCD, también son conocidas.

La mayoría de dichas propuestas se hallan descritas en artículos especializados, algunos de los cuales serán citados a continuación, y descritos brevemente, por considerarse como representativos del estado de la técnica más cercano a la presente invención.

Uno de dichos artículos es el de J. I. Goldhaber *et al.*, "Local regulation of the threshold for calcium sparks in rat ventricular myocytes: role of sodium—calcium exchange"; publicado en "Journal of Physiology (1999), 520.2, pp. 431—438", donde se describe un procedimiento para detectar espículas de calcio a partir de unas imágenes bidimensionales, no directamente adquiridas de manera simultánea, sino construidas a partir de un conjunto de líneas escaneadas mediante un microscopio láser confocal. En su Fig. 2 puede verse un ejemplo donde las imágenes de fluorescencia A y C han sido construidas a partir de un barrido lineal de 320ms de duración mediante un microscopio confocal. En las vistas B y C se muestran, en un marco espacio-temporal, sendas imágenes correspondientes, cada una de ellas, a la información obtenida en una sola línea escaneada. Puede observarse cómo el número de espículas de calcio de cada una de las vistas B y D es muy inferior al de las vistas A y C. Si además se tiene en cuenta que, por ejemplo, el escaneado de la línea asociada a la vista B no volverá a producirse hasta pasados 320 ms, toda la información relativa a espículas de calcio que se produzca durante dicho periodo de tiempo en dicha línea no será obtenida. Todos

estos inconvenientes provocan que se llegue a una subestimación del número y morfología de las espículas de calcio.

Con el fin de superar en cierta medida los inconvenientes que el escaneado lineal provoca a la hora de detectar espículas de calcio que no coinciden con el plano focal de ninguna de las líneas escaneadas, H. Cheng *et al.* han desarrollado una propuesta, plasmada en el artículo "Amplitude Distribution of Calcium Sparks in Confocal Images: Theory and Studies with an Automatic Detection Method" de "Biophysical Journal Volume 76 February 1999 606–617", mediante la cual parte de la información relativa a eventos de liberación de calcio que se han quedado fuera del plano focal de las líneas escaneadas, es decir que no han sido directamente escaneados, se recupera de manera indirecta al analizar la difusión que dichos eventos han provocado en zonas vecinas que sí han sido escaneadas. Dichas espículas son así detectadas de manera indirecta pero con una intensidad máxima atenuada, con el resultado de que la distribución de amplitud de las espículas detectadas es sesgada en función de la distancia a la que se encuentren respecto a la línea escaneada.

En el artículo de M. A. Bray *et al.*, "Multidimensional Detection and Analysis of Ca Sparks in Cardiac Myocytes", incluido en "Biophysical Journal Volume 92 June 2007 4433–4443", se realiza una propuesta la cual se considera como el antecedente más cercano a la presente invención, que representa un paso más allá en la detección de espículas de calcio con respecto a las propuestas anteriores, ya que en lugar de analizar unas imágenes generadas a partir de la información adquirida mediante unas líneas escaneadas durante un barrido, se analizan secuencias de imágenes bidimensionales capturadas mediante microscopía confocal 2D o mediante una cámara CCD. Se describe en dicho artículo la utilización de técnicas estadísticas para analizar dichas imágenes una vez pre-procesadas o normalizadas. Para llevar a cabo dicha normalización toman en consideración tanto una fluorescencia basal detectada en la secuencia de imágenes como distintos eventos transitorios detectados.

Tras normalizar las imágenes, en dicho artículo se propone calcular un histograma de la distribución de píxeles en toda la secuencia de imágenes que denominan "histograma de intensidades", es decir cuantas veces un píxel ha tomado un cierto valor. Estiman que la mayoría de veces los píxeles tomarán unos valores que corresponden a actividad de ruido de fondo, lo cual es lógico ya que ésta es la actividad normal de la célula en reposo. Entonces proponen localizar el máximo del histograma y definir el valor umbral de píxel a partir del cual la actividad no es ruido sino un evento de liberación de calcio. Tras ello se propone definir unas regiones de interés como aquellas que incluyen píxeles que han superado un cierto

número de veces el valor umbral definido, lo cual llevan a cabo mediante un parámetro supervisado, denominado Cri, que determina cuantas veces por encima del valor umbral debe encontrarse un píxel para considerar que la actividad corresponde a un evento de liberación de calcio.

5 Si bien la propuesta realizada por M. A. Bray *et al.* representa una clara mejora con respecto al estado de la técnica previo a la aparición de la misma, no obstante adolece de ciertos inconvenientes relacionados con el análisis estadístico realizado, y en particular con las influencias negativas que posibles eventos globales de liberación de calcio intracelular, detectados en algunas de las imágenes, pueden tener en el
10 resultado final de dicho análisis, pudiendo llegar a distorsionar tanto los resultados obtenidos que provoquen que éstos no puedan considerarse como válidos. En particular dichos eventos globales de liberación de calcio intracelular distorsionarían el histograma de intensidades calculado hasta, posiblemente, llegar a invalidarlo.

15 Explicación de la invención

Obtener una detección de eventos locales de liberación de calcio intracelular, en particular de espículas de calcio, que pueda considerarse fiable mediante un método suficientemente robusto, es algo de gran importancia, sobre todo en lo referente a la detección de dichos eventos en células cardíacas, o cardiomiocitos, teniendo en cuenta
20 los últimos hallazgos que relacionan dichas espículas con patologías cardíacas.

Recientemente las arritmias auriculares y ventriculares se han asociado a alteraciones en la entrada de calcio a través de los canales de calcio, así como a la regulación del calcio intracelular producido por una hiperactividad del canal de calcio del retículo sarcoplasmático (también denominado receptor de rianodina o RYR2). Esta
25 hiperactividad produce liberación espontánea de calcio del retículo sarcoplasmático. El exceso de calcio producido por dicha liberación espontánea se expulsa del citosol por el intercambiador Na-Ca (tres Na⁺ por un Ca²⁺), generándose así una despolarización anormal de la membrana, lo cual es una de las causas de la inducción y perpetuación de arritmias, ya que despolarizaciones anormales inducen arritmia por actividad
30 repetitiva.

Actualmente, la liberación local de calcio denominada espícula de calcio, o "calcium spark", se considera el evento fundamental en la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático. Se ha demostrado en cardiomiocitos de mamíferos que durante el potencial de acción se activan de manera sincronizada alrededor de diez mil
35 espículas de calcio dando lugar a un transitorio de calcio ("calcium transient") y a una contracción normal. En situaciones patológicas, varias espículas de calcio pueden

coincidir espacial y temporalmente durante la diástole, dando lugar a un aumento local del calcio intracelular suficientemente grande para desencadenar una liberación regenerativa de calcio del retículo sarcoplasmático que se extienda a través de la célula.

5 Por todo ello, y dado que las propuestas convencionales no ofrecen suficientes garantías en cuanto a la validez de los resultados que ofrecen, aparece necesario ofrecer una alternativa al estado de la técnica que, de igual manera que en el artículo de M. A. Bray *et al.*, plantee la aplicación de técnicas estadísticas sobre una secuencia de imágenes bidimensionales correspondientes a una sección de una o más células,
10 para detectar eventos locales de liberación de calcio intracelular, pero que supere los inconvenientes hallados en dicha propuesta, proporcionando un método mucho más robusto, automático y que ofrezca unos resultados completamente fiables, que no requieran de una posterior intervención humana.

Para ello, la presente invención concierne a un método de detección de eventos
15 locales de liberación de calcio intracelular, que comprende realizar las siguientes etapas:

- adquirir una secuencia de imágenes bidimensionales correspondientes a al menos parte de una sección determinada (en general de toda la sección) de como mínimo una célula, incluyendo información relativa a actividad de calcio intracelular;
- 20 - normalizar dichas imágenes; y
- realizar un análisis estadístico de la distribución espacio-temporal de cada uno de los píxeles en dicha secuencia de imágenes normalizadas, para determinar una serie de regiones de interés en dichas imágenes normalizadas, cada una de ellas común para toda la sucesión de imágenes, y determinar que dichas regiones de interés
25 son candidatas a contener un evento local de liberación de calcio intracelular de interés.

A diferencia de la propuesta de M. A. Bray *et al.*, el método propuesto por la presente invención comprende, de manera previa a dicho análisis estadístico, realizar las siguientes etapas, de manera automática:

- detectar eventos globales de liberación de calcio en como mínimo una de las
30 imágenes de dicha sucesión de imágenes; y
- realizar dicho análisis estadístico solamente sobre las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio.

Por lo que respecta al tipo de análisis estadístico a realizar, para un ejemplo de realización éste es de tipo iterativo.

35 Por lo que se refiere al tipo de imágenes bidimensionales adquiridas, para un ejemplo de realización, éstas son unas imágenes de fluorescencia, aunque otra clase

de imágenes, tales como imágenes de otro tipo de luminancia, también pueden utilizarse para aplicar el método propuesto por la presente invención

En función del ejemplo de realización el método comprende utilizar un sistema con una o más cámaras CCD para realizar dicha adquisición de imágenes bidimensionales, o un sistema de microscopía confocal 2D.

En general los anteriormente denominados como eventos globales de liberación de calcio son liberaciones regenerativas globales de calcio del retículo sarcoplasmático de dicha célula, que se propagan en forma de ondas globales.

La influencia distorsionadora que dichos eventos globales tienen en el resto de información de eventos de calcio existente en una imagen que se produce simultáneamente a uno de dichos eventos globales, es tan grande como para camuflar completamente a dicha información de eventos de calcio. Es por ello que dichas imágenes con eventos globales son descartadas a la hora de realizar el análisis estadístico que resulte en la detección de uno o más eventos locales de liberación de calcio.

Para un ejemplo de realización el método comprende realizar la mencionada etapa de detección de eventos globales de liberación de calcio, también de manera previa a dicha etapa de normalización, y comprende asimismo llevar a cabo la etapa de normalización solamente sobre las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio.

Para otro ejemplo de realización los eventos locales de liberación de calcio intracelular a detectar mediante el método propuesto por la presente invención son liberaciones regenerativas locales de calcio del retículo sarcoplasmático de dicha célula, que se propagan en forma de mini ondas.

Para un ejemplo de realización preferido los eventos locales de liberación de calcio intracelular a detectar mediante el método propuesto por la presente invención son espículas de calcio.

Para dicho caso preferido referente a la detección de espículas de calcio, y con el fin de mejorar los resultados en cuanto a dicha detección, el método comprende, para un ejemplo de realización, descartar no solamente las imágenes que contienen eventos globales de liberación de calcio, sino también las que contienen liberaciones regenerativas locales de calcio del retículo sarcoplasmático de como mínimo dicha célula, de las que se propagan en forma de mini ondas, es decir que el método comprende detectar mini ondas en al menos una de las imágenes de dicha sucesión de imágenes y realizar la etapa o etapas llevadas a cabo solamente sobre las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio, para llevarlas a

cabo solamente sobre las imágenes en las cuales tampoco se han detectado mini ondas.

En general dicha detección de ondas globales y de mini ondas se lleva a cabo de manera simultánea, a partir de la evolución de la luminancia o fluorescencia total de las imágenes. La detección se realiza aplicando diferentes umbrales de amplitud para 5 detectar las ondas globales y las mini ondas, utilizándose un umbral más alto para la detección de las ondas globales que para las mini ondas, siendo detectadas las ondas globales al superar su amplitud dicho umbral más alto, y siendo detectadas la mini ondas cuando su amplitud está por debajo de dicho umbral más alto pero por encima 10 de un umbral mínimo.

En cuanto al tipo de células sobre las que es posible aplicar el método propuesto por la invención, éstas pueden ser miocitos, en particular cardiomicocitos, o neuronas, en función del ejemplo de realización.

Para un ejemplo de realización del método propuesto por la presente invención, 15 éste comprende realizar la etapa de adquisición de imágenes para adquirir una pluralidad de secuencias de unas imágenes bidimensionales correspondientes a unas secciones determinadas de una pluralidad de células, y realizar por tanto la normalización y el análisis estadístico descritos anteriormente sobre dicha pluralidad de secuencias de imágenes, descartando las que contienen ondas globales.

20 La etapa de adquisición de imágenes del método propuesto por la presente invención es llevada a cabo, según el ejemplo de realización:

- cuando la célula o células están en reposo, con ausencia de estímulos externos,
- cuando la célula o células están siendo, o han sido, sometidas a un estímulo 25 eléctrico externo mediante una señal alterna, o
- cuando la célula o células están en reposo, con ausencia de estímulos externos, y cuando están siendo sometidas a un estímulo eléctrico externo mediante una señal alterna, para adquirir una secuencia de imágenes que incluyen información relativa a actividad de calcio cuando la célula o células no están siendo estimuladas y 30 cuando sí lo están siendo.

Les técnicas de estimulación eléctrica de la célula o células son las conocidas como "técnicas de fijación de membrana" (en inglés "patch-clamp").

Para una variante de los ejemplos de realización que comprenden aplicar una señal de estímulo alterna, el método comprende variar la frecuencia de dicha señal de 35 estímulo alterna durante la etapa de adquisición de imágenes, con el fin de analizar la respuesta de la célula o células frente a dicha señal de frecuencia variable.

Una posible prueba a la que someter a una o más células mediante la variación de frecuencia referida, es la de aplicar la señal de estímulo con una frecuencia inicial hasta detectar que la respuesta de la célula o células, en cuanto a eventos locales de liberación de calcio provocados, demuestre que estos eventos detectados siguen la frecuencia de estimulación, y entonces aumentar la frecuencia de estimulación progresivamente, con el fin de detectar a qué frecuencia la respuesta detectada se desincroniza en relación a la señal de estímulo, es decir cuando la célula o células ya no son capaces de seguir a la señal de estímulo.

En particular, y volviendo a hacer referencia a dicho ejemplo de realización para el cual el método está aplicado a la detección de eventos locales de liberación de calcio intracelular en una pluralidad de células, analizando una pluralidad de secuencias de imágenes correspondientes a unas secciones determinadas de dichas células, el método comprende, en un caso, aplicar dicha adquisición de imágenes y posterior análisis, a un grupo o red de células, y evaluar la transmisión de eventos locales de calcio intracelular de una célula a otra, ya sea de manera espontánea, en ausencia de estímulos externos, o inducidos por un estímulo externo. Se consigue así estudiar el comportamiento de un grupo de células en cultivo, o de una red neuronal, en especial el comportamiento en cuanto a capacidades de transmisión de las mismas, y del grupo o red en su totalidad.

Una aplicación interesante de dicho caso es la consistente en inducir un estímulo eléctrico en un punto de una red neuronal y observar cómo y por donde se transmite, mediante la detección de los eventos de liberación de calcio inducidos, con el fin, por ejemplo, de detectar posibles anomalías en alguna de las neuronas o en alguna de sus respectivas interconexiones.

25

Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras ventajas y características se comprenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de unos ejemplos de realización con referencia a los dibujos adjuntos, que deben tomarse a título ilustrativo y no limitativo, en los que:

30

la Fig. 1 muestra, en asociación con una secuencia de imágenes de una sección de una célula, en particular un cardiomiocito, un diagrama de flujo que incluye las diferentes etapas del método propuesto por la presente invención para un ejemplo de realización;

35

la Fig. 2 ilustra, en su vista superior, a una imagen de la secuencia de imágenes de la sección de un cardiomiocito, con una serie de regiones de interés indicadas en la

imagen y determinadas mediante el método propuesto por la invención, y, en su vista inferior, muestra una gráfica relativa a la evolución temporal de la fluorescencia promedio en cada una de las regiones de interés indicadas, que incluye una serie de espículas de calcio detectadas mediante el método propuesto; y

5 la Fig. 3 muestra, en su vista superior, a la imagen de la Fig. 2 pero incluyendo únicamente una región agregada, de dichas regiones de interés, dividida en dos sub-áreas adyacentes, cuya información relativa a la evolución temporal de su fluorescencia promedio se ilustra en la gráfica de la vista inferior, para cada una de las dos sub-áreas.

10 Descripción detallada de unos ejemplos de realización

En la Fig. 1 se expone un diagrama de flujo que representa las etapas básicas del método propuesto para un ejemplo de realización aplicado a la detección de espículas de calcio.

15 Debe indicarse que es necesario conocer el intervalo de tiempo con el que son capturadas las imágenes de la secuencia, así como la correspondencia entre tamaño de la imagen en píxeles y tamaño real del sistema (célula o células) en micras, para poder llevar a cabo algunas de las etapas del método propuesto, por ejemplo a la hora de determinar el tamaño de las áreas de interés, el cual, tal y como se describirá posteriormente, es determinante a la hora de clasificar debidamente a las mismas.

20 El método propuesto comprende una etapa no preferida ni esencial, que puede llevarse a cabo cuando se considere necesario, en función del tipo de imágenes adquiridas, consistente en una conversión de las imágenes adquiridas, si éstas lo han sido en color, o RGB, a escala de grises, la cual se lleva a cabo mediante la eliminación del tono (hue) y la saturación manteniendo la luminancia. Cada píxel RGB se convierte
25 a un valor de escala de grises (P_gris) mediante una ecuación que estima su luminancia, ponderando cada uno de sus colores fundamentales (Rojo:R, Azul:B y Verde:G), por ejemplo tal y como se indica a continuación:

$$P_gris = 0.2989 * R + 0.5870 * G + 0.1140 * B.$$

30 Para llevar a cabo dicha etapa de normalización, no solamente para la detección de espículas de calcio, sino en general para la detección de cualquier evento local de liberación de calcio intracelular, el método comprende, una vez descartadas las imágenes que contienen como mínimo eventos globales de liberación de calcio (según la Fig. 1 una vez se han descartado también las imágenes con mini ondas), calcular un índice de luminancia o fluorescencia base (Fb), a utilizar en dicha etapa de
35 normalización, solamente con la información de las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio.

Tras ello, el método comprende calcular la luminancia o fluorescencia media de cada píxel con las imágenes que no contienen eventos globales de liberación de calcio, y asignar el valor de dicha luminancia o fluorescencia media de cada píxel a un correspondiente índice de luminancia o fluorescencia base (Fb). Se obtiene así una
5 determinación de la actividad basal individualizada para cada píxel.

Finalmente, dicha etapa de normalización comprende normalizar cada píxel de dichas imágenes que no contienen eventos globales de liberación de calcio (mostradas en la Fig. 1 para un ejemplo de realización), utilizando su respectivo índice de luminancia o fluorescencia base (Fb) calculado. Es decir que cada imagen se normaliza
10 píxel a píxel utilizando la fluorescencia base (Fb) del propio píxel. De esta forma se eliminan las heterogeneidades estacionarias de las imágenes asociadas a diferentes concentraciones de reactivo o a zonas de mejor enfoque en el plano confocal, cuando las imágenes han sido adquiridas mediante un microscopio confocal. El resultado final es una película donde la luminancia de cada píxel ha sido normalizada de forma
15 temporalmente global sin tener en cuenta las diferentes correlaciones espaciales dentro de una imagen.

Por lo que se refiere a la determinación de las regiones de interés de la secuencia de imágenes que excluyen a las que incluyen ondas globales, el método comprende llevarla a cabo mediante la realización de las etapas que se describen en
20 los siguientes párrafos:

En primer lugar, el método comprende detectar los píxeles cuya luminancia o fluorescencia ha tomado valores extremos en al menos una de las imágenes normalizadas y etiquetarlos como píxeles atípicos y, opcionalmente, almacenarlos para cada una de las imágenes normalizadas de la secuencia.

25 Tras haber detectado los píxeles atípicos, el método comprende calcular un histograma acumulado de la luminancia o fluorescencia en los píxeles atípicos, que en función del ejemplo de realización se lleva a cabo:

- contabilizando, de manera acumulativa en el tiempo, el número de veces que cada uno de dichos píxeles atípicos ha tomado un valor extremo; o
- 30 - realizando la suma de los valores que han tomado los píxeles atípicos.

Para un ejemplo de realización, el método comprende agrupar los valores de dicho histograma mediante una matriz.

Para el cálculo de dicho histograma acumulado, el método comprende, para un ejemplo de realización, ponderar dichos píxeles atípicos, y tener en cuenta el valor
35 ponderado para llevar a cabo dicha selección y posterior etiquetado como píxeles de interés.

Dicha ponderación se lleva a cabo, para el caso referente a dicha suma, asignando diferentes pesos a cada píxel atípico y realizando por tanto una suma ponderada de sus valores, o, para el caso de que el histograma se calcule contabilizando el número de veces que cada uno de los píxeles atípicos ha tomado un valor extremo, asignando también diferentes pesos a cada píxel atípico y aplicando un factor corrector que tenga en cuenta el peso de cada píxel a la hora de contabilizar las veces que han tomado un valor extremo.

Después de haber obtenido dicho histograma acumulado, el método comprende realizar una normalización del mismo, en particular el método comprende normalizar dichos números de veces en que dichos píxeles atípicos han tomado valores extremos, de luminancia o fluorescencia, o los resultados de dicha suma, por píxel, en relación al número de veces promedio en el que los píxeles toman valores extremos en dicha secuencia de imágenes normalizadas y al número de imágenes normalizadas.

Dicha normalización, cuando se aplica a dicha matriz-histograma, resulta en la obtención de una segunda matriz, que en este caso especifica el porcentaje de veces que un píxel ha tomado valores extremos (píxel atípico) en la secuencia completa de imágenes normalizadas. Cada elemento de la matriz está asociado a un píxel y es una especie de puntuación promediada de cuan probable es que dicho píxel sea relevante en el momento de analizar su actividad. A mayor valor, más veces ha sido un píxel atípico, y por tanto más probabilidades hay de que forme parte de una región donde se producen espículas.

Una vez se ha realizado dicha normalización del histograma acumulado, el método comprende seleccionar, de entre dichos píxeles atípicos con valores extremos, los que han tomado dichos valores extremos un número de veces, normalizado, por encima de un umbral predeterminado, o los que, en dicha suma, han obtenido un resultado, normalizado, por encima de un umbral determinado, y etiquetarlos como píxeles de interés.

Para el ejemplo de realización para el que se ha obtenido la segunda matriz mencionada, resultado de normalizar la matriz-histograma, el método comprende llevar a cabo dicha selección de píxeles de interés, definiendo un porcentaje umbral, para dicha segunda matriz, a partir del cual se determinará que un píxel ha superado el valor extremo un número suficiente de veces en la imagen como para ser considerado un "píxel de interés". Al aplicar el umbral a la segunda matriz se obtiene una matriz (imagen) binaria Z de los píxeles de interés. Este parámetro umbral es clave en la parte final del proceso ya que establece el nivel de restricción que se obtiene en la detección de regiones de interés. Un umbral muy alto investiga solo las regiones de interés más

claras. Un umbral muy bajo considera gran parte de la célula como activa. Los valores de umbral implementados están diseñados para que la selección de regiones de interés funcione de forma óptima y que, en cualquier caso, pequen por permisivos y no por restrictivos, a la hora de seleccionar regiones de interés.

5 Tras haber seleccionado los píxeles atípicos etiquetados como píxeles de interés, el método comprende definir una o más regiones de interés uniendo como mínimo parte de los píxeles que superan dicho umbral predeterminado o porcentaje umbral.

10 En general, el método comprende definir varias de dichas regiones de interés uniendo los píxeles que superan dicho umbral predeterminado o porcentaje umbral, es decir los píxeles de interés, según una técnica estándar de conectividad de píxeles consistente en agrupar los píxeles que están en contacto a través de sus lados o de sus esquinas.

15 Por lo que se refiere a dichos valores extremos de luminancia o fluorescencia, cuyo valor toman los píxeles atípicos, el método comprende definir dichos valores extremos como aquellos que se encuentran por encima de una media calculada, de los valores de luminancia o fluorescencia de sus píxeles, en más de un número predeterminado de veces multiplicado por una desviación típica calculada, también relativa a los valores de luminancia o fluorescencia de sus píxeles. Se utiliza así por
20 primera vez, según las etapas del método propuesto, la información espacial al comparar cada píxel con todos los demás píxeles de la misma imagen.

 El método comprende realizar el cálculo de dicha media y desviación típica para cada una de las imágenes normalizadas, en general tras un filtrado de las mismas.

25 Para un ejemplo de realización el método comprende llevar a cabo dicho filtrado mediante la aplicación de un filtro de mediana 2D a cada una de las imágenes normalizadas.

30 En cuanto a dicho número predeterminado de veces la desviación típica que la luminancia o fluorescencia de un píxel debe superar la media calculada para ser un píxel atípico, los presentes inventores han optimizado un valor igual a seis para una serie de experimentos en concreto, aunque también han constatado que un valor entre
 cuatro y ocho ofrece unos resultados igual de válidos.

35 Debe resaltarse que el valor de dicho número predeterminado no es ajustable de forma arbitraria por el usuario, es decir que no constituye un parámetro supervisado, ya que, por ejemplo, existe una definición estadística de "valor extremo" como aquel que está seis veces la desviación típica por encima de la media.

En cualquier caso, la elección de dicho "valor extremo" no está limitada a dicha definición estadística, y el método comprende utilizar otras definiciones también válidas de valor extremo, como por ejemplo aquel que supere tres veces el intervalo intercuartil (IQR = $x_{75\%} - x_{25\%}$, diferencia entre el Tercer Cuartil superior y el Primer Cuartil, siendo el segundo cuartil $x_{50\%}$ la mediana).

Particularizando ahora la aplicación del método propuesto por la invención al caso de la detección de espículas, el método comprende llevarla a cabo mediante la clasificación de las regiones de interés en dos tipos, en función de su tamaño:

- un primer tipo o grupo de regiones estándar, que incluye todas aquellas regiones de interés que tienen un tamaño similar o menor que el tamaño característico del soporte espacial donde se produce una espícula de calcio; y

- un segundo tipo o grupo de regiones agregadas, que incluye todas aquellas regiones de interés cuyo tamaño es mayor que el tamaño característico del soporte espacial donde se produce una espícula de calcio.

En la Fig. 2 se ilustran tres regiones de interés delimitadas por tres respectivos rectángulos, indicados con las referencias numéricas 1 a 3, dibujados sobre una imagen de la secuencia de imágenes de la sección de un cardiomiocito, y que incluyen tanto regiones estándar como regiones agregadas.

Para el ejemplo de realización ilustrado por dicha Fig. 2, para determinar el tamaño de cada región de interés, indicadas como ROI (del inglés "Region Of Interest"), se ha circunscrito un círculo en el rectángulo que delimita cada ROI, y que se encuentra definido por la dimensión máxima en cada una de las dos direcciones. Dicho círculo tiene el radio definido por la distancia máxima entre el centroide de la ROI y el píxel más alejado de dicho centroide.

En la gráfica de la vista inferior de la Fig. 2, se ilustra la evolución temporal de la fluorescencia promedio en cada una de las tres ROIs incluidas en la vista superior.

Una vez las regiones de interés han sido debidamente agrupadas, el método comprende realizar las siguientes etapas para cada una de dichas regiones estándar:

- determinar la actividad promedio de la luminancia o fluorescencia en la región estándar, mediante el cálculo de la luminancia o fluorescencia en cada uno de los píxeles que forman parte de la región estándar y el cálculo de su promedio espacial a cada instante de tiempo;

- aplicar un método de detección por ondículas para detectar posibles espículas de calcio, localizando la posible actividad de las mismas en dicha área estándar, teniendo en cuenta que las espículas de calcio tienen una duración característica de entre 40 y 150 ms; y

- rechazar dicha región estándar si su tamaño es inferior a un tamaño mínimo predeterminado o si no se ha detectado ninguna espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas; o

5 - establecer que dicha región estándar es una región definitiva de interés si su tamaño es superior a dicho tamaño mínimo predeterminado y si se ha detectado al menos una espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas.

10 Las ROIs 2 y 3 ilustradas en la Fig. 2 son dos regiones estándar consideradas como regiones definitivas de interés, al tener un tamaño superior a un tamaño mínimo predeterminado y al haberse detectado una o más espículas de calcio en su interior, en concreto una espícula en la ROI 3 y diez espículas en la ROI 2, las cuales se encuentran ubicadas en el interior de los círculos allí ilustrados.

15 Para el experimento cuyos resultados se hallan expuestos en la Fig. 2 el tamaño mínimo predeterminado es de 6x6 píxeles, que corresponde a unas 2x2 micras (de hecho el tamaño de píxel utilizado en el experimento es de 0,282 micras).

20 El método comprende la realización de análisis posteriores, automáticos o mediante intervención humana, sobre cada región estándar rechazada en la cual no se haya detectado al menos una espícula de calcio pero que tiene un tamaño superior a dicho tamaño mínimo predeterminado pero similar o menor que el tamaño característico del soporte espacial donde se produce una espícula de calcio. Dichos análisis posteriores se realizan con el fin de verificar si dicha falta de detección ha sido correcta.

25 En la Fig. 2 también se ilustra una ROI que supera el tamaño característico del soporte espacial donde se produce una espícula de calcio, es decir una ROI agregada, en concreto la ROI 1, cuyo tratamiento se describe seguidamente. Puede observarse en la gráfica que muestra la evolución temporal de la fluorescencia promedio, que la curva correspondiente a dicha ROI 1 agregada incluye seis posibles espículas de calcio, señaladas por seis correspondientes círculos.

Por lo que se refiere a dichas regiones agregadas, el método comprende realizar las siguientes etapas para cada una de las mismas:

30 - subdividir cada región agregada en sub-áreas adyacentes de un mismo, o sustancialmente un mismo, tamaño;

35 - determinar, para cada una de dichas sub-áreas agregadas la actividad promedio de la luminancia o fluorescencia en su interior, mediante el cálculo de la luminancia o fluorescencia en cada uno de los píxeles que forman parte de cada sub-área y el cálculo de su promedio espacial a cada instante de tiempo;

- aplicar un método de detección por ondículas (con los mismos parámetros que el aplicado sobre las ROIs estándar), para detectar posibles espículas de calcio, localizando la posible actividad de las mismas en cada una de dichas sub-áreas agregadas; y

- 5 - establecer que cada sub-área agregada en la que se ha detectado al menos una espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas, es una región definitiva de interés.

En la Fig. 3 se ilustra, en su vista superior, sobre la misma imagen de la sección de un cardiomiocito ilustrada en la Fig. 2, la ROI agregada 1 dividida en dos sub-áreas, indicadas como SUBROIS 1 y 2. En la gráfica de la vista inferior de la Fig. 3 se ilustra la evolución temporal de la fluorescencia promedio en cada una de las dos sub-áreas, o SUBROI 1 y SUBROI 2 incluidas en la vista superior.

Puede apreciarse cómo las dos sub-áreas, SUBROI 1 y SUBROI 2, presentan una actividad de calcio muy diferente, incluyendo la SUBROI 2 una gran cantidad de espículas de calcio, en concreto siete, mientras que en la SUBROI 1 solamente existen dos. Además la primera de estas dos espículas de la SUBROI 1 no coincide en el tiempo con ninguna de la SUBROI 2, lo que indica que las sub-áreas tienen actividades independientes.

De igual manera que para las regiones estándar, el método comprende la realización de análisis posteriores, automáticos o mediante intervención humana, con la información de cada sub-área agregada en la que no se haya detectado ninguna espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas, con el fin de detectar características propias de posibles espículas de calcio localizadas en las cercanías de dicha sub-área agregada. Debido a que estas sub-áreas provienen de una región de interés grande, es habitual que presenten actividad debida a su cercanía a una zona de la célula donde se producen espículas. Dicha actividad no es detectada por el procedimiento por ondículas pero puede ser de interés para el investigador, dándole una idea del soporte espacial de las espículas o de su posible direccionalidad.

Con el fin de posibilitar los mencionados y otros análisis posteriores, automáticos o mediante intervención humana, el método propuesto por la presente invención comprende la presentación de la información recopilada durante la aplicación de sus etapas y como resultado de las mismas, relativa a la actividad de liberación de calcio intracelular. En particular el método comprende recopilar y presentar la siguiente información a un usuario:

1. Fluorescencia promedio en cada imagen de la secuencia, indicando:

- i. Localización temporal de las ondas globales, indicando qué imágenes de la secuencia quedan afectadas por dicha actividad global.
 - ii. Localización de las mini-ondas.
- 5 2. Fluorescencia base de cada píxel de la secuencia, F_b .
3. Regiones de Interés: Listado de los píxeles que pertenecen a cada región de interés.
4. Actividad media en cada región de interés, presentada en término de F/F_0 , donde F_0 es la fluorescencia media de la célula calculada durante un período de inactividad.
- 10 5. Localización de las espículas de calcio detectadas en cada región de interés.
6. Actividad media en regiones de interés de tamaño característico similar a una espícula de calcio y sub-ROIs donde la actividad correspondiente a una espícula de calcio no ha sido detectada para proceder a supervisión humana del resultado o a análisis automáticos adicionales.
- 15 7. Resumen de actividad observada en la secuencia de imágenes:
 - i. Número total de ondas globales.
 - ii. Número total de mini-ondas.
 - iii. Número total de espículas de calcio.

20

Un experto en la materia podría introducir cambios y modificaciones en los ejemplos de realización descritos sin salirse del alcance de la invención según está definido en las reivindicaciones adjuntas.

25

Reivindicaciones

- 1.- Método de detección de eventos locales de liberación de calcio intracelular, del tipo que comprende realizar las siguientes etapas:
- 5 - adquirir una secuencia de imágenes bidimensionales correspondientes a al menos parte de una sección determinada de al menos una célula, incluyendo información relativa a actividad de calcio intracelular;
- normalizar dichas imágenes; y
- realizar un análisis estadístico de la distribución espacio-temporal de píxeles en
- 10 dicha secuencia de imágenes normalizadas, para determinar una serie de regiones de interés en dichas imágenes normalizadas, cada una de ellas común para toda la sucesión de imágenes, y determinar que dichas regiones de interés son candidatas a contener un evento local de liberación de calcio intracelular de interés;
- estando dicho método **caracterizado** porque comprende, de manera previa a al menos dicho análisis estadístico, realizar las siguientes etapas, de manera automática:
- 15 - detectar eventos globales de liberación de calcio en al menos una de las imágenes de dicha sucesión de imágenes; y
- realizar dicho análisis estadístico solamente sobre las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio.
- 20 2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas imágenes bidimensionales adquiridas son unas imágenes de fluorescencia obtenidas mediante técnicas de microscopía confocal.
- 3.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dichos eventos globales de liberación de calcio son liberaciones regenerativas globales de calcio del
- 25 retículo sarcoplasmático de dicha célula, que es al menos una, que se propagan en forma de ondas globales.
- 4.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque comprende realizar dicha etapa de detección de eventos globales de liberación de calcio también de manera previa a dicha etapa de normalización, y porque comprende llevar a cabo
- 30 dicha etapa de normalización solamente sobre las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio.
- 5.- Método según la reivindicación 4, caracterizado porque comprende calcular al menos un índice de luminancia o fluorescencia base, a utilizar en dicha etapa de normalización, solamente con la información de las imágenes en las cuales no se han
- 35 detectado eventos globales de liberación de calcio.

6.- Método según la reivindicación 5, caracterizado porque comprende calcular la luminancia o fluorescencia media de cada píxel con las imágenes que no contienen eventos globales de liberación de calcio, y asignar el valor de dicha luminancia o fluorescencia media de cada píxel a un correspondiente índice de luminancia o fluorescencia base.

7.- Método según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha etapa de normalización comprende normalizar cada píxel de dichas imágenes que no contienen eventos globales de liberación de calcio, utilizando su respectivo índice de luminancia o fluorescencia base calculado.

8.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizado porque comprende llevar a cabo dicha determinación de dichas regiones de interés mediante la realización de las siguientes etapas:

- detectar los píxeles cuya luminancia o fluorescencia ha tomado valores extremos en al menos una de las imágenes normalizadas, etiquetarlos como píxeles atípicos y contabilizar, de manera acumulativa en el tiempo, el número de veces que cada uno de dichos píxeles atípicos ha tomado un valor extremo o realizar la suma de los valores que han tomado los píxeles atípicos;

- normalizar dichos números de veces en que dichos píxeles atípicos han tomado valores extremos, de luminancia o fluorescencia, o los resultados de dicha suma, por píxel, en relación al número de veces promedio en el que los píxeles toman valores extremos en dicha secuencia de imágenes normalizadas y al número de imágenes normalizadas;

- seleccionar, de entre dichos píxeles atípicos con valores extremos, los que han tomado dichos valores extremos un número de veces, normalizado, por encima de un umbral predeterminado, o los que, en dicha suma, han obtenido un resultado, normalizado, por encima de un umbral determinado, y etiquetarlos como píxeles de interés; y

- definir al menos una de dichas regiones de interés uniendo al menos parte de los píxeles que superan dicho umbral predeterminado.

9.- Método según la reivindicación 8, caracterizado porque comprende definir varias de dichas regiones de interés uniendo los píxeles que superan dicho umbral predeterminado según una técnica estándar de conectividad de píxeles consistente en agrupar los píxeles que están en contacto a través de sus lados o de sus esquinas.

10.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, caracterizado porque comprende llevar a cabo dicha determinación de dichas regiones de interés mediante la realización de la siguiente etapa:

- calcular, para cada una de las imágenes normalizadas, la media y la desviación típica de los valores de luminancia o fluorescencia de sus píxeles.

5 11.- Método según la reivindicación 10, caracterizado porque comprende llevar a cabo dicha determinación de dichas regiones de interés mediante la realización de la siguiente etapa:

- aplicar un filtro de mediana 2D a cada una de las imágenes normalizadas; y porque comprende llevar a cabo dicha etapa de cálculo de la media y la desviación típica para cada una de las imágenes normalizadas, una vez filtradas.

10 12.- Método según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque comprende definir dichos valores extremos de luminancia o fluorescencia como aquellos que se encuentran por encima de dicha media calculada en más de un número predeterminado de veces multiplicado por dicha desviación típica calculada.

15 13.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dichos eventos locales de liberación de calcio intracelular a detectar son espículas de calcio.

14.- Método según la reivindicación 13, caracterizado porque comprende llevar a cabo dicha detección de espículas de calcio mediante la clasificación de dichas regiones de interés en dos tipos en función de su tamaño:

20 - un primer tipo o grupo de regiones estándar, que incluye todas aquellas regiones de interés que tienen un tamaño similar o menor que el tamaño característico del soporte espacial donde se produce una espícula de calcio; y

- un segundo tipo o grupo de regiones agregadas, que incluye todas aquellas regiones de interés cuyo tamaño es mayor que el tamaño característico del soporte espacial donde se produce una espícula de calcio.

25 15.- Método según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende realizar las siguientes etapas para cada una de dichas regiones estándar:

30 - determinar la actividad promedio de la luminancia o fluorescencia en la región estándar, mediante el cálculo de la luminancia o fluorescencia en cada uno de los píxeles que forman parte de la región estándar y el cálculo de su promedio espacial a cada instante de tiempo;

- aplicar un método de detección por ondículas para detectar posibles espículas de calcio, localizando la posible actividad de las mismas en dicha área estándar; y

35 - rechazar dicha región estándar si su tamaño es inferior a un tamaño mínimo predeterminado o si no se ha detectado ninguna espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas; o

- establecer que dicha región estándar es una región definitiva de interés si su tamaño es superior a dicho tamaño mínimo predeterminado y si se ha detectado al menos una espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas.

5 16.- Método según la reivindicación 15, caracterizado porque comprende la realización de análisis posteriores, automáticos o mediante intervención humana, sobre dicha región estándar rechazada, si en la misma no se ha detectado al menos una espícula de calcio; con el fin de verificar si dicha falta de detección ha sido correcta.

10 17.- Método según la reivindicación 14 ó 15, caracterizado porque comprende realizar las siguientes etapas para cada una de dichas regiones agregadas:

- subdividir dicha región agregada en sub-áreas adyacentes de un mismo, o sustancialmente un mismo, tamaño;

15 - determinar, para cada una de dichas sub-áreas agregadas la actividad promedio de la luminancia o fluorescencia en su interior, mediante el cálculo de la luminancia o fluorescencia en cada uno de los píxeles que forman parte de cada sub-área y el cálculo de su promedio espacial a cada instante de tiempo;

- aplicar un método de detección por ondículas para detectar posibles espículas de calcio, localizando la posible actividad de las mismas en cada una de dichas sub-áreas agregadas; y

20 - establecer que cada sub-área agregada en la que se ha detectado al menos una espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas, es una región definitiva de interés.

25 18.- Método según la reivindicación 17, caracterizado porque comprende la realización de análisis posteriores, automáticos o mediante intervención humana, con la información de cada sub-área agregada en la que no se haya detectado ninguna espícula de calcio en su interior como resultado de la aplicación de dicho método por ondículas, con el fin de detectar características propias de posibles espículas de calcio localizadas en las cercanías de dicha sub-área agregada.

30 19.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque dichos eventos locales de liberación de calcio intracelular a detectar son liberaciones regenerativas locales de calcio del retículo sarcoplasmático de dicha célula, que es al menos una, que se propagan en forma de mini ondas.

35 20.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende detectar liberaciones regenerativas locales de calcio del retículo sarcoplasmático de dicha célula, que es al menos una, que se propagan en forma de mini ondas, en al menos una de las imágenes de dicha sucesión de imágenes; y

realizar dicha o dichas etapas llevadas a cabo solamente sobre las imágenes en las cuales no se han detectado eventos globales de liberación de calcio, para llevarlas a cabo solamente sobre las imágenes en las cuales tampoco se han detectado mini ondas.

5 21.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho análisis estadístico es de tipo iterativo.

 22.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque comprende utilizar un sistema de microscopía confocal para realizar dicha adquisición de imágenes bidimensionales.

10 23.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque comprende utilizar un sistema con al menos una cámara CCD para realizar dicha adquisición de imágenes bidimensionales.

 24.- Método según la reivindicación 8, caracterizado porque comprende ponderar dichos píxeles atípicos, y tener en cuenta el valor ponderado para llevar a cabo dicha selección y posterior etiquetado como píxeles de interés.

15 25.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende realizar dicha etapa de adquisición de imágenes para adquirir una pluralidad de secuencias de unas imágenes bidimensionales correspondientes a unas secciones determinadas de una pluralidad de células.

20 26.- Método según la reivindicación 1 ó 25, caracterizado porque comprende realizar dicha etapa de adquisición de imágenes cuando dicha o dichas células están en reposo, con ausencia de estímulos externos.

 27.- Método según la reivindicación 1 ó 25, caracterizado porque comprende realizar dicha etapa de adquisición de imágenes cuando dicha o dichas células están siendo, o han sido, sometidas a un estímulo eléctrico externo mediante una señal alterna.

25 28.- Método según la reivindicación 27, caracterizado porque comprende variar la frecuencia de dicha señal de estímulo alterna durante dicha etapa de adquisición de imágenes.

30 29.- Método según la reivindicación 1 ó 25, caracterizado porque comprende realizar dicha etapa de adquisición de dicha secuencia de imágenes cuando dicha o dichas células están en reposo, con ausencia de estímulos externos, y cuando están siendo sometidas a un estímulo eléctrico externo mediante una señal alterna, para adquirir una secuencia de imágenes que incluyen información relativa a actividad de calcio cuando al menos dicha célula no está siendo estimulada y cuando sí lo está
35 siendo.

30.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha o dichas células son al menos una del grupo que comprende los siguientes tipos de células: miocitos, cardiomiocitos y neuronas.

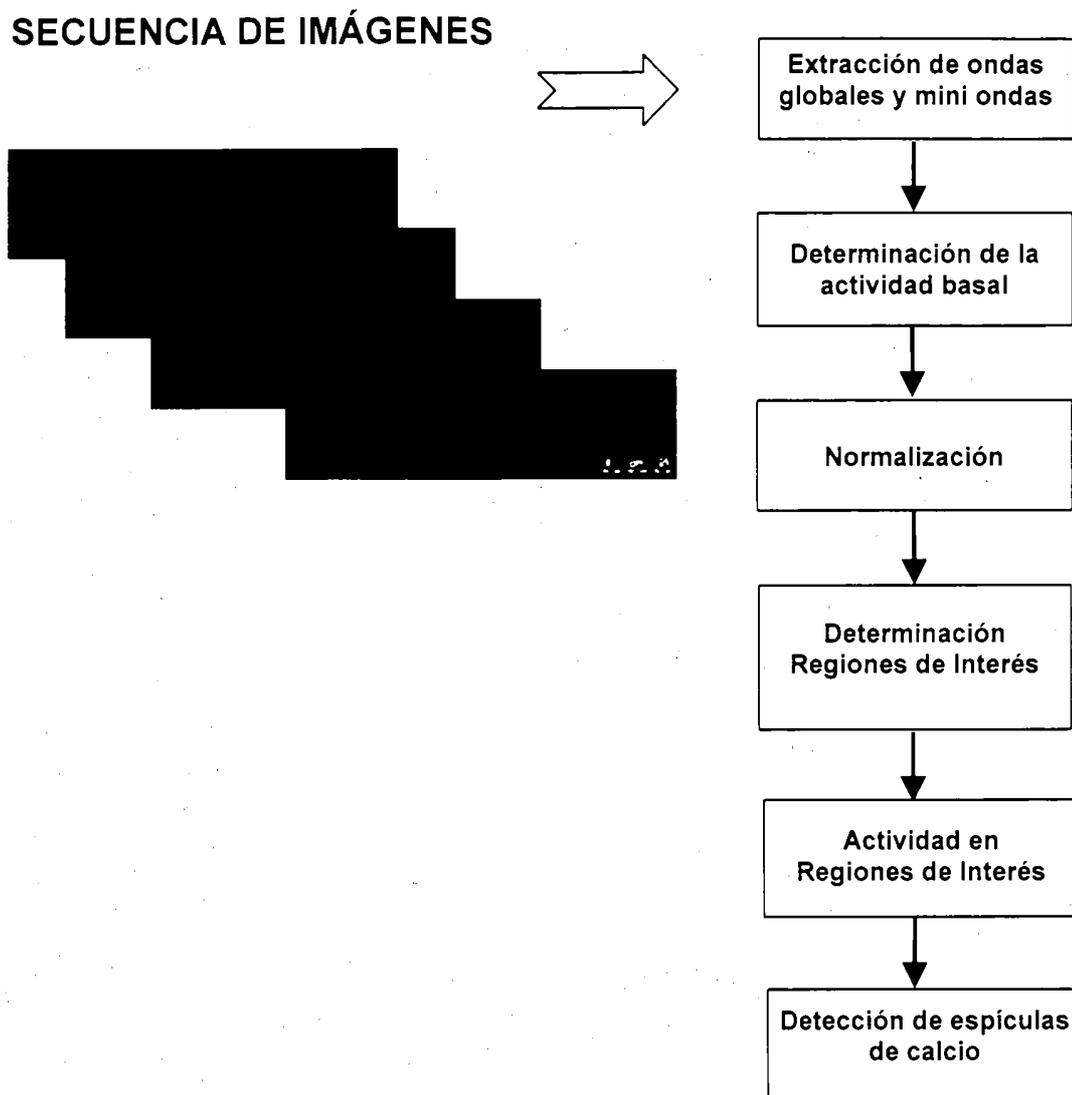


Fig. 1

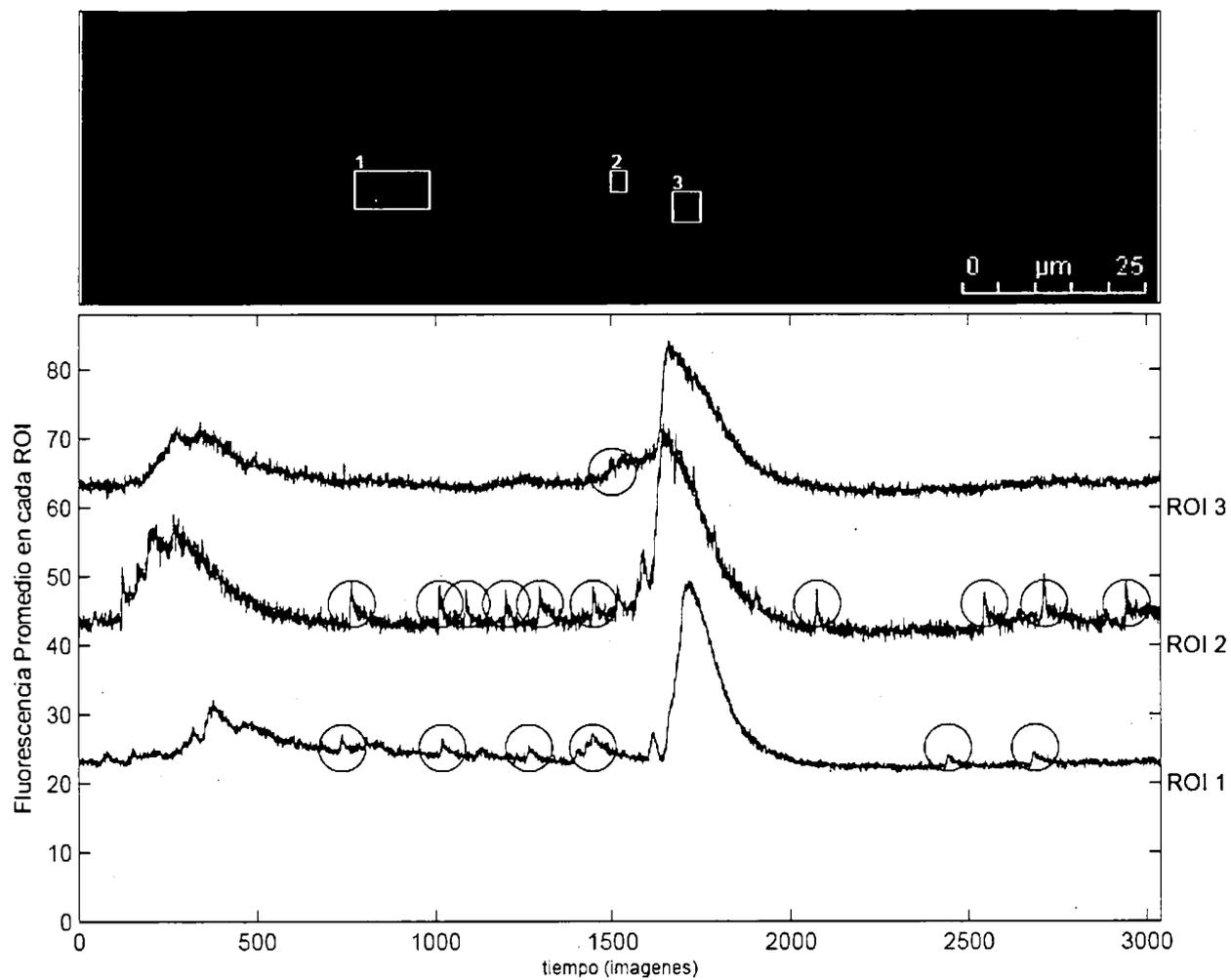


Fig. 2

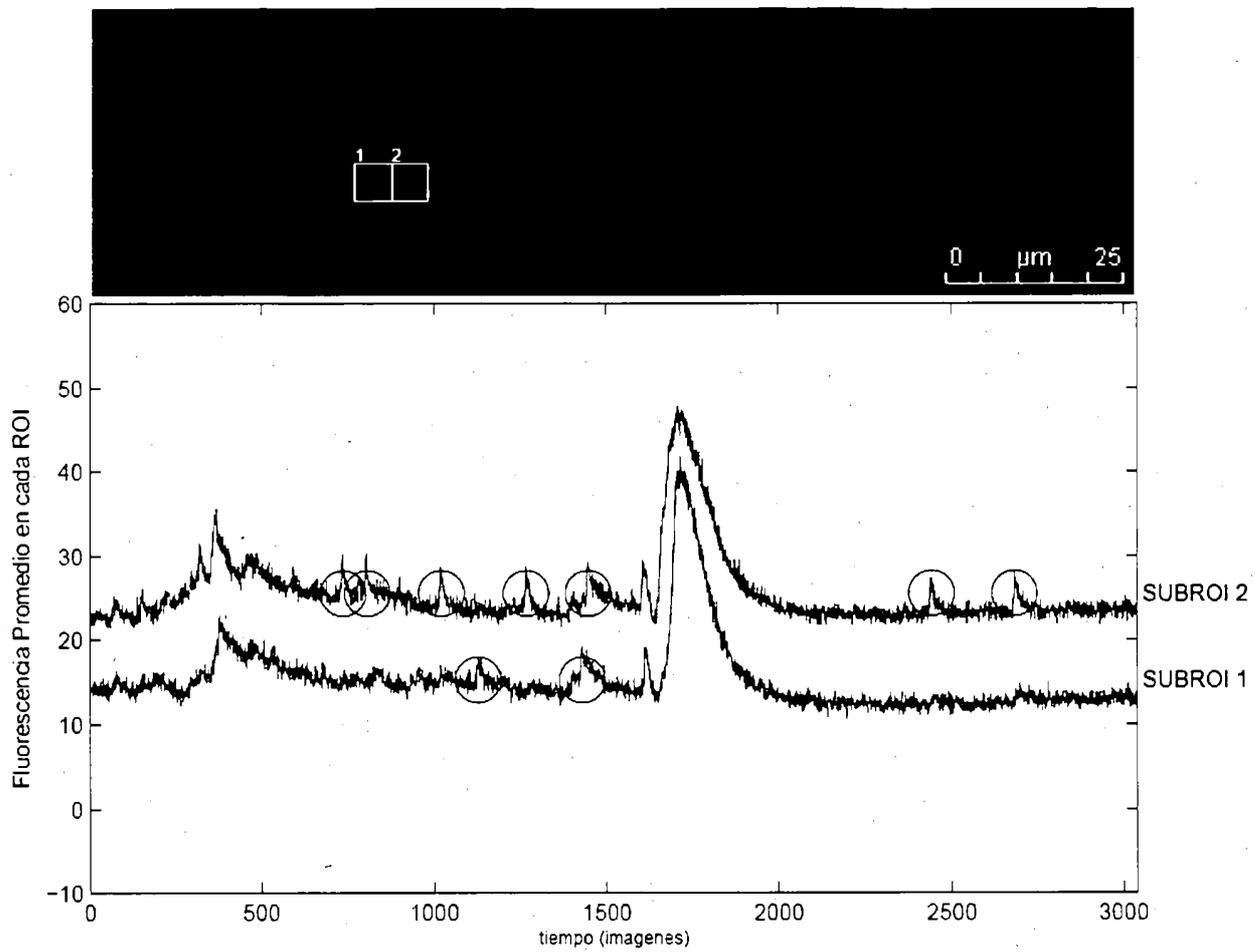


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2010/000102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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)

A61B5, G06T

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)

INVENES,EPODOC,WPI,NPL,INSPEC,BIOSIS,MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kong Cherrie H T et al. "Increasing Sensitivity of Ca ²⁺ Spark Detection in Noisy Images by Application of a Matched-Filter Object Detection Algorithm", Biophysical Journal, 15.12.2008, vol. 95, n° 12, pages 6016 - 6024	1 - 30
A	Banyasz T et al. "A new approach to the detection and statistical classification of Ca ²⁺ sparks", Biophysical Journal, 15.06.2007, vol 92, n° 12, pages 4458 - 4465	1 - 30
A	Bray M A et al. "Multidimensional detection and analysis of Ca ²⁺ sparks in cardiac myocytes", Biophysical Journal, 6.2007, vol. 92, n° 12, pages 4433 - 4443	1 - 30
A	Cheng H et al. "Automated, objective detection and measurement of Ca ²⁺ sparks in confocal images", Biophysical Journal, 02.1998, vol. 74, n° 2PART2, page A269 pages 606 - 617	1 - 30

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

28.June.2010 (28.06.2010)

Date of mailing of the international search report

(29/06/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

A. Cardenas Villar

Telephone No. +34 91 349 53 93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/000102

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cheng H et al. "Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: Theory and studies with an automatic detection method", Biophysical Journal, 02.1999, vol. 76, n° 2, pages 606 - 617	1 - 30
A	Sebille S et al. "Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series", Computer methods and programs in biomedicine, 01.01.2005, vol. 77, n° 1, pages 57 - 70	1 - 30
A	Stuyvers B D et al. "2D-confocal analysis of spontaneous micro Ca ²⁺ transients in canine Purkinje cells", Biophysical Journal, 01.2004, vol. 86, n° 1, pages 223a	1 - 30
A	Bai Y et al. "Total internal reflection fluorescence microscopy study of spiral Ca ²⁺ waves in single heart cell", Journal of Microscopy, 03.2008, vol. 229, pages 555 - 560	1 - 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/000102

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B 5/00 (2006.01)

G06T 5/40 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2010/000102

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

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)

A61B5, G06T

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)

INVENES,EPODOC,WPI,NPL,INSPEC,BIOSIS,MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Kong Cherrie H T et al. "Increasing Sensitivity of Ca ²⁺ Spark Detection in Noisy Images by Application of a Matched-Filter Object Detection Algorithm", Biophysical Journal, 15.12.2008, vol. 95, n° 12, páginas 6016 - 6024	1 - 30
A	Banyasz T et al. "A new approach to the detection and statistical classification of Ca ²⁺ sparks", Biophysical Journal, 15.06.2007, vol. 92, n° 12, páginas 4458 - 4465	1 - 30
A	Bray M A et al. "Multidimensional detection and analysis of Ca ²⁺ sparks in cardiac myocytes", Biophysical Journal, 6.2007, vol. 92, n° 12, páginas 4433 - 4443	1 - 30
A	Cheng H et al. "Automated, objective detection and measurement of Ca ²⁺ sparks in confocal images", Biophysical Journal, 02.1998, vol. 74, n° 2PART2, página A269 páginas 606 - 617	1 - 30

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.

28.Junio.2010 (28.06.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

29-JUNIO-2010 (29/06/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Cardenas Villar

N° de teléfono +34 91 349 53 93

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/000102

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Cheng H et al. "Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: Theory and studies with an automatic detection method", Biophysical Journal, 02.1999, vol. 76, n° 2, páginas 606 - 617	1 - 30
A	Sebille S et al. "Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series", Computer methods and programs in biomedicine, 01.01.2005, vol. 77, n° 1, páginas 57 - 70	1 - 30
A	Stuyvers B D et al. "2D-confocal analysis of spontaneous micro Ca ²⁺ transients in canine Purkinje cells", Biophysical Journal, 01.2004, vol. 86, n° 1, páginas 223a	1 - 30
A	Bai Y et al. "Total internal reflection fluorescence microscopy study of spiral Ca ²⁺ waves in single heart cell", Journal of Microscopy, 03.2008, vol. 229, páginas 555 - 560	1 - 30

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61B 5/00 (2006.01)

G06T 5/40 (2006.01)