

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 710**

51 Int. Cl.:

G01B (2012.01)

G01B 9/04 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2020** **PCT/EP2020/083951**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2021** **WO21110595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2020** **E 20824465 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2023** **EP 4070144**

54 Título: **Dispositivos y procedimientos de microscopía de barrido lineal**

30 Prioridad:

03.12.2019 FR 1913670

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

30.05.2024

73 Titular/es:

DAMAE MEDICAL (100.0%)
14 rue Sthrau
75013 Paris, FR

72 Inventor/es:

OGIEN, JONAS

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 970 710 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivos y procedimientos de microscopía de barrido lineal

Ámbito técnico de la invención

- 5 La presente descripción se refiere a dispositivos y procedimientos de microscopía de barrido lineal. Más concretamente, los dispositivos y procedimientos se basan en la microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal.

Estado de la técnica

La tomografía de coherencia óptica u OCT (abreviatura de la expresión anglosajona "*Optical Coherence Tomography*") se basa en la utilización de un interferómetro de baja coherencia.

- 10 Esta técnica de formación de imágenes, descrita por ejemplo en D. Huang et al. [Ref. 1] permite obtener imágenes transversales de tejidos con una resolución axial de unas pocas micras.

Más concretamente, se conocen técnicas de OCT de barrido.

- 15 En una versión de la OCT en el dominio del tiempo (o "Time Domain OCT"), como se describe en la [Ref. 1], un haz de luz blanca se divide en dos partes, una enfocada sobre el tejido a estudiar y la otra sobre un espejo de referencia. La luz reflejada (retrodispersada) por el objeto observado se combina con la reflejada por el espejo de referencia y es detectada por un fotodetector. La interferencia sólo se produce cuando la diferencia de camino óptico es como máximo del orden de la longitud de coherencia de la radiación; cambiando la longitud óptica del brazo de referencia del interferómetro, podemos acceder a diferentes profundidades en el objeto. Se puede construir una imagen bidimensional o incluso tridimensional utilizando la interferometría (que permite la adquisición según la dimensión axial, es decir, en profundidad) y el barrido (que permite la adquisición según una o dos dimensiones laterales). En la OCT de barrido en el dominio de la frecuencia (o "Frequency Domain OCT"), el brazo de referencia tiene una longitud óptica fija y la señal interferométrica se analiza espectralmente. Véase el artículo de A. F. Fercher *et al.* [Ref. 2]. En la práctica, la OCT de barrido dificulta la obtención de resoluciones laterales mejores que unos pocos micrómetros.

- 25 Con el objetivo particular de mejorar la resolución lateral, el artículo de J. A. Izatt *et al.* la [Ref. 3] describe una técnica mejorada que combina la tomografía de coherencia óptica y la microscopía confocal. La microscopía confocal reduce considerablemente el número de fotones retrodispersados por zonas de la muestra situadas fuera del volumen de coherencia y percibidos por el sensor, lo que aumenta la relación señal/ruido.

Más recientemente, el artículo de Y. Chen *et al.* [Ref. 4] propuso un dispositivo LS-OCM de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal. Tal dispositivo se muestra en la Fig. 1.

- 30 El dispositivo LS-OCM 100 mostrado en la Fig. 1 comprende un microscopio interferométrico de tipo Linnik 101 con dos objetivos de microscopio 102, 103 respectivamente en el brazo portaobjetos y en el brazo de referencia del interferómetro, estando dichos brazos portaobjetos y de referencia separados por un cubo divisor de haz 104. El dispositivo 100 también incluye una fuente láser 110, en este ejemplo una fuente láser de femtosegundo que emite pulsos de banda espectral ancha (80 nm). La iluminación lineal de la muestra 10 se obtiene con una disposición de una lente cilíndrica 111 y lentes esféricas 112, 113. La potencia óptica en el brazo de referencia está controlada por un filtro de densidad neutra 105 y una placa de vidrio 106 está dispuesta en el brazo portaobjetos para compensar la dispersión. La luz procedente de los brazos portaobjetos y referencia es recombinada por el cubo divisor de haz 104 y proyectada mediante una lente 121 sobre una cámara lineal 122, permitiendo obtener una señal interferométrica. La señal interferométrica se modula accionando sinusoidalmente un espejo de referencia 107 dispuesto en un plano focal del objetivo del microscopio 103 del brazo de referencia, mediante un transductor piezoeléctrico 108, y se reconstruye una imagen de una línea de la muestra a partir de una combinación de cuatro señales de interferencia resultantes de la modulación.

- 45 El dispositivo de microscopía descrito en la Fig. 1 tiene una configuración de filtrado confocal lineal o unidimensional (en una dirección); de hecho, la línea de iluminación se conjuga ópticamente con un detector lineal cuya superficie de detección tiene una anchura sustancialmente idéntica a una anchura de la imagen de la línea, lo que da como resultado el filtrado espacial de una región del objeto a observar.

Así, el dispositivo de microscopía descrito en la Fig. 1 tiene ventajas relacionadas con el filtrado confocal pero permite aumentar la velocidad de adquisición en comparación con la microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido descrita en la [Ref. 3] debido a la adquisición paralela en una línea.

- 50 Además, en la [Ref. 4], también pueden generarse imágenes *frontales* de la muestra barriendo la muestra 10 en una dirección perpendicular a la línea de iluminación, mediante una etapa de traslación 109.

Aunque permite la formación de imágenes delante de la muestra con una resolución axial, es decir, en la dirección del eje óptico del objetivo 102 del microscopio, de aproximadamente 3 μm , y una resolución lateral, es decir, en una

dirección contenida en un plano perpendicular al eje óptico del objetivo del microscopio, de aproximadamente 2 μm , el dispositivo descrito en [Ref. 4] no es, sin embargo, adecuado para la microscopía de especímenes *in vivo*, ya que la muestra tiene que ser desplazada con el fin de obtener imágenes *frontales*. Además, si se previeran, los mecanismos de barrido de los haces de iluminación y detección aumentarían el tamaño del aparato, lo que se intenta evitar con vistas a su industrialización. YU CHEN ET AL: "Real-Time Imaging of Biological Tissues using High Resolution Line-Scanning Optical Coherence Microscopy", CLEO '07. 2007 CONFERENCE ON LASERS AND ELECTRO-OPTICS 5-11 MAY 2007 BALTIMORE, MD, USA, OSA, PISCATAWAY, NJ, USA, 6 de mayo de 2007 (2007-05-06), páginas 1-2, ISBN: 978-1-55752-834-6 también divulga un sistema de microscopía de coherencia óptica (OCM) de barrido lineal basado en un láser Ti:Sapphire de banda ancha y una cámara CCD de barrido lineal de alta velocidad.

- 10 La presente descripción proporciona dispositivos y procedimientos de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal para la obtención de imágenes *frontales* de una muestra *in vivo*, con una rápida adquisición de imágenes y una pequeña huella del dispositivo.

Sumario de la invención

- 15 En la presente descripción, el término "comprender" significa lo mismo que "incluir", "contener", y es inclusivo o abierto y no excluye otros elementos no descritos o representados. Además, en la presente descripción, el término "aproximadamente" o "sustancialmente" es sinónimo de (significa lo mismo que) un margen de menos y/o más del 10%, por ejemplo el 5%, del valor respectivo.

Según un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la reivindicación 1.

- 20 En la presente descripción, un eje óptico del primer objetivo de microscopio dispuesto en el brazo portaobjetos está definido por una línea que pasa por el centro de una pupila de dicho objetivo y es sustancialmente perpendicular al plano de dicha pupila. Esta línea puede ser una línea discontinua si hay espejos de reenvío u otros elementos deflectores de la luz en el dispositivo.

- 25 Así, en un espacio dado del dispositivo, una dirección colineal con el eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio, considerada en dicho espacio, se denomina generalmente "dirección axial".

En un espacio dado del dispositivo, una dirección perpendicular al eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio, considerada en dicho espacio, se denomina generalmente "dirección lateral".

- 30 En la presente descripción, la "superficie de enfoque" es la superficie formada por la línea de enfoque en el espacio portaobjetos del primer objetivo del microscopio, durante el barrido de dicha línea. El espacio portaobjetos del primer objetivo del microscopio se define en esta descripción como el espacio en el que se encuentra el objeto de estudio en funcionamiento. La superficie de enfoque es generalmente plana, sustancialmente perpendicular al eje óptico del primer objetivo de microscopio y definida en una región correspondiente a la profundidad de campo de dicho objetivo de microscopio.

- 35 La "superficie de enfoque" es una superficie, en el espacio portaobjetos, conjugada ópticamente con la superficie de detección lineal por el primer objetivo del microscopio y todos los elementos ópticos presentes entre el primer objetivo del microscopio y la superficie de detección. El dispositivo se ajusta antes de la toma de imágenes de modo que la superficie de enfoque coincida sustancialmente con la superficie de enfoque.

- 40 La disposición original del dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica así descrito, con un dispositivo de barrido unidireccional de dicha línea de enfoque dispuesto en el brazo portaobjetos del microscopio interferométrico, aguas arriba de dicho primer objetivo de microscopio, permite formar imágenes *frontales* de muestras *in vivo*, manteniendo al mismo tiempo una huella reducida para el dispositivo.

- 45 El objeto de estudio es, por ejemplo y de forma no limitativa, una región de piel y se aplica, por ejemplo, al diagnóstico de diversos tipos y subtipos de cáncer de piel, en particular melanomas, carcinomas basocelulares y carcinomas escamosos, al diagnóstico de patologías inflamatorias y bullosas de la piel, a la evaluación de diversos parámetros morfológicos de la piel sana, al seguimiento de la evolución de lesiones cutáneas, al examen de los márgenes de exéresis, etc.

- 50 Según una o más realizaciones, la fuente de luz de banda espectral ancha comprende un diodo electroluminiscente o una combinación de diodos electroluminiscentes, un diodo superluminiscente o una combinación de diodos superluminiscentes, una lámpara de filamento halógeno, una lámpara de arco o una fuente láser de banda espectral ancha (una fuente de generación "supercontinuum", por ejemplo). En todos los casos, la anchura espectral (a media altura) de la fuente será preferentemente superior o igual a 100 nm; cuanto mayor sea esta anchura espectral, mejor será la resolución axial del dispositivo; la longitud de onda del centro de la banda puede ser visible o en el infrarrojo cercano; en aplicaciones biológicas y médicas, se prefiere generalmente el infrarrojo cercano, entre 700 nm y 1500 nm. La fuente puede ser polarizada o no polarizada, espacialmente coherente o incoherente.

Las fuentes espacialmente coherentes (como láseres o diodos superluminiscentes) pueden ser ventajosas debido a su mayor luminancia. Además, junto con una lente cilíndrica, forman la línea de enfoque. Según una o más realizaciones, dicho microscopio interferométrico es un microscopio Linnik, que comprende además un segundo objetivo de microscopio dispuesto en dicho brazo de referencia, estando dichos brazos de referencia y portaobjetos separados entre sí. Por ejemplo, el primer objetivo del microscopio y el segundo objetivo del microscopio son idénticos, lo que permite compensar los efectos de la dispersión cromática entre los dos brazos del interferómetro.

Según una o más realizaciones, el brazo de referencia no incluye un objetivo de microscopio. En este caso en particular, el dispositivo también puede incluir un elemento de compensación de la dispersión cromática dispuesto en uno u otro de dichos brazos portaobjetos y de referencia.

Según una o más realizaciones, dicho primer objetivo de microscopio y/o dicho segundo objetivo de microscopio, cuando están presentes, son objetivos de microscopio de inmersión, es decir, objetivos de microscopio sumergidos en un medio cuyo índice de refracción es sustancialmente igual al índice de refracción del objeto de estudio. Según una o más realizaciones, dicha superficie reflectante de referencia comprende una superficie configurada para reflejar aproximadamente el 5% o menos de la luz incidente. Dicha superficie reflectante de referencia comprende, por ejemplo, una interfaz vidrio/aire de una placa de vidrio (por ejemplo, cuarzo). Por supuesto, también pueden utilizarse otras superficies reflectantes con coeficientes de reflexión más elevados, como los espejos.

Según una o varias realizaciones, el dispositivo de microscopía comprende también un elemento de atenuación de potencia óptica, dispuesto en el brazo de referencia, que permite controlar la diferencia de potencia óptica de los haces de luz que se propagan en cada uno de los brazos del microscopio interferométrico. El elemento de atenuación es, por ejemplo, un filtro de densidad neutra. Un elemento de compensación de la dispersión cromática, por ejemplo una placa de vidrio, puede disponerse entonces en el brazo del objeto para compensar la dispersión introducida por el elemento de atenuación.

Según una o más realizaciones, un detector con una superficie de detección lineal es un detector lineal, por ejemplo una cámara lineal de tipo CCD o CMOS, que comprende una pluralidad de detectores elementales (o "píxeles") dispuestos a lo largo de una o más líneas para formar una superficie de detección unidimensional de anchura determinada. Un detector con una superficie de detección lineal también comprende un detector bidimensional en el que sólo se tienen en cuenta una o varias líneas de píxeles, por ejemplo, sólo se activan electrónicamente una o varias líneas de píxeles.

Según una o más realizaciones, la selección de la luz retrodispersada por dicho objeto y procedente de dicha línea de enfoque para el filtrado espacial confocal unidimensional se obtiene mediante dicha superficie de detección lineal, conjugada ópticamente con dicha línea de enfoque, por ejemplo mediante el primer objetivo del microscopio y una lente tubular dispuesta aguas abajo del microscopio interferométrico, y cuya anchura se adapta a la anchura de la imagen de la línea de enfoque en la superficie de detección. La superficie de detección lineal forma parte, por tanto, del dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional.

Según una o más realizaciones, la selección de la luz retrodispersada por dicho objeto y procedente de dicha línea de enfoque para el filtrado espacial confocal unidimensional se obtiene mediante un elemento de filtrado espacial, por ejemplo una ranura, conjugado ópticamente con dicha línea de enfoque por el primer objetivo del microscopio y una lente tubular dispuesta aguas abajo del microscopio interferométrico. En este ejemplo, las dimensiones del elemento de filtrado espacial, por ejemplo la anchura de la ranura, se adaptan a la anchura de la imagen de la línea de enfoque en un plano de dicho elemento de filtrado espacial. El elemento de filtrado espacial está, por ejemplo, conjugado ópticamente con la superficie de detección del detector.

En ambos casos, respectivamente, la anchura de la superficie de detección lineal o de la ranura puede ser inferior a 10 veces, ventajosamente inferior a 5 veces, la anchura de la imagen de la línea de enfoque. Por ejemplo, la anchura de la superficie de detección lineal o de la ranura podría ser sustancialmente igual a la anchura de la imagen de la línea de enfoque.

Según una o más realizaciones, el dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional comprende una lente cilíndrica, dispuesta aguas arriba del microscopio interferométrico, y que coopera con la fuente de luz de banda espectral ancha para formar dicha línea de enfoque en un espacio portaobjetos del primer objetivo del microscopio. La fuente de luz de banda espectral ancha es, por ejemplo, una fuente de luz espacialmente coherente, por ejemplo, un láser *supercontinuum* o un diodo superluminiscente. Tal dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional es ventajoso porque permite iluminar el objeto a lo largo de una línea con una potencia óptica satisfactoria, por ejemplo del orden de unos pocos milivatios. Sin embargo, el dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional puede comprender, en otras realizaciones, una abertura lineal dispuesta en un plano ópticamente conjugado con un plano de la fuente, por ejemplo una ranura, y un objetivo aguas arriba del microscopio interferométrico que coopera con dicho primer objetivo del microscopio para formar dicha línea de enfoque.

Según una o más realizaciones, el dispositivo para el barrido unidireccional de la línea de enfoque comprende una superficie reflectante, por ejemplo un espejo, y medios para hacer girar dicha superficie reflectante según un eje de rotación sustancialmente perpendicular al eje óptico del primer objetivo del microscopio.

El dispositivo de barrido unidireccional para la línea de enfoque está dispuesto en el brazo portaobjetos, aguas arriba del primer objetivo del microscopio.

Según una o más realizaciones, la superficie reflectante del dispositivo de barrido está ópticamente conjugada con una pupila de entrada del primer objetivo del microscopio para limitar cualquier efecto de viñeteado.

5 Según otras realizaciones, la superficie reflectante del dispositivo de barrido está simplemente dispuesta cerca de dicho primer objetivo de microscopio para limitar el posible viñeteado del haz de iluminación en la pupila de entrada del primer objetivo de microscopio y para limitar el viñeteado de la luz retrodispersada por el objeto. En particular, no se introduce ningún elemento óptico para la conjugación óptica de la superficie reflectante del dispositivo de barrido y la pupila de entrada del primer objetivo del microscopio, lo que contribuye a que el dispositivo sea más compacto.

10 Según una o más realizaciones, la unidad de procesamiento comprende una o más entidades físicas, por ejemplo uno o más ordenadores. Cuando en la presente descripción se haga referencia a etapas de cálculo o procesamiento para la implementación de etapas del procedimiento en particular, se entiende que cada etapa de cálculo o procesamiento puede implementarse mediante software, hardware, firmware, microcódigo o cualquier combinación adecuada de estas tecnologías. Cuando se utiliza software, cada etapa de cálculo o procesamiento puede implementarse mediante instrucciones de programa informático o código de software. Estas instrucciones pueden almacenarse o transmitirse a un medio de almacenamiento legible por la unidad de procesamiento y/o ejecutarse por la unidad de procesamiento para implementar estas etapas de cálculo o procesamiento. En una o más realizaciones, la unidad de procesamiento está conectada a una pantalla y/o interfaz para interactuar con un usuario.

20 Según una o más realizaciones, se genera una imagen tomográfica unidimensional a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales determinando una dispersión de valores entre imágenes sucesivas de dicha pluralidad de imágenes. La dispersión se determina en la pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales sucesivas en paralelo para cada punto. Por ejemplo, la determinación de dicha imagen tomográfica unidimensional comprende el cálculo de la varianza de dicha pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales sucesivas. Según una o más realizaciones, dicha pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales comprende entre 2 y 20, ventajosamente entre 2 y 10, imágenes interferométricas unidimensionales.

Según una o más realizaciones, la unidad de procesamiento está configurada para :

- producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, cada una de dichas imágenes tomográficas unidimensionales producidas a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante dicho barrido unidireccional; y
- producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de una pluralidad de dichas imágenes tomográficas unidimensionales.

35 En estas realizaciones, no es necesario un desplazamiento de la superficie reflectante de referencia para la adquisición de una imagen tomográfica unidimensional; de hecho, debido al barrido lineal de enfoque, y si la superficie reflectante del dispositivo de barrido de la línea de enfoque no está ópticamente conjugada con la pupila de entrada del primer objetivo del microscopio, el microscopio interferométrico puede producir una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales (o señales interferométricas unidimensionales) y el detector puede adquirirlas para una pluralidad de posiciones sucesivas de la línea de enfoque en el objeto, las imágenes interferométricas de dicha pluralidad de imágenes interferométricas tienen diferentes estados de interferencia en cada punto correspondientes a diferentes diferencias de paso entre la luz del brazo de referencia y la luz del brazo del objeto. Una imagen tomográfica unidimensional puede producirse a partir de dicha pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales.

Según una o más realizaciones, el dispositivo de microscopía según el primer aspecto comprende medios para el desplazamiento unidireccional de dicha superficie reflectante de referencia en una dirección axial.

Según una o más realizaciones, la unidad de procesamiento está configurada para :

- 45 • producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, siendo producida cada una de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de la superficie reflectante de referencia; y
- 50 • producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de una pluralidad de dichas imágenes tomográficas unidimensionales.

En estas realizaciones de ejemplo, se produce una imagen tomográfica unidimensional a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de la superficie reflectante de referencia, lo que da lugar a diferentes diferencias de paso entre la luz procedente del brazo de referencia y la luz procedente del brazo portaobjetos, y por tanto a diferentes estados de interferencia para las

imágenes interferométricas de dicha pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales. En estos ejemplos, el desplazamiento de la línea de enfoque durante la producción de una imagen interferométrica unidimensional es ventajosamente sustancialmente cero o suficientemente pequeño para no dañar la imagen tomográfica así producida.

5 Según una o más realizaciones, dichos medios para desplazar dicha superficie reflectante de referencia están configurados para introducir además un desplazamiento axial adicional de dicha superficie reflectante de referencia para compensar un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de línea de enfoque.

10 El solicitante ha demostrado que durante el barrido unidireccional de la línea de enfoque para producir una imagen *frontal*, la "superficie de coherencia", es decir, la superficie de diferencia de paso cero que es la superficie que puede observarse realmente, no es estrictamente plana sino que adopta la forma de una superficie parabólica. Esto puede dar lugar a una imagen *frontal* "borrosa". La introducción de un desplazamiento axial adicional de dicha superficie reflectante de referencia permite entonces introducir un desplazamiento de fase de compensación para obtener una mejor superposición de la superficie de coherencia y de la superficie de enfoque, y producir una imagen *frontal* sustancialmente plana con una nitidez mejorada.

15 Según una o más realizaciones, el dispositivo de microscopía según el primer aspecto comprende además una superficie reflectante de retorno dispuesta en el brazo de referencia y medios para mover dicha superficie reflectante de retorno en una y/u otra de una dirección axial y una dirección lateral.

Según una o más realizaciones, dicha unidad de procesamiento está configurada para :

- 20 • producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, cada una de dichas imágenes tomográficas unidimensionales producidas a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha superficie reflectante de retorno; y
- producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de una pluralidad de dichas imágenes tomográficas unidimensionales.

25 El desplazamiento de una superficie reflectante de retorno dispuesta en el brazo de referencia del microscopio interferométrico permite reducir aún más el tamaño del dispositivo de microscopía, ya que no es necesario desplazar la superficie reflectante de referencia. Además, en particular cuando la superficie reflectante de referencia se encuentra en un plano focal de un objetivo de microscopio, se limita el riesgo de variación de la intensidad luminosa de la luz procedente del brazo de referencia durante el desplazamiento de dicha superficie reflectante de referencia, ya que dicha variación podría ser el resultado de impurezas en la superficie reflectante de referencia y dar lugar a artefactos en la imagen.

Según una o más realizaciones, para cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales, dichos medios para desplazar dicha superficie reflectante de retorno están configurados para introducir además un desplazamiento adicional de dicha superficie reflectante de retorno para compensar un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de línea de enfoque.

35 Por supuesto, la compensación de un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de línea de enfoque también puede obtenerse mediante un desplazamiento axial adicional de dicha superficie reflectante de referencia, incluso cuando las imágenes tomográficas unidimensionales se producen mediante la adquisición de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales para diferentes posiciones de dicha superficie reflectante de referencia. A la inversa, la compensación de un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido lineal de enfoque puede obtenerse mediante un desplazamiento adicional de dicha superficie reflectante de referencia, incluso cuando las imágenes tomográficas unidimensionales se producen adquiriendo una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales para diferentes posiciones de la superficie reflectante de referencia.

45 Según uno o más ejemplos de realización, el dispositivo de microscopía tomográfica según el primer aspecto comprende además medios para el desplazamiento axial de dicha línea de enfoque, en una dirección paralela a dicho eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio para el desplazamiento de dicha línea de enfoque en profundidad en el objeto. A continuación, la superficie de enfoque se desplaza hasta la profundidad del objeto.

Según una o más realizaciones, la unidad de procesamiento está configurada para producir además una imagen tridimensional de dicho objeto a observar, a partir de una pluralidad de imágenes *frontales* producidas para diferentes superficies de enfoque.

50 Según una o más realizaciones, dichos medios para desplazar axialmente la línea de enfoque comprenden medios para desplazar solidariamente un conjunto que comprende dicho primer objetivo de microscopio y dicho divisor de haz, en una dirección paralela a dicho eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio. Esta configuración es ventajosa porque permite desplazar simultánea e solidariamente la superficie de coherencia y la superficie de enfoque durante el barrido axial, minimizando al mismo tiempo el peso a desplazar.

55 Por supuesto, pueden preverse otros medios de desplazamiento axial de la línea de enfoque.

Por ejemplo, y de manera no limitativa, dichos medios de desplazamiento axial de la línea de enfoque pueden comprender medios de desplazamiento solidarios con un conjunto que comprende dicho primer objetivo de microscopio y dicho dispositivo de barrido unidireccional de la línea de enfoque, o con un conjunto que comprende dicho primer objetivo de microscopio, dicha superficie reflectante de retorno del brazo de referencia cuando esté presente, o con un conjunto que comprende todos los elementos de dicho microscopio interferométrico.

En los ejemplos citados anteriormente, puede elegirse un objetivo de microscopio de inmersión para dicho primer objetivo de microscopio y dicho segundo objetivo de microscopio, si está presente. En estos ejemplos, los movimientos de la superficie de coherencia y de la superficie de enfoque son interdependientes; adaptando el índice de refracción del objeto estudiado al del medio en el que está sumergido el primer objetivo del microscopio, es posible mantenerlos confundidos.

Según otras realizaciones, dichos medios para el desplazamiento axial de la línea de enfoque pueden comprender medios para el desplazamiento independiente del primer objetivo de microscopio, por una parte, y del conjunto formado por el segundo objetivo de microscopio, cuando esté presente, con la superficie reflectante de referencia, por otra parte. Dichos medios para el desplazamiento axial de la línea de enfoque también pueden comprender medios para el desplazamiento independiente del primer objetivo de microscopio, por una parte, y de una superficie reflectante de retorno dispuesta en el brazo de referencia, por otra parte.

En estos ejemplos, los movimientos de la superficie de coherencia y de la superficie de enfoque están desacoplados y los dos planos pueden moverse en una cantidad diferente para mantenerlos coincidentes.

Según un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la reivindicación 11. sustancialmente perpendicular a un eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio, por medio de un dispositivo de barrido dispuesto en dicho brazo de objeto aguas arriba de dicho primer objetivo de microscopio;

- la producción, mediante una unidad de procesamiento, de al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a observar, dispuesta en un plano sustancialmente perpendicular a dicho eje óptico del objetivo del microscopio, a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante dicho barrido unidireccional.

Según una o más realizaciones, la producción de dicha al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto comprende:

- producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, cada una de dichas imágenes tomográficas unidimensionales producidas a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante dicho barrido unidireccional; y
- producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de una pluralidad de dichas imágenes tomográficas unidimensionales.

Según una o más realizaciones, la producción de dicha al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto comprende:

- producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, siendo producida cada una de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de la superficie reflectante de referencia o para diferentes posiciones de una superficie reflectante de retorno dispuesta en el brazo de referencia; y
- producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de una pluralidad de dichas imágenes tomográficas unidimensionales.

Según una o más realizaciones, el procedimiento comprende además, para cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales, la introducción de un desplazamiento axial adicional de dicha superficie reflectante de referencia o la introducción de un desplazamiento adicional de dicha superficie reflectante de retorno, para compensar un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de la línea de enfoque.

Según una o más realizaciones, el procedimiento comprende además:

- el desplazamiento axial de dicha línea de enfoque en profundidad en el objeto, en una dirección paralela a dicho eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio;

- la producción de una imagen tridimensional de dicho objeto a observar, a partir de una pluralidad de imágenes *frontales* producidas para diferentes profundidades de la línea de enfoque.

Breve descripción de las figuras

Otras ventajas y características de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción, ilustrada por las siguientes figuras:

- la [Fig. 1], ya descrita, muestra un diagrama que ilustra un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal (LS-OCM) de un objeto, conocido en el estado de la técnica;
- la [Fig. 2] muestra un diagrama que ilustra un ejemplo de un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción;
- la [Fig. 3A] ilustra, en una primera vista, el funcionamiento de los medios de filtrado espacial confocal unidimensional en un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal, según un ejemplo de la presente descripción;
- la [Fig. 3B] muestra medios de filtrado espacial confocal unidimensional como los ilustrados en la Fig. 3A, en una segunda vista;
- la [Fig. 4A] muestra un diagrama que ilustra un ejemplo de un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción;
- la [Fig. 4B] muestra un diagrama que ilustra un ejemplo de un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción;
- la [Fig. 4C] muestra un diagrama que ilustra un ejemplo de un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción;
- la [Fig. 5A] muestra un diagrama que ilustra, a modo de ejemplo, el barrido unidireccional de la línea de enfoque en función del tiempo;
- la [Fig. 5B] muestra un diagrama que ilustra, a modo de ejemplo, una sección transversal de la superficie de coherencia cuando la línea de enfoque se desplaza lateralmente a lo largo del barrido mostrado en la Fig. 5A y la superficie de coherencia cuando la línea de enfoque se desplaza lateralmente a lo largo del barrido mostrado en la Fig. 5A, con compensación mediante una variación de la posición axial de la superficie reflectante de referencia, también mostrada en la Fig. 5B ;
- la [Fig. 5C] muestra un diagrama que ilustra, a modo de ejemplo, una sección transversal de la superficie de coherencia cuando la línea de enfoque se desplaza lateralmente a lo largo del barrido mostrado en la Fig. 5A y la superficie de coherencia cuando la línea de enfoque se desplaza lateralmente a lo largo del barrido mostrado en la Fig. 5A, con compensación escalonada mediante una variación de la posición axial de la superficie reflectante de referencia, también mostrada en la Fig. 5C;
- la [Fig. 6A] muestra un diagrama que ilustra, a modo de ejemplo, la superficie de coherencia en un ejemplo de un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción, sin compensación;
- la [Fig. 6B] muestra un diagrama que ilustra, a modo de ejemplo, la superficie de coherencia en un ejemplo de un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción, con compensación;
- la [Fig. 7] muestra imágenes de una muestra obtenidas mediante un ejemplo del procedimiento según la presente descripción, con y sin compensación.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción detallada, se exponen muchos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente descripción. Sin embargo, será evidente para el experto en la materia que la presente descripción puede aplicarse sin estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito en detalle características bien conocidas para no complicar innecesariamente la descripción.

En las figuras, los elementos no se muestran a escala para una mejor visibilidad.

La Fig. 2 muestra un diagrama que ilustra un ejemplo de un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción.

El dispositivo de microscopía tomográfica 200 mostrado en la Fig. 2 comprende una fuente de luz de banda espectral ancha 210, un detector 222 con una superficie de detección lineal 223, por ejemplo una cámara lineal de tipo CCD o CMOS, una unidad de procesamiento 240 configurada en particular para procesar las señales procedentes del detector 222 y un microscopio interferométrico 201.

El microscopio interferométrico 201 comprende, en particular, un brazo de referencia en cuyo extremo está dispuesta una superficie reflectante de referencia 207, un brazo portaobjetos configurado para recibir un objeto que se va a representar 10, un divisor de haz 204 que acopla los brazos portaobjetos y de referencia a la fuente de luz 210 y al detector, y al menos un primer objetivo de microscopio 202 dispuesto en dicho brazo portaobjetos. El microscopio interferométrico es, por ejemplo, un microscopio de tipo Linnik, como se muestra en la Fig. 2, con un segundo objetivo de microscopio 203 idéntico al primer objetivo de microscopio 202, dispuesto en el brazo de referencia y en cuyo plano focal se encuentra la superficie reflectante de referencia 207. En el ejemplo mostrado en la Fig. 2, los objetivos de microscopio 202, 203 son objetivos de inmersión, sumergidos en un líquido de índice 205, 206, es decir, un líquido cuyo índice de refracción se adapta al índice de refracción del objeto 10. El microscopio interferométrico 201 también puede comprender, de manera conocida, un elemento de atenuación de la potencia óptica (no representado) dispuesto en el brazo portaobjetos y/o un elemento de compensación de la dispersión cromática (no representado) dispuesto en uno u otro de dichos brazos portaobjetos y de referencia.

El dispositivo de microscopía tomográfica 200 comprende también un dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional, que comprende en particular una lente cilíndrica 212. El dispositivo de filtrado confocal está configurado para cooperar con la fuente de luz para iluminar el objeto 10 a lo largo de una línea de enfoque situada en un espacio portaobjetos del primer objetivo del microscopio (aquí el "espacio portaobjetos" se define desde el punto de vista de la formación de imágenes, es decir, el espacio del objetivo del microscopio en el que, en funcionamiento, se encuentra el objeto de estudio). También está configurado para seleccionar la luz retrodispersada por el objeto y procedente de dicha línea de enfoque para formar una imagen unidimensional de la línea de enfoque en la superficie de detección 223. Los ejemplos de dispositivos de filtrado espacial confocal unidimensional se describirán con más detalle en referencia a las Figs. 3A y 3B.

En el ejemplo de la Fig. 2, el eje óptico del primer objetivo de microscopio 202, definido por una línea que pasa por el centro de una pupila del objetivo y es sustancialmente perpendicular al plano de dicha pupila, está referenciado por un eje z en el espacio portaobjetos 10. Los ejes x e y corresponden, en el ejemplo de la Fig. 2, a dos direcciones laterales en el espacio portaobjetos 10, es decir, dos direcciones ortogonales entre sí y perpendiculares al eje óptico z del primer objetivo 202 del microscopio. En el espacio de la superficie reflectante de referencia, z_r indica la dirección axial, es decir, la dirección colineal con el eje óptico del primer objetivo del microscopio, considerado en este espacio, y x_r , y_r , las direcciones laterales.

En un microscopio interferométrico de un dispositivo según la presente descripción, debido a la pequeña longitud de coherencia temporal de la fuente de banda espectral ancha, la interferencia entre la luz reflejada por la superficie reflectante de referencia 207 y la retrodispersada por el objeto 10 sólo se produce cuando las trayectorias ópticas en los brazos del objeto y de referencia son iguales, con una tolerancia igual a la longitud de coherencia de la fuente.

El corte virtual en el objeto en el que puede producirse interferencia se denomina en esta descripción "superficie de coherencia" (o "superficie de diferencia de paso cero"). La superficie de coherencia es la superficie que puede observarse realmente. La "imagen interferométrica" es la señal de interferencia resultante de la adquisición por el detector de la interferencia formada en la superficie de detección. De este modo, cada punto de una imagen interferométrica tiene un "estado de interferencia" determinado, es decir, una diferencia de paso entre la luz procedente del objeto y los brazos de referencia para dicho punto que es inferior a la longitud de coherencia. En esta descripción, la imagen interferométrica es unidimensional debido a la iluminación y detección confocal lineal. La luz retrodispersada por el objeto a ambos lados de la superficie de coherencia contribuye a crear un fondo de luz constante en la señal de interferencia. Modificando la diferencia de paso entre los dos brazos del microscopio interferométrico, en formas que se describirán más adelante, es posible modular los estados de interferencia de los puntos entre imágenes sucesivas. A continuación, las imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por el detector se combinan para formar una imagen tomográfica unidimensional.

Varios medios utilizados para modificar la diferencia de velocidad entre los dos brazos del microscopio interferométrico se describen en particular con referencia a las Figs. 4A, 4B y 4C a continuación.

En la práctica, cuando la diferencia de paso entre imágenes interferométricas unidimensionales sucesivas se genera de acuerdo con una ley conocida, la imagen tomográfica unidimensional puede determinarse a partir de dichas imágenes interferométricas sobre la base de esta ley.

Por ejemplo, un enfoque sencillo para formar la imagen tomográfica unidimensional se basa en el uso de un procedimiento conocido como interferometría de desplazamiento de fase, que consiste en combinar digitalmente varias imágenes interferométricas unidimensionales desplazadas de fase. Por ejemplo, pueden combinarse cuatro imágenes interferométricas unidimensionales correspondientes a posiciones de líneas de enfoque espaciadas $\lambda/8n$ en la dirección axial, donde λ es la longitud de onda central de la luz iluminante en el objeto y n es el índice en el que está inmerso el primer objetivo del microscopio. Esto corresponde a un desplazamiento de fase de $\pi/2$ entre dos imágenes

adyacentes. Si denotamos estas imágenes por E_1, E_2, E_3, E_4 , $(E_1-E_3)^2 + (E_2-E_4)^2$ corresponde a la amplitud de la señal de interferencia -es decir, la amplitud de la imagen reconstruida- y $(E_1-E_3)/(E_2-E_4)$ corresponde a la fase de la señal de interferencia. Esta fase puede proporcionar información distinta de la estructural y tomográfica sobre el objeto. Cabe señalar que no existe contradicción entre la noción de desplazamiento de fase y el hecho, mencionado anteriormente, de que la línea de enfoque siempre corresponde a una diferencia de camino óptico entre el objeto y los brazos de referencia igual a cero. Esto se debe a que cualquier estructura del objeto susceptible de retrodispersión de la luz no sólo se observa cuando coincide con la línea de enfoque, sino también antes y después (porque la "puerta" de coherencia y la introducida por el filtrado confocal tienen una anchura mayor que λ). Por lo tanto, existe un desfase entre las contribuciones de esta estructura a las imágenes adquiridas sucesivamente durante el barrido axial.

Alternativamente, también puede utilizarse un algoritmo adaptado a un desplazamiento de fase sinusoidal entre imágenes sucesivas. Por ejemplo, una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales puede procesarse mediante análisis de Fourier para extraer la envolvente de las franjas de interferencia (la amplitud de la señal interferométrica) y eliminar la parte no modulada de la señal (señal no interferométrica). Puede obtenerse un desplazamiento de fase sinusoidal, por ejemplo, pero no exclusivamente, en el caso de que la superficie de referencia esté modulada sinusoidalmente.

En general, el solicitante ha demostrado que puede generarse una imagen tomográfica unidimensional a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales determinando la dispersión entre imágenes sucesivas de dicha pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales. Por lo tanto, no es necesario conocer con precisión la ley de variación de la diferencia de paso entre imágenes interferométricas unidimensionales sucesivas. Por ejemplo, para generar una imagen tomográfica unidimensional, se puede calcular la varianza de N imágenes interferométricas unidimensionales sucesivas, siendo N entre 2 y 20, ventajosamente entre 2 y 10, por ejemplo alrededor de 5.

La fuente de banda espectral ancha 210 comprende, por ejemplo, un láser *supercontinuum*, siendo la longitud de coherencia típicamente entre 1 y 5 μm .

El dispositivo de microscopía tomográfica 200 también comprende un dispositivo 235, 237 para el barrido unidireccional de dicha línea de enfoque, dispuesto en el brazo portaobjetos aguas arriba del primer objetivo de microscopio 202. El dispositivo de barrido unidireccional comprende, por ejemplo, y sin limitación, una superficie reflectante 235 y medios 237 para hacer girar la superficie reflectante según un eje de rotación perpendicular al eje óptico del primer objetivo del microscopio. El dispositivo de barrido consiste, por ejemplo, en un espejo galvanométrico. El dispositivo de barrido unidireccional de la línea de enfoque está configurado para explorar la línea de enfoque en una dirección lateral (denominada y en el ejemplo de la Fig. 2) sustancialmente perpendicular al eje óptico z de dicho primer objetivo de microscopio.

Es entonces posible, según la presente descripción, producir, mediante la unidad de procesamiento 240, al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* del objeto 10, es decir, una imagen tomográfica bidimensional dispuesta en un plano x , y sustancialmente perpendicular al eje óptico del objetivo del microscopio, a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales del objeto adquiridas por el detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante el barrido unidireccional.

Debido al posicionamiento del dispositivo de barrido unidireccional de la línea de enfoque en el fondo del objeto del microscopio interferométrico 201, se reduce la huella del dispositivo 200 para la adquisición de la imagen frontal.

Según una realización, la superficie reflectante del dispositivo de barrido lineal de enfoque está ópticamente conjugada con la pupila de entrada del primer objetivo de microscopio 202, por ejemplo mediante una lente óptica. De este modo se evita el viñeteado del haz de iluminación en la pupila de entrada del primer objetivo del microscopio y el viñeteado de la luz retrodispersada por el objeto. Sin embargo, esta configuración hace más complejo el montaje y aumenta el tamaño del aparato. Por lo tanto, es preferible, como se ilustra en la Fig. 2, situar la superficie reflectante del dispositivo de barrido aguas arriba del primer objetivo de microscopio 202, cerca del primer objetivo de microscopio para limitar el viñeteado, es decir, lo más cerca posible de la pupila del objetivo, en función de lo que sea accesible a la vista de las limitaciones mecánicas de la integración del dispositivo de barrido.

La unidad de procesamiento 240 está generalmente configurada para implementar etapas del procedimiento según la presente descripción. La unidad de procesamiento 240 puede estar conectada a una pantalla y/o interfaz (no mostrada en la Fig. 2) para interactuar con un usuario. La unidad de procesamiento también puede comprender medios para controlar los medios de rotación 237 de la superficie reflectante y/o medios para controlar otros elementos móviles del dispositivo de microscopía tomográfica según la presente descripción.

Las Fig. 3A y 3B ilustran el filtrado espacial confocal unidimensional en un dispositivo de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal, según un ejemplo de la presente descripción, en dos planos transversales perpendiculares (respectivamente los planos yz y xz que contienen el eje óptico z del objetivo 202 del microscopio). En estas figuras, sólo se muestran los elementos del dispositivo de microscopía tomográfica que son útiles para comprender el filtrado espacial confocal unidimensional.

En este ejemplo, el dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional comprende una lente cilíndrica 212, dispuesta aguas arriba del microscopio interferométrico, que coopera con la fuente de luz de banda ancha para formar una línea de enfoque 301 en el espacio portaobjetos del primer objetivo 202 del microscopio. Al barrer la línea de enfoque, ésta se desplaza sobre una superficie de enfoque, sustancialmente coincidente con una superficie de enfoque. Dicha superficie de enfoque es generalmente plana, sustancialmente coincidente con un plano focal del primer objetivo de microscopio 202 si el haz incidente sobre dicho primer objetivo de microscopio está colimado. La fuente de luz de banda espectral ancha es, por ejemplo, una fuente de luz espacialmente coherente, como un láser *supercontinuum*. Este dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional es ventajoso porque permite iluminar el objeto con una potencia óptica satisfactoria.

La selección de la luz retrodispersada por el objeto 10 y procedente de dicha línea de enfoque 301 para el filtrado espacial confocal unidimensional se obtiene además en este ejemplo mediante una superficie de detección lineal 323 del detector 322, conjugada ópticamente con la línea de enfoque mediante el primer objetivo de microscopio 202 y una lente tubular 221 dispuesta aguas abajo del microscopio interferométrico. La anchura de la superficie de detección 323 se determina en función de la anchura de la imagen de la línea de enfoque en la superficie de detección. De este modo, la superficie de detección lineal se comporta como una ranura de filtro de anchura determinada y, por tanto, forma parte del dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional. Cabe señalar que la selección de la luz retrodispersada por el objeto 10 y procedente de dicha línea de enfoque 301 también puede obtenerse mediante una ranura de filtrado separada de la superficie de detección (no mostrada en el ejemplo de las Fig. 3A, 3B), conjugada ópticamente con la línea de enfoque 301 y la superficie de detección 323.

Así, en el plano yz (Fig. 3A) perpendicular a la ranura de filtrado formada por la superficie de detección 323, sólo la luz procedente de la región del objeto donde la línea de enfoque 301 está formada por la lente cilíndrica 212 y el primer objetivo de microscopio 202 (haz mostrado como línea continua) es detectada por el detector 222, mientras que la luz procedente de otras regiones 302, 303 del objeto (haces con líneas de puntos, por ejemplo) es atenuada muy fuertemente. En un plano paralelo a la ranura de filtrado (plano xz en la Fig. 3B), no se produce tal filtrado.

El filtrado confocal espacial es complementario al filtrado "coherente" resultante de la interferometría de baja longitud de coherencia con una fuente de banda espectral ancha, cuyo principio se ha descrito anteriormente. En concreto, el filtrado confocal mejora el rendimiento de las imágenes interferométricas al eliminar el "fondo" producido por la dispersión de la luz procedente de zonas de la muestra situadas fuera del plano de enfoque y por las reflexiones parásitas. De este modo, se utiliza todo el rango dinámico del detector para detectar la señal interferométrica útil y se mejora la relación señal/ruido. Además, la interferometría -incluso a baja longitud de coherencia- no puede distinguir entre un fotón balístico procedente de la región del objeto fotografiada y un fotón procedente de otras regiones del objeto y que ha recorrido un camino óptico de la misma longitud debido a la dispersión. El resultado es una señal interferométrica espuria que se añade a la señal interferométrica útil, creando artefactos en las imágenes y limitando la profundidad de imagen accesible. En el dispositivo aquí descrito, el filtrado confocal sólo permite el paso de fotones balísticos, eliminando este fondo.

En comparación con el filtrado confocal solo, el uso de la detección interferométrica permite una amplificación considerable de la señal útil (en el caso de la microscopía confocal "pura", es la baja relación señal/ruido la que limita la profundidad de adquisición). En el dispositivo aquí descrito, existe por tanto una sinergia -y no una simple yuxtaposición- entre los dos principios implicados: la microscopía por interferometría de longitud de coherencia corta y la microscopía confocal de ranura.

Las Fig. 4A, 4B y 4C ilustran tres ejemplos de dispositivos de microscopía tomográfica para llevar a cabo procedimientos según la presente descripción.

En estos diagramas, sólo se ilustran los elementos del dispositivo necesarios para comprender el procedimiento según la presente descripción. En particular, no se ilustran los medios de iluminación y el dispositivo de filtrado espacial confocal ni la unidad de procesamiento. Aunque algunos ejemplos sólo se muestran en algunos de los diagramas, los diversos procedimientos descritos anteriormente pueden combinarse.

En estas figuras, los elementos idénticos a los ilustrados en el ejemplo de la Fig. 2 se indican con las mismas referencias y no se describen de nuevo.

La Fig. 4A ilustra un primer ejemplo de un dispositivo en el que el microscopio interferométrico comprende un solo objetivo de microscopio, a saber, el primer objetivo de microscopio 202. El brazo portaobjetos comprende un elemento de compensación de la dispersión cromática (403), por ejemplo una placa de vidrio.

En este ejemplo, la superficie reflectante de referencia 207 es fija.

Cada imagen tomográfica unidimensional se produce en este ejemplo a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por el detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante el barrido unidireccional. Esto es posible gracias a que la superficie reflectante del escáner de línea de enfoque no está ópticamente conjugada con la pupila de entrada del primer objetivo del microscopio. Así, para una pluralidad de diferentes posiciones sucesivas de la línea de enfoque resultantes del barrido de las líneas de observación, los

puntos de las sucesivas imágenes interferométricas adquiridas por el detector tienen diferentes estados de interferencia correspondientes a diferentes diferencias de paso (o desplazamientos de fase) entre la luz del brazo de referencia y la luz del brazo portaobjetos. A partir de la pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales, es posible producir una imagen tomográfica unidimensional.

- 5 En este ejemplo, la ley de variación de la diferencia de paso entre dos adquisiciones de imágenes interferométricas no se conoce de forma tan determinista como cuando, por ejemplo, se desplaza la superficie reflectante de referencia.

Sin embargo, el solicitante ha demostrado que pueden generarse imágenes tomográficas unidimensionales a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales determinando la dispersión entre imágenes sucesivas, como se ha descrito anteriormente.

- 10 La FIG.4B ilustra un segundo ejemplo de dispositivo en el que el microscopio interferométrico es del tipo Linnik y comprende, además del primer objetivo de microscopio 202 en el brazo portaobjetos, un segundo objetivo de microscopio 203 en el brazo de referencia. Ventajosamente, los dos objetivos del microscopio son idénticos.

- 15 En este ejemplo, la superficie reflectante de referencia 207 puede moverse en traslación en una dirección axial z , por medio de medios de desplazamiento unidireccionales para la superficie reflectante de referencia, mostrados en la Fig. 4B por una flecha doble 405, comprendiendo estos medios, por ejemplo, un motor piezoeléctrico.

- 20 En este ejemplo, cada imagen tomográfica unidimensional puede producirse a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por el detector para diferentes posiciones de la superficie de referencia reflectante, dando lugar a diferentes diferencias de recorrido entre la luz procedente del brazo de referencia y la luz procedente del brazo portaobjetos, y por tanto a diferentes estados de interferencia para las diferentes imágenes interferométricas unidimensionales. En estos ejemplos, el desplazamiento de la línea de enfoque durante la producción de una imagen interferométrica unidimensional es ventajosamente sustancial o suficientemente pequeño para no degradar la imagen tomográfica unidimensional así generada.

La Fig. 4C ilustra de nuevo un ejemplo de dispositivo en el que el microscopio interferométrico es del tipo Linnik.

En este ejemplo, la superficie reflectante de referencia 207 es fija.

- 25 En este ejemplo, el microscopio interferométrico comprende una superficie reflectante de retorno 402 dispuesta en el brazo de referencia y medios 406, 408 para desplazar dicha superficie reflectante de retorno según una y /u otra de una dirección axial z , y una dirección lateral (y , en el ejemplo de la Fig. 4C). Los medios de desplazamiento 406, 408 comprenden, por ejemplo, uno o dos actuadores piezoeléctricos.

- 30 Mediante esta disposición particular, es posible obtener cada imagen tomográfica unidimensional a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por el detector para diferentes posiciones de la superficie reflectante de retorno.

- 35 El desplazamiento de la superficie reflectante de retorno 402 permite adquirir una imagen tomográfica unidimensional sin tener que hacer oscilar la superficie de referencia 207. Esto tiene la ventaja, por ejemplo, de limitar el riesgo de variaciones en la intensidad luminosa de la luz emitida por el brazo de referencia cuando se desplaza la superficie reflectante de referencia, en particular cuando la superficie de referencia se encuentra en un plano focal del segundo objetivo 203 del microscopio, como se ilustra en la Fig. 4C, variación que puede deberse a impurezas en la superficie reflectante de referencia.

Además, al eliminar el desplazamiento de la superficie reflectante de referencia 207, el tamaño del dispositivo puede limitarse aún más.

- 40 En los ejemplos ilustrados en las Figs. 4A a 4C, el dispositivo de microscopía tomográfica comprende además medios para desplazar axialmente la línea de enfoque en una dirección paralela al eje óptico z de dicho primer objetivo 202 de microscopio. Esto implica mover la superficie de enfoque para obtener una pluralidad de imágenes *frontales* del objeto 10, según un procedimiento descrito en el presente documento, a diferentes profundidades. A continuación, se puede producir una imagen tridimensional del objeto a observar a partir de la pluralidad de imágenes *frontales*.

- 45 Como se ilustra en las Figs. 4A a 4C, los medios para el desplazamiento axial de la línea de enfoque pueden comprender medios para el desplazamiento solidario de un conjunto 209 que comprende el primer objetivo de microscopio 202 y el divisor de haz 204, en una dirección paralela al eje óptico z del primer objetivo de microscopio 202. Esta configuración es ventajosa porque permite desplazar simultánea y solidariamente la superficie de coherencia y la superficie de enfoque durante el barrido axial, minimizando al mismo tiempo el peso a desplazar. Esto maximiza la velocidad de movimiento y , por tanto, de adquisición.

Por supuesto, pueden preverse otros medios de desplazamiento axial de la línea de enfoque, no representados en las figuras.

Por ejemplo, y de manera no limitativa, los medios para el desplazamiento axial de la línea de enfoque pueden comprender medios para el desplazamiento solidario con un conjunto que comprende el primer objetivo de microscopio 202 y el dispositivo de barrido de la línea de enfoque 235, 237 o con un conjunto que comprende el primer objetivo de microscopio 202 y la superficie de retorno reflectante 402 del brazo de referencia cuando está presente (Fig. 4C), o con un conjunto que comprende todos los elementos del microscopio interferométrico 201.

En los ejemplos citados anteriormente, se elige ventajosamente un objetivo de microscopio de inmersión para el primer objetivo de microscopio 202 y el segundo objetivo de microscopio 203, si está presente. En estos ejemplos, los movimientos de la superficie de coherencia y de la superficie de enfoque son solidarios; la adaptación del índice de refracción del objeto de estudio 10 al del medio en el que está sumergido el primer objetivo del microscopio permite mantenerlos confundidos.

Según otros ejemplos (no representados en las figuras), los medios para el desplazamiento axial de la línea de enfoque pueden comprender medios para el desplazamiento independiente del primer objetivo de microscopio 202, por una parte, y del conjunto formado por el segundo objetivo de microscopio 203, cuando está presente, con la superficie reflectante de referencia 207, por otra parte. Los medios de desplazamiento axial de la línea de enfoque también pueden comprender medios de desplazamiento independiente del primer objetivo de microscopio 202, por un lado, y de la superficie reflectante de retorno 402 dispuesta en el brazo de referencia, por otro (Fig. 4C).

En estos ejemplos, los movimientos de la superficie de coherencia y de la superficie de enfoque están desacoplados y los dos planos pueden moverse en una cantidad diferente para mantenerlos coincidentes.

El solicitante ha demostrado además que, en particular cuando, como se ilustra en las Fig. 4A a 4C, la superficie reflectante 235 del dispositivo de barrido unidireccional de la línea de enfoque no está ópticamente conjugada con la pupila de entrada del objetivo 202 del microscopio, puede introducirse una diferencia de paso (o desplazamiento de fase) durante el barrido, dando lugar a una deformación de la superficie de diferencia de paso cero (superficie de coherencia) con respecto a una superficie perfectamente plana. Como resultado, la imagen *frontal* formada no puede ser perfectamente nítida en todo el campo, porque la superficie de enfoque es plana y no tiene una gran profundidad de campo debido al uso de objetivos con una gran apertura numérica (normalmente entre 0,3 y 0,8).

Con el fin de compensar el desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de la línea de enfoque y hacer coincidir la superficie de coherencia y la superficie de enfoque, el procedimiento de microscopía según la presente descripción puede comprender además, para cada imagen de la pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales, la introducción de un desplazamiento axial adicional de la superficie reflectante de referencia 207 (Fig. 2) o de dicha superficie reflectante de referencia 402 (Fig. 4C).

Las Fig. 5A a 5C son diagramas que muestran, por ejemplo, el barrido unidireccional de la línea de enfoque en función del tiempo (Fig. 5A), y diagramas (Figs. 5B, 5C) que muestran, en dos ejemplos, secciones transversales de la superficie de coherencia cuando la línea de enfoque se desplaza lateralmente según el barrido mostrado en la Fig. 5A, con o sin compensación.

Las Fig. 6A y 6B muestran diagramas que ilustran los planos de coherencia (610) y enfoque (612) en la muestra, con y sin compensación. En el ejemplo de las Fig. 6A, 6B, la superficie reflectante de referencia 207 está desplazada, pero el efecto deseado sería el mismo si la superficie reflectante de retorno estuviera desplazada.

Más concretamente, en el ejemplo de la Fig. 5B, la superficie de coherencia, cuando la línea de enfoque se desplaza lateralmente según el barrido ilustrado en la Fig. 5A, está representada por la curva 510. La posición de la diferencia de paso cero se representa a 100 μm de profundidad para una posición de la línea de enfoque $y=0$. Como se muestra en la Fig. 5B, la superficie de coherencia es sustancialmente parabólica cuando no se aplica ningún desplazamiento de fase de compensación. Con compensación, por ejemplo mediante una variación de la posición axial de la superficie reflectante de referencia representada en la Fig. 5B por la curva 512, la superficie de coherencia, ilustrada por la curva 514, es sustancialmente plana y coincide con la superficie de enfoque.

Como se muestra en las Figs. 6A, 6B, la superficie reflectante de referencia 207 se controla dinámicamente, por ejemplo mediante un transductor piezoeléctrico 405, para introducir un desplazamiento de fase durante el movimiento del espejo de barrido 235 que permite mantener la posición de la diferencia de recorrido cero del interferómetro a nivel del objeto (curva 610) en un plano 612 sustancialmente perpendicular al eje óptico del objetivo de microscopio 202. Figs. 6A, 6B representan en particular tres posiciones (1, 2, 3) del espejo de barrido, asociadas a tres posiciones de la superficie de referencia para la corrección de la planitud de la superficie de coherencia (superficie de diferencia nula de velocidad de desplazamiento).

El transductor piezoeléctrico 405 puede seguir una ley cuya frecuencia es igual a la del espejo de barrido 235, y cuya amplitud y forma se calibran según la amplitud y forma de la desviación de la posición de diferencia de recorrido cero con respecto al plano perpendicular al eje óptico de la lente objeto, en función de la posición de la línea de enfoque. Esta desviación puede evaluarse previamente para aplicar una ley adecuada al transductor piezoeléctrico. Esta desviación es independiente de la muestra, y depende únicamente de la posición del espejo de barrido 235 con

respecto al objetivo del microscopio 202. Una vez determinada la ley adaptada, teórica o empíricamente, ya no es necesario ajustarla.

Como se ilustra en la Fig. 5C, para simplificar el accionamiento y el ajuste del transductor piezoeléctrico 207, también es posible introducir un desplazamiento de fase 520 que varía paso a paso (accionamiento por pasos del transductor piezoeléctrico), con varios puntos de funcionamiento durante el movimiento del espejo de barrido 237. Estos puntos de funcionamiento se eligen de forma que la sonda interferométrica se mantenga en un paralelepípedo 524 cuya altura (según el eje óptico del objetivo 202 del microscopio) se considere aceptable desde el punto de vista de la nitidez de la imagen (por tanto, en relación con la profundidad de campo del objetivo del microscopio).

La Fig. 7 representa una imagen *in vivo* 710 de una muestra, obtenida mediante un ejemplo de procedimiento según la presente descripción, sin compensación. La imagen 710 se obtiene con una muestra formada a partir del dorso de la mano de un hombre de 25 años, sobre un campo de $1,2 \times 1,2 \text{ mm}^2$, con un barrido del espejo de barrido 237 a una frecuencia de 7 Hz.

En las regiones 712 y 714 de la imagen 710, se puede ver el *stratum granulosum* (con células), y en la región 716, se puede ver el *stratum corneum* (sin células), aunque estas capas estén físicamente a diferentes profundidades. Esta imagen ilustra claramente que la superficie de coherencia, que es la superficie que puede observarse realmente, no es necesariamente perfectamente plana.

La compensación permite aislar estas regiones.

De este modo, las imágenes 720 y 730 corresponden a imágenes del mismo campo, obtenidas con compensación para hacer coincidir la superficie de coherencia con la superficie de enfoque a dos profundidades respectivamente. Las dos zonas fotografiadas son el *stratum corneum* 720 y el *stratum granulosum* 730.

La compensación se obtiene haciendo oscilar la superficie de referencia (placa de vidrio) a 7 Hz, según una ley similar a la mostrada en la Fig. 5B (512). Las imágenes tomográficas unidimensionales se obtienen añadiendo una oscilación sinusoidal de alta frecuencia (10 kHz) a la señal de compensación.

Aunque se describe mediante un cierto número de realizaciones, el procedimiento y el dispositivo para microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal según la presente descripción comprende diversas variantes, modificaciones y mejoras que serán evidentes para el experto en la materia, siempre que estas variantes, modificaciones o mejoras se deriven de las reivindicaciones.

Referencias

Ref 1.: D. Huang et al, "Optical coherence tomography" Science 254(5035), 1178-1181 (1991)

Ref. 2 : A. F. Fercher et al. "Tomografía de coherencia óptica - principios y aplicaciones", Reports on Progress in Physics 66 (2003) 239 - 303

Ref. 3 : J. A. Izatt, et al, "Optical coherence microscopy in scattering media", OPTICS LETTERS / Vol. 19, No. 8 / 15 de abril (1994)

Ref 4.: Y. Chen et al. "Microscopía de coherencia óptica de barrido lineal de alta resolución", Optics Letters, Vol. 32, N°14, 1971 - 1973 (2007)

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (200) de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal, que comprende:

una fuente de luz de banda espectral ancha (210);
 un detector (222) con una superficie de detección lineal (223);
 un microscopio interferométrico (201) que comprende un brazo de referencia en cuyo extremo está dispuesta una superficie reflectante de referencia (207), un brazo portaobjetos configurado para recibir un objeto del que se desea obtener una imagen (10), un divisor de haz (204) que acopla dichos brazos portaobjetos y de referencia a dicha fuente de luz y a dicho detector, y al menos un primer objetivo de microscopio (202) dispuesto en dicho brazo portaobjetos;
 un dispositivo de filtrado espacial confocal unidimensional (212, 223) configurado para cooperar con dicha fuente de luz para iluminar dicho objeto a lo largo de una línea de enfoque situada en un espacio portaobjetos de dicho primer objetivo de microscopio, y configurado para seleccionar la luz retrodispersada por dicho objeto y procedente de dicha línea de enfoque para formar una imagen unidimensional de dicha línea de enfoque en la superficie de detección;
 un dispositivo de barrido unidireccional (235, 237) de dicha línea de enfoque que comprende una superficie reflectante y medios para hacer girar la superficie reflectante según un eje de rotación sustancialmente perpendicular a un eje óptico (z) del primer objetivo de microscopio, estando dicha superficie reflectante dispuesta en dicho brazo portaobjetos, aguas arriba de dicho primer objetivo de microscopio, de modo que el brazo portaobjetos no comprende ningún elemento óptico para la conjugación óptica de la superficie reflectante con una pupila de entrada del primer objetivo de microscopio, estando configurado el dispositivo de barrido unidireccional para un barrido de la línea de enfoque según una dirección lateral (y) sustancialmente perpendicular al eje óptico (z) de dicho primer objetivo de microscopio;
 una unidad de procesamiento (240) configurada para producir al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a observar, dispuesta en un plano (x, y) sustancialmente perpendicular a dicho eje óptico del objetivo del microscopio, a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales del objeto producidas por el microscopio interferométrico para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante dicho barrido unidireccional y adquiridas por dicho detector.

2. Dispositivo de microscopía según la reivindicación 1, en el que dicha unidad de procesamiento está configurada para:

producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, siendo cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales producida a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante dicho barrido unidireccional; y
 producir dicha imagen tomográfica bidimensional frontal de dicho objeto a partir de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales.

3. Dispositivo de microscopía según la reivindicación 1, que comprende además:

medios (401) para el desplazamiento unidireccional de dicha superficie reflectante de referencia según una dirección axial (z_r); y en el que dicha unidad de procesamiento está configurada para:

producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, siendo producida cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de la superficie reflectante de referencia; y
 producir dicha imagen tomográfica bidimensional frontal de dicho objeto a partir de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales.

4. Dispositivo de microscopía según la reivindicación 3, en el que:

para cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales, dichos medios para desplazar dicha superficie reflectante de referencia están configurados para introducir además un desplazamiento axial adicional de dicha superficie reflectante de referencia que permite compensar un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de la línea de enfoque.

5. Dispositivo de microscopía según la reivindicación 1, que comprende además:

una superficie reflectante de retorno (402) dispuesta en el brazo de referencia y medios para desplazar (406, 408) dicha superficie reflectante de retorno según una cualquiera de una dirección axial (z_r) y una dirección lateral (y_r); y en el que:

dicha unidad de procesamiento está configurada para:

producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, siendo cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales producida a partir de una pluralidad de

imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha superficie reflectante de retorno; y
producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales.

- 5 6. Dispositivo de microscopía según la reivindicación 5, en el que:
para cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales, dichos medios para desplazar dicha superficie reflectante de retorno están configurados para introducir además un desplazamiento adicional de dicha superficie reflectante de retorno que permite compensar un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de línea de enfoque.
- 10 7. Dispositivo de microscopía según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un dispositivo de compensación de la dispersión cromática (403) dispuesto en uno cualquiera de dichos brazos portaobjetos y de referencia.
8. Dispositivo de microscopía según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho microscopio interferométrico es un microscopio Linnik, que comprende además un segundo objetivo de microscopio (203),
15 dispuesto en dicho brazo de referencia, estando dichos brazos de referencia y portaobjetos separados entre sí.
9. Dispositivo de microscopía según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además:
medios para desplazar axialmente dicha línea de enfoque según una dirección paralela a dicho eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio para desplazar dicha línea de enfoque en profundidad en el objeto; y en
20 el que :
la unidad de procesamiento está configurada para producir además una imagen tridimensional de dicho objeto a observar, a partir de una pluralidad de imágenes *frontales* producidas para diferentes profundidades de la línea de enfoque.
10. Dispositivo de microscopía según la reivindicación 9, en el que:
dichos medios de desplazamiento axial de la línea de enfoque comprenden medios (208) de desplazamiento solidario
25 de un conjunto (209) que comprende dicho primer objetivo de microscopio y dicho divisor de haz, en una dirección paralela a dicho eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio.
11. Procedimiento de microscopía tomográfica de coherencia óptica de barrido lineal, que comprende:
formar un haz de iluminación mediante una fuente de luz de banda espectral ancha (210);
30 dividir el haz de iluminación, por medio de un divisor de haz (204), en una primera fracción de luz y una segunda fracción de luz, enviándose dicha primera fracción de luz a un brazo de referencia en cuyo extremo se dispone una superficie reflectante de referencia (207), enviándose dicha segunda fracción de luz a un brazo portaobjetos que recibe un objeto del que se desea formar una imagen (10);
enfocar dicha segunda fracción de luz, por medio de un primer objetivo de microscopio (202) dispuesto en dicho brazo portaobjetos y que coopera con un dispositivo de filtrado espacial confocal, con el fin de iluminar
35 dicho objeto del que se desea formar una imagen a lo largo de una línea de enfoque situada en un espacio portaobjetos de dicho objetivo de microscopio;
seleccionar, mediante dicho dispositivo de filtrado espacial confocal, la luz retrodispersada por el objeto y procedente de dicha línea de enfoque para formar una imagen unidimensional de dicha línea de enfoque en una superficie de detección lineal (223) de un detector (222);
40 combinar, mediante dicho divisor de haz, la luz retrodispersada por el objeto así seleccionado y la luz resultante de la reflexión de dicha primera fracción de luz por la superficie reflectante del brazo de referencia, para generar una imagen interferométrica unidimensional;
barrido unidireccional de dicha línea de enfoque en una dirección lateral (y) sustancialmente perpendicular a un eje óptico (z) de dicho primer objetivo de microscopio, mediante un dispositivo de barrido (235, 237) que
45 comprende una superficie reflectante y medios para hacer girar la superficie reflectante según un eje de rotación sustancialmente perpendicular a dicho eje óptico del primer objetivo de microscopio, estando dicha superficie reflectante dispuesta en dicho brazo portaobjetos aguas arriba de dicho primer objetivo de microscopio, de manera que el brazo portaobjetos no comprende ningún elemento óptico para la conjugación óptica de la superficie reflectante con una pupila de entrada del primer objetivo de microscopio;
50 producir, mediante una unidad de procesamiento (240), al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a observar, dispuesta en un plano (x, y) sustancialmente perpendicular a dicho eje óptico del objetivo del microscopio, a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante dicho barrido unidireccional.
- 55 12. Procedimiento de microscopía según la reivindicación 11, en el que la producción de dicha al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto comprende:

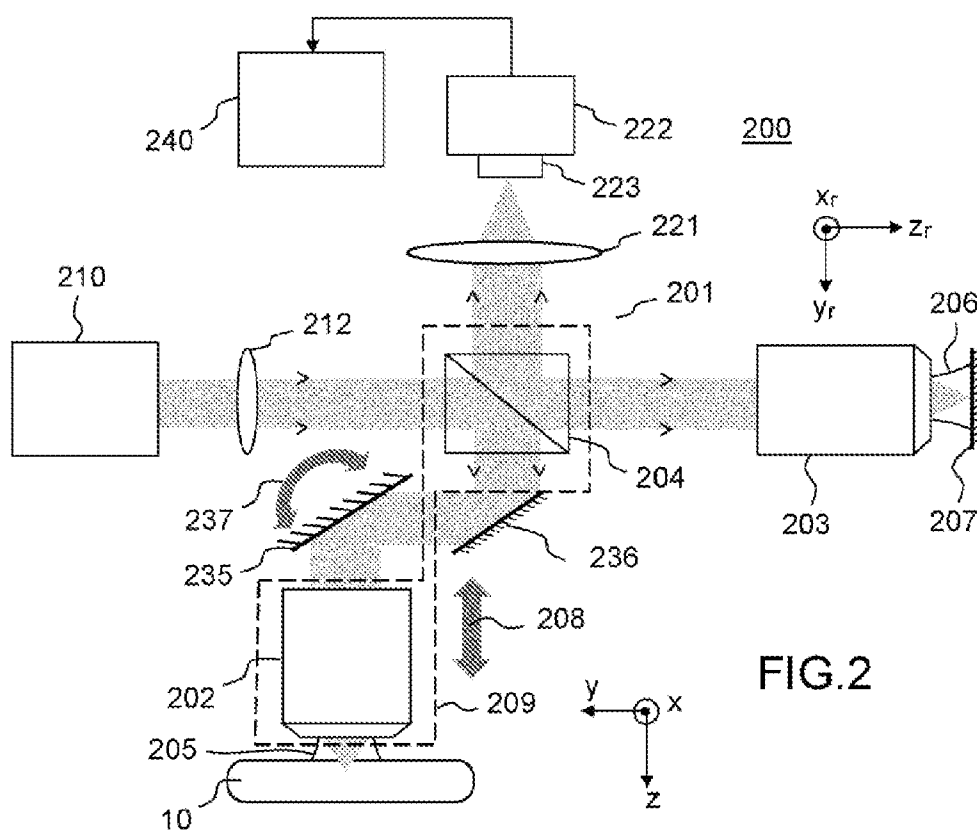
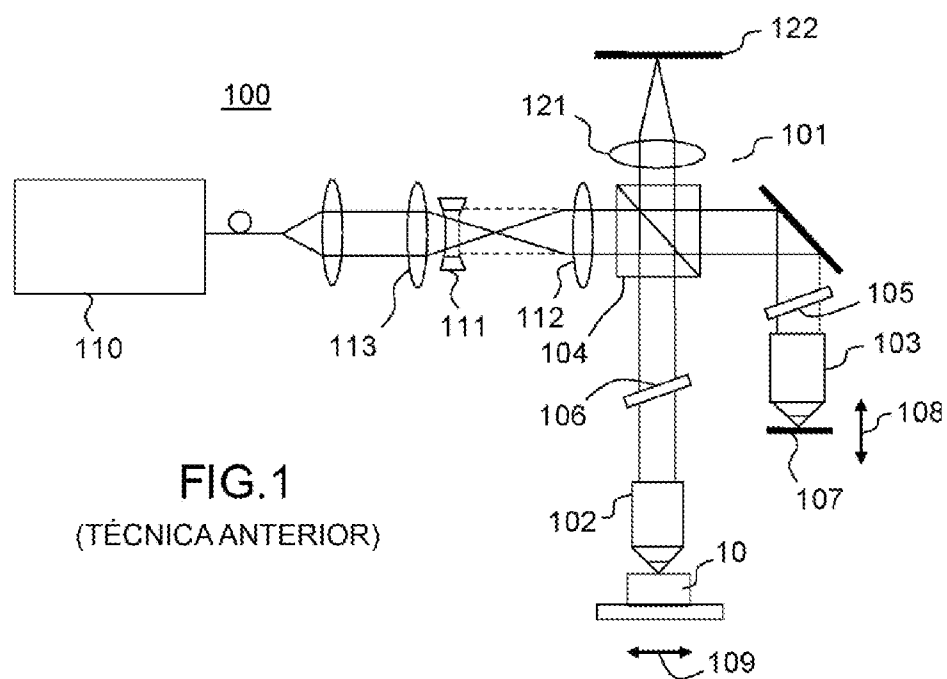
5 producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, estando cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales producida a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de dicha línea de enfoque durante dicho barrido unidireccional; y
 producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales.

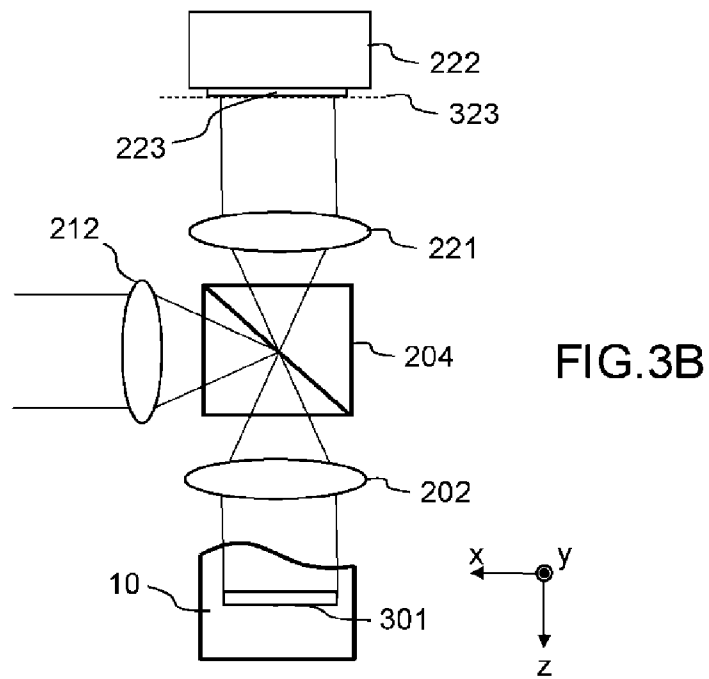
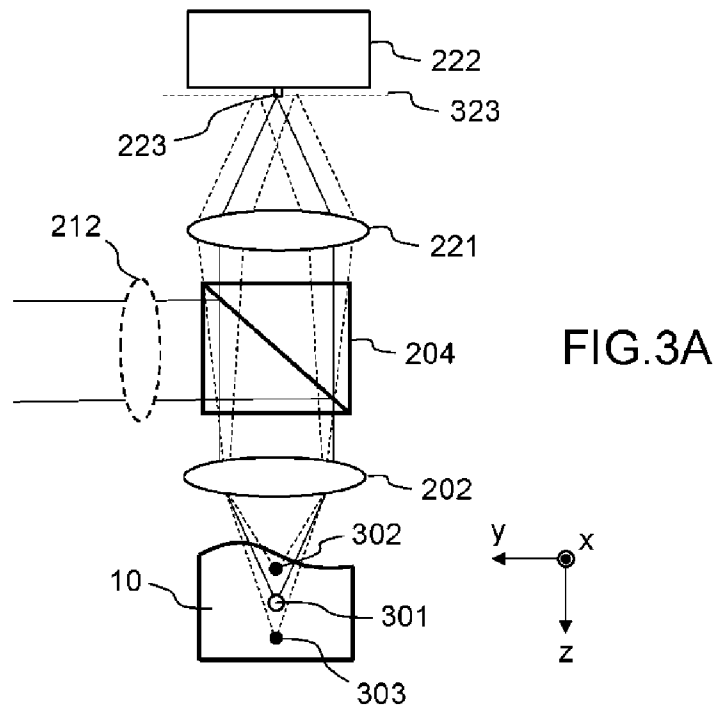
13. Procedimiento de microscopía según la reivindicación 11, en el que la producción de dicha al menos una imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto comprende:

10 producir una pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales de dicho objeto, produciéndose cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales a partir de una pluralidad de imágenes interferométricas unidimensionales adquiridas por dicho detector para diferentes posiciones de la superficie reflectante de referencia (207) o para diferentes posiciones de una superficie reflectante de retorno (402) dispuesta en el brazo de referencia; y
 15 producir dicha imagen tomográfica bidimensional *frontal* de dicho objeto a partir de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales.

14. Procedimiento de microscopía según la reivindicación 13, que comprende además:
 para cada imagen de dicha pluralidad de imágenes tomográficas unidimensionales, introducir un desplazamiento axial adicional de dicha superficie reflectante de referencia o de dicha superficie reflectante de retorno, para compensar un desplazamiento de fase introducido por el dispositivo de barrido de la línea de enfoque.

20 15. Procedimiento de microscopía según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende además:
 el desplazamiento axial de dicha línea de enfoque en profundidad en el objeto, en una dirección paralela a dicho eje óptico de dicho primer objetivo de microscopio;
 la producción de una imagen tridimensional de dicho objeto a observar, a partir de una pluralidad de imágenes *frontales* producidas para diferentes profundidades de la línea de enfoque.





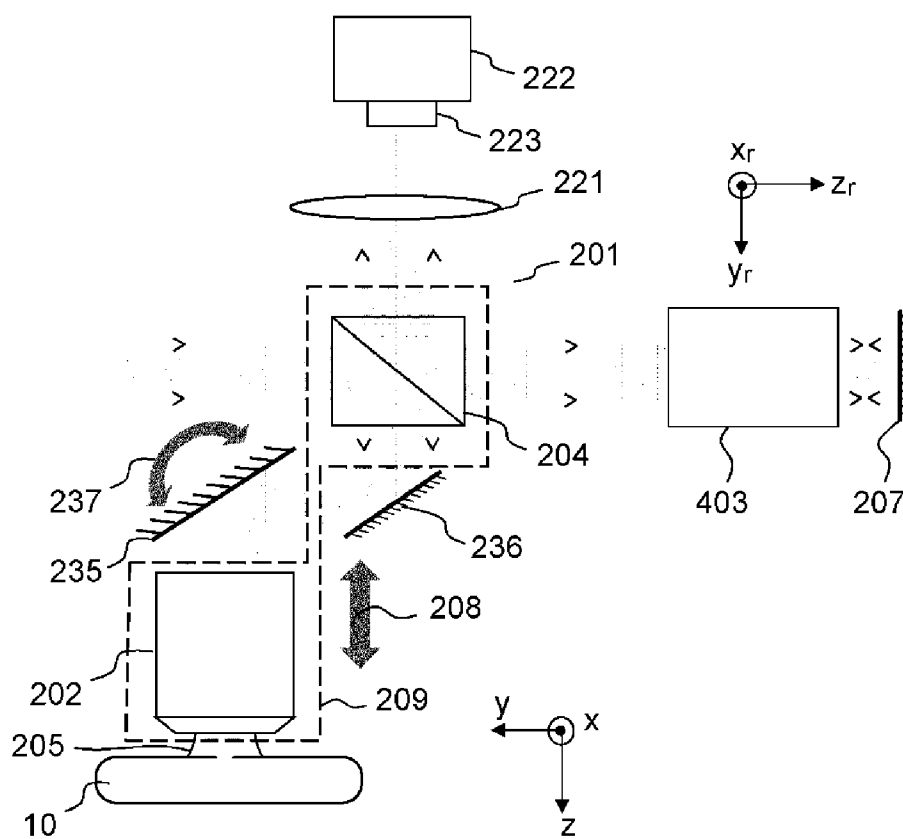


FIG.4A

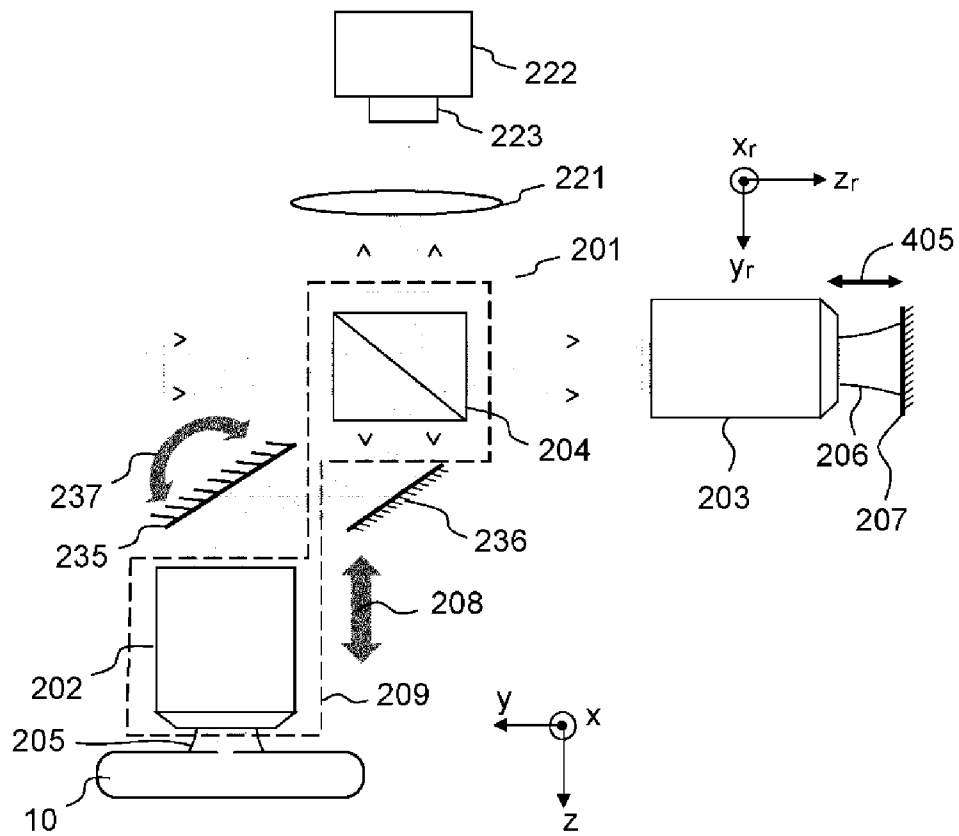


FIG. 4B

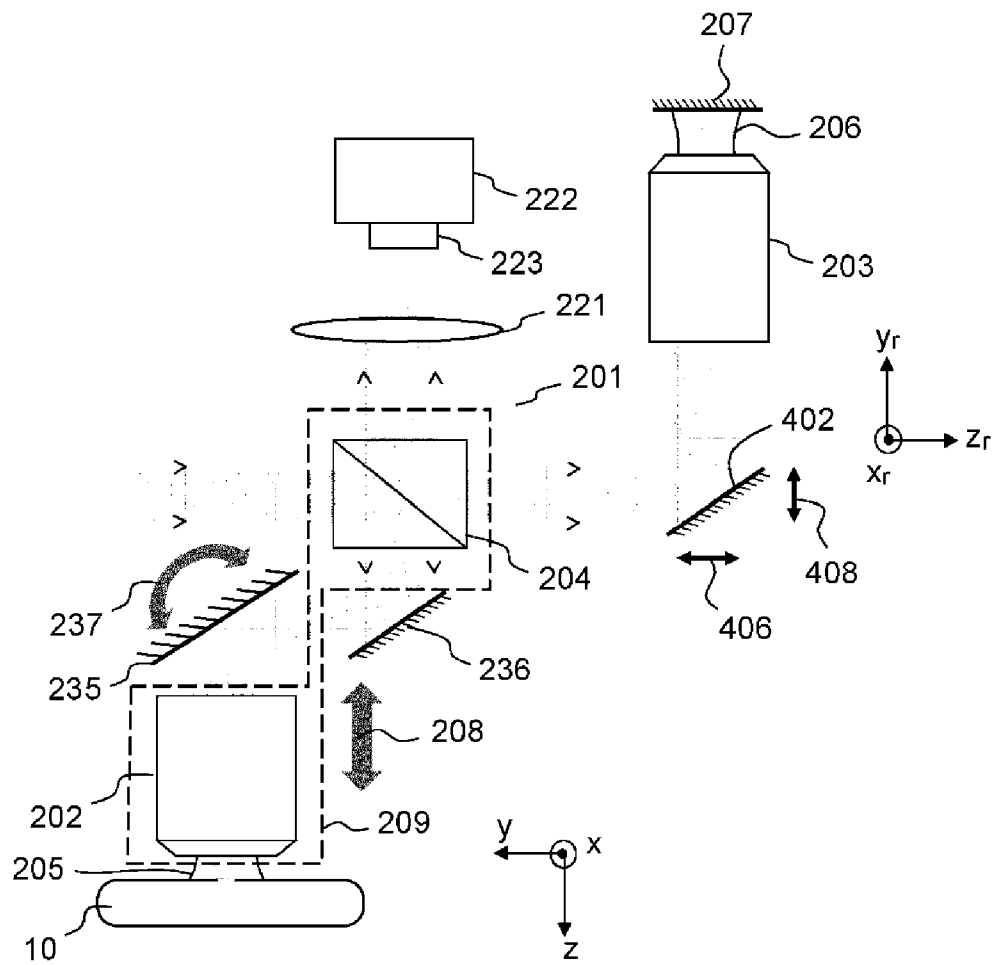


FIG. 4C

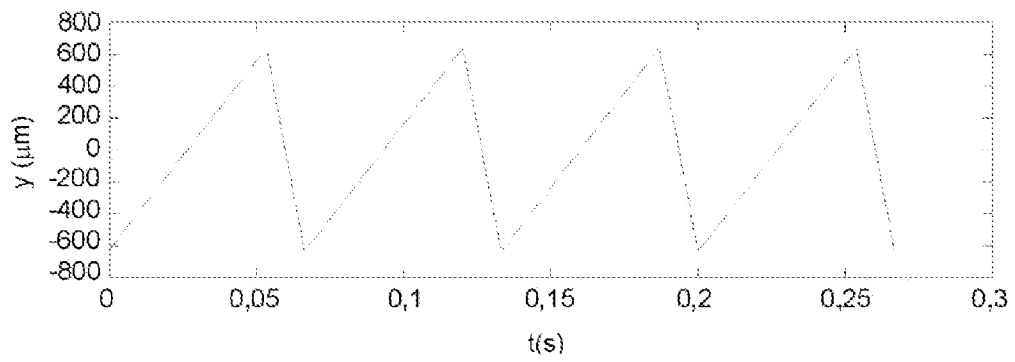


FIG.5A

FIG.5B

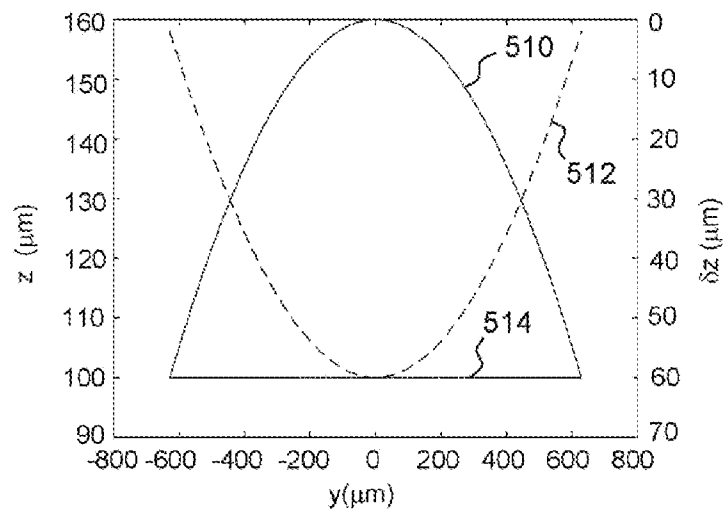
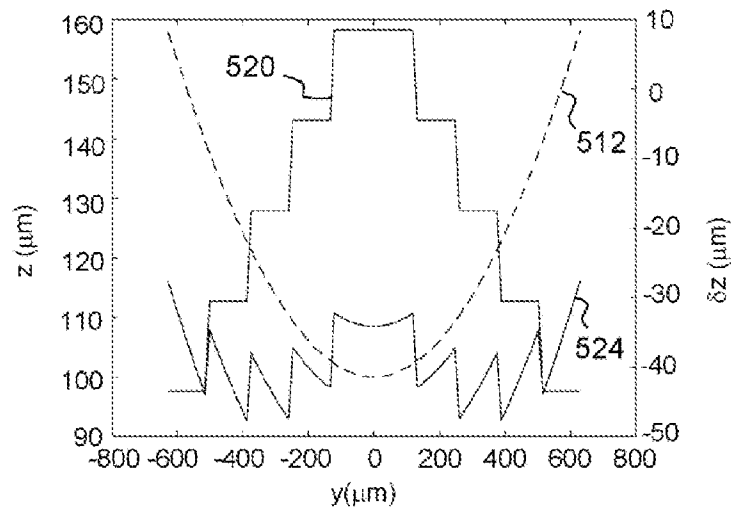


FIG.5C



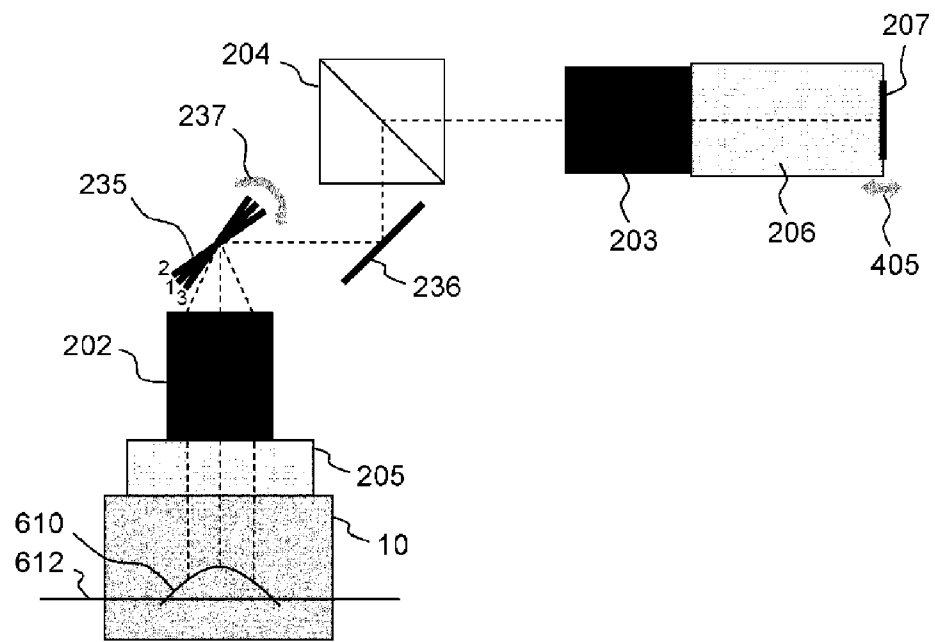


FIG. 6A

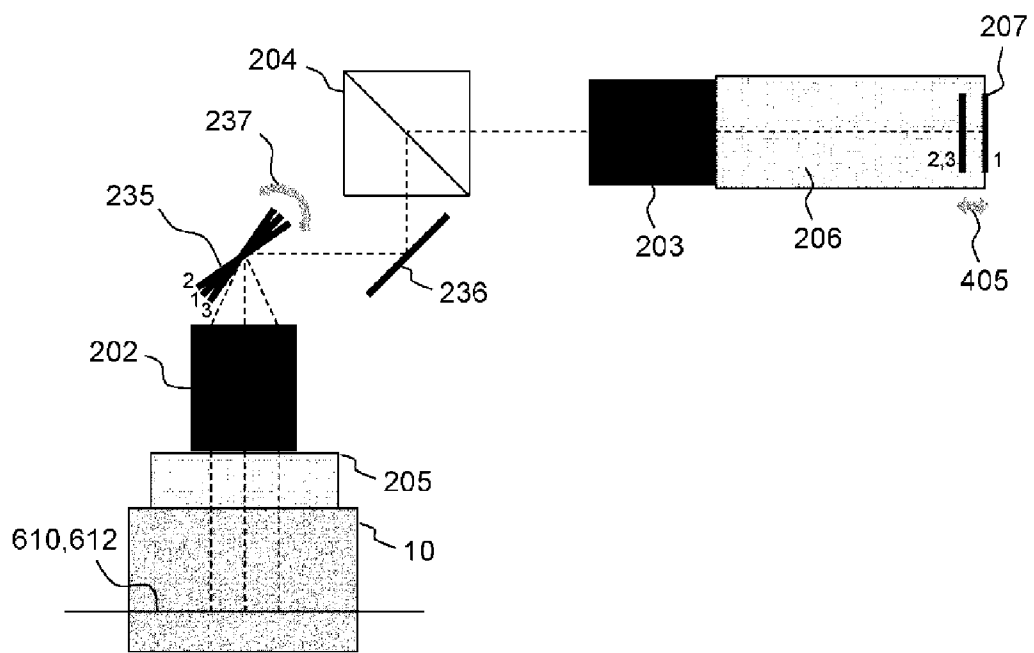


FIG. 6B

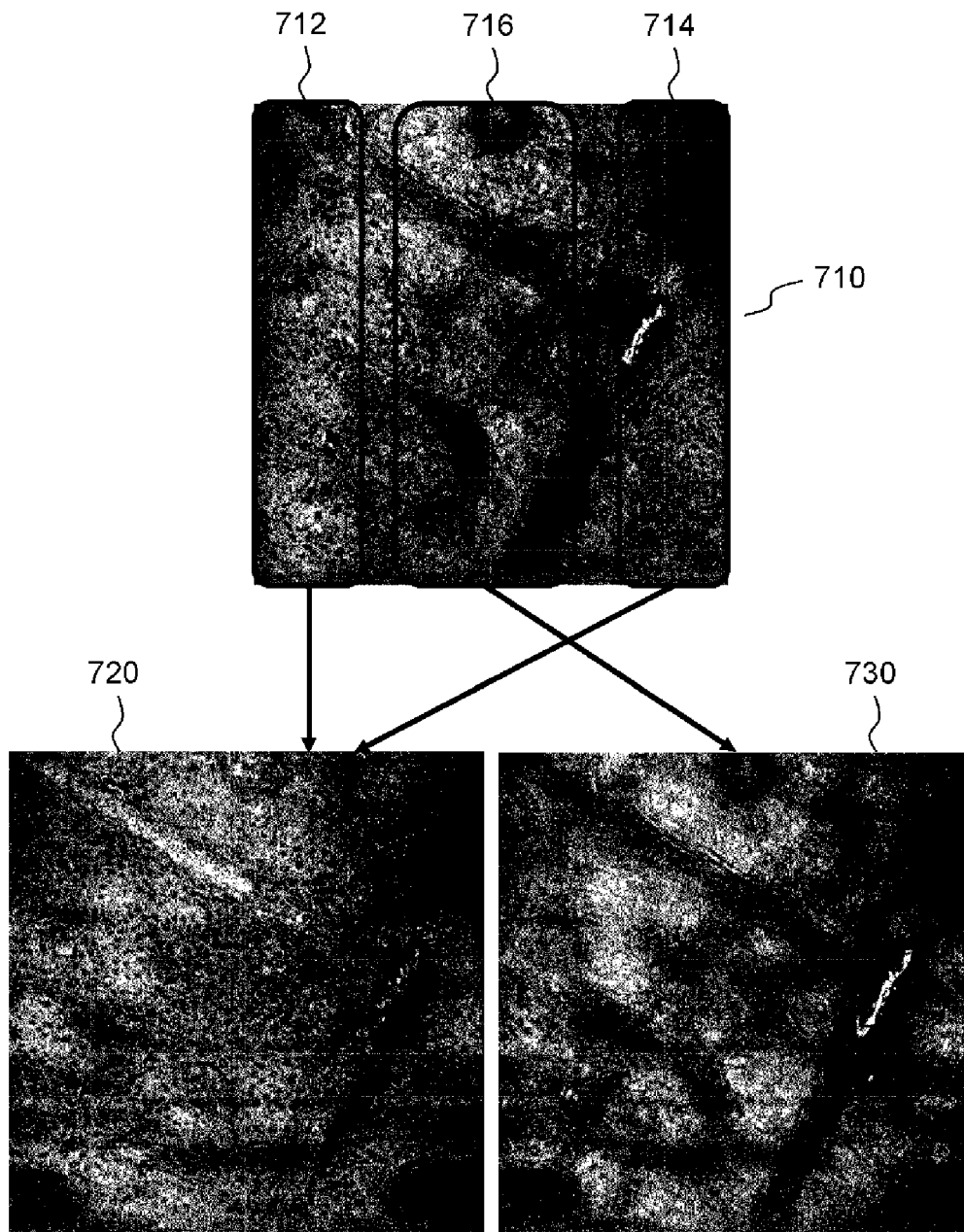


FIG.7