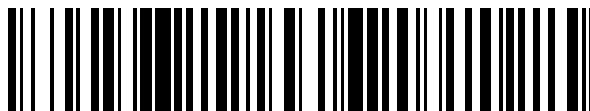


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 742**

21 Número de solicitud: 201830912

51 Int. Cl.:

G02B 21/00

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

21.09.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.03.2020

Fecha de concesión:

26.03.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.04.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID (100.0%)
Av. Gregorio Peces Barba, 1
28919 Leganés (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

RIPOLL LORENZO, Jorge

54 Título: **Microscopio y procedimiento de haz láser plano para muestras extensas**

57 Resumen:

La invención describe un microscopio (1) de haz láser plano para muestras extensas que comprende una cubeta (2), un emisor de láser, y un conjunto óptico (5) que recibe la emisión de fluorescencia de la muestra (M). El conjunto óptico comprende: una matriz (51) de lentes situada adyacente a una cara de la cubeta (2); una lente de tubo (52) que abarca varias lentes (51a) de la matriz (51) de lentes; un conjunto (53) de espejos galvanométricos que transmite a una unidad (54) de enfoque una sub-imagen de la muestra (M) recibida de la lente de tubo (52); y la unidad (54) de enfoque que enfoca la sub-imagen sobre un sensor de cámara (55). Así, seleccionando de manera sucesiva varias lentes (51a), y realizando un barrido de la muestra (M) para cada una de dichas lentes (51a), se construye una imagen 3D completa de la muestra (M).

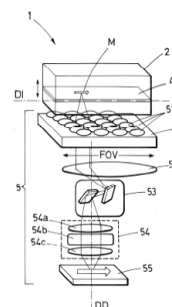


FIG.3a

ES 2 749 742 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Microscopio y procedimiento de haz láser plano para muestras extensas

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la microscopía, y más particularmente a la microscopía de iluminación de haz láser plano usada para la obtención de imágenes de varias muestras transparentes o semi-transparentes tales como embriones, tejidos y otras
10 muestras biológicas.

Un primer objeto de la presente invención es un nuevo microscopio de haz láser plano particularmente diseñado para permitir la obtención de imágenes 3D de muestras de gran tamaño sin necesidad de desplazar la muestra.

15

Un segundo objeto de la presente invención es un procedimiento de operación del nuevo microscopio de haz láser plano mencionado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

Los estudios de embriones y muestras biológicas similares a través de microscopio óptico presentan, a diferencia de lo que sucede con células individuales, problemas particulares relacionados con la absorción de la luz y la pérdida de resolución debida a la dispersión de la luz. Para solucionar estos problemas, en los últimos años se han desarrollado mejoras
25 importantes sobre los microscopios de haz láser plano, cuya invención data del 1903.

Un microscopio de haz láser plano está formado fundamentalmente por una cámara acoplada a un objetivo de alta apertura numérica y dispuesta según una dirección denominada "*dirección de detección*", y un medio de iluminación capaz de emitir una lámina delgada de luz según una dirección denominada "*dirección de iluminación*" que es perpendicular a la dirección de detección, siguiendo la configuración original de Siedentopf y Zsigmondy acoplada a una cámara de detección. Con esta configuración, la cámara puede obtener una imagen 2D de fluorescencia de la parte de la muestra iluminada por la lámina o plano de iluminación. Si además se desplaza la muestra en la dirección del eje de detección
30 y se toman varias imágenes 2D en diferentes posiciones, se genera un conjunto o pila de imágenes 2D donde cada una de las imágenes 2D corresponde a una posición del plano de
35

iluminación con respecto a la muestra. Esta pila de imágenes 2D contiene información de la posición en z (profundidad de la muestra según la dirección de detección) obtenida al mover la muestra, y de las posiciones x e y, presentes en cada imagen 2D. La pila de imágenes 2D puede entonces fusionarse para generar una imagen 3D de la muestra, como se describe en el documento US 7,554,725 de Stelzer et al. Posteriormente, se propuso hacer rotar la muestra alrededor de su propio eje, normalmente vertical, para captar varias pilas de imágenes 2D (comúnmente denominadas “medidas angulares”) y fusionarlas posteriormente, lo que permite mejorar la anisotropía y la calidad de las imágenes (S. Preibisch et al, Nature Methods 7 (2010)).

Desde el año 2015, los inventores de la presente solicitud han presentado varias solicitudes de patente dirigidas a diversas mejoras en este tipo de microscopios. Estas solicitudes de patente son las siguientes:

PCT/ES2015/070455 titulada “*Microscopio y procedimiento para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras*” que describe un nuevo microscopio que combina la técnica de haz láser plano de tipo SPIM (Selective Plane Illumination Microscope) con la técnica de la tomografía de proyección óptica (OPT, Optical Projection Tomography).

PCT/ES2016/070714, titulada “*Dispositivo de carga múltiple para microscopio de haz láser plano*” que describe un dispositivo de carga múltiple para la alimentación a un microscopio de haz láser plano de un flujo continuo y secuencial de muestras.

PCT/ES2017/070028, titulada “*Dispositivo automático de cambio de objetivo para microscopio de haz láser plano*”, que describe un dispositivo que permite cambiar de manera automática el objetivo de adquisición de imágenes de un microscopio de haz láser plano en función de la magnificación deseada en cada momento.

PCT/ES2017/070028, titulada “*Dispositivo rotativo de cambio de objetivo para microscopio de haz láser plano*”, que describe un dispositivo donde el cambio de objetivo se realiza a través de rotaciones de la propia cubeta.

PCT/ES2017/070184 titulada “*Dispositivo de sujeción de muestras para microscopio*”, que describe un dispositivo para poder montar las muestras y medirlas

en un equipo de haz láser plano.

Para una comprensión más clara de esta técnica, se adjuntan las Figs. 1a y 1b que muestran un primer ejemplo de microscopio (100) de haz láser plano. La muestra (107) se dispone en un soporte (101) dentro de una cubeta (102) rellena con un líquido. Un haz (103) de iluminación lineal Gaussiano, Bessel, Airy o similar, incide sobre una lente (104) cilíndrica que lo enfoca gracias a un objetivo (105) de iluminación para generar la lámina (106) de iluminación plana vertical. Esta lámina (106) de iluminación plana vertical incide sobre la muestra (107) según la dirección de iluminación (DI), y la luz fluorescente (108) emitida por ese plano concreto de la muestra (107) es recogida por un objetivo (109) de detección orientado según la dirección de detección (DD), que es perpendicular a la dirección de iluminación (DI). El soporte (101) puede girar alrededor de su eje vertical para permitir la toma de varias medidas angulares de acuerdo con la técnica propuesta por Preibisch.

En el año 2013, el artículo de F. O. Farbach et al titulado "*Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens*", Optics Express, Vol. 21, Issue 18, pp. 21020-21026 describe una mejora de esta técnica consistente en la introducción de una lente tuneable con el propósito de evitar la necesidad de desplazar la muestra o el objetivo para enfocar la imagen 2D obtenida a medida que el haz láser se desplaza a lo largo de la dirección de detección.

Para una comprensión más precisa de esta configuración, la Fig. 2 muestra un segundo ejemplo de microscopio (200) de haz láser plano según la técnica anterior dotado de lente tuneable (212) donde se han asignado números de referencia similares a partes equivalentes a las mostradas en las Figs. 1a y 1b. En la Fig. 2, el conjunto de cubeta (202) y haz láser plano (206) se han dibujado de manera esquemática, aunque debe suponerse que incluye todos los elementos mostrados en las Figs. 1a y 1b. El objetivo (209) tiene una lente tuneable eléctricamente (ETL, Electrically Tuneable Lens) que recibe la luz emitida por la muestra (207) a lo largo de la dirección de detección (DD) y la transmite a lo largo de un conjunto de lentes diseñadas para enfocar la imagen de la muestra (207) sobre el sensor (214) de una cámara. Concretamente, unas primera y segunda lentes (210, 211) transmiten la imagen de la muestra (207) hasta la lente tuneable (212). La lente tuneable (212) tiene la característica de permitir la modificación de su distancia focal, de tal modo que la imagen de la muestra (207) puede enfocarse adecuadamente independientemente de la posición concreta del haz láser plano (206) en cada momento. Una tercera lente (213) vuelve a transmitir la imagen ya enfocada hasta el sensor (214) de la cámara, donde finalmente la imagen es captada

Sin embargo, a pesar de estas y otras mejoras, sigue siendo un inconveniente la necesidad de mover físicamente la cubeta (202) cuando el tamaño de la misma es mayor que el campo de visión (FOV, Field Of View) de la lente ETL presente en el objetivo (209). En el ejemplo
5 mostrado en la Fig. 2, si suponemos que la muestra tiene un tamaño en el plano perpendicular a la dirección de detección (DD) de 1 cm x 1 cm y se usa un objetivo (209) 10x con un campo de visión de 1 mm x 1 mm, sería necesario desplazar 100 veces la cubeta (202) con la muestra (207). Puesto que cada movimiento supone al menos 2 segundos, se aprecia la gran cantidad de tiempo que requiere la obtención de la imagen 3D
10 de una muestra de este tamaño.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención resuelve el problema anterior gracias a la sustitución de la lente única
15 empleada hasta ahora por una matriz de lentes capaces de abarcar la totalidad de la muestra. Un mecanismo de selección basado en el uso de espejos galvanométricos permite transmitir al sistema óptico que construye la imagen de la muestra la sub-imagen obtenida por una lente individual de entre la pluralidad de lentes de la matriz. De este modo, es posible realizar un barrido láser para cada una de las lentes de la matriz de lentes y construir
20 así una imagen completa de la muestra, incluso cuando ésta tiene un tamaño muy grande, a partir de la pluralidad de sub-imágenes obtenidas.

Un primer aspecto de la presente invención está dirigido a un microscopio de haz láser plano para muestras extensas. El microscopio comprende una cubeta configurada para
25 alojar una muestra, un emisor de láser configurado para emitir un haz de láser plano a lo largo de una dirección de iluminación, y un conjunto óptico dispuesto a lo largo de una dirección de detección perpendicular al haz de láser plano configurado para recibir la emisión de fluorescencia de la muestra causada por dicho haz láser plano. Se trata hasta ahora de los elementos que incluye un microscopio de haz láser plano convencional.
30 Aunque no se describe de manera específica cada uno de estos elementos, debe entenderse que el microscopio de la presente invención incluye todos los elementos descritos en el apartado relativo a la técnica anterior, en particular aquellos elementos mencionados en las Figs. 1 y 2, a no ser que se indique explícitamente lo contrario o bien ello se deduzca claramente del contexto en cada momento.

35 El microscopio de la presente invención se diferencia principalmente de la técnica anterior

en la configuración del conjunto óptico, que en este caso comprende una matriz de lentes, una lente de tubo, un conjunto de espejos galvanométricos, y una unidad de enfoque. A continuación, se describe cada uno de estos elementos con mayor detalle.

5 a) Matriz de lentes

10 Se trata de una matriz de lentes donde cada lente tiene un campo de visión sustancialmente menor que el tamaño de la cubeta y eje paralelo a la dirección de detección. Esta matriz de lentes está situada en una posición adyacente a una cara de la cubeta.

15 Es decir, el campo de visión total de la matriz de lentes será la suma de los campos de visión de cada una de las lentes individuales. Esto permite incrementar indefinidamente el campo de visión del microscopio, ya que basta añadir más lentes a la matriz para abarcar cubetas arbitrariamente más grandes. Por ejemplo, puede utilizarse una matriz de 5x5 cm formada por 250x250 lentes individuales de distancias focales entre 1 mm y 100 mm. Se obtendría así un campo de visión de prácticamente 5x5 cm. Normalmente, el campo de visión de la matriz de lentes abarcará la totalidad de la cara de la cubeta junto a la que está dispuesta, permitiendo así obtener imágenes 3D de cualquier muestra que se introduzca en la cubeta.

25 Esto contrasta con el uso de una única lente individual descrita en los microscopios de la técnica anterior, cuyo campo de visión está limitado por diversas consideraciones técnicas. En general, los microscopios convencionales utilizan lentes (u objetivos) denominadas “*de distancia de trabajo*” (WD, Working Distance), que tienen una apertura numérica pequeña. Como se indicaba en el apartado anterior, se trataría de un objetivo 10x cuyo campo de visión es de 1x1 mm.

30 b) Lente de tubo

35 Se trata de una lente de tubo que tiene el eje paralelo a la dirección de detección y cuyo campo de visión abarca varias lentes de la matriz de lentes, preferiblemente todas las lentes de la matriz de lentes. Es decir, la sub-imagen obtenida por cualquiera de las lentes de la matriz de lentes es recibida y ampliada por la lente de tubo.

La lente de tubo amplifica la sub-imagen obtenida por cada lente individual de la matriz de lentes hasta conseguir una magnificación comparable a la del objetivo de distancia de trabajo. Por ejemplo, si cada lente de la matriz de lentes tiene una distancia focal de 2 mm, una lente de tubo de 200 mm daría como resultado una magnificación 10x, similar a la de un objetivo de distancia de trabajo convencional.

c) Conjunto de espejos galvanométricos

El conjunto de espejos galvanométricos está configurado para recibir de la lente de tubo una sub-imagen de la muestra correspondiente a una lente seleccionada de la matriz de lentes y para transmitir dicha sub-imagen de la muestra a una unidad de enfoque.

Por tanto, el conjunto de espejos galvanométricos es configurable para recibir de la lente de tubo únicamente aquella luz que tiene una dirección y/o posición determinadas. En efecto, la luz fluorescente recogida por cada lente individual incide en la lente de tubo, según la dirección de detección, en un punto determinado de dicha lente de tubo. En consecuencia, la lente de tubo transmite la luz fluorescente transmitida por cada lente individual en una dirección diferente. El conjunto de espejos galvanométricos está configurado para discriminar la luz fluorescente recibida de la lente de tubo en función de la dirección de la que proviene, lo que permite seleccionar únicamente la luz fluorescente, es decir, la sub-imagen, proveniente de una determinada lente individual seleccionada.

En definitiva, el conjunto de espejos galvanométricos permite seleccionar la sub-imagen captada por una lente determinada de entre la pluralidad de lentes de la matriz y enviar dicha sub-imagen a la unidad de enfoque.

d) Unidad de enfoque

La unidad de enfoque está configurada para enfocar la sub-imagen de la muestra sobre un sensor de cámara. La unidad de enfoque puede configurarse de diferentes modos siempre que sea capaz de recibir la sub-imagen enviada por el conjunto de espejos galvanométricos y de enfocarla sobre un sensor de cámara donde se forma la imagen. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la unidad de

enfoque comprende una primera lente de transmisión que recibe del conjunto de espejos galvanométricos la sub-imagen de la muestra y la transmite a una lente tuneable, la lente tuneable que enfoca dicha sub-imagen, y una segunda lente de transmisión que recibe de la lente tuneable dicha sub-imagen enfocada y la transmite al sensor de cámara.

La lente tuneable puede ser una lente tuneable eléctricamente, o lente ETL, capaz de modificar la distancia focal en función de la tensión aplicada.

Gracias a esta configuración, mediante el conjunto de espejos galvanométricos es posible seleccionar de manera sucesiva varias lentes de la matriz de lentes y, realizando un barrido de la muestra mediante el haz láser plano para cada una de dichas lentes, se construye una imagen 3D completa de la muestra alojada en la cubeta. Este proceso quedará más claro a partir de la descripción del procedimiento de la invención que se describe más adelante en este documento.

En una realización preferida adicional de la invención, el microscopio comprende además, entre la unidad de enfoque y el sensor de cámara, una unidad de modulación de luz espacial configurada para corregir aberraciones esféricas de la sub-imagen de la muestra. La unidad de modulación puede tener en principio cualquier configuración siempre que pueda recibir la sub-imagen transmitida por la unidad de enfoque y corregir cualquier aberración que pueda tener.

En una realización particularmente preferida de la invención, la unidad de modulación de luz espacial comprende una tercera lente de transmisión que recibe de la segunda lente de transmisión la sub-imagen de la muestra y la transmite a un modulador de luz espacial, el modulador de luz espacial que corrige aberraciones esféricas de la sub-imagen, y una cuarta lente de transmisión que recibe del modulador de luz espacial la sub-imagen con las aberraciones esféricas corregidas y la transmite al sensor de cámara. En este contexto, un modulador espacial de luz es un dispositivo que permite controlar la intensidad, la fase o el estado de polarización de la luz en función del tiempo y el espacio del haz que incide en dicho dispositivo. Pueden ser de tipo electro-óptico (efecto Kerr y efecto Pockels), magneto-óptico (efecto Faraday), mecánico (espejos), acusto-ópticos, o de cristal líquido.

En otra realización preferida de la invención, el microscopio comprende además un espejo

dicróico dispuesto tras la lente tuneable y configurado para introducir un haz láser externo que incide en la muestra siguiendo un camino óptico inverso al seguido por la sub-imagen de la muestra. Es decir, el haz láser externo incide en el espejo dicróico y es orientado a lo largo del camino óptico formado por la lente tuneable, la primera lente de transmisión, el conjunto de espejos galvanométricos, la lente de tubo, la lente seleccionada de entre la matriz de lentes, y finalmente alcanza la muestra. Esta configuración permite introducir el haz láser externo con el propósito de que éste interaccione con la muestra, por ejemplo para quemar zonas de la misma, realizar *photobleaching* o *photoactivation*. El espejo dicróico, por supuesto, al mismo tiempo que permite la introducción de haz láser externo permite que las sub-imágenes provenientes de la muestra continúen su camino a través de la segunda lente de transmisión hasta llegar al sensor de cámara. El funcionamiento normal del microscopio, por tanto, no se ve afectado por la disposición del espejo dicróico.

En una realización particularmente preferida, el microscopio comprende además una fuente de haz láser externo orientado hacia un segundo conjunto de espejos galvanométricos que dirigen dicho haz láser pulsado al espejo dicróico.

Un segundo aspecto de la presente invención está dirigido a un procedimiento de formación de imágenes de muestras extensas mediante el microscopio de haz láser plano descrito en los párrafos anteriores. Este procedimiento comprende realizar los siguientes pasos para cada lente de la matriz de lentes:

1) Configurar el conjunto de espejos galvanométricos para transmitir a la unidad de enfoque una sub-imagen de la muestra recogida por una lente seleccionada. Es decir, en este paso el conjunto de espejos galvanométricos se dispone de modo que únicamente reciba de la lente de tubo la luz, es decir, la sub-imagen, transmitida por una lente particular de entre la matriz de lentes.

2) Realizar un barrido de la muestra mediante el haz láser plano para obtener una sub-imagen 3D parcial de una porción de muestra situada dentro del campo de visión de la lente seleccionada. En este contexto, el barrido de la muestra mediante el haz láser plano a su vez comprende los siguientes pasos:

- Emitir un haz láser plano en una posición seleccionada a lo largo de la dirección de iluminación.

- Transmitir a la unidad de enfoque, mediante el conjunto de espejos galvanométricos, la sub-imagen de la muestra recogida por la lente

seleccionada.

- Enfocar la sub-imagen mediante la unidad de enfoque y transmitirla a un sensor de cámara.

- Repetir estas operaciones para una pluralidad de posiciones del haz láser plano de manera que abarquen toda la muestra.

3) Construir una imagen 3D completa de la muestra mediante la combinación de la pluralidad de sub-imágenes 3D parciales obtenidas por cada lente. Cada una de las sub-imágenes 3D parciales abarcan una porción de la muestra correspondiente al campo de visión de cada lente individual de la matriz. Estas sub-imágenes 3D pueden fusionarse para obtener una imagen 3D completa de la muestra en su totalidad.

En una realización particularmente preferida de la invención, el procedimiento además comprende el paso de corregir aberraciones esféricas de cada sub-imagen enfocada por medio de una unidad de modulación de luz espacial.

En otra realización particularmente preferida de la invención, el procedimiento comprende además el paso de introducir un haz láser externo que incide en la muestra siguiendo un camino óptico inverso al seguido por la sub-imagen de la muestra.

En este contexto, nótese que la construcción de la imagen 3D completa de la muestra puede realizarse construyendo primero la imagen 3D de cada porción de muestra correspondiente a cada lente, y combinando después el conjunto de imágenes 3D obtenidas. Alternativamente, sería posible combinar todas las sub-imágenes planas obtenidas por las lentes para cada posición concreta del haz láser plano, obteniéndose así imágenes planas completas de la muestra, y luego apilar todas esas imágenes planas para formar la imagen 3D completa de la muestra. En cualquiera de los casos, el resultado final es la obtención de la imagen 3D completa de la muestra extensa de una manera mucho más rápida que utilizando los microscopios existentes en la actualidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figs. 1 muestran sendas vistas de la zona de medida de un microscopio de haz láser plano convencional.

La Fig. 2 muestra un esquema donde se aprecia el tratamiento de la imagen adquirida desde el objetivo hasta el sensor de la cámara en un microscopio de haz láser convencional.

Las Figs. 3a y 3b muestran esquemáticamente la configuración de un microscopio de acuerdo con la presente invención.

Las Figs. 4a y 4b muestran esquemáticamente el modo en que se selecciona una lente particular de entre la matriz de lentes en un microscopio de acuerdo con la presente invención.

Las Figs. 5a y 5b muestran esquemáticamente el modo en que se realiza un barrido mediante el haz láser plano para una lente particular en un microscopio de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 6 muestra esquemáticamente la disposición de una unidad de modulación espacial en un microscopio de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 7 muestra esquemáticamente la disposición de un espejo dicróico para la introducción de un haz láser externo en un microscopio de acuerdo con la presente invención.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Se describe a continuación el microscopio (1) de la presente invención haciendo referencia a las figuras adjuntas.

Las Figs. 3 muestran sendas vistas esquemáticas del microscopio (1) de la presente invención donde se aprecian los diferentes elementos que lo conforman. El microscopio (1) dispone de una cubeta (2) en la que se encuentra la muestra (M). Un emisor emite un haz láser plano (4) según una dirección de iluminación, siendo el haz láser plano (4) perpendicular a la dirección de detección (DD) según la cual se detecta la luz fluorescente emitida por la porción de muestra (M) iluminada por dicho haz láser plano (4). En este ejemplo, la porción de muestra (M) iluminada por el haz láser plano (4) se representa por medio de figuras sencillas tales como flechas o estrellas. Aunque la zona de detección del microscopio (1) no se muestra con detalle en estas figuras, se entiende que éste tendrá todos los elementos habituales en la técnica descritos con relación a la Fig. 1, a no ser que

el contexto indique claramente lo contrario. La luz fluorescente emitida por la muestra (M) es recibida por un conjunto óptico (5) dispuesto esencialmente a lo largo de la dirección de detección (DD).

- 5 El conjunto óptico (5) este ejemplo de microscopio (1) dispone de una matriz (51) de lentes dispuesta en paralelo a una cara de la cubeta (4), en este caso la cara inferior. La matriz (51) de lentes comprende una pluralidad de lentes (51a) que tienen un eje paralelo a la dirección de detección (DD). En este ejemplo simplificado, la matriz (51) tiene 24 lentes (51a), aunque el número de lentes (51a) puede incrementarse indefinidamente de modo que
- 10 el campo de visión global de la matriz (51) de lentes puede hacerse arbitrariamente amplio para abarcar cubetas (4) de gran tamaño que alojan muestras (M) muy grandes. Las lentes (51a) de la matriz (51) de lentes tienen la distancia focal (fL) coincidente con la distancia entre la lente (51a) y el haz láser plano (4) en cada momento.
- 15 Siguiendo la dirección de detección (DD) en sentido opuesto a la posición de la cubeta (2), el conjunto óptico (5) comprende una lente de tubo (52) situada junto a la matriz (51) de lentes y cuyo campo de visión (FOV) abarca toda la matriz (51) de lentes. Por tanto, cuando una porción de muestra (M) iluminada por el haz láser plano (4) emite una luz fluorescente, o sub-imagen de la muestra (M), ésta es recibida por las lentes (51a) de la matriz (51) y
- 20 transmitida, según la dirección de detección (DD), a un punto determinado de la lente de tubo (52). Tras la lente de tubo (52), el conjunto óptico (5) comprende un conjunto (53) de espejos galvanométricos que están configurados para recibir y transmitir al siguiente elemento, la unidad (54) de enfoque, únicamente la luz recibida desde una determinada dirección. Puesto que la luz fluorescente transmitida a la lente de tubo (52) por cada lente
- 25 (51a) incide en una posición diferente de dicha lente de tubo (52), la dirección de salida de la lente de tubo (52) de la sub-imagen correspondiente a cada lente (51a) sigue una dirección diferente. De ese modo, actuando adecuadamente sobre el conjunto (53) de espejos galvanométricos, es posible elegir la recepción de la sub-imagen de una lente (51a) particular de entre la pluralidad de lentes (51a) de la matriz (51). Esto se ha presentado de
- 30 manera simplificada en la Fig. 3b, donde se ha eliminado la matriz (51) de lentes y únicamente se representa la lente (51a) concreta cuya sub-imagen es recibida por el conjunto (53) de espejos galvanométricos y transmitida hacia la unidad (54) de enfoque.

La unidad (54) de enfoque recibe así solo la sub-imagen de una lente (51a) particular y la enfoca adecuadamente sobre un sensor de cámara (55), por ejemplo una cámara CMOS. Para ello, la unidad (54) de enfoque dispone de una primera lente (54a) de transmisión que

recibe del conjunto (53) de espejos galvanométricos la sub-imagen de la muestra (M) y la transmite a una lente tuneable (54b), la lente tuneable (54b) que enfoca dicha sub-imagen, y una segunda lente (54c) de transmisión que recibe de la lente tuneable (54b) dicha sub-imagen enfocada y la transmite finalmente al sensor de cámara (55). La lente tuneable (54b) puede ser cualquier lente cuya distancia focal pueda modificarse de manera rápida, por ejemplo una lente tuneable eléctricamente (ETL).

Gracias a esta configuración, el proceso para construir una imagen 3D completa de una muestra (M) muy grande sería fundamentalmente el siguiente. En primer lugar, se configura el conjunto (53) de espejos galvanométricos para recibir la luz fluorescente transmitida a través de la lente de tubo (52) por una determinada lente (51a) en particular de entre la matriz (51) de lentes. A continuación, se realiza un barrido de la muestra mediante el haz láser plano (4) y se recibe una primera pila de sub-imágenes correspondientes a la porción de muestra (M) situada en el campo de visión de dicha lente (51a) particular. Cada una de estas sub-imágenes seguirá el camino descrito anteriormente pasando por la lente de tubo (52), el conjunto (53) de espejos galvanométricos, y la unidad (54) de enfoque, hasta llegar al sensor de cámara (55). Las sub-imágenes adquiridas pueden entonces combinarse para formar una pila de sub-imágenes que forman una imagen 3D de dicha porción de muestra (M). A continuación, se modifica la configuración del conjunto (53) de espejos galvanométricos para recibir la luz fluorescente emitida por una lente (51a) particular subsiguiente y se repite la operación. Este proceso continúa hasta que se han recibido correspondientes pilas de sub-imágenes para cada una de las lentes (51a) de la matriz (51) de lentes. Entonces, es posible combinar todas las sub-imágenes para formar una imagen 3D de la muestra (M) completa.

Las Figs. 4a y 4b muestran respectivamente dos momentos de este proceso de adquisición de las sub-imágenes correspondientes a dos lentes (51a, 51a') particulares de la matriz (51) de lentes. Concretamente, la Fig. 4a muestra una vista esquemática del microscopio (1) de la invención donde el conjunto (53) de espejos galvanométricos está configurado para recibir únicamente las sub-imágenes recibidas de una lente (51a) particular situada en la tercera fila, segunda columna de la matriz (51) de lentes. En este ejemplo simplificado, la sub-imagen captada por la lente (51a) adopta la forma de una flecha (M_1). Una vez realizado el barrido del haz láser plano (4) y adquirida la pluralidad de sub-imágenes necesarias para la formación de la imagen 3D correspondiente a esa porción concreta de la muestra (M), la configuración del conjunto (53) de espejos galvanométricos se modifica para recibir únicamente las sub-imágenes transmitidas por una segunda lente (51a') diferente de la

anterior, en este caso la lente (51a') situada en la sexta fila, cuarta columna. En este ejemplo simplificado, la sub-imagen captada por la segunda lente (51a') adopta la forma de una estrella (M_2). Con el microscopio (1) en esta segunda configuración, que se muestra en la Fig. 4b, se realiza otro barrido del haz láser plano (4) y se adquieren las sub-imágenes necesarias para la formación de la imagen 3D correspondiente a esta segunda porción concreta de la muestra (M). Este proceso se repite para cada una de las lentes (51a) de la matriz (51).

Las Figs. 5a y 5b muestran respectivamente dos momentos del proceso de barrido del haz láser plano (4) para una lente (51a) particular de la matriz (51) de lentes. Durante todo el proceso de barrido, el conjunto (53) de lentes galvanométricas permanece en la misma posición, de modo que únicamente recibe las sub-imágenes transmitidas por una determinada lente (51a) particular. Como se describió anteriormente, estas sub-imágenes son después enfocadas mediante la unidad (54) de enfoque y captadas por el sensor de cámara (55). La Fig. 5a muestra un momento de este proceso en que el haz láser plano (4) adopta una determinada primera posición donde corta una muestra (M) de forma esencialmente de huevo aproximadamente por la mitad. Como se puede apreciar, en el sensor de cámara (55) se recibe una sub-imagen plana correspondiente aproximadamente a una circunferencia. La Fig. 5b muestra otro momento de este proceso en que el haz láser plano (4) adopta una segunda posición donde corta la muestra (M) cerca de uno de sus extremos. En este segundo caso, el sensor de cámara (55) recibe una sub-imagen plana correspondiente aproximadamente a una circunferencia de un radio sensiblemente menor. El barrido completo de la muestra (M) es esencialmente similar al funcionamiento de un microscopio de haz láser plano convencional, y permite formar una imagen 3D de la porción de muestra (M) situada en el campo de visión de la lente (51a) concreta.

La Fig. 6 muestra esquemáticamente una unidad (56) de modulación de luz espacial configurada para corregir aberraciones esféricas de la sub-imagen de la muestra (M) que está situada entre la unidad (54) de enfoque y el sensor de cámara (5). Más concretamente, la unidad (56) de modulación de luz espacial comprende una tercera lente (56a) de transmisión que recibe de la segunda lente (54c) de transmisión la sub-imagen de la muestra (M) y la trasmite a un modulador (56b) de luz espacial, el modulador (56b) de luz espacial que corrige aberraciones esféricas de la sub-imagen, y una cuarta lente (56c) de transmisión que recibe del modulador (56b) de luz espacial la sub-imagen con las aberraciones esféricas corregidas y la transmite al sensor (55) de cámara.

La Fig. 7 muestra otra configuración de microscopio (1) según la presente invención que incluye todos los elementos del microscopio (1) mostrado en las Figs. 3 a 5 y que además está dotado de un espejo dicroico (58) para permitir la introducción de un haz láser externo dirigido hacia la muestra (M). De ese modo, en caso necesario es posible actuar sobre la muestra (M), por ejemplo, para quemar zonas de la misma, realizar *photobleaching* o *photoactivation*. En este ejemplo, una fuente de haz láser externo (no mostrada) emite un haz láser en dirección a un segundo conjunto (59) de espejos galvanométricos, los cuales dirigen dicho haz láser hacia el espejo dicroico (58). El espejo dicroico (58) está dispuesto en el camino óptico seguido por las sub-imágenes de la muestra entre la lente tuneable (54b) y la segunda lente (54c) de transmisión. De ese modo, una adecuada configuración del espejo dicroico (58) permite dirigir el haz láser externo proveniente del segundo conjunto (59) de espejos galvanométricos a lo largo del camino seguido por las sub-imágenes de la muestra (M), de modo que dicho haz láser externo recorre en sentido inverso dicho camino hasta incidir en la muestra (M). El espejo dicroico (58), al mismo tiempo, sigue permitiendo que las sub-imágenes de la muestra continúen su camino pasando por la segunda lente (54c) de transmisión hasta llegar al sensor (55) de cámara.

REIVINDICACIONES

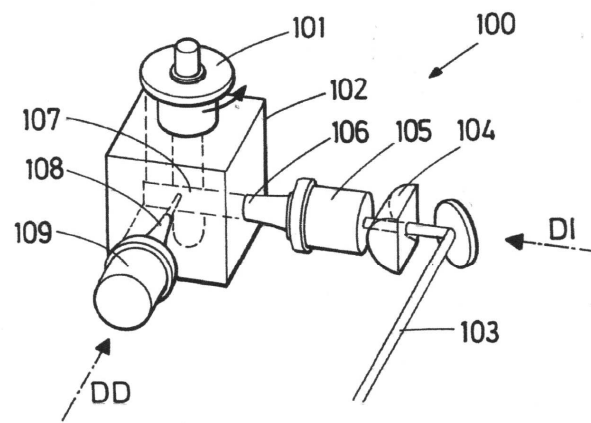
1. Microscopio (1) de haz láser plano para muestras extensas, que comprende una cubeta (2) configurada para alojar una muestra (M), un emisor de láser configurado para emitir un haz de láser plano (4) a lo largo de una dirección de iluminación (DI), y un conjunto óptico (5) dispuesto a lo largo de una dirección de detección (DD) perpendicular al haz de láser plano (4) configurado para recibir la emisión de fluorescencia de la muestra (M) causada por dicho haz láser plano (4), caracterizado por que el conjunto óptico comprende:
 - una matriz (51) de lentes, donde cada lente (51a) tiene un campo de visión sustancialmente menor que el tamaño de la cubeta (2) y eje paralelo a la dirección de detección (DD), y estando situada la matriz (51) de lentes en una posición adyacente a una cara de la cubeta (2);
 - una lente de tubo (52) de eje paralelo a la dirección de detección (DD) y cuyo campo de visión (FOV) abarca varias lentes (51a) de la matriz (51) de lentes;
 - un conjunto (53) de espejos galvanométricos configurados para recibir de la lente de tubo (52) una sub-imagen de la muestra (M) correspondiente a una lente (51a) seleccionada de la matriz (51) de lentes y para transmitir dicha sub-imagen de la muestra (M) a una unidad (54) de enfoque; y
 - la unidad (54) de enfoque, configurada para enfocar la sub-imagen de la muestra (M) sobre un sensor de cámara (55),
 - de manera que, seleccionando mediante el conjunto (53) de espejos galvanométricos de manera sucesiva varias lentes (51a) de la matriz (51) de lentes, y realizando un barrido de la muestra (M) mediante el haz láser plano (4) para cada una de dichas lentes (51a), se construye una imagen 3D completa de la muestra (M) alojada en la cubeta (2).
2. Microscopio (1) de haz láser plano de acuerdo con la reivindicación 1, donde la unidad (54) de enfoque comprende una primera lente (54a) de transmisión que recibe del conjunto (53) de espejos galvanométricos la sub-imagen de la muestra (M) y la transmite a una lente tuneable (54b), la lente tuneable (54b) que enfoca dicha sub-imagen, y una segunda lente (54c) de transmisión que recibe de la lente tuneable (54b) dicha sub-imagen enfocada y la transmite al sensor de cámara (55).
3. Microscopio (1) de haz láser plano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende, entre la unidad (54) de enfoque y el sensor de cámara (5), una unidad (56) de modulación de luz espacial configurada para corregir aberraciones esféricas de la sub-imagen de la muestra (M).

4. Microscopio (1) de acuerdo con la reivindicación 3, donde la unidad (56) de modulación de luz espacial comprende una tercera lente (56a) de transmisión que recibe de la segunda lente (54c) de transmisión la sub-imagen de la muestra (M) y la trasmite a un modulador (56b) de luz espacial, el modulador (56b) de luz espacial que corrige aberraciones esféricas de la sub-imagen, y una cuarta lente (56c) de transmisión que recibe del modulador (56b) de luz espacial la sub-imagen con las aberraciones esféricas corregidas y la transmite al sensor (55) de cámara.
5. Microscopio (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un espejo dicroico (58) dispuesto tras la lente tuneable (54b) y configurado para introducir un haz láser externo que incide en la muestra (M) siguiendo un camino óptico inverso al seguido por la sub-imagen de la muestra (M).
6. Microscopio (1) de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende una fuente de haz láser externo orientada hacia un segundo conjunto (59) de espejos galvanométricos que dirigen dicho haz láser pulsado al espejo dicroico (58).
7. Procedimiento de formación de imágenes de muestras extensas mediante el microscopio (1) de haz láser plano de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que comprende realizar los siguientes pasos para cada lente de la matriz (51) de lentes:
 - configurar el conjunto (53) de espejos galvanométricos para transmitir a la unidad (54) de enfoque una sub-imagen de la muestra (M) recogida por una lente (51a) seleccionada;
 - realizar un barrido de la muestra (M) mediante el haz láser plano (4) para obtener una sub-imagen 3D parcial de una porción de muestra (M) situada dentro del campo de visión (FOV) de la lente (51a) seleccionada; y
 - construir una imagen 3D completa de la muestra (M) mediante la combinación de la pluralidad de sub-imágenes 3D parciales obtenidas por cada lente (51a),donde el barrido de la muestra (M) mediante el haz láser plano a su vez comprende los siguientes pasos:
 - emitir un haz láser plano (4) en una posición seleccionada a lo largo de la dirección de iluminación (DD);
 - transmitir a la unidad (54) de enfoque, mediante el conjunto (53) de espejos galvanométricos, la sub-imagen de la muestra (M) recogida por la lente seleccionada;
 - enfocar la sub-imagen mediante la unidad (54) de enfoque y transmitirla a un

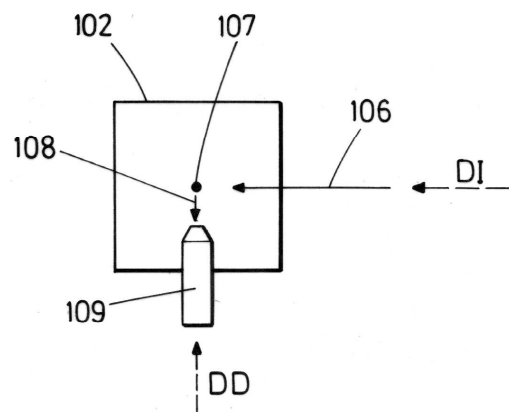
sensor (55) de cámara;

- repetir estas operaciones anteriores para una pluralidad de posiciones del haz láser plano (4) de manera que abarquen toda la muestra (M).

- 5 8. Procedimiento de formación de imágenes de acuerdo con la reivindicación 7, que
además comprende el paso de corregir aberraciones de cada sub-imagen enfocada de la
muestra (M) por medio de una unidad (56) de modulación de luz espacial.
- 10 9. Procedimiento de formación de imágenes de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 7-8, que además comprende el paso de introducir un haz láser externo que
incide en la muestra (M) siguiendo un camino óptico inverso al seguido por la sub-imagen de
la muestra (M).



TÉCNICA ANTERIOR



TÉCNICA ANTERIOR

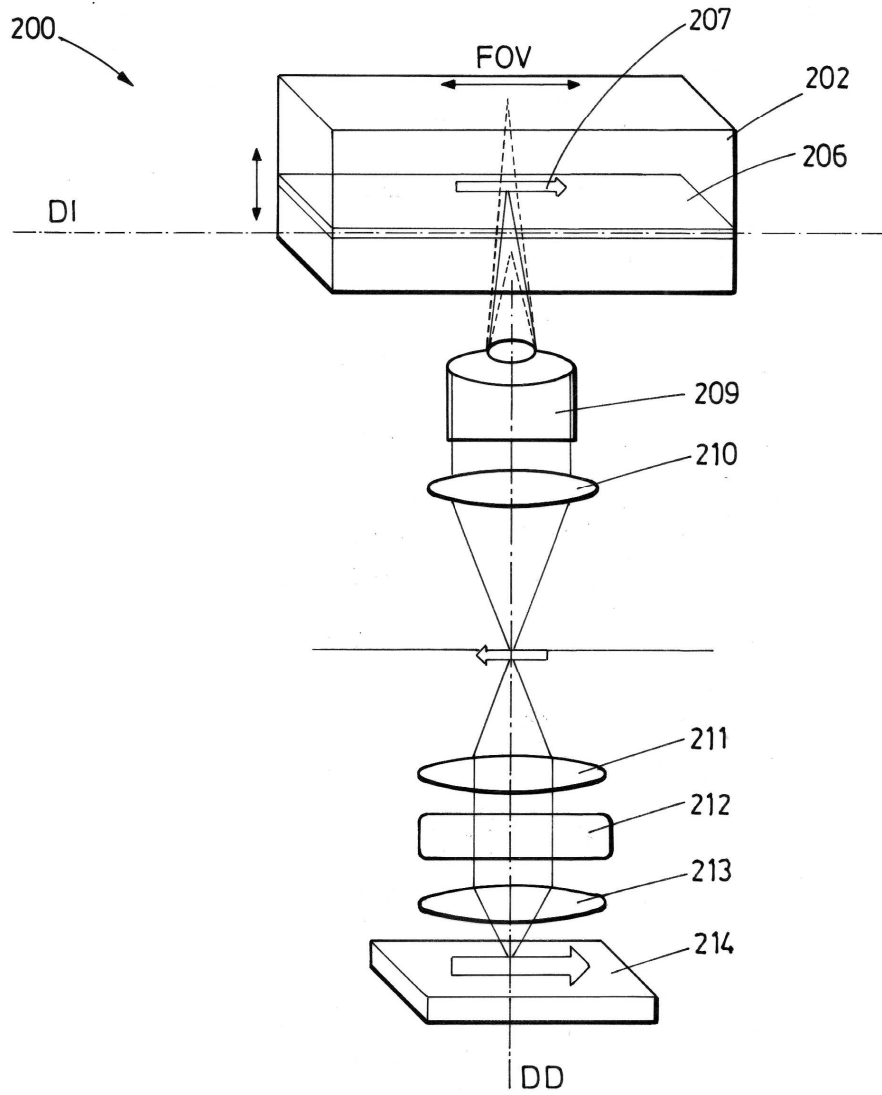


FIG.2
TECNICA ANTERIOR

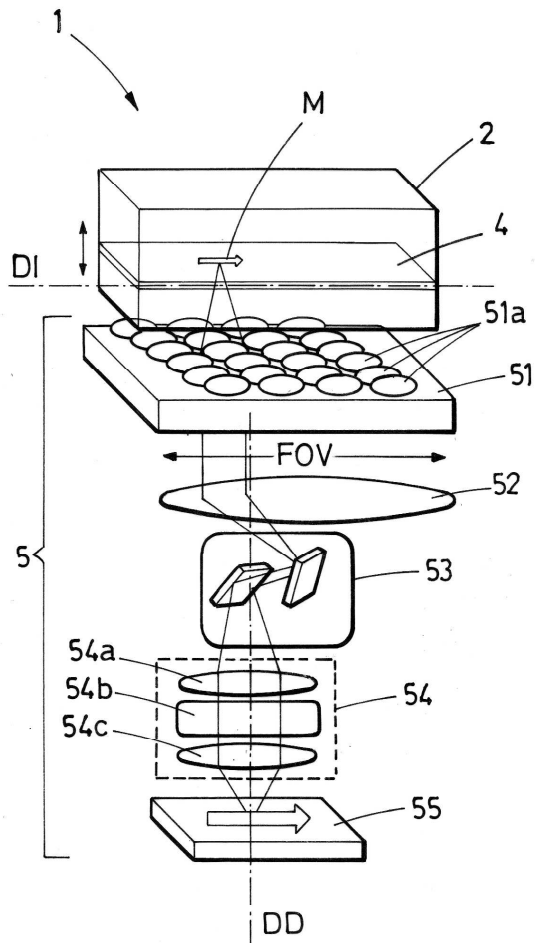


FIG. 3a

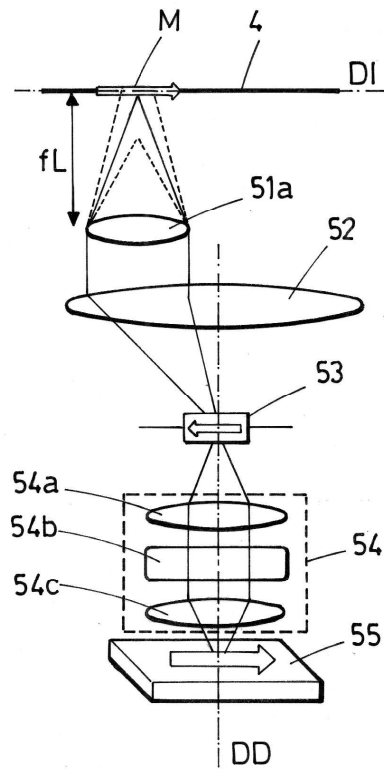


FIG. 3b

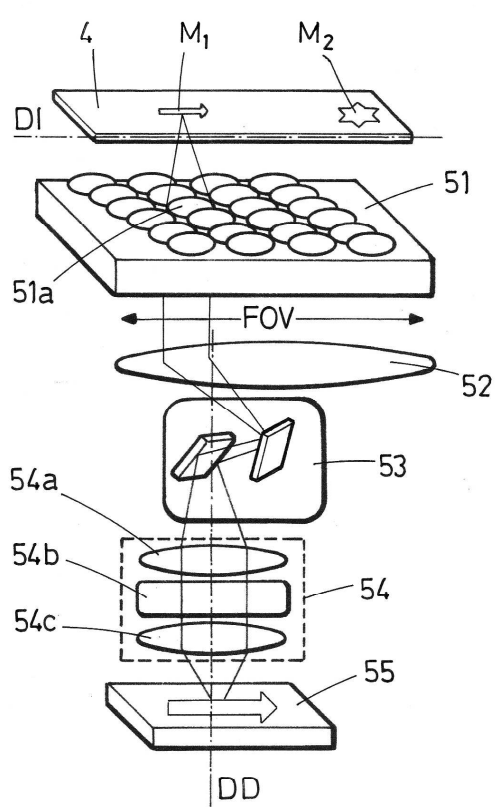


FIG.4a

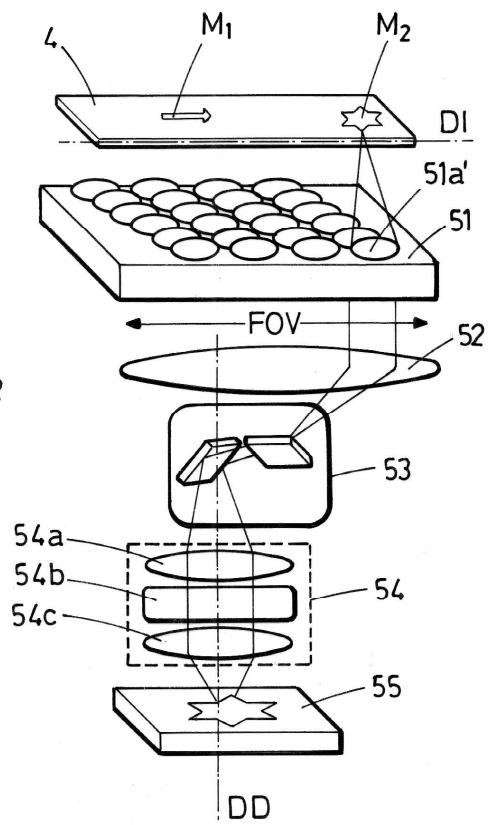


FIG.4b

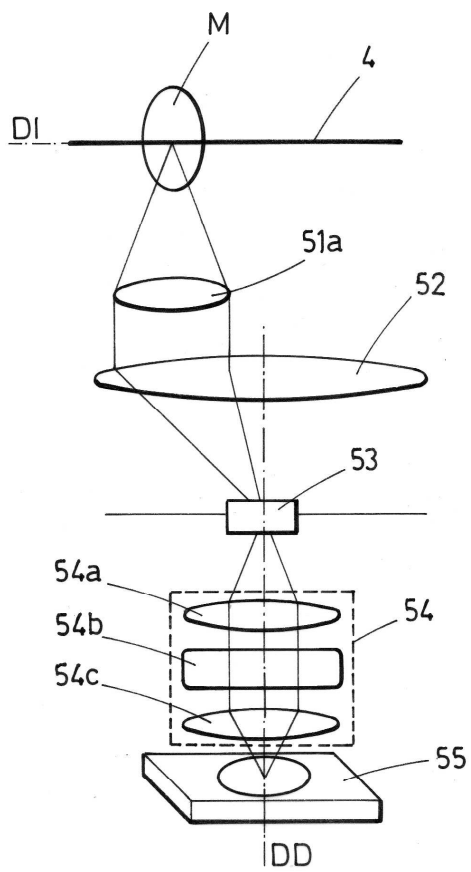


FIG. 5a

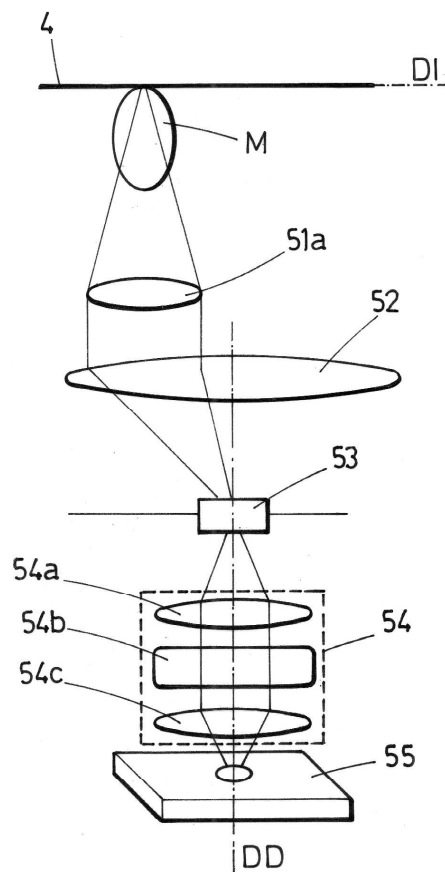


FIG. 5b

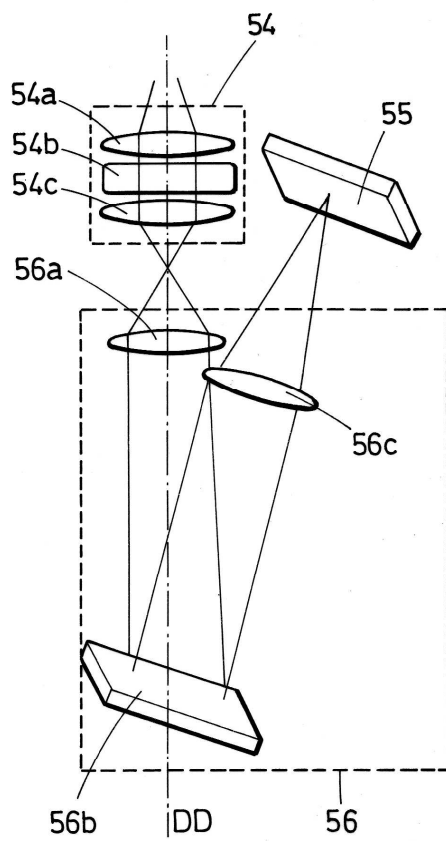


FIG. 6

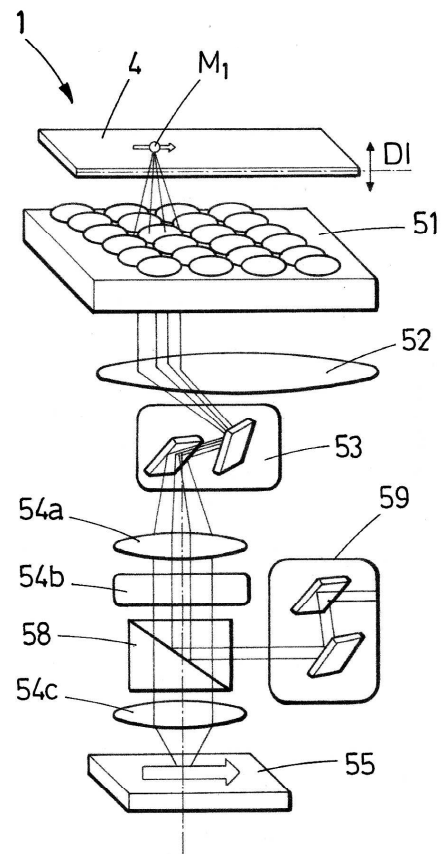


FIG. 7