

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 506**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64	(2006.01)
G02B 21/00	(2006.01)
G02B 21/16	(2006.01)
G02B 21/36	(2006.01)
A61B 10/02	(2006.01)
A61B 90/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2014 PCT/US2014/038141**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14186544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2014 E 14797836 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2022 EP 2997353**

54 Título: **Microscopia de una muestra de tejido mediante iluminación estructurada**

30 Prioridad:

15.05.2013 US 201361823817 P
20.12.2013 US 201361919434 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2023

73 Titular/es:

**THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND (100.0%)
1440 Canal Street TB-32
New Orleans, Louisiana 70112-2632, US**

72 Inventor/es:

BROWN, JONATHON QUINCY

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 935 506 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

Microscopía de una muestra de tejido mediante iluminación estructurada

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a métodos y sistemas de formación de imágenes médicas, y más particularmente, a la microscopía de una muestra de tejido usando iluminación estructurada.

10 Antecedentes

Existen diversas condiciones clínicas que podrían verse beneficiadas por un método de procesamiento histológico más rápido, que reduzca el número de etapas entre la obtención de una muestra de tejido fresco y el diagnóstico. Por ejemplo, existe la necesidad de una detección patológica rápida de cáncer residual en la superficie de las muestras de resección tumoral, conocidas como márgenes tumorales positivos, de modo que el procedimiento quirúrgico pueda revisarse a tiempo para evitar que el cáncer se mantenga en el paciente. La escisión del tumor es un tratamiento muy común en los cánceres sólidos, donde el cirujano debe extirpar todo el tejido enfermo del paciente para minimizar el riesgo de reaparición del cáncer. La extirpación quirúrgica completa ofrece el mejor pronóstico para muchos tipos de cáncer, especialmente aquellos que no han hecho metástasis. En la mayoría de los casos, el objetivo de estas cirugías o resecciones tumorales es lograr márgenes quirúrgicos libres de cáncer (o negativos), reduciendo así el riesgo de reaparición tumoral local. Se ha demostrado que el estado del margen quirúrgico es un potente predictor de reaparición local en varios tipos de cáncer, incluidos los cánceres de mama, cerebro, boca, cabeza y cuello, hígado, esófago, colorrectal, próstata y cuello uterino, así como en sarcomas de tejidos blandos ubicados en las regiones de las extremidades, el tronco y la cabeza y el cuello.

En la actualidad, existen muy pocas herramientas intraoperatorias disponibles para ayudar a los cirujanos en el diagnóstico del margen del tumor para garantizar la extirpación completa del tumor. La citología de preparación al tacto y el análisis de secciones congeladas son dos herramientas intraoperatorias implementadas actualmente en algunas clínicas, pero ambas requieren de un patólogo capacitado y de otros recursos. La patología intraoperatoria para las resecciones quirúrgicas de tumores es costosa y lleva mucho tiempo y, en consecuencia, solo está disponible en unos pocos centros de cirugía en los Estados Unidos de América. Por lo tanto, existe una clara necesidad clínica que no ha sido satisfecha, de herramientas intraoperatorias eficaces que puedan examinar rápidamente las propiedades microscópicas de los márgenes quirúrgicos. Las técnicas de imagen óptica son especialmente atractivas para esta aplicación, ya que se pueden obtener imágenes intraoperatorias de márgenes completos de forma no destructiva y, potencialmente, in situ.

La microscopía de fluorescencia se puede combinar con un biomarcador adecuado para generar contraste nuclear específico adicional, lo que permite la cuantificación del tamaño y la densidad nuclear. En la microscopía de fluorescencia convencional, todo el campo de visión se ilumina uniformemente con una luz de excitación. Esto crea un problema ya que los fluoróforos fuera del plano de enfoque también se excitan y emiten fotones, generando una cantidad significativa de fluorescencia de fondo no deseada. Esto, a su vez, degrada significativamente el contraste de las características de interés en el plano focal. Este es un problema común en la microscopía de fluorescencia de campo amplio y existen varias técnicas especializadas para rechazar la fluorescencia de fondo, como la microscopía confocal de fluorescencia. Si bien es eficaz para rechazar la fluorescencia de fondo, la microscopía confocal requiere una óptica especializada en forma de espejos de escaneo rápido y una colección de orificios ajustables, lo que aumenta el costo y disminuye la velocidad, lo que dificulta la viabilidad clínica intraoperatoria. Además, la cantidad de fotones recolectados en cada posición de escaneo del haz es limitada, por lo que el sistema requiere un detector sensible, como un tubo fotomultiplicador. Además, debido al pequeño campo de visión, la posición del haz tiene que escanearse en forma de trama para poder inspeccionar un área que está en el orden de un milímetro cuadrado a un centímetro cuadrado.

El documento US 2012/0108982 A1 describe métodos y sistemas para: (i) iluminar secuencialmente una muestra con diferentes distribuciones espaciales de luz, donde cada iluminación hace que un objeto incrustado en la muestra emita radiación en respuesta a la luz; (ii) para cada distribución espacial diferente de la luz de iluminación, obtener imágenes de la radiación emitida por el espécimen desde cada uno de los múltiples lados del espécimen; y (iii) determinar información sobre el objeto en el espécimen basándose en la radiación reflejada en imágenes de cada uno de los múltiples lados para cada una de las diferentes distribuciones espaciales de luz de iluminación.

60 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un sistema como el que se define en la reivindicación independiente adjunta 1, y a un método tal y como se define en la reivindicación independiente 7. Las realizaciones particulares de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un sistema para obtener imágenes de una muestra de tejido fresco de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 La figura 2 ilustra un esquema de un ejemplo de un sistema de microscopía para obtener imágenes de una muestra fresca de acuerdo con una realización de la presente invención.

10 La figura 3 ilustra un gráfico del ancho total medido y teórico a la mitad del máximo (FWHM del inglés "*full width at half maximum*") de la respuesta axial del sistema de la figura 2 en función de la frecuencia espacial normalizada en un maniquí preparado.

La figura 4 ilustra un gráfico de la relación de la relación señal a ruido (SNR del inglés "*signal-to-noise ratio*") uniforme a la SNR seccionada frente a la profundidad de modulación.

15 La figura 5 ilustra dos imágenes de imágenes fantomas [maniqués] preparadas con y sin el uso de microscopía de iluminación estructurada (SIM del inglés "*structure illumination microscopy*").

20 La figura 6 es un gráfico de barras que demuestra un aumento en SBR (del inglés "*signal-to-background ratio*") en la imagen SIM de la figura 5 sobre la otra imagen utilizando una velocidad de fotogramas comparable.

La figura 7 ilustra un método para evaluar rápidamente una muestra de tejido extraída durante un procedimiento médico.

25 La figura 8 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra un sistema ejemplar de componentes de hardware capaces de implementar ejemplos de los sistemas y métodos descritos en las figuras 1 a 7.

Descripción detallada

30 La presente invención describe el desarrollo de un escáner de muestras de corte óptico rápido de próxima generación basado en microscopía de iluminación estructurada incoherente de velocidad de video y desarrollado teniendo en cuenta los requisitos de diseño para una microscopía de fluorescencia rápida y de alto rendimiento de muestras quirúrgicas y de biopsias intactas. Un sistema de formación de imágenes de acuerdo con la presente invención, tal y como se define en la reivindicación 1 adjunta, proporciona la capacidad de obtener imágenes de tejido fresco inmediatamente después de retirarlo del sujeto para proporcionar una muestra clínicamente útil. Por "fresco" se entiende que el tejido se ha extraído o expuesto durante un procedimiento médico que se produce al mismo tiempo que la obtención de las imágenes de la muestra. Se apreciará que una muestra fresca será significativamente más gruesa que una muestra preparada de forma tradicional, lo que aumenta el desafío del proceso de obtención de imágenes. Por "útil clínicamente", se quiere decir que la imagen debe tener una resolución suficiente para permitir una toma de decisiones clínicas significativas asociadas con el procedimiento médico que ocurre simultáneamente con la formación de imágenes. Por ejemplo, una característica bien conocida del cáncer es el aumento de la densidad nuclear celular, debido a la mayor tasa de crecimiento del tejido maligno. Para proporcionar una guía significativa a un cirujano que busca márgenes de cáncer en una muestra de tejido recién extraída, es necesario que la imagen tenga suficiente resolución para localizar de forma fiable los núcleos de células individuales, que tienen un diámetro del orden de diez micrómetros.

45 Con este fin, se utiliza un enfoque de iluminación estructurada con un procesamiento posterior apropiado para proporcionar una imagen de alta resolución y alta velocidad de la muestra de tejido fresco. El método divulgado tiene una resolución lateral y un grosor de sección óptica suficientes para reducir eficazmente la fluorescencia desenfocada y aislar núcleos únicos, y un campo de visión que puede escalarse razonablemente para cubrir un margen de resección tumoral grande u otra muestra de patología quirúrgica grande. La presente invención emplea un modulador de luz espacial digital de alta velocidad y una tecnología de cámara de semiconductor de óxido de metal complementario (CMOS del inglés "*complementary metal-oxide-semiconductor*") para lograr imágenes de alta resolución, seccionadas ópticamente de muestras fluorescentes a un rendimiento suficiente para permitir el análisis completo de una muestra durante un procedimiento médico en curso. En este documento se proporcionan descripciones detalladas de una o más realizaciones preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la presente invención puede realizarse de diversas formas. Por lo tanto, los detalles específicos revelados en este documento no deben interpretarse como limitantes, sino más bien como una base para las reivindicaciones y como una base representativa para enseñar a un experto en la materia a emplear la presente invención de cualquier manera apropiada. Con este fin, siempre que cualquiera de las frases "por ejemplo", "tal como", "incluyendo" y similares se utilicen en el presente documento, se entiende que sigue la frase "y sin limitación", a menos que se indique explícitamente lo contrario. De manera similar, se entiende que "un ejemplo", "ejemplar" y similares se refieren a un detalle de implementación específico de un concepto inventivo más general, cuyo alcance está definido por las reivindicaciones independientes adjuntas, y no pretenden limitar el alcance reivindicado.

65 El término "sustancialmente" permite desviaciones del descriptor que no impactan negativamente el propósito

previsto. Por lo tanto, por ejemplo, la frase "donde la palanca se extiende verticalmente" significa "donde la palanca se extiende sustancialmente verticalmente" siempre que no sea necesaria una disposición vertical precisa para que la palanca realice su función. Los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" (y de manera similar "comprende", "incluye" y "tiene") se usan indistintamente y tienen el mismo significado. Específicamente, cada uno de los términos se usa como un término abierto que significa "al menos lo siguiente" y no excluye características adicionales, limitaciones, aspectos, etc. Así, por ejemplo, "un proceso que involucra los pasos a, b y c" significa que el proceso incluye al menos los pasos a, b y c. Dondequiera que se utilicen los términos "un" o "una", se entiende "uno o más", a menos que tal interpretación no tenga sentido en el contexto.

La figura 1 ilustra un sistema 10 para obtener imágenes de una muestra de tejido fresco 12 de acuerdo con una realización de la presente invención. La muestra de tejido 12 se prepara de manera que la muestra emita fluorescencia cuando se ilumina. En una implementación, la muestra de tejido 12 se puede preparar en vivo utilizando un agente de contraste fluorescente no tóxico que realza el tejido para obtener imágenes al retirar el tejido del cuerpo. En otra implementación, se aplica una tinción fluorescente a la muestra de tejido 12 después de que se haya extraído del cuerpo. Por ejemplo, la tinción fluorescente se selecciona del grupo que comprende acriflavina, naranja de acridina, alumbre-tetraciclina, eosina, ácido pícrico, DRAQ5™ y fucsina ácida. En otro ejemplo, se seleccionan al menos dos tinciones del grupo como parte de un proceso de múltiples tinciones de varios colores. La tinción fluorescente se puede aplicar opcionalmente mediante al menos una de las siguientes: pulverización, goteo, inmersión o vertido.

El sistema 10 incluye una fuente de luz estructurada 14 configurada para iluminar la muestra de tejido con un haz de luz que tiene un patrón específico. En una implementación, la fuente de luz estructurada 14 puede incluir un láser y un modulador de luz espacial, junto con componentes ópticos apropiados para dirigir el haz del láser hacia o a través del modulador y hacia la muestra y mantener las propiedades espectrales deseadas del haz. En otra implementación, la fuente de luz estructurada 14 puede incluir un diodo emisor de luz (led) u otra fuente de luz incoherente (por ejemplo, una lámpara) y una o más lentes de condensación y componentes ópticos apropiados para proyectar luz sobre o a través de un modulador de luz espacial y sobre la muestra de tejido 12 y mantener las propiedades espectrales deseadas de la luz. En un ejemplo, usando iluminación coherente, el modulador de luz espacial puede configurarse para modificar la fase o la amplitud de la fuente de luz para proyectar franjas de interferencia sobre la muestra. En otro ejemplo, utilizando una fuente de luz incoherente, la luz puede reflejarse o pasar a través del modulador de luz espacial o proyectar una imagen de la pantalla del modulador de luz espacial sobre la muestra.

La fluorescencia emitida por la muestra de tejido iluminada 12 es luego reflejada por un sistema de imágenes 16. Se apreciará que, además de un generador de imágenes, como una cámara, el sistema de imágenes 16 puede incluir componentes ópticos apropiados para dirigir la fluorescencia sobre el generador de imágenes y filtrar la luz extraña. En una implementación, la fuente de luz estructurada 14 está configurada para proyectar el patrón de luz espacial en un plano específico dentro de la muestra de tejido, con el sistema de formación de imágenes 16 configurado para tener un plano focal coincidente con el plano iluminado.

A continuación, la imagen de la fluorescencia de la muestra se proporciona a un sistema de control 18 para producir una salida clínicamente útil y comprensible para el ser humano (imagen clínica) para mostrarla a un usuario a partir de la imagen. En una implementación, el sistema de control 18 puede indicar a la fuente de luz estructurada 14 que proyecte una serie de patrones espaciales sobre la muestra 12 e indicar al sistema de imágenes 16 que capture al menos una imagen asociada con cada una de las series de patrones espaciales. En otra implementación, el sistema de control 18 aplica un filtro de paso alto a la imagen para aislar los núcleos celulares y otras características de la imagen. Como alternativa o adicionalmente, el sistema de control 18 puede incluir un algoritmo de clasificación de imágenes automatizado para categorizar la muestra de tejido en una de una pluralidad de clases. Por ejemplo, las clases pueden representar probabilidades de que la muestra de tejido contenga tejido canceroso, de modo que el sistema pueda identificar células anormales y células normales dentro de la imagen.

El algoritmo de clasificación de imágenes automatizado puede incluir, por ejemplo, uno o más modelos de clasificación, que se pueden combinar a través de un esquema de arbitraje apropiado a partir de sus resultados asociados y valores de confianza. Estos modelos de clasificación pueden incluir redes neuronales artificiales, modelos de regresión, máquinas de vectores de soporte, modelos de aprendizaje de conjunto y árboles de decisión [decisión ramificada].

De acuerdo con la invención, que puede usarse sola o en combinación con el filtro de paso alto y el algoritmo de clasificación de imágenes automatizado descrito anteriormente, se genera entonces una imagen clínica como una síntesis de las imágenes asociadas con la serie de patrones espaciales. En un ejemplo, se puede indicar a la fuente de luz estructurada 14 que genere un primer patrón espacial que tenga una frecuencia espacial asociada, un segundo patrón espacial que tenga la misma frecuencia espacial, pero con un cambio de fase del primer patrón espacial en una primera cantidad, por ejemplo, $2\pi / 3$, y un tercer patrón espacial que tiene la misma frecuencia espacial, pero con un cambio de fase desde el primer patrón espacial en una segunda cantidad, por ejemplo, $4\pi / 3$. Se captura una imagen para cada uno de los patrones espaciales y se combina para proporcionar una imagen clínica con un valor de intensidad, I_s , para cada píxel en función de los valores de intensidad, I_1 , I_2 , y I_3 , para el píxel

correspondiente en las tres imágenes, de forma tal que:

$$I_s = \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_1 - I_3)^2} \quad \text{Ecuación 1}$$

5 El sistema de formación de imágenes ilustrado 10 proporciona una serie de ventajas. Por ejemplo, la velocidad de adquisición de imágenes SIM aumenta significativamente. En una implementación, el sistema 10 puede lograr tasas de muestreo de píxeles de 112,8 MHz, correspondientes a una frecuencia de fotogramas SIM de 26,9 Hz, a 2048 * 2048 píxeles por fotograma para imágenes SIM utilizando tres imágenes sin procesar por fotograma SIM. La velocidad de adquisición está directamente relacionada con el potencial clínico. Dado que el objetivo es cubrir grandes áreas en un corto período de tiempo a alta resolución, el sistema 10 se enfoca en la tasa de muestreo de píxeles. El inventor ha logrado esto a través de una cuidadosa selección de componentes, como el SLM [del inglés "spatial light modulator" o "modulador de luz espacial"] ferroeléctrico con tiempos de conmutación de microsegundos, y una cámara sCMOS con una frecuencia de fotogramas de 100 Hz, así como un cuidadoso desarrollo del software de control 18 para optimizar la sincronización entre la cámara y el patrón SLM mostrado.

15 Además, el sistema 10 puede incluir un método para implementar el enfoque automático en cada posición del sistema de formación de imágenes en la muestra. Dado que el sistema 10 está configurado para obtener imágenes de muestras frescas e intactas, el objetivo generalmente no es plano. Para permitir la formación de imágenes contiguas de los contornos de la superficie, el sistema de control 18 proporciona una rutina de enfoque automático automatizada para enfocar la superficie del tejido en cada posición del mosaico. Esto permite un mosaico consistente de alta resolución, ya que no es práctico para un ser humano enfocar manualmente el sistema miles de veces para obtener imágenes de un solo espécimen.

25 La figura 2 ilustra un esquema de un ejemplo de un sistema de microscopía 50 para obtener imágenes de una muestra fresca 52 de acuerdo con una realización de la presente invención. El sistema de ejemplo utiliza una plataforma de microscopio de epifluorescencia automatizada modular, que incorpora una platina XY motorizada y un controlador y un posicionador de objetivo Z piezoeléctrico que se utiliza para reposicionar un conjunto de lente de objetivo 54. En consecuencia, el sistema ilustrado 50 puede proporcionar imágenes de muestras que tienen campos de visión más grandes que tal solo un fotograma al trasladar la plataforma del microscopio y crear un mosaico a partir de las imágenes resultantes. En una implementación, esto se puede lograr trasladando la muestra en las direcciones X e Y con exploración serpentina o de trama en incrementos apropiados definidos de acuerdo con el tamaño del sensor de la cámara y la ampliación proporcionada por el conjunto de lentes del objetivo 54.

35 En el sistema ilustrado, una fuente de luz 56 incluye un diodo emisor de luz (led) azul recogido por una lente condensadora esférica. Sin embargo, se apreciará que la luz podría proporcionarse de otra manera, por ejemplo, a través de un láser y un expansor de haz asociado. La luz recolectada luego se transmite a través de un divisor de haz polarizador (PBS del inglés "polarizing beam splitter") 58. Luego, la luz se suministra a un modulador de luz espacial (SLM del inglés "spatial light modulator") 60. El modulador de luz espacial 60 puede incluir, por ejemplo, un dispositivo de cristal líquido ferroeléctrico sobre silicio, un dispositivo de microespejo digital, un dispositivo de cristal líquido nemático torcido sobre silicio, un dispositivo de rejilla mecánica y un dispositivo de máscara física. El modulador de luz espacial 60 puede funcionar en modo de reflexión o el modulador de luz espacial puede funcionar en modo de transmisión. El modulador de luz espacial 60 ajusta uno o ambos de la intensidad y la fase del haz de la fuente de luz, de manera que la salida de luz del modulador de luz espacial tiene un patrón espacial definido.

45 En la implementación que se muestra, la luz se refleja en un modulador de luz espacial 60 de cristal líquido sobre silicio ferroeléctrico, que se coloca en un plano conjugado con el plano de la muestra. La salida del led se refleja en el modulador de luz espacial 60 para aumentar el contraste del patrón, aumentar la uniformidad de la iluminación y maximizar la duración. En la implementación que se muestra, el modulador de luz espacial 60 está configurado de tal manera que la luz reflejada desde el modulador de luz espacial tiene un brillo, si, variando una dimensión, x, en un patrón sinusoidal que se puede representar como:

$$s_i(x, y) = 1 + m \cos(vx + \phi_i) \quad \text{Ecuación 2}$$

55 en donde m es una profundidad de modulación, donde varía entre cero y uno, v es una frecuencia espacial de la variación del brillo, y ϕ_i es un cambio de fase para un patrón dado. Cada uno de la profundidad de modulación y la frecuencia espacial son seleccionados por el usuario para producir un patrón específico para una aplicación determinada.

60 Una vez que la luz de excitación ha sido modulada, se pasa a través de un polarizador de limpieza 62 para mejorar el contraste, una primera lente de tubo 64 y un filtro pasabanda de excitación 66. La luz de excitación filtrada se

refleja en el conjunto de lentes de objetivo 54 mediante un espejo dicróico 70 y forma una imagen del patrón espacial asociado con el modulador de luz espacial 60 sobre la muestra. La potencia aproximada en la muestra se puede monitorear, en algunas implementaciones, con un sensor de potencia térmica colocado sobre el conjunto de lentes del objetivo 54. La fluorescencia de la muestra es recolectada por el conjunto de lentes del objetivo 54, transmitida a través del espejo dicróico 70, en un filtro pasabanda de emisión 72. A continuación, la fluorescencia es reflejada por una segunda lente de tubo 74 en una cámara científica CMOS 76.

En una implementación del sistema que se ilustra 50, la sincronización y el control de la fuente de luz 54, el SLM 60, el escenario, el objetivo y la cámara se lograron 76 a través de un software personalizado almacenado en un medio informático no transitorio en un sistema de control 80. Por ejemplo, los patrones de cuadrícula sinusoidal se generaron en el software y se cargaron en una memoria integrada del SLM 60 antes de la creación de imágenes. El cálculo de la imagen SIM y el ensamblaje de las imágenes en mosaicos se pueden realizar automáticamente durante el procedimiento de adquisición mediante un software personalizado. Un módulo de iluminación estructurada autónomo, que contiene los componentes que comprenden la ruta óptica para la iluminación 56, 58, 60, 62, 64 y 66, está montado en la plataforma del microscopio, y todo el sistema se adapta cómodamente en un banco de laboratorio con ruedas personalizado, de cuatro pies de ancho [121,92 cm] y tres pies de profundidad [91,44 cm].

De acuerdo con una realización de la presente invención, el sistema de control 80 puede sincronizar la plataforma del microscopio, la fuente de luz 56, el SLM 60 y la cámara CMOS 76. Específicamente, una posición relativa del conjunto de lente objetivo 54 y la muestra 52 se puede ajustar en incrementos precisos definidos por un campo de visión de la cámara CMOS 76, y se puede formar una imagen de mosaico, que representa la muestra completa. El inventor ha encontrado que, a través de una sincronización cuidadosa de estos componentes 56, 60 y 76, es posible proporcionar una imagen de mosaico que está sustancialmente libre de objetos.

En una implementación, el SLM 60 se puede operar en modo de ponderación de plano de bits de 8 bits, y la visualización del patrón se sincronizó con la exposición de la cámara mediante el sistema de control 80. Las pantallas de cristal líquido ferroeléctrico del SLM 60 operaron en modo de equilibrio de DC, en el que cada píxel se impulsa en direcciones positivas y negativas durante la misma duración. Por lo tanto, para mantener el contraste entre los patrones, la fuente de luz 56 se activó para iluminar únicamente el SLM durante la parte positiva del ciclo de visualización. A la velocidad de fotogramas máxima de la cámara de resolución completa de aproximadamente cien fotogramas por segundo (fps del inglés "*frames-per-second*") en el modo de disparo interno, la velocidad de fotogramas de la SIM de resolución completa correspondiente fue de aproximadamente $100/3 = 33$ fps, como se muestra en la ecuación 1, se utilizan tres tramas secuenciales en una trama SIM. Esto correspondía a una frecuencia de muestreo de píxeles de aproximadamente 138,4 MHz para obtener imágenes seccionadas ópticamente. La velocidad de fotogramas de la cámara, dada por el recíproco del tiempo de integración para tiempos de integración superiores a 10 ms, se ajustó para optimizar la intensidad de la señal de la muestra. La duración de la secuencia del plano de bits de 8 bits utilizada en una implementación fue de aproximadamente 4,135 ms, y se utilizaron tiempos de integración que eran múltiplos enteros de la duración de la secuencia, particularmente en tiempos de integración cortos, para sincronizar correctamente la visualización del patrón con los tiempos de integración de la cámara.

En una realización, el sistema 50 tiene un campo de visión (FOV del inglés "*field-of-view*") de un solo fotograma de aproximadamente 1,3 mm x aproximadamente 1,3 mm, con una resolución de aproximadamente 4,2 megapíxeles, aproximadamente 2048 x 2048 píxeles. Para el objetivo y la cámara particulares utilizados en una realización, el factor limitante para la resolución es el tamaño de píxel de la cámara, que es de aproximadamente 0,65 μm en la muestra. La resolución óptica limitada por difracción del sistema óptico es de aproximadamente 0,745 μm , utilizando la fórmula comúnmente aceptada de $R = 0,61 \lambda/\text{NA}$, donde λ = aproximadamente 550 nm para el filtro pasabanda de emisión utilizado en esta realización. Por tanto, según el criterio de Nyquist, la resolución del sistema no está limitada por la difracción, sino por el tamaño de los píxeles de la cámara, y está limitada a 1,3 μm . Se pueden lograr diferentes relaciones de FOV a resolución óptica para diversas realizaciones cambiando el objetivo de formación de imágenes a modelos de mayor o menor aumento.

Una implementación del sistema 50 ilustrado proporciona una solución de coste y complejidad relativamente bajos para la evaluación de muestras intraoperatorias. Es robusto para el uso clínico de rutina, ya que no es necesario que el usuario lo ajuste y la única parte móvil es la plataforma del microscopio 52. El sistema ilustrado 50 es compacto y cabe en un carro de instrumentos de laboratorio con ruedas personalizado. Debido a su naturaleza de imagen de campo amplio y eficiente en luz, permite una evaluación rápida y es fácilmente escalable para una amplia gama de proporciones de resolución a área de cobertura simplemente cambiando el objetivo del microscopio. El sistema se basa en análogos fluorescentes simples de los colorantes histológicos estándar como agentes de contraste para resaltar las características histológicas y no se basa en el reconocimiento molecular ni tiene la necesidad de establecer umbrales de sensibilidad cuantitativos, lo cual es común con otras aplicaciones de imágenes moleculares. El sistema proporciona datos en forma de imágenes histológicas, que son bien entendidos y aceptados por los profesionales clínicos primarios, patólogos y cirujanos. El paradigma de imágenes *ex vivo* es consistente con el estándar actual de atención, no es destructivo y no requiere la administración de medicamentos u otros agentes a los pacientes.

Al proporcionar un análogo de fluorescencia multicolor y multitinción optimizado para la tinción histológica estándar aplicable a tejidos frescos no fijados mediante pulverización u otro método de administración, el sistema mostrado 50 permite una alta resolución de la característica histológica en un sistema de exploración rápida. Este enfoque de histología de fluorescencia podría tener implicaciones para otras aplicaciones más allá de la evaluación del margen del tumor, como en la detección rápida de muestras de patología para dirigir el muestreo para histopatología permanente. Estos análogos fluorescentes que se pueden aplicar intraoperatoriamente al tejido extirpado, mediante pulverización, inmersión, goteo, vertido u otras técnicas de aplicación, permitirán la adquisición de imágenes de detalles histológicos que antes solo eran posibles con técnicas de tinción y cortes físicos que requieren mucho trabajo.

En una implementación, se puede usar un tinte optimizado para preparar la muestra de tejido. Por ejemplo, las soluciones de colorantes catiónicos, como los análogos de la hematoxilina, incluidos el naranja de acridina, la acriflavina, la proflavina, la tetraciclina de alumbre y la primulina, se pueden ajustar de pH ácido a neutro, o las soluciones de colorantes aniónicos, como la eosina o los análogos de la eosina, se pueden ajustar de pH básico a neutro. La formulación óptima proporciona un equilibrio entre la selectividad nuclear, citoplasmática o estromal y la intensidad de la tinción. Es probable que la intensidad de la fluorescencia siga un comportamiento parabólico con un aumento de la concentración, con una intensidad de emisión máxima cuando el tejido está saturado con colorante, pero no tan concentrado como para que los efectos de autoextinción o filtro interno reduzcan la emisión de fluorescencia.

Cuando se utilizan estos colorantes optimizados, el sistema puede incluir una cámara adicional para obtener imágenes simultáneas de doble longitud de onda. Se puede usar un divisor dicróico en el brazo de detección para separar las bandas de emisión de los dos fluoróforos óptimos y dirigirlos a las cámaras. Si se usan dos longitudes de onda de excitación distintas, se puede usar un combinador dicróico para combinar dos ledes con un componente dicróico multibanda para iluminar simultáneamente el tejido. El inventor ha descubierto que actualmente es preferible una solución de dos cámaras a una disposición de una sola cámara, para facilitar la obtención de imágenes a alta velocidad, aunque se apreciará que se podría utilizar una disposición de una sola cámara para la obtención de imágenes de doble longitud de onda con el uso de filtros apropiados.

Finalmente, en una implementación, el sistema de control 80 puede incluir una herramienta de zoom y transmisión basada en la web para la visualización remota de imágenes grandes. La herramienta puede incluir versiones de varias resoluciones de las imágenes de mosaico, denominadas "pirámides de imágenes". Esto se puede utilizar para una visualización y un diagnóstico eficientes de las imágenes, ya que no es práctico utilizar imágenes en bruto de resolución completa que pueden superar los veinticinco gigabytes de tamaño.

Los inventores han probado y calificado las medidas de rendimiento de un ejemplo de un sistema utilizando fantasmas [maniqués] sólidos. Para probar la respuesta axial del sistema, se untó una gota de bolitas de poliestireno fluorescente de 1 μm sobre el fondo de cubreobjetos de una placa de cultivo y se cubrió con una capa de polímero ópticamente transparente, como poli(dimetilsiloxano) (PDMS del inglés "*poly(dimethylsiloxane)*"). Esto se denomina en el presente documento Fantoma A. Para simular la obtención de imágenes de núcleos celulares teñidos con fluorescencia en la superficie del tejido, se untaron bolitas fluorescentes de 10 μm sobre el cubreobjetos y se cubrieron con una capa de PDMS mezclado con TiO₂ en polvo, para simular la dispersión de tejido (coeficiente de dispersión reducido $\mu_s \sim 20\text{cm}^{-1}$), denominado en el presente como Fantoma B.

Para garantizar que la muestra de la imagen sea clínicamente útil, los inventores han determinado cómo se pueden seleccionar los parámetros óptimos para el patrón de luz espacial utilizado para el sistema de microscopía de iluminación estructurada de las FIGS. 1 y 2. Por ejemplo, los inventores han determinado experimentalmente el espesor efectivo de la sección óptica del sistema SIM. Con este fin, el Fantoma A se trasladó axialmente hacia el objetivo y se adquirió una imagen seccionada utilizando iluminación estructurada en cada paso de 10 μm. La intensidad de fluorescencia media de una región de interés (ROI del inglés "*region of interest*") dentro de la imagen seccionada se trazó frente a la profundidad axial para determinar el grosor de la sección del sistema.

La figura 3 ilustra un gráfico 100 del ancho total medido y teórico a la mitad del máximo (FWHM) de la respuesta axial del sistema de la figura 2 como una función de la frecuencia espacial normalizada, que se midió usando el Fantoma A. El eje vertical, 102, representa el FWHM, y el eje horizontal 104 representa la frecuencia espacial

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu\lambda}{n \sin(\alpha)}$$

normalizada, . Para cada frecuencia de patrón, el objetivo del microscopio se escaneó a través de la muestra en incrementos de aproximadamente 1-3 μm, dependiendo de la frecuencia, y se adquirió una imagen de microscopía de iluminación estructurada en cada plano z. La respuesta axial del sistema se determinó promediando la intensidad de una región de interés (ROI) que contenía el frotis de bolitas de poliestireno de subdifracción y trazando la intensidad media frente a la posición z.

Como se puede ver en el gráfico, el grosor de la sección óptica disminuye a medida que aumenta la frecuencia

espacial del patrón de cuadrícula, y existe una concordancia bastante buena entre las respuestas axiales medidas y teóricas. El inventor ha determinado que hay pocos beneficios en el uso de frecuencias espaciales normalizadas mayores de aproximadamente 0,17, dado que el aumento en la potencia de corte óptico es pequeño y puede compensarse mediante la disminución de la SNR. Para SIM incoherente, la frecuencia espacial normalizada óptima es más baja, alrededor de 0,1, más allá de la cual hay una pequeña disminución en el grosor de la sección óptica. Esta es una ventaja de la SIM incoherente, ya que el grosor de la sección óptica para una frecuencia espacial normalizada dada es menor que para la SIM coherente, y permite utilizar frecuencias de patrón más bajas con una SNR más alta para obtener el mismo efecto de sección óptica.

Además, el grosor de la sección se midió en un rango de frecuencias de patrones de iluminación, para cada uno de los espectros con diferentes propiedades de dispersión. La aproximación de Stokseth, mostrada a continuación como ecuación 3, se encontró que proporciona un valor de espesor de sección óptica teórico válido.

$$I(u) = 2f(\tilde{v}) \frac{J_1 \left[2u\tilde{v} \left(1 - \frac{\tilde{v}}{2} \right) \right]}{2u\tilde{v} \left(1 - \frac{\tilde{v}}{2} \right)}$$

Ecuación 3

en dónde $F(\tilde{v}) = 1 - 0,69\tilde{v} + 0,0076\tilde{v}^2 + 0,043\tilde{v}^3$, $\tilde{v} = \frac{v\lambda}{n \sin(\alpha)}$, $u = \frac{8\pi zn}{\lambda} \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right)$, $I(u)$ es la respuesta axial de corte óptico, J_1 es la función de Bessel del primer tipo, v es la frecuencia de red, \tilde{v} es la frecuencia de red normalizada, λ es la longitud de onda de emisión, $n \sin(\alpha)$ es la NA del objetivo, z es la distancia axial real, y u es la distancia axial normalizada.

A continuación, el inventor determinó una relación entre el grosor de la sección y la frecuencia de iluminación para ayudar a seleccionar la frecuencia apropiada para la formación de imágenes. La profundidad de modulación, m , como se mostró anteriormente en la ecuación 2, es una cantidad que representa la amplitud del patrón de iluminación sinusoidal transferido a la muestra. La intensidad de la fluorescencia recibida en la imagen seccionada, I_s , se puede describir como una función de la fluorescencia en foco, $f(x,y)$ y la profundidad de modulación como:

$$I_s = \frac{3m}{2\sqrt{2}} f(x, y)$$

Ecuación 4

Puede verse que la señal resultante de la imagen seccionada ópticamente, I_s , se describe principalmente por la fluorescencia en foco, $f(x,y)$. Sin embargo, en esta ecuación aparece un coeficiente que depende de la profundidad de modulación, m , y escala $f(x,y)$ respectivamente. Además, la profundidad de modulación disminuye con la frecuencia espacial debido al decaimiento natural en la forma de la función de transferencia óptica incoherente del objetivo. La profundidad de modulación se puede medir píxel por píxel utilizando imágenes trifásicas desplazadas, I_1 , I_2 , y I_3 , tal y como se describe en la ecuación 1, de la siguiente manera:

$$m(x, y) = \sqrt{\frac{8}{3} \left[\left(\mu_1 - \frac{1}{2} \right)^2 + \left(\mu_2 - \frac{1}{2} \right)^2 + \left(\mu_3 - \frac{1}{2} \right)^2 \right]}$$

Ecuación 5

$$\mu_i = \frac{3I_i}{2(I_1 + I_2 + I_3)}$$

La profundidad de modulación, $m(x,y)$ en cada píxel dentro de una imagen dada se puede medir y se puede elegir un valor medio para representar la profundidad de modulación sobre una región específica de interés en cada imagen. Esta profundidad de modulación mediana se midió para un rango de frecuencias utilizando la misma región

de interés y ubicación de la muestra en los mismos fantasmas fluorescentes utilizados para caracterizar el espesor de la sección óptica. El fantoma simplemente se enfocó en el plano de la muestra y se adquirieron tres imágenes con desplazamiento de fase en múltiples frecuencias de iluminación. El inventor ha descubierto que, debido a la relación directa de la profundidad de modulación en la señal recuperada y la relación inversa entre la relación señal/ruido y la profundidad de modulación, se selecciona una frecuencia de iluminación que produzca una profundidad de modulación y un espesor de sección óptica suficientes para generar un resultado clínicamente útil. La relación señal-ruido de una imagen seccionada es una medida cuantitativa de la calidad de la imagen, que está directamente influenciada por la profundidad de modulación de la siguiente manera:

10 en donde $I_w = 2(I_1 + I_2 + I_3)/3$.

$$SNR_{Uniform} = \frac{\langle I_w \rangle}{\delta(I_w)} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$SNR_{Sectioned} = \frac{mI_s \sqrt{3}}{2\delta(I_w)} \quad \text{Ecuación 7}$$

15 La I_w representa la imagen tradicional de campo amplio que se reconstruye a partir de las imágenes de iluminación estructurada desplazada en tres fases. La imagen seccionada, I_s , se calcula usando la ecuación 1. La profundidad de modulación tiene un impacto directo en la SNR de la imagen seccionada, como se muestra en la ecuación 7. El inventor ha calificado las mediciones del grosor de la sección óptica, la profundidad de la modulación y la SNR correspondiente a múltiples frecuencias para proporcionar información sobre la selección de una única frecuencia de iluminación que proporcione el mejor equilibrio entre estos parámetros.

20 Se tomaron imágenes de los fantasmas que consistían en una sola capa de esferas de fluorescencia de 10 μm de diámetro. Las esferas se incrustaron en PDMS y TiO_2 dando al medio circundante un valor de coeficiente de dispersión reducido biológicamente relevante ($\mu_s = 10\text{cm}^{-1}$) para introducir fluorescencia de fondo. Cada imagen se normalizó dividiendo cada píxel por la intensidad máxima dentro de la imagen. Las imágenes demuestran claramente la mejora observada en la iluminación estructurada en comparación con la iluminación uniforme. La frecuencia de iluminación específica elegida para adquirir estas imágenes fue de 31,7 μm . La relación de contraste se calculó directamente en ambas imágenes, lo que mostró una mejora cuantitativa significativa, un 830% mayor en la imagen seccionada sobre la imagen uniforme.

30 La fuerza de corte óptico para cada una de una pluralidad de frecuencias de iluminación se midió utilizando los tres fantasmas, con coeficientes de dispersión, en cm^{-1} , de 0, 10 y 20, y los métodos descritos anteriormente. Específicamente, para el objetivo 4x, las frecuencias de iluminación absolutas en el plano de muestra, en mm^{-1} , incluído 101; 67; 50,3; 47,7; 40,7; 31,7; 24,1 y 19,6. Para el objetivo 2x, las frecuencias incluíeron 25,1; 16,7; 12,5 y 10,2. La apertura numérica de ambas lentes era de 0,1. Se determinó que el espesor del corte óptico disminuyó a medida que la frecuencia espacial de iluminación aumentó en una relación no lineal. El análisis estadístico de los datos usando una prueba t de Student no demostró una diferencia significativa entre los niveles de dispersión. Los datos de espesor de la sección óptica medidos se compararon con un valor teórico adquirido utilizando la aproximación de Stokseth a la función de transferencia óptica como se muestra en la ecuación 3. Los datos medidos del escaneo axial único coincidieron bien con la aproximación de Stokseth usando las variables $v = 19,6 \text{ mm}^{-1}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$ y $\text{NA} = 0,1$. Los espesores de la sección óptica medidos mostraron una excelente concordancia con el espesor de la sección óptica teórico calculado utilizando la aproximación de Stokseth.

45 Después de determinar la dependencia de la frecuencia del grosor de la sección óptica, el inventor midió la profundidad de modulación en cada frecuencia de iluminación. Las profundidades de modulación medidas en dos fantasmas separados ($\mu_s = 0$ y 10 cm^{-1}) para cada frecuencia se calcularon como el valor medio sobre una ROI idéntica en cada imagen para todas las frecuencias de iluminación utilizando la misma potencia de iluminación láser y el mismo tiempo de integración del dispositivo de carga acoplada. Las barras de error se generaron calculando la desviación estándar de la profundidad de modulación en diez imágenes en la misma ubicación de muestra. Los datos indicaron claramente una relación inversa entre la profundidad de modulación y la frecuencia de iluminación. Además, se observó una disminución significativa en la profundidad de modulación en todas las frecuencias en el fantoma con un coeficiente de dispersión de 10 cm^{-1} en comparación con el fantoma sin dispersión.

La figura 4 ilustra un gráfico 110 de la relación de la relación señal a ruido (SNR) uniforme a la SNR seccionada frente a la profundidad de modulación. Esta relación, representada por el eje vertical 112, demuestra la reducción en

la SNR de la microscopía de iluminación estructurada en comparación con la microscopía estándar de campo amplio. Un eje horizontal 114 del gráfico 100 representa la profundidad de modulación. Tal y como se puede ver en el gráfico 100, la relación disminuye con la profundidad de modulación, lo que indica una menor degradación en SNR a profundidades de modulación más altas en comparación con profundidades de modulación más bajas.

5 La velocidad de generación de imágenes del sistema y la relación señal-fondo (SBR) resultante se midieron con el Fantoma B. Se tomaron imágenes de una sola región del fantoma en modo SIM usando tiempos de integración de alrededor de 12,4 ms, alrededor de 25 ms, alrededor de 50 ms y alrededor de 100 ms, correspondientes a tasas de formación de imágenes SIM de aproximadamente 26,9, aproximadamente 13,3, aproximadamente 6,7 y
10 aproximadamente 3,3 Hz, respectivamente. Las imágenes no SIM correspondientes se recopilaron para comparar. Se adquirieron diez imágenes secuenciales para cada tiempo de integración. La SBR para una sola imagen se midió promediando la intensidad de una región de interés (ROI) de la imagen que contiene bolitas y dividiéndola por la intensidad promedio de una ROI de tamaño idéntico sin bolitas. La desviación promedio y estándar del SBR se calculó sobre las diez imágenes secuenciales utilizando las mismas ROI. La salida del led se ajustó para obtener la
15 señal más alta disponible sin saturar el detector CMOS científico antes de la toma de imágenes. Además, se obtuvieron mosaicos del fantoma.

La relación señal-fondo (SBR) en función de la velocidad de formación de imágenes se calculó a partir de la serie de imágenes fantoma. Se usó una frecuencia espacial de patrón normalizado de aproximadamente 0,05 para SIM en
20 estas imágenes de una realización. La figura 5 ilustra dos imágenes 122 y 124 del Fantoma B. En la primera imagen 122, el fantoma se refleja a 80,6 fotogramas por segundo (fps) sin usar SIM. En la segunda imagen 124, se tomaron imágenes del fantoma a 26,9 fps efectivos, estando formado cada fotograma a partir de tres imágenes constituyentes que representan diferentes patrones espaciales, como se describe anteriormente con respecto a la ecuación. 1. Se apreciará que la imagen SIM 124 proporciona un aumento significativo en el contraste y la
25 resolución. La figura 6 es un gráfico de barras 130 que demuestra el aumento de SBR, representado por el eje vertical 132, en las imágenes SIM utilizando una velocidad de fotogramas comparable. Se apreciará que el SBR para la imagen SIM 124 es significativamente más alto que el SBR para la imagen no SIM 122, lo que demuestra la mejora en el contraste debido a la sección óptica debida a SIM.

30 En vista de las características estructurales y funcionales anteriores descritas anteriormente en las figuras 1 a 6, las metodologías de ejemplo se apreciarán mejor con referencia a la figura 7. Si bien, con el propósito de simplificar la explicación, la metodología de la figura 7 se muestra y se describe como ejecutándose en serie, debe entenderse y apreciarse que la presente invención no está limitada por el orden ilustrado, ya que algunas acciones podrían ocurrir en otros ejemplos en diferentes órdenes y/o al mismo tiempo que las mostradas y descritas en este documento.

35 La figura 7 ilustra un método 150 para evaluar rápidamente una muestra de tejido extraída durante un procedimiento médico. En 152, la muestra de tejido se prepara de manera que el tejido emita fluorescencia bajo iluminación. En una implementación, preparar la muestra de tejido incluye aplicar una tinción fluorescente a la muestra de tejido extraída de un paciente. La tinción fluorescente se puede seleccionar el grupo que comprende acriflavina, naranja de acridina, alumbre-tetraciclina, eosina, DRAQ5™, ácido pícrico y fucsina ácida, por ejemplo, mediante pulverización, goteo, inmersión o vertido. En otra implementación, preparar la muestra de tejido incluye administrar al paciente un agente de contraste fluorescente no tóxico que mejora el tejido y obtener imágenes del tejido después de la extracción. En otra aplicación más, aplicar el tinte fluorescente a la muestra de tejido comprende aplicar al menos dos tintes seleccionados del grupo anterior como parte de un proceso de múltiples tintes multicolor. En 154, se proyecta sobre la muestra de tejido una iluminación modelada espacialmente. En una implementación, proyectar iluminación con patrón espacial sobre la muestra de tejido incluye producir luz en uno de un láser y un diodo emisor de luz y reflejar la luz producida desde un conjunto de modulador de luz espacial.

50 En 156, se forma una imagen de la fluorescencia emitida por la muestra durante el procedimiento médico. En una implementación, cada uno de un primer patrón espacial, que tiene una frecuencia espacial, y una pluralidad de otros patrones espaciales, que tienen la frecuencia espacial y un cambio de fase asociado con respecto al primer patrón, se proyectan sobre la muestra de tejido en una secuencia predeterminada. La fluorescencia emitida por la muestra se refleja durante cada patrón de iluminación espacial para producir una pluralidad de imágenes. En una implementación, cada imagen de la pluralidad de imágenes puede representar por sí misma compuestos, o
55 mosaicos, de una pluralidad de imágenes individuales que representan diferentes porciones de la muestra de tejido. De acuerdo con la invención, para capturar una de la pluralidad de imágenes, la muestra y al menos una parte de un sistema de formación de imágenes, tal como la lente del objetivo, se pueden colocar en una primera posición relativa, pudiéndose capturar una primera imagen compuesta, que representa la fluorescencia emitida desde una primera ubicación en la muestra. Al mover la muestra o la parte del sistema, la muestra y el sistema de formación de imágenes se pueden colocar en una segunda posición relativa. Se puede capturar una segunda imagen compuesta, que representa la fluorescencia emitida desde una segunda ubicación en la muestra de tejido. Esto puede repetirse hasta que todas las porciones de la muestra estén adecuadamente representadas. Las diversas imágenes compuestas pueden luego combinarse para proporcionar una de la pluralidad de imágenes.

65 En 158, se proporciona un resultado clínicamente útil y comprensible para el ser humano (imagen clínica). De acuerdo con la presente invención, esta salida es una síntesis de varias imágenes compuestas seccionadas

5 ópticamente, tomadas con diferentes cambios de fase tal y como se describe en 156, para producir una imagen clínica. Por ejemplo, el cambio de fase del patrón de iluminación espacial para una i -ésima imagen en una serie de n imágenes puede ser igual a $2\pi(i-1)/n$. Las imágenes resultantes se pueden combinar de manera que la combinación de las imágenes de tal manera que una intensidad para un píxel dado de la imagen clínica, I_s , se pueda representar mediante una combinación de píxeles correspondientes, I , tal que:

$$I_s = \sqrt{\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (I_i - I_j)^2}$$

Ecuación 8

10 En otra implementación, la salida clínicamente útil se proporciona cuando se aplica un filtro de paso alto a una imagen compuesta seccionada ópticamente o una imagen clínica formada a partir de múltiples imágenes para aislar y aclarar estructuras pequeñas, como núcleos celulares, dentro de la imagen. En otra implementación más, la imagen seccionada ópticamente y la imagen clínica pueden proporcionarse a un algoritmo de clasificación de imágenes automatizado para clasificar todo o una parte del tejido. Por ejemplo, el algoritmo de clasificación puede ubicar regiones de tejido sano y enfermo dentro de la muestra según una o más características de clasificación, como la densidad de los núcleos celulares.

15 La figura 8 es un diagrama de bloques esquemático que ilustra un ejemplo de un sistema 200 de componentes de hardware capaces de implementar ejemplos de los sistemas y métodos descritos en las figuras 1 a 7, como el sistema de microscopía de iluminación estructurada ilustrado en las figuras 1 y 2. El sistema 200 puede incluir varios sistemas y subsistemas. El sistema 200 puede ser un ordenador [computador] personal, un ordenador portátil, una estación de trabajo, un sistema informático, un dispositivo, un circuito integrado de aplicación específica (ASIC del inglés "*application-specific integrated circuit*"), un servidor, un centro de servidores *blade*, una granja de servidores, etc.

25 El sistema 200 puede incluir un bus de sistema 202, una unidad de procesamiento 204, una memoria de sistema 206, dispositivos de memoria 208 y 210, una interfaz de comunicación 212 (por ejemplo, una interfaz de red), un enlace de comunicación 214, una pantalla 216 (por ejemplo, una pantalla de vídeo), y un dispositivo de entrada 218 (por ejemplo, un teclado y/o un ratón [mouse, o ratón para ordenador]). El bus del sistema 202 puede estar en comunicación con la unidad de procesamiento 204 y la memoria del sistema 206. Los dispositivos de memoria adicionales 208 y 210, como una unidad de disco duro, un servidor, una base de datos independiente u otra memoria no volátil, también pueden estar en comunicación con el bus del sistema 202. El bus del sistema 202 interconecta la unidad de procesamiento 204, los dispositivos de memoria 206-210, la interfaz de comunicación 212, la pantalla 216 y el dispositivo de entrada 218. En algunos ejemplos, el bus del sistema 202 también se interconecta un puerto adicional (no se muestra), como un puerto de bus serie universal (USB del inglés "*universal serial bus*").

35 La unidad de procesamiento 204 puede ser un dispositivo informático y puede incluir un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC). La unidad de procesamiento 204 ejecuta un conjunto de instrucciones para implementar las operaciones de los ejemplos descritos en este documento. La unidad de procesamiento puede incluir un núcleo de procesamiento.

40 Los dispositivos de memoria adicionales 206, 208 y 210 pueden almacenar datos, programas, instrucciones, consultas de bases de datos en formato de texto o compilado, y cualquier otra información que pueda ser necesaria para hacer funcionar el ordenador [computador]. Las memorias 206, 208 y 210 pueden implementarse como medios legibles por computadora (integrados o extraíbles) tales como una tarjeta de memoria, unidad de disco, disco compacto (CD del inglés "*compact disk*") o servidor accesible a través de una red. En ciertos ejemplos, las memorias 206, 208 y 210 pueden comprender texto, imágenes, vídeo y/o audio, partes de los cuales pueden estar disponibles en formatos comprensibles para los seres humanos.

45 Además o alternativamente, el sistema 200 puede acceder a una fuente de datos externa o una fuente de consulta a través de la interfaz de comunicación 212, que puede comunicarse con el bus del sistema 202 y el enlace de comunicación 214.

50 En funcionamiento, el sistema 200 se puede usar para implementar una o más partes de un sistema de imágenes de acuerdo con la presente invención, como el sistema de control 18. La lógica ejecutable por computadora para implementar partes del sistema de imágenes reside en uno o más de los la memoria del sistema 206, y los dispositivos de memoria 208, 210 de acuerdo con ciertos ejemplos. La unidad de procesamiento 204 ejecuta una o más instrucciones ejecutables por computadora que se originan en la memoria del sistema 206 y los dispositivos de memoria 208 y 210. El término "medio legible por computadora" tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un medio o medios que participan en proporcionar instrucciones a la unidad de procesamiento 204 para su ejecución. Por lo tanto, se apreciará que un medio legible por computadora no es transitorio y puede incluir múltiples medios discretos que están operativamente conectados a la unidad de procesamiento, por ejemplo, a través de uno o más de un bus local o una conexión de red.

Lo que se ha descrito anteriormente son ejemplos de la presente invención. Por supuesto, no es posible describir cada combinación concebible de componentes o metodologías con el fin de describir la presente invención, pero un experto en la materia reconocerá que son posibles muchas otras combinaciones y permutaciones de la presente invención, dentro de las alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

REIVINDICACIONES

1. Sistema (10) para evaluar una muestra de tejido fresco (12), preparada para emitir fluorescencia bajo iluminación y extraída o expuesta durante un procedimiento médico, comprendiendo el sistema:

una plataforma para contener la muestra de tejido fresco (12);

una fuente de luz estructurada (14) que comprende una fuente de luz (58) y un modulador de luz espacial (60), en donde:

la fuente de luz (56) está configurada para generar un haz de luz; y

el modulador de luz espacial (60) está configurado para modular el haz de luz de acuerdo con un conjunto predefinido de múltiples patrones de iluminación,

en el que la fuente de luz estructurada (14) está configurada para proyectar los múltiples patrones de iluminación del haz de luz sobre la muestra de tejido fresco (12) para iluminar la muestra de tejido fresco;

un sistema de formación de imágenes (16) configurado para obtener imágenes de la fluorescencia emitida por la muestra de tejido fresco cuando la platina y al menos una parte del sistema de formación de imágenes están dispuestos en una primera posición relativa e iluminados con el conjunto predefinido de múltiples patrones de iluminación para proporcionar una primera imagen compuesta ópticamente seccionada y para obtener imágenes de la fluorescencia emitida por la muestra de tejido fresco cuando la platina y al menos una parte del sistema de imágenes se disponen en una segunda posición relativa y se iluminan con el conjunto predefinido de múltiples patrones de iluminación para proporcionar una segunda imagen compuesta seccionada ópticamente; y

un sistema de control (18) configurado para proporcionar una imagen clínica comprensible para el ser humano que tiene una resolución suficiente para permitir la toma de decisiones clínicas significativas asociadas con el procedimiento médico basado en la imagen clínica sintetizando al menos la primera imagen compuesta seccionada ópticamente y la segunda imagen compuesta seccionada ópticamente.

2. El sistema (10) de la reivindicación 1, en el que el sistema de control (18) comprende un algoritmo de clasificación de imágenes automatizado.

3. El sistema (10) de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sistema de control (18) está configurado además para aplicar un filtro de paso alto a una imagen clínica o compuesta seccionada ópticamente a partir de la fluorescencia emitida por la muestra de tejido fresco iluminada (12).

4. El sistema (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fuente de luz (56) comprende:

un diodo emisor de luz; y

una lente condensadora posicionada para recolectar luz del diodo emisor de luz y para proporcionar la luz recolectada al modulador de luz espacial (60).

5. El sistema (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fuente de luz (56) comprende:

un láser; y

un expansor de haz colocado en una trayectoria óptica de un haz procedente del láser.

6. El sistema (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el modulador de luz espacial (60) comprende uno de un dispositivo de cristal líquido ferroeléctrico sobre silicio, un dispositivo de microespejo digital, un dispositivo de cristal líquido nemático torcido sobre silicio, un dispositivo de rejilla mecánica y un dispositivo de máscara física.

7. Método para evaluar una muestra de tejido fresco (12) extraída o expuesta durante un procedimiento médico, en el que el método no se practica en el cuerpo humano o animal, comprendiendo el método:

preparar la muestra de tejido fresco (12) de modo que el tejido emita fluorescencia bajo iluminación (152);

disponer la muestra y al menos una parte de un sistema de formación de imágenes en una primera posición relativa;

- proyectar una pluralidad de patrones espaciales de luz sobre una primera parte de la muestra de tejido fresco (154) en una secuencia predeterminada;
- 5 capturar una primera imagen compuesta seccionada ópticamente que representa la fluorescencia emitida desde la primera posición relativa de la muestra de tejido fresco debido a la pluralidad de patrones espaciales de luz (156);
- 10 reorganizar la muestra y al menos la parte del sistema de formación de imágenes en una segunda posición relativa;
- proyectar la pluralidad de patrones espaciales de luz sobre una segunda parte de la muestra de tejido fresco (154) en la secuencia predefinida;
- 15 capturar una segunda imagen compuesta seccionada ópticamente que representa la fluorescencia emitida desde la segunda ubicación en la muestra de tejido; y
- 20 producir una imagen clínica comprensible para el ser humano sintetizando al menos la primera imagen compuesta seccionada ópticamente de la primera parte de la muestra de tejido fresco y la segunda imagen compuesta seccionada ópticamente de la segunda parte de la muestra de tejido fresco,
- 25 en el que la imagen clínica comprensible para el ser humano tiene una resolución suficiente para permitir la toma de decisiones clínicas significativas asociadas con el procedimiento médico en base a la imagen clínica.
8. El método de la reivindicación 7, en el que preparar la muestra de tejido (12) comprende aplicar una tinción fluorescente a la muestra de tejido seleccionada del grupo que comprende acriflavina, naranja de acridina, alumbre-tetraciclina, eosina, ácido pícrico y fucsina ácida.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en el que aplicar la tinción fluorescente comprende aplicar el tinte a la muestra de tejido fresco (12) mediante al menos uno de entre pulverización, goteo, inmersión y vertido.
10. El método de la reivindicación 8, en el que aplicar la tinción fluorescente a la muestra de tejido fresco (12) comprende aplicar al menos dos tinciones seleccionadas del grupo como parte de un proceso de múltiples tinciones multicolor.
- 35 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la pluralidad de patrones espaciales de la luz tiene una frecuencia espacial común y cada uno de la pluralidad de patrones espaciales está desfasado de al menos otro de la pluralidad de patrones espaciales por un valor conocido.
- 40 12. El método de la reivindicación 7, en el que capturar la primera imagen compuesta seccionada ópticamente y capturar la segunda imagen seccionada ópticamente comprende aplicar una rutina de enfoque automático en el sistema de formación de imágenes (16).

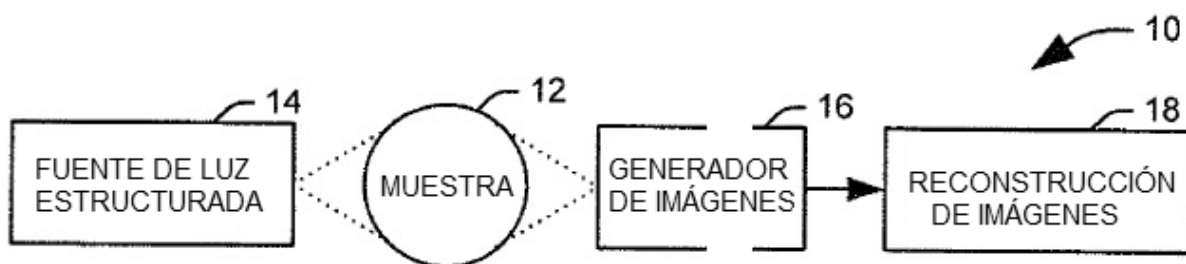


FIG. 1

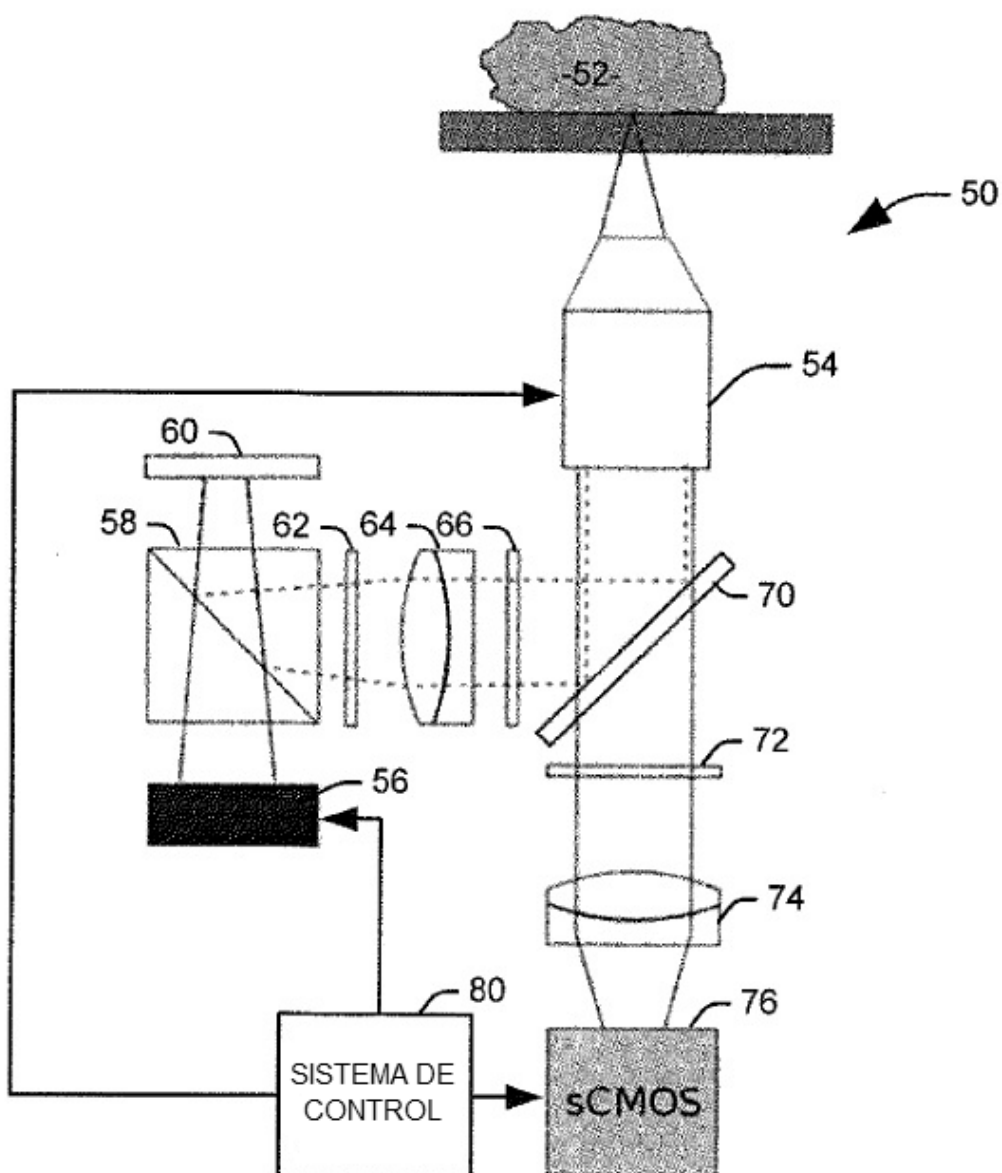


FIG. 2

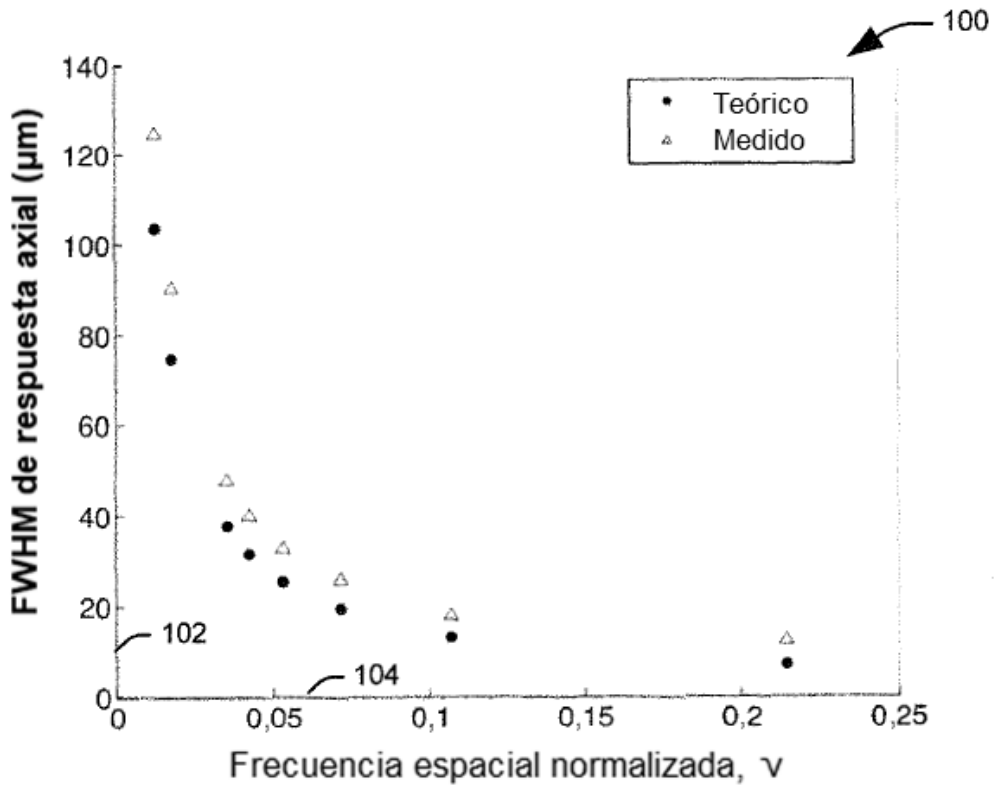


FIG. 3

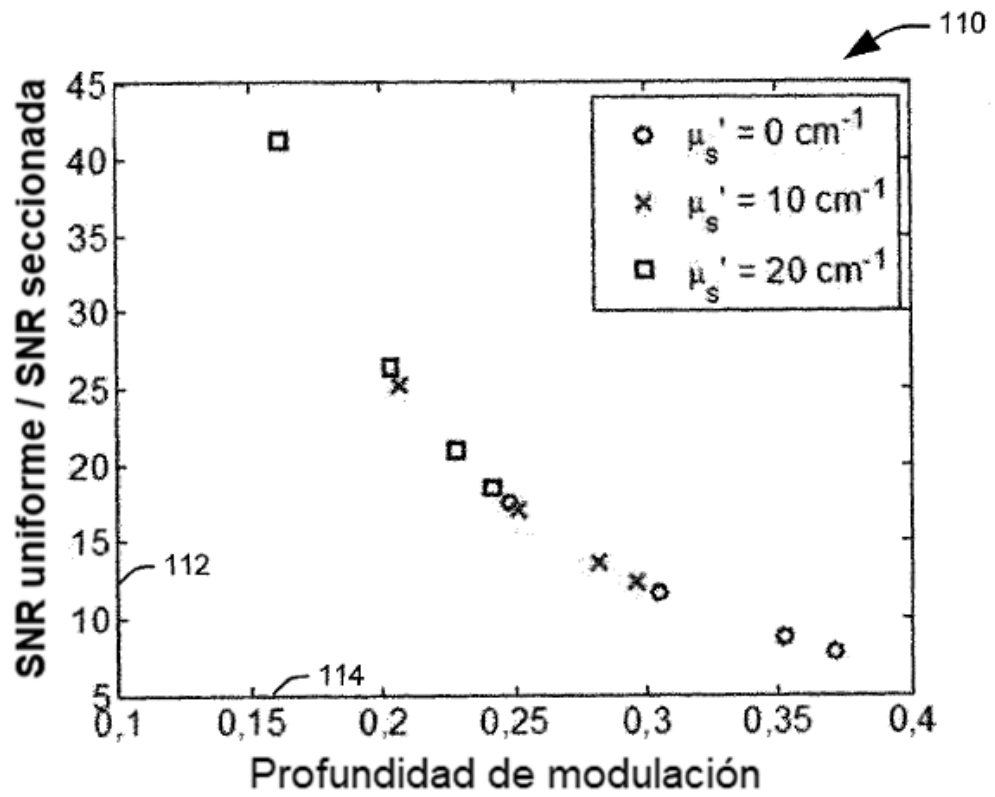


FIG. 4

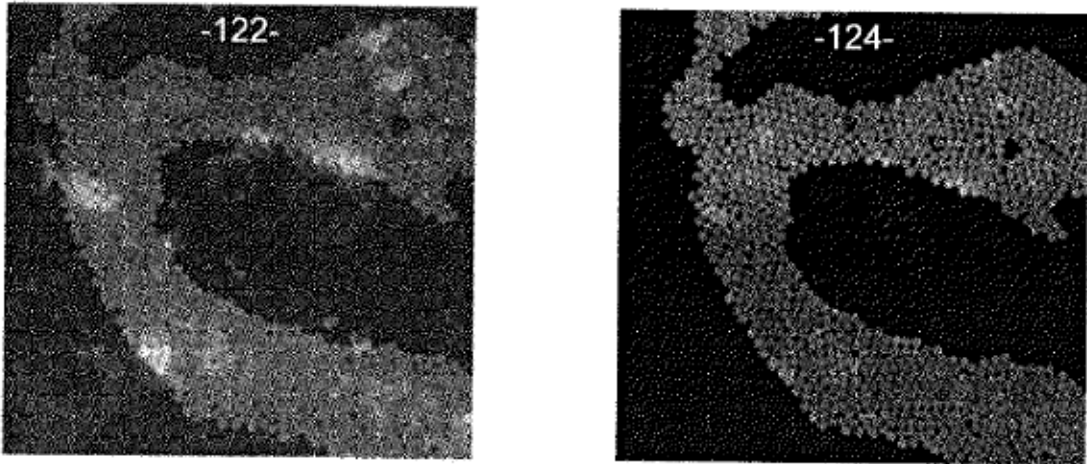


FIG. 5

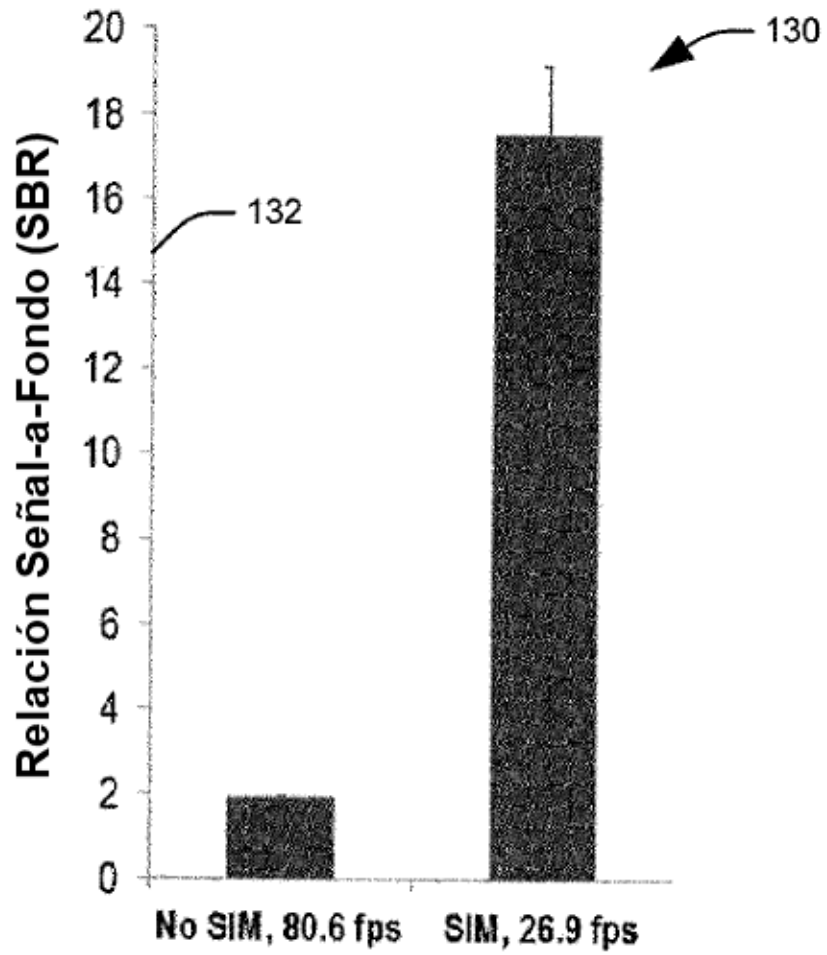


FIG. 6

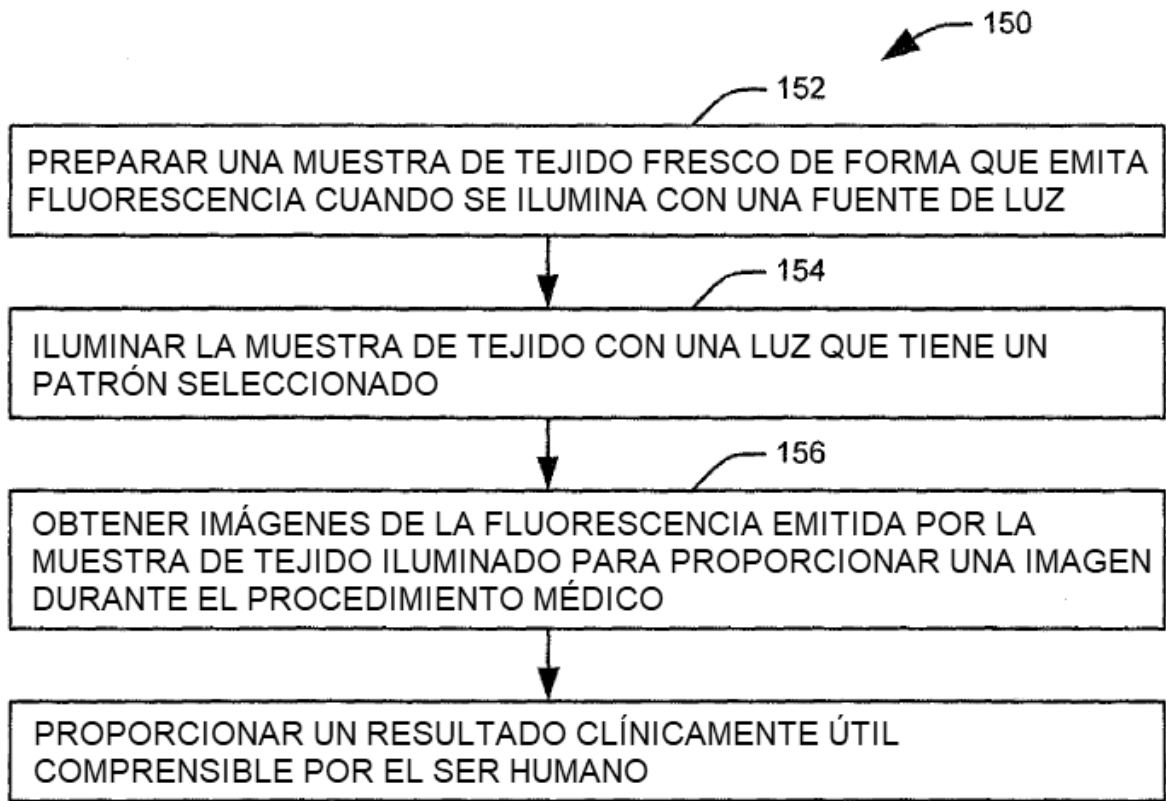


FIG. 7

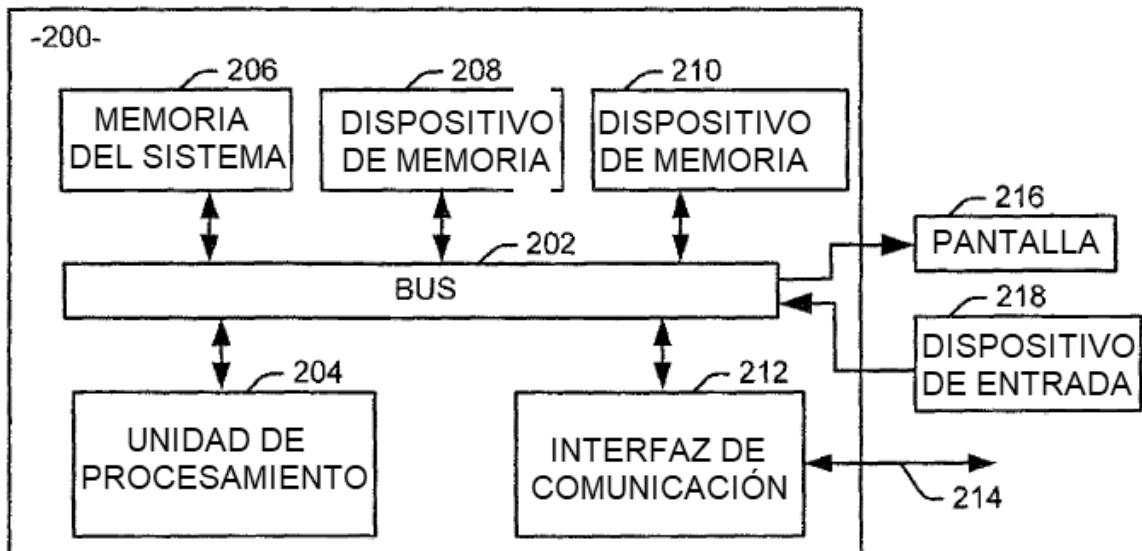


FIG. 8