

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 448**

21 Número de solicitud: 201831272

51 Int. Cl.:

**G02B 21/36** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**21.12.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.06.2020**

Fecha de concesión:

**05.08.2021**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**12.08.2021**

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)  
Avda. Blasco Ibáñez, 13  
46010 Valencia (Valencia) ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ ORTIGA, Emilio;  
SAAVEDRA TORTOSA, Genaro;  
MARTÍNEZ CORRAL, Manuel y  
SOLA PICABEA, Jorge**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

54 Título: **MICROSCOPIO ÓPTICO POR FLUORESCENCIA Y MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA POR FLUORESCENCIA**

57 Resumen:

La presente invención concierne a un microscopio óptico por fluorescencia, que comprende:

- un objetivo (6);
- un soporte (10) para soportar una muestra;
- medios de iluminación para proyectar sobre una muestra un patrón de iluminación periódico en dos direcciones transversales ortogonales entre sí, a partir de cuatro fuentes de luz puntuales;
- un sistema de barrido (7) para proporcionar un desplazamiento relativo de la muestra con respecto al patrón de iluminación; y
- medios de obtención de imágenes, que comprenden:
  - un detector de luz para detectar secuencialmente luz fluorescente emitida por distintas porciones de la muestra, en respectivas posiciones de barrido; y
  - medios para formar una imagen a partir de la intensidad lumínica existente en la luz fluorescente detectada por el detector de luz.

La presente invención también concierne a un método adaptado para realizar las etapas operativas del microscopio de la invención.

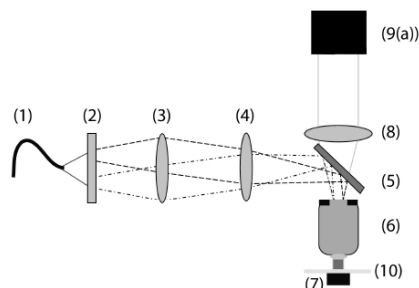


Figura 1a

ES 2 768 448 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 óptico por fluorescencia y método para la obtención de imágenes de microscopía óptica por fluorescencia**Sector de la técnica

- 5 La presente invención concierne, en un primer aspecto, a un microscopio óptico por fluorescencia, que combina una iluminación estructurada según un patrón determinado con un barrido de la muestra, para obtener seccionado óptico y superresolución sin necesidad de aplicar ninguna operación de post-procesado a las imágenes obtenidas ni de rotar el patrón de iluminación.
- 10 Un segundo aspecto de la presente invención concierne a un método para la obtención de imágenes de microscopía óptica por fluorescencia adaptado para realizar las etapas operativas del microscopio propuesto por el primer aspecto de la invención.

Estado de la técnica anterior

- 15 El poder de resolución de los sistemas ópticos en general y de los microscopios en particular, se encuentra limitado por la difracción. En condiciones de iluminación de la muestra y detección de la luz emitida o reflejada por la misma que pueden denominarse como convencionales (iluminación uniforme y detección por medio de un sensor localizado en el plano focal imagen del sistema), el límite dado por la difracción es bien conocido y se puede expresar por medio de la siguiente ecuación:

$$20 \quad \Delta r = 0.6 \frac{\lambda}{NA}$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz emitida o reflejada por la muestra y NA es la apertura numérica del objetivo de microscopio empleado. La distancia  $\Delta r$  es la mínima separación a la cual podrían estar dos puntos emisores de luz para poder ser distinguibles por medio del microscopio.

- 25 Por otro lado, los microscopios convencionales no son capaces de obtener secciones ópticas de muestras tridimensionales, esto es, para una posición de foco de la muestra, la imagen contendrá la correspondiente imagen del plano focal junto con la luz desenfocada proveniente de los planos fuera de foco. Este hecho hace que las imágenes convencionales posean poco contraste, especialmente cuando se emplean objetivos de
- 30 alta apertura numérica ya que su profundidad de foco es muy reducida.

Existen distintos sistemas capaces de mejorar la resolución transversal y de obtener seccionado óptico. El seccionado óptico, por ejemplo, es posible obtenerlo mediante un microscopio confocal de barrido. En dicho microscopio, la muestra se ilumina con un “spot” limitado por difracción y la luz emitida o reflejada por la muestra se proyecta sobre un estenope de dimensiones micrométricas. La luz que atraviesa el estenope llega a un detector de área extensa y corresponde a un pixel de la imagen confocal. La luz proveniente de los planos fuera de foco es bloqueada por el estenope. Para obtener una imagen es necesario realizar un barrido de la muestra. Este tipo de microscopio posee capacidad de seccionado óptico pero no mejora la resolución transversal. Además, posee ciertos problemas como es el blanqueo de los tintes fluorescentes al tener que concentrar la luz en un spot limitado por difracción.

Por otro lado, existen sistemas de iluminación estructurada que permiten obtener mejora en resolución y/o seccionado óptico. Para ello, proyectan un patrón de iluminación extenso sobre la muestra. Dicho patrón es típicamente un coseno generado mediante la interferencia de dos ondas planas. Para poder obtener una imagen superresuelta, es necesario desplazar el patrón de iluminación sucesivas veces además de rotarlo en distintas direcciones. Además, es necesario aplicar una gran cantidad de operaciones computacionales de post-procesado con el fin de obtener la imagen final. Estos sistemas requieren de un total de entre 9 y 75 imágenes que se combinan mediante operaciones matemáticas y requiere del conocimiento con alta precisión de los parámetros del patrón de iluminación. Los resultados obtenidos con este tipo de sistemas dependen altamente de las operaciones de post-procesado, dando lugar en ocasiones a artefactos en la imagen.

En [1] y [2] se describen microscopios que también permiten obtener superresolución y seccionado óptico mediante operaciones complejas de post-procesado de una gran cantidad de imágenes de una muestra (15, como mínimo), obtenidas también rotando (al menos tres veces) un patrón de iluminación estructurada periódico, únicamente en una dirección transversal y en la dirección axial, que es aplicado sobre una muestra. Las imágenes se obtienen mediante una captura de campo amplio, es decir que cada una de las imágenes es una imagen bidimensional compuesta por  $N \times N$  píxeles, y las operaciones de post-procesado implican la ejecución de un algoritmo computacional de reconstrucción que necesita, entre otras cosas, detectar la frecuencia del patrón, los desplazamientos de fase, el tamaño de la función de transferencia óptica y la dirección del patrón de iluminación. Sin embargo, este método requiere tiempo para realizar la reconstrucción computacional dado que no se obtiene directamente al realizar la captura.

De manera similar, en [3] se propone un microscopio basado en la obtención de múltiples imágenes bidimensionales, obtenidas también mediante una captura de campo amplio, tras rotar y desplazar lateralmente un patrón de iluminación (periódico en una dirección transversal y en la dirección axial), y un complejo algoritmo de procesado de imágenes que puede alcanzar tiempos de cómputo elevados.

Aparece necesario, por tanto, ofrecer una alternativa al estado de la técnica que cubra las lagunas halladas en el mismo, mediante la proporción de un microscopio que permita obtener tanto una imagen superresuelta, es decir de una gran resolución transversal, como seccionado óptico, sin la necesidad de aplicar ninguna operación de post-procesado ni de rotar el patrón de iluminación.

#### Explicación de la invención

Con tal fin, la presente invención concierne a un microscopio óptico por fluorescencia, que comprende:

- 15 - un objetivo de microscopio óptico cuyo eje de simetría, llamado eje óptico, define una primera dirección o dirección principal de propagación de la luz;
- un soporte (tal como una platina) para soportar una muestra tintada con un tinte fluorescente, para que quede dispuesta en el plano focal objeto del objetivo de microscopio óptico, o en el rango axial definido por la profundidad de campo de dicho objetivo de microscopio óptico;
- 20 - medios de iluminación estructurada configurados y dispuestos para proyectar sobre una muestra situada en el soporte un patrón de iluminación periódico en dos direcciones transversales ortogonales entre sí, mediante la generación y proyección sobre el diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico de al menos cuatro fuentes de luz puntuales, distanciadas espacialmente entre sí, que generen y proporcionen al menos
- 25 cuatro ondas planas cuya dirección de propagación equidista angularmente, o sustancialmente equidista angularmente (es decir, con una tolerancia en cuanto a desviación angular de  $\pm 5\%$ ), de dicha primera dirección del eje óptico del objetivo de microscopio óptico, cuya interferencia resulte en el citado patrón de iluminación;
- un sistema de barrido configurado y dispuesto para proporcionar un desplazamiento
- 30 relativo del soporte, y por tanto de la muestra soportada por la misma, con respecto al patrón de iluminación, para adoptar diferentes posiciones de barrido; y
- medios de obtención de imágenes, que comprenden:

- al menos un detector de luz configurado y dispuesto sobre un plano conjugado del plano objeto del objetivo de microscopio óptico, para detectar secuencialmente luz fluorescente emitida por al menos dos porciones de la muestra, en dos respectivas de dichas posiciones de barrido, al interactuar con la luz del patrón de iluminación, colectada a través del objetivo de microscopio óptico según una segunda dirección del eje óptico del objetivo de microscopio óptico, opuesta a la primera dirección; y

- medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para formar una imagen de al menos dos píxeles, a partir de la intensidad lumínica existente en la luz fluorescente detectada por el detector de luz, que es al menos uno, para cada una de las al menos dos porciones de la muestra, una por píxel.

Para un ejemplo de realización, el detector de luz es un sensor de imagen configurado y dispuesto para detectar secuencialmente, en un área de detección común formada por uno o más elementos fotodetectores del sensor de imagen, la luz fluorescente emitida por cada una de las dos o más porciones de la muestra, estando los medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para integrar la intensidad lumínica existente en el área de detección común en un valor de intensidad por posición de barrido, para formar cada píxel de la citada imagen. Para una implementación de este ejemplo de realización, el sensor de imagen es multipíxel, donde cada píxel está formado por uno o más de dichos elementos fotodetectores.

Para un ejemplo de realización alternativo, el detector de luz es un detector de área extensa, y los medios de obtención de imágenes comprenden además un estenope configurado y dispuesto, entre el objetivo de microscopio óptico y el detector de área extensa, para que el detector de área extensa detecte secuencialmente la luz fluorescente que pase por el estenope y que es emitida por cada una de las dos o más porciones de la muestra, estando los medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para formar cada píxel de la imagen con los respectivos valores de intensidad lumínica detectados por el detector de área extensa para cada posición de barrido.

En cualquier caso, la detección realizada mediante el detector de luz del microscopio del primer aspecto de la presente invención es una detección que puede denominarse como de tipo puntual, ya se realiza o bien por medio de un estenope o bien empleando unos pocos píxeles de un sensor de imagen, de forma que en cada captura se registra únicamente la imagen de un punto, entendiéndose como "punto" el asociado a cada valor de intensidad lumínica obtenido por posición de barrido, ya sea integrando la intensidad lumínica existente en el área de detección común, para el ejemplo de realización que

incluye un sensor de imagen, o directamente el valor de intensidad lumínica detectado por el detector de área extensa para cada posición de barrido, para el ejemplo de realización que incluye tal detector de área extensa y un estenope.

5 Según un ejemplo de realización preferida, los medios de iluminación estructurada están configurados y dispuestos para la generación y proyección sobre el diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico de las al menos cuatro fuentes de luz puntuales, según una distribución de intensidades coherente, formando respectivos vectores de posición que parten del centro del diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico y que están distanciados angularmente entre sí por unos ángulos relativos de  $90^\circ$ .

10 Se considera como óptimo un número de cuatro fuentes de luz puntuales, dada la localización de los órdenes resultantes al interaccionar con la muestra, que permite doblar la resolución en los ejes X e Y, y, a su vez, obtener capacidad de seccionado óptico.

No obstante, la presente invención también contempla unos ejemplos de realización para los que el número de fuentes de luz puntuales es distinto a cuatro, lo cual generaría distintas geometrías resultantes al interaccionar con la muestra. Por ejemplo, se podría  
15 aumentar el número de fuentes de luz puntuales en las direcciones diagonales (es decir cuyas proyecciones sobre el diafragma del objetivo forman vectores de posición a  $45^\circ$  con respecto a cada uno de los demás vectores de posición contiguos, y con una frecuencia cercana a la frecuencia de corte) y de esta forma conseguir un aumento en  
20 resolución no sólo en X e Y, si no en direcciones transversales.

Con el fin de optimizar los resultados obtenidos en cuanto a resolución transversal, permitiendo obtener el doble de la obtenida con los microscopios convencionales, de manera preferida, el módulo de cada uno de los citados vectores de posición es igual o  
25 sustancialmente igual al radio del diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico, extendiéndose así el ancho de banda del microscopio al límite de la técnica, esto es, al doble de la resolución de un sistema convencional.

Para un ejemplo de realización el objetivo de microscopio óptico y el soporte están configurados y dispuestos para que, en uso, la luz emitida por cada una de las dos o más porciones de la muestra, colectada a través del objetivo de microscopio óptico, produzca  
30 en el diafragma de apertura del mismo un patrón de distribución de intensidades incoherente formado por nueve componentes frecuenciales, que es proporcional al módulo cuadrado del patrón de iluminación.

De acuerdo a un ejemplo de realización, el sistema de barrido está configurado y dispuesto para que el citado desplazamiento relativo sea un desplazamiento transversal al eje óptico del microscopio según al menos una primera dirección transversal.

5 Para otro ejemplo de realización, el sistema de barrido está configurado y dispuesto para que el desplazamiento relativo incluya también, además del desplazamiento según una primera dirección transversal, un desplazamiento axial a lo largo del eje óptico del microscopio, para obtener una imagen, formada por parte de los medios de formación de imágenes, correspondiente a un corte meridional de la muestra.

10 Ventajosamente, el sistema de barrido está configurado y dispuesto para que el desplazamiento relativo sea un desplazamiento transversal al eje óptico del microscopio según también una segunda dirección transversal ortogonal a la primera dirección transversal.

De acuerdo a otro ejemplo de realización, el sistema de barrido está configurado y dispuesto para que el desplazamiento relativo incluya también, además del desplazamiento según una primera y una segunda direcciones transversales, un desplazamiento axial a lo largo del eje óptico del microscopio, para obtener una imagen tridimensional de la muestra, formada mediante los medios de formación de imágenes, a partir de unas secciones ópticas de la misma. Al realizar el mencionado desplazamiento relativo axial se enfoca una parte distinta de la muestra a la vez que otras posiciones pasan a estar fuera de foco. En microscopía convencional, sobre el plano del sensor de imagen se tendría la suma de las intensidades del plano de foco junto con la del resto de planos que se encuentran fuera de foco. Sin embargo, dado que el microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención proporciona seccionado óptico, una vez realizado el barrido, en la imagen final se captura exclusivamente la luz proveniente de cada uno de los planos de foco, eliminando la información desenfocada.

30 Según un ejemplo de realización, el microscopio del primer aspecto de la presente invención comprende además una lente de tubo dispuesta entre el objetivo de microscopio óptico y el detector o detectores de luz y configurado para conjugar el plano focal objeto del objetivo de microscopio óptico a su distancia focal, proporcionando el arriba mencionado plano conjugado.

Para otro ejemplo de realización, el microscopio comprende además al menos un filtro dicróico configurado y dispuesto para dirigir, según la citada primera dirección, luz con una longitud de onda de iluminación, que es generadora de las al menos cuatro fuentes de luz puntuales, hacia el diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico, y

para dirigir hacia el detector o detectores de luz, según la citada segunda dirección, exclusivamente la luz fluorescente colectada por el objetivo de microscopio óptico, que tiene una longitud de onda superior a la longitud de onda de iluminación, bloqueando el paso de luz con la longitud de onda de iluminación hacia el detector o detectores de luz.

- 5 Dado que el tamaño del píxel de la imagen final formada viene dado por el paso elegido para realizar el barrido de la muestra, con el fin de observar la mejora en resolución dicho paso debe ser inferior a la cuarta parte del límite de resolución del objetivo de microscopio óptico, por lo que, para un ejemplo de realización preferido, el sistema de barrido está configurado y dispuesto para proporcionar el desplazamiento relativo con un paso de
- 10 barrido inferior a la cuarta parte del límite de resolución del objetivo de microscopio óptico, de manera que no se solapen las porciones de la muestra dentro del área de detección común.

El microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención permite alcanzar resoluciones laterales por debajo del límite dado por la difracción, pudiendo llegar a

15 doblar la resolución transversal de un microscopio convencional. Simultáneamente, el microscopio presenta capacidad de seccionado óptico, es decir, elimina la luz proveniente de los planos situados fuera de foco en muestras 3D.

La presente invención también concierne, en un segundo aspecto, a un método para la obtención de imágenes de microscopía óptica por fluorescencia, que comprende:

- 20 - proyectar sobre una muestra tintada con un tinte fluorescente y dispuesta en el plano focal objeto de un objetivo de microscopio óptico, o en el rango axial definido por la profundidad de campo de dicho objetivo de microscopio óptico, un patrón de iluminación periódico en dos direcciones transversales ortogonales entre sí, mediante la generación y proyección sobre el diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico de al
- 25 menos cuatro fuentes de luz puntuales, distanciadas espacialmente entre sí, que generen y proporcionen al menos cuatro ondas planas cuya dirección de propagación equidista angularmente, o sustancialmente equidista angularmente (es decir, con una tolerancia en cuanto a desviación angular de  $\pm 5\%$ ), de una primera dirección del eje óptico del objetivo de microscopio óptico, cuya interferencia resulte en el citado patrón de iluminación;
- 30 - proporcionar un barrido que incluye un desplazamiento relativo de la muestra con respecto al citado patrón de iluminación, para adoptar diferentes posiciones de barrido;
- detectar secuencialmente, en un plano conjugado del plano objeto del objetivo de microscopio óptico, luz fluorescente emitida por al menos dos porciones de la muestra, en dos respectivas de dichas posiciones de barrido, al interaccionar con la luz del patrón



de iluminación, colectándola a través del objetivo de microscopio óptico según una segunda dirección opuesta a la primera dirección; y

- formar una imagen de al menos dos píxeles, a partir de la intensidad lumínica existente en la luz fluorescente detectada para cada una de las al menos dos porciones de la muestra, una por píxel.
- 5

El método del segundo aspecto de la presente invención está adaptado para realizar las distintas etapas del mismo utilizando el microscopio propuesto por el primer aspecto de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 1a muestra un esquema del montaje del microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización para el que el detector de luz de éste comprende un sensor de imagen o detector pixelado.

15

La Figura 1b muestra un esquema del montaje del microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización para el que el detector de luz de éste comprende un estenope y un detector de área extensa.

La Figura 2 muestra un esquema de la iluminación empleada sobre el diafragma de apertura del objetivo del microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización para el que el módulo de cada uno de los cuatro vectores de posición de la proyección sobre el diafragma de apertura de las cuatro fuentes de luz puntuales es igual o sustancialmente igual al radio del diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico.

20

Figura 3. (a) Simulación del patrón resultante de la interacción entre la iluminación propuesta y una muestra fluorescente plana y uniforme, que es muy similar a la interferencia producida entre las cuatro ondas planas (que es la raíz cuadrada de dicha distribución de intensidad). (b) Representación de los 9 órdenes de colección sobre el diafragma de apertura.

25

Figura 4. Ilustración de la distribución de intensidades sobre el sensor de imagen del esquema de la Figura 1a, para tres posiciones de barrido en una de las direcciones transversales. El cuadrado blanco representa el área de detección común en la cual la

30

intensidad de la luz fluorescente detectada por cada uno de los píxeles contenidos en la misma se suma para obtener un pixel de la imagen final.

5 Figura 5 Cálculo de la forma tridimensional de la función de transferencia óptica de (izquierda) un microscopio convencional y (derecha) el microscopio propuesto por la presente invención.

Figura 6. Resultados obtenidos mediante la simulación de formación de imágenes mediante un microscopio convencional (superior) y el microscopio propuesto por la presente invención (inferior). Dichos resultados se corresponden con (izquierda) la respuesta impulsional del sistema, (centro) la OTF transversal y (derecha) la imagen de un test USAF 1951.

10 Figura 7. Resultados experimentales del barrido transversal de una nanopartícula de oro empleando un prototipo del microscopio propuesto por la presente invención y un microscopio convencional. Como puede verse, la respuesta impulsional del microscopio propuesto por la presente invención (b) es el doble de estrecha que la de un microscopio convencional (a).

Figura 8 Medidas resultantes del barrido axial de una lámina fluorescente plana mediante un microscopio convencional (a) y mediante el microscopio propuesto por la presente invención (b). Como puede verse, el microscopio propuesto por la presente invención posee capacidad de seccionado óptico ya que elimina la luz de los planos de la muestra que no son el plano de foco.

#### Descripción detallada de unos ejemplos de realización

En las Figuras 1a y 1b se ilustran dos posibles esquemas del microscopio propuesto por la presente invención, para dos correspondientes ejemplos de realización, para los que el microscopio comprende los siguientes componentes:

25 (1) Una fuente puntual de luz láser total o parcialmente coherente. Dicha fuente puntual se puede obtener con un láser acoplado a una fibra y emplear la salida de la fibra como fuente puntual o bien con un láser en el espacio libre focalizado.

(2) Un elemento óptico (difractivo o refractivo) capaz de generar cuatro o más fuentes de luz puntuales virtuales coherentes entre sí a partir de la iluminación con una única fuente puntual. En función del ejemplo de realización podría emplearse una pirámide de vidrio  
30 cuyo vértice coincida con el eje óptico, una red de difracción cuadrada en la que se

filtrasen órdenes superiores o moduladores espaciales de luz controlados electrónicamente, o cualquier otro elemento óptico capaz de cumplir la función descrita.

(3) Una lente colimadora situada a su distancia focal con respecto a la fuente puntual de luz láser.

5 (4) Una lente de proyección que focalice la fuente (o fuentes) puntuales sobre el diafragma de un objetivo de microscopio óptico (6).

(5) Un filtro dicroico o juego de filtros cuyo fin es iluminar empleando la longitud de onda del láser, es decir dirigir hacia el diafragma de apertura del objetivo óptico (6), según una primera dirección, la luz emitida por el láser, y coleccionar exclusivamente la luz emitida por  
10 la muestra, es decir dirigir hacia el detector de luz, según una segunda dirección, exclusivamente la luz fluorescente coleccionada por el objetivo óptico 6, que tiene una longitud de onda superior a la longitud de onda de iluminación, bloqueando el paso de la luz láser.

(6) Objetivo de microscopio óptico empleado para iluminar la muestra y coleccionar la luz  
15 emitida por la misma.

(7) Sistema de barrido de la muestra: Este sistema puede ser de barrido mecánico, es decir, un aparato que permita desplazar la muestra con alta precisión (por debajo de 50 nm). Podría emplearse también un sistema de barrido del haz en lugar de la muestra, es decir, un juego de espejos galvanométricos de alta precisión (no ilustrados). En este  
20 último caso este elemento se situaría entre el filtro dicroico (5) y el objetivo de microscopio (6).

(8) Lente de tubo que permite conjugar el plano focal objeto del objetivo a su distancia focal (entre 160 mm y 300 mm).

(9a), (9b). Detector de luz que forma parte de unos medios de formación de imágenes y  
25 que está configurado y dispuesto sobre un plano conjugado del plano objeto del objetivo de microscopio óptico (6), para detectar secuencialmente luz fluorescente emitida por diferentes porciones de dicha muestra, en unas respectivas posiciones de barrido, al interaccionar con la luz del patrón de iluminación, coleccionada a través del objetivo óptico (6) según la referida segunda dirección.

30 (10) Platina para soportar una muestra tintada con un tinte fluorescente, para que quede dispuesta en las inmediaciones del plano focal objeto del objetivo de microscopio óptico (6).

Para el ejemplo de realización de la Figura 1a, el detector de luz (9a) es un sensor de imagen (tal como una cámara digital) configurado y dispuesto para detectar secuencialmente, en un área de detección común formada por uno o más elementos fotodetectores o píxeles del mismo, la luz fluorescente emitida por cada una de las porciones de la muestra, estando los medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para integrar la intensidad lumínica existente en un área de detección común en un valor de intensidad por posición de barrido, para formar cada píxel de la imagen de la muestra.

En la Figura 4 se ilustra la distribución de intensidades sobre el sensor de imagen (9a) del esquema de la Figura 1a, para tres posiciones de barrido en una de las direcciones transversales, según la dirección indicada por la referencia Db. El cuadrado blanco representa la arriba denominada como área de detección común, en la cual la intensidad de la luz fluorescente detectada por cada uno de los píxeles contenidos en la misma se suma para obtener un píxel de la imagen final.

Para el ejemplo de realización de la Figura 1b, el detector de luz (9b) es un detector de área extensa, y los medios de obtención de imágenes comprenden además un estenope (11) configurado y dispuesto, entre el objetivo óptico (6) y el detector de área extensa (9b), para que el detector de área extensa (9b) detecte secuencialmente la luz fluorescente que pase por el estenope (11) y que es emitida por cada una de las distintas porciones de la muestra, estando los medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para formar cada píxel de la imagen de la muestra con los respectivos valores de intensidad lumínica detectados por el detector de área extensa (9b) para cada posición de barrido. El estenope es preferentemente de dimensiones micrométricas (entre 1-50  $\mu\text{m}$ ) y está situado sobre el plano focal de la lente de tubo (8).

Para que el microscopio permita doblar la resolución lateral y tenga seccionado óptico, en lugar de iluminar la muestra con luz uniforme (como es propio de los microscopios convencionales) ésta se ilumina mediante el patrón resultante de la interferencia de cuatro ondas planas. Dichas ondas planas interfieren de tal manera que su vector de onda forma un ángulo con el eje óptico que dependerá de la apertura numérica y cuya proyección transversal vendrá dada por vectores ortogonales (cada proyección transversal del vector de onda está separada 90 grados con respecto al vector contiguo). Una forma sencilla de conseguir este patrón de iluminación es realizando la imagen de cuatro fuentes de luz puntuales y coherentes entre sí sobre el diafragma de apertura del objetivo de microscopio. Dichas fuentes se conseguirían realizando la imagen de las fuentes puntuales virtuales generadas con el elemento (2) del montaje. Con el fin de

obtener los ángulos relativos deseados entre las ondas planas en el plano objeto, los vectores de posición con respecto al centro del diafragma de cada una de las fuentes puntuales de luz deben formar ángulos de 90, 180 y 270° con el resto, tal como se ilustra en la Figura 2, que muestra al diafragma de apertura con cuatro vectores posicionales que parten del centro del diafragma de apertura y finalizan en unos respectivos círculos que representan las proyecciones de las cuatro fuentes de luz puntuales u órdenes de iluminación. Cuando mayor sea el módulo del vector de posición de dichas fuentes con respecto al centro del diafragma, mayor será el ángulo que formen las ondas planas con respecto al eje óptico en el espacio objeto. Para el caso ilustrado en la Figura 2, el módulo es casi igual al radio del diafragma de apertura.

Mediante el mencionado patrón estructurado, se ilumina una muestra fluorescente. Dicha muestra interacciona con la luz coherente del patrón emitiendo de forma incoherente, según se explica matemáticamente a continuación.

Las ondas planas generadas en el espacio objeto representan una distribución de intensidades coherente que se puede representar matemáticamente de la siguiente forma:

$$s(x, y) = e^{j\pi Ax} + e^{-j\pi Ax} + e^{-j\pi Ay} + e^{j\pi Ay},$$

Donde  $A$  es el modulo del vector que define la posición de las fuentes puntuales en el plano de la pupila. Al interactuar con una muestra fluorescente con una distribución espacial de fluoroforos  $O(x, y)$ , se genera una distribución de intensidades incoherente que se puede expresar como:

$$I(x, y) = |s(x, y)|^2 O(x, y) = [4 + e^{j2\pi Ax} + e^{-j2\pi Ax} + e^{j2\pi Ay} + e^{-j2\pi Ay} + e^{j\pi A(x+y)} + e^{j\pi A(y-x)} + e^{j\pi A(x-y)} + e^{-j\pi A(x+y)}] O(x, y).$$

Como puede verse, la interferencia de las 4 ondas planas coherentes da lugar a una distribución de intensidades incoherente con nueve componentes y, por tanto, en el espacio de Fourier se tendrán nueve órdenes correspondientes a cada una de dichas componentes.

Por tanto, si se considera una muestra fluorescente uniforme y delgada, la luz resultante de la interacción entre iluminación y muestra no es más que una intensidad proporcional al módulo cuadrado del patrón coherente. El objetivo (6) empleado para iluminación colecta la luz emitida por la muestra (de longitud de onda superior a la luz de iluminación). La luz colectada, al ser proporcional al módulo cuadrado del patrón de iluminación, produce un patrón de 9 componentes frecuenciales de colección en el diafragma de

apertura a las que se denominará como órdenes de colección, tal como se ilustra en la vista (b) de la Figura 3. Dichos órdenes de colección aparecen además de en las mismas posiciones que los órdenes de iluminación (es decir de las proyecciones de las cuatro fuentes de luz puntuales) y uno posicionado en el centro del diafragma de apertura, en posiciones intermedias a  $45^\circ$  (a las que se denominará como órdenes mixtos) y con un vector de posición con respecto al centro con un módulo igual a la mitad que los de iluminación. Para optimizar el microscopio, el módulo de los vectores de posición de los vectores de mayor módulo debe ser igual al radio del diafragma de apertura. Si se realiza la imagen de la muestra fluorescente uniforme y plana sobre un detector pixelado (9a) se observará un patrón cuyo aspecto es de malla de puntos, según se ilustra en la vista (a) de la Figura 3. La interferencia producida entre las 4 ondas es muy similar a la ilustrada en dicha vista (a) de la Figura 3.

La malla de puntos podrá observarse en el detector pixelado (9a) o será proyectada sobre un estenope (11) situado frente a un detector de área extensa (9b) (haciendo coincidir un máximo de intensidad de la malla con el centro del estenope (11)). En el caso del detector pixelado (9a), se podrá seleccionar una subregión con un número de píxeles relativamente bajo, de forma que se integre la intensidad de los píxeles de dicha subregión en un único valor. Teniendo esto en cuenta, se colocará una muestra con el debido tinte fluorescente en el plano focal objeto del objetivo de microscopio óptico (6). Para una determinada posición de la muestra, se obtendrá una señal de intensidad, bien mediante la integración de píxeles mencionada o mediante el detector de área extensa (9b). Dicho valor de intensidad se corresponde con la posición relativa de la muestra y la iluminación. Para poder obtener una imagen, se desplazará sucesivamente la muestra empleando, por ejemplo, un sistema de posicionamiento piezoeléctrico (7) conectado a la platina (10), o bien la iluminación mediante un sistema de espejos galvanométricos (no ilustrados). Para cada posición de la muestra o de la iluminación, a la que se denominará como posición de barrido, se obtendrá un valor de intensidad que corresponde a un píxel de la imagen final, debidamente posicionado acorde con las posiciones de barrido. Dicho barrido puede ser (1) transversal: es decir, perpendicular al eje óptico para obtener un plano de foco de la muestra, (2) transversal y axial: barriendo la muestra en una dirección transversal y en la dirección del eje óptico, o (3) tridimensional: se realiza una sucesión de barridos trasversales (en dos direcciones ortogonales entre sí) para distintas posiciones axiales de la muestra que, mediante el software adecuado, pueden compilarse en una representación tridimensional de intensidades de la imagen de la muestra.

El microscopio propuesto por la presente invención, mediante la combinación de una iluminación estructurada adecuada y el barrido de la muestra permite doblar la resolución transversal con respecto a un microscopio convencional así como le otorga capacidad de seccionado óptico. Esto puede entenderse estudiando la transmisión de frecuencias especiales del espacio objeto al espacio imagen. En un microscopio convencional, dicha transmisión ocurre en una banda de frecuencias espaciales limitada por la función tridimensional conocida como función de transferencia óptica (OTF). Dicha función tiene forma de toroide e indica que las frecuencias espaciales del objeto que se encuentren en su interior, pasarán del objeto a su correspondiente imagen (ver Figura 5). Por un lado, la forma transversal de esta función está estrechamente relacionada que el tamaño del diafragma de apertura del objetivo de microscopio y la distancia focal del mismo (es decir, por la apertura numérica). Por otro lado, el hecho de que los microscopios convencionales carezcan de seccionado óptico se debe a la forma de esta función, ya que presenta un cono vacío en la dirección de las frecuencias espaciales en la dirección axial lo cual impide la transmisión de detalles en volumen del objeto a su correspondiente imagen.

El microscopio propuesto por la presente invención, una vez capturada una imagen mediante el barrido de la muestra o de la iluminación, posee una OTF distinta a la de un microscopio convencional. De hecho, su OTF viene dada por 9 de réplicas de la OTF convencional situadas sobre las posiciones del espacio de frecuencias espaciales dadas por los órdenes de colección en el diafragma de apertura del objetivo de microscopio. Si las fuentes puntuales de iluminación están situadas físicamente en los extremos del diafragma de apertura, entonces el ancho de banda de la OTF del microscopio propuesto será el doble que el de un microscopio convencional, es decir, tendrá el doble de resolución. Además, las réplicas de la OTF desplazadas a las posiciones dadas por los órdenes mixtos permiten llenar el cono de pérdidas, es decir, dotan al microscopio de capacidad de seccionado óptico.

En la Figura 6 se presentan resultados simulados de la funcionalidad del microscopio propuesto por la presente invención. Dichos cálculos corresponden con la imagen convencional y con la imagen obtenida empleando el microscopio propuesto mediante el barrido transversal de un único punto (conocido normalmente como respuesta impulsional) y de un test de resolución USAF 1951. La respuesta impulsional trasversal está directamente relacionada con la resolución del microscopio y su transformada de Fourier es la OTF transversal, presentada asimismo en la Figura 6. Como puede observarse, la OTF del microscopio propuesto dobla el ancho de banda con respecto a un microscopio convencional. Esto puede observarse igualmente en la imagen del test

USAF 1951, en la que el microscopio propuesto posee el doble de resolución que el microscopio convencional (una mejora en resolución de un grupo, es decir, seis elementos del test).

Además, se presentan resultados preliminares obtenidos mediante un prototipo del microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención. En la Figura 7 se presenta la imagen de una nanopartícula de oro empleando un objetivo 50x NA=0.6 tanto para el caso de un microscopio convencional (a) como para el propuesto por la presente invención (b). Como puede verse, la respuesta impulsional obtenida mediante esta medida es aproximadamente la mitad de estrecha en el microscopio propuesto, es decir, el microscopio propuesto por la invención posee el doble de resolución que le convencional.

Por otro lado, se prueba la capacidad de seccionado óptico mediante el barrido axial de una lámina fluorescente plana, tanto para el caso convencional (a) como con el microscopio de iluminación estructurada de barrido (b), mostrándose en la Figura 8 las medidas resultantes de tal barrido axial de una lámina fluorescente plana.

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



**Referencias**

- [1] Mats G L Gustafsson; Lin Shao; Peter M Carlton; Rachel Wang C J; Inna N Golubovskaya; Zacheus Cande W; David A Agard; John W Sedat , "Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination".
- 5 [2] Yasuhiro Hirano; Atsushi Matsuda; Yasushi Hiraoka," Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging".
- [3] Birk Udo; Hase Johann V; Cremer Christoph,"Super-resolution microscopy with very large working distance by means of distributed aperture illumination".

## REIVINDICACIONES

1.- Microscopio óptico por fluorescencia, que comprende:

- un objetivo de microscopio óptico (6) cuyo eje de simetría, llamado eje óptico, define una primera dirección o dirección principal de propagación de la luz;

5 - un soporte (10) para soportar una muestra tintada con un tinte fluorescente, para que quede dispuesta en el plano focal objeto de dicho objetivo de microscopio óptico (6), o en el rango axial definido por la profundidad de campo de dicho objetivo de microscopio óptico (6);

10 - medios de iluminación estructurada configurados y dispuestos para proyectar sobre una muestra situada en dicho soporte (10) un patrón de iluminación periódico en dos direcciones transversales ortogonales entre sí, mediante la generación y proyección sobre el diafragma de apertura de dicho objetivo de microscopio óptico (6) de al menos cuatro fuentes de luz puntuales, distanciadas espacialmente entre sí, que generen y proporcionen al menos cuatro ondas planas cuya dirección de propagación equidista, o  
15 sustancialmente equidista, angularmente de dicha primera dirección del eje óptico del objetivo de microscopio óptico (6), cuya interferencia resulte en dicho patrón de iluminación;

- un sistema de barrido (7) configurado y dispuesto para proporcionar un desplazamiento relativo de dicho soporte (10), y por tanto de la muestra soportada por la misma, con  
20 respecto a dicho patrón de iluminación, para adoptar diferentes posiciones de barrido; y

- medios de obtención de imágenes, que comprenden:

25 - al menos un detector de luz configurado y dispuesto sobre un plano conjugado del plano objeto del objetivo de microscopio óptico (6), para detectar secuencialmente luz fluorescente emitida por al menos dos porciones de dicha muestra, en dos respectivas de dichas posiciones de barrido, al interactuar con la luz del patrón de iluminación, colectada a través de dicho objetivo de microscopio óptico (6) según una segunda dirección del eje óptico del objetivo de microscopio óptico (6), opuesta a dicha primera dirección; y

30 - medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para formar una imagen de al menos dos píxeles, a partir de la intensidad lumínica existente en la luz fluorescente detectada por el detector de luz, que es al menos uno, para cada una de dichas al menos dos porciones de la muestra, una por píxel.

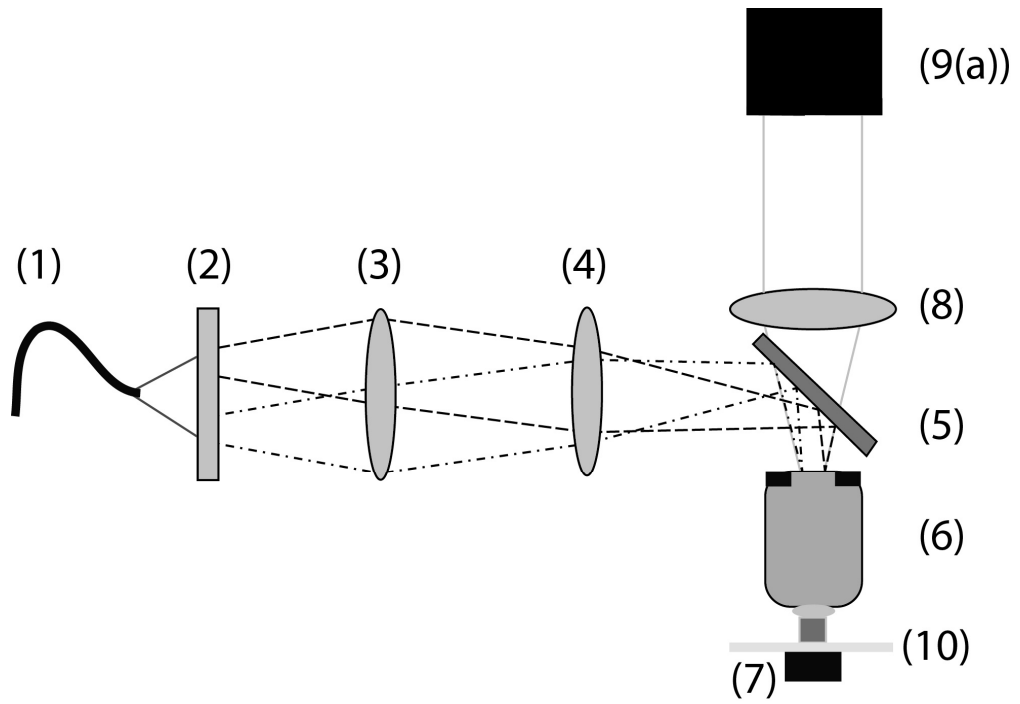
- 2.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho detector de luz, que es al menos uno, es un sensor de imagen (9(a)) configurado y dispuesto para detectar secuencialmente, en un área de detección común formada por uno o más elementos fotodetectores de dicho sensor de imagen (9(a)), la luz fluorescente emitida por cada una de dichas al menos dos porciones de la muestra, estando dichos medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para integrar la intensidad lumínica existente en dicha área de detección común en un valor de intensidad por posición de barrido, para formar cada píxel de dicha imagen.
- 5
- 3.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho detector de luz es un detector de área extensa (9(b)), y dichos medios de obtención de imágenes comprenden además un estenope (11) configurado y dispuesto, entre el objetivo de microscopio óptico (6) y dicho detector de área extensa (9(b)), para que el detector de área extensa (9(b)) detecte secuencialmente la luz fluorescente que pase por el estenope (11) y que es emitida por cada una de dichas al menos dos porciones de la muestra, estando dichos medios de formación de imágenes configurados y dispuestos para formar cada píxel de dicha imagen con los respectivos valores de intensidad lumínica detectados por el detector de área extensa (9(b)) para cada posición de barrido.
- 10
- 15
- 4.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los medios de iluminación estructurada están configurados y dispuestos para la generación y proyección sobre el diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico (6) de dichas al menos cuatro fuentes de luz puntuales, según una distribución de intensidades coherente, formando respectivos vectores de posición que parten del centro del diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico (6) y que están distanciados angularmente entre sí por unos ángulos relativos de  $90^\circ$ .
- 20
- 5.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el módulo de cada uno de dichos vectores de posición es igual o sustancialmente igual al radio del diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico (6).
- 25
- 6.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en el que el objetivo de microscopio óptico (6) y el soporte (10) están configurados y dispuestos para que, en uso, la luz emitida por cada una de las al menos dos porciones de la muestra, colectada a través del objetivo de microscopio óptico (6), produzca en el diafragma de apertura del mismo un patrón de distribución de intensidades incoherente formado por nueve componentes frecuenciales, que es proporcional al módulo cuadrado del patrón de iluminación.
- 30

- 7.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sistema de barrido (7) está configurado y dispuesto para que dicho desplazamiento relativo sea un desplazamiento transversal al eje óptico del microscopio según al menos una primera dirección transversal.
- 5 8.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho sistema de barrido (7) está configurado y dispuesto para que dicho desplazamiento relativo sea un desplazamiento transversal al eje óptico del microscopio según también una segunda dirección transversal ortogonal a dicha primera dirección transversal.
- 9.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho sistema de barrido (7)
- 10 está configurado y dispuesto para que dicho desplazamiento relativo incluya también un desplazamiento axial a lo largo del eje óptico del microscopio, para obtener una imagen, formada por parte de dichos medios de formación de imágenes, correspondiente a un corte meridional de la muestra.
- 10.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho sistema de barrido
- 15 (7) está configurado y dispuesto para que dicho desplazamiento relativo incluya también un desplazamiento axial a lo largo del eje óptico del microscopio, para obtener una imagen tridimensional de la muestra, formada mediante dichos medios de formación de imágenes, a partir de unas secciones ópticas de la misma.
- 11.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que
- 20 comprende además una lente de tubo (8) dispuesta entre dicho objetivo de microscopio óptico (6) y dicho detector de luz, que es al menos uno, y configurado para conjugar el plano focal objeto del objetivo de microscopio óptico (6) a su distancia focal, proporcionando dicho plano conjugado.
- 12.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que
- 25 comprende además al menos un filtro dicróico configurado y dispuesto para dirigir, según dicha primera dirección, luz con una longitud de onda de iluminación, que es generadora de dichas al menos cuatro fuentes de luz puntuales, hacia el diafragma de apertura del objetivo de microscopio óptico (6), y para dirigir hacia el detector de luz, que es al menos uno, según dicha segunda dirección, exclusivamente la luz fluorescente colectada por el
- 30 objetivo de microscopio óptico (6), que tiene una longitud de onda superior a dicha longitud de onda de iluminación, bloqueando el paso de luz con dicha longitud de onda de iluminación hacia el detector de luz.
- 13.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sistema de barrido (7) está configurado y dispuesto para proporcionar dicho

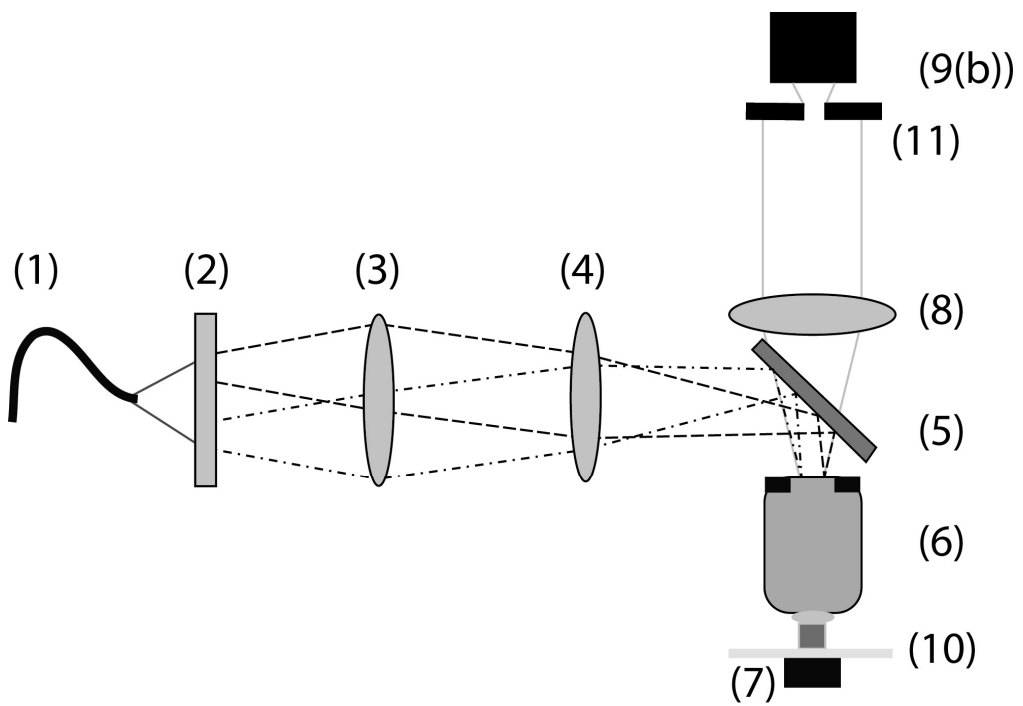
desplazamiento relativo con un paso de barrido inferior a la cuarta parte del límite de resolución del objetivo de microscopio óptico (6).

14.- Método para la obtención de imágenes de microscopía óptica por fluorescencia, que comprende:

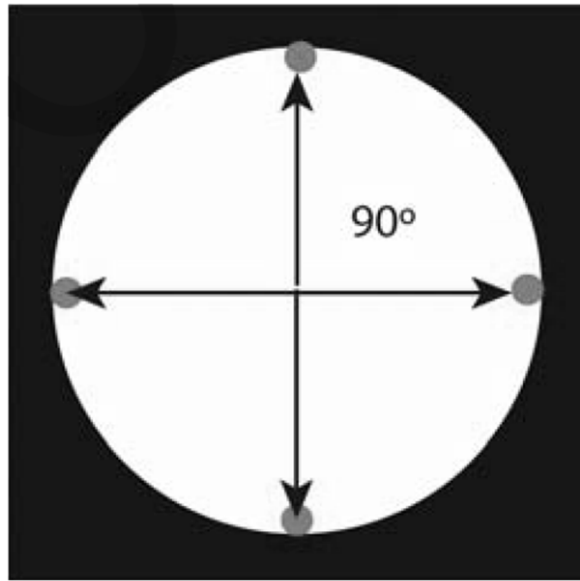
- 5 - proyectar sobre una muestra tintada con un tinte fluorescente y dispuesta en el plano focal objeto de un objetivo de microscopio óptico, o en el rango axial definido por la profundidad de campo de dicho objetivo de microscopio óptico, un patrón de iluminación periódico en dos direcciones transversales ortogonales entre sí, mediante la generación y proyección sobre el diafragma de apertura de dicho objetivo de microscopio óptico de  
10 al menos cuatro fuentes de luz puntuales, distanciadas espacialmente entre sí, que generen y proporcionen al menos cuatro ondas planas cuya dirección de propagación equidista, o sustancialmente equidista, angularmente de una primera dirección del eje óptico del objetivo de microscopio óptico, cuya interferencia resulte en dicho patrón de iluminación;
- 15 - proporcionar un barrido que incluye un desplazamiento relativo de dicha muestra con respecto a dicho patrón de iluminación, para adoptar diferentes posiciones de barrido;  
- detectar secuencialmente, en un plano conjugado del plano objeto del objetivo de microscopio óptico, luz fluorescente emitida por al menos dos porciones de dicha muestra, en dos respectivas de dichas posiciones de barrido, al interaccionar con la luz  
20 del patrón de iluminación, colectándola a través de dicho objetivo de microscopio óptico según una segunda dirección opuesta a dicha primera dirección; y  
- formar una imagen de al menos dos píxeles, a partir de la intensidad lumínica existente en la luz fluorescente detectada para cada una de dichas al menos dos porciones de la muestra, una por píxel.



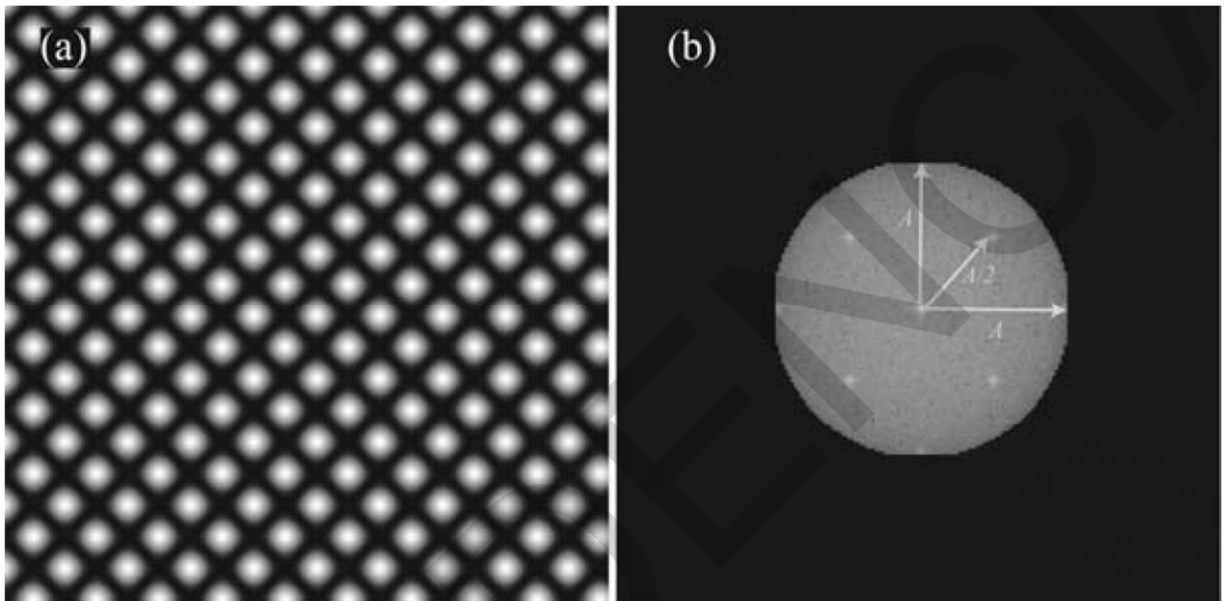
**Figura 1a**



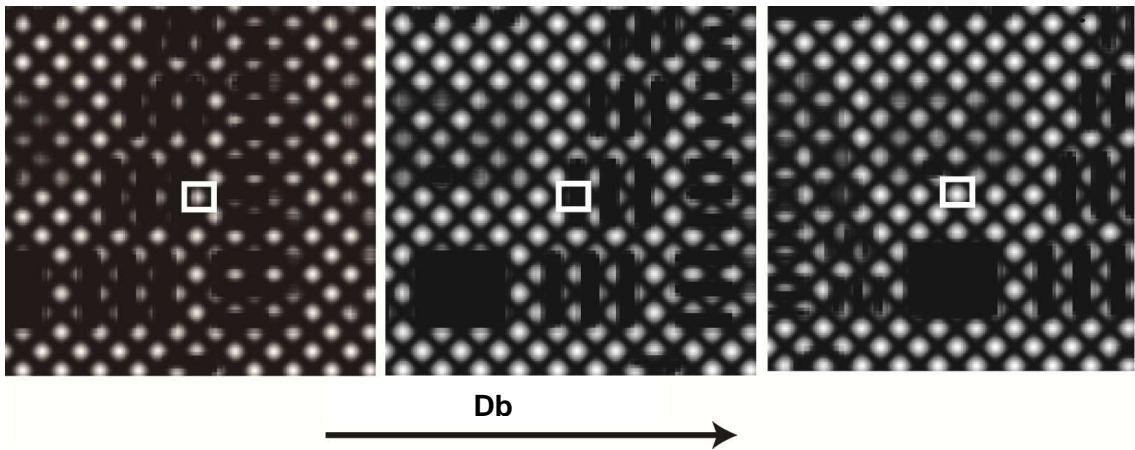
**Figura 1b**



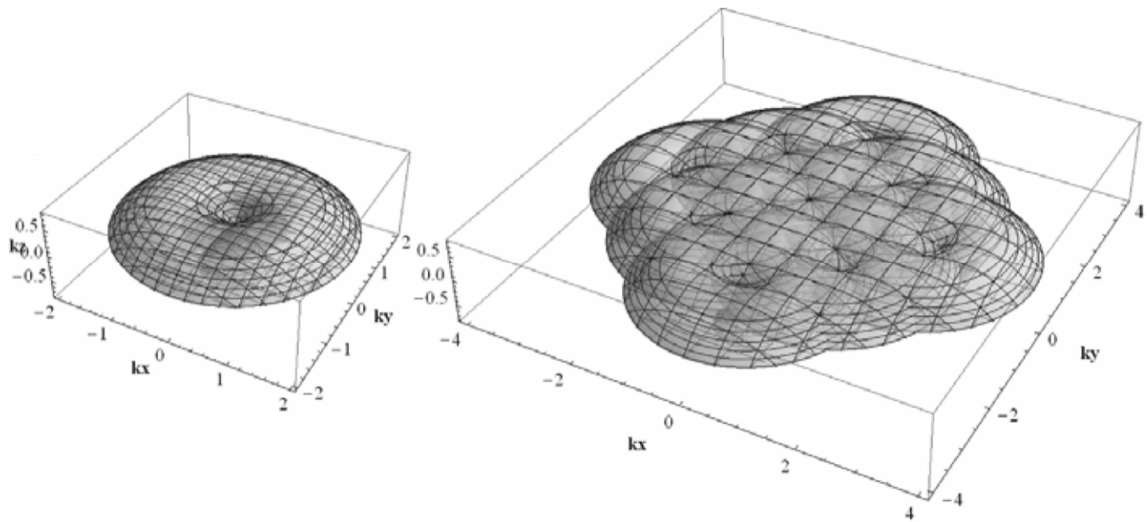
**Figura 2**



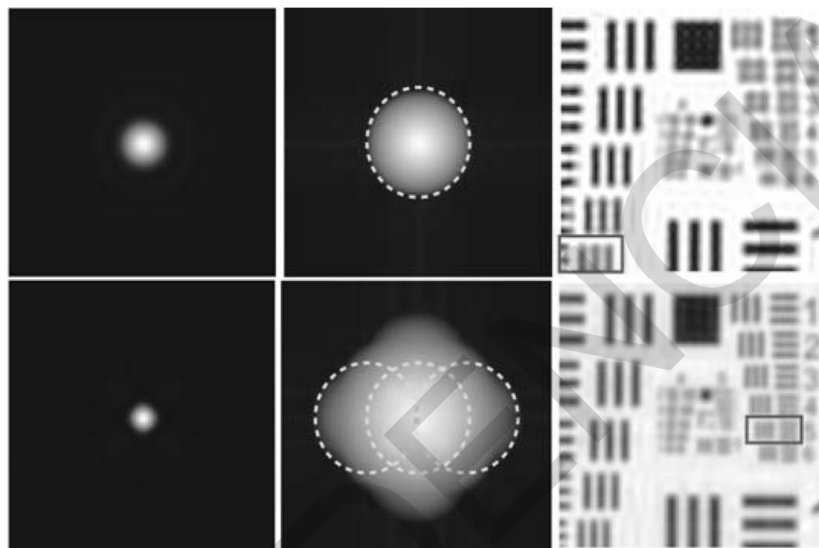
**Figura 3**



**Figura 4**

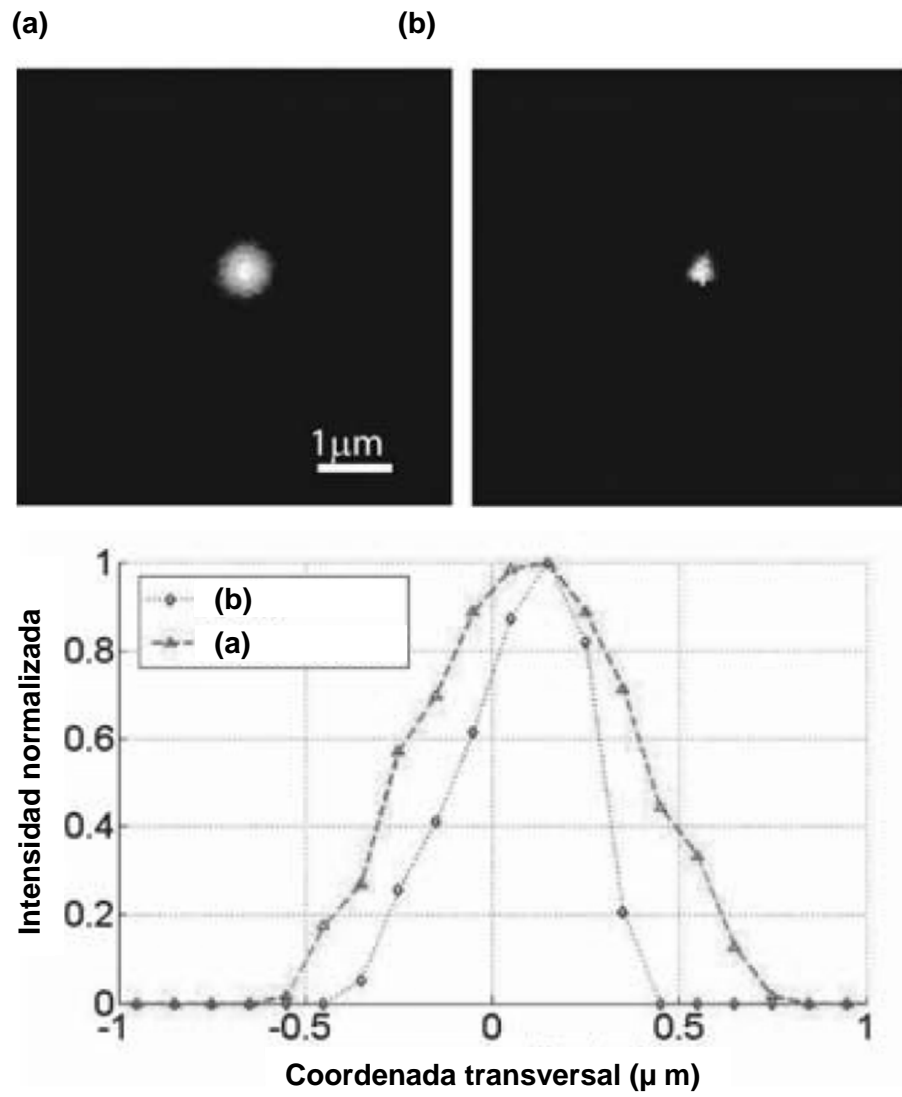


**Figura 5**

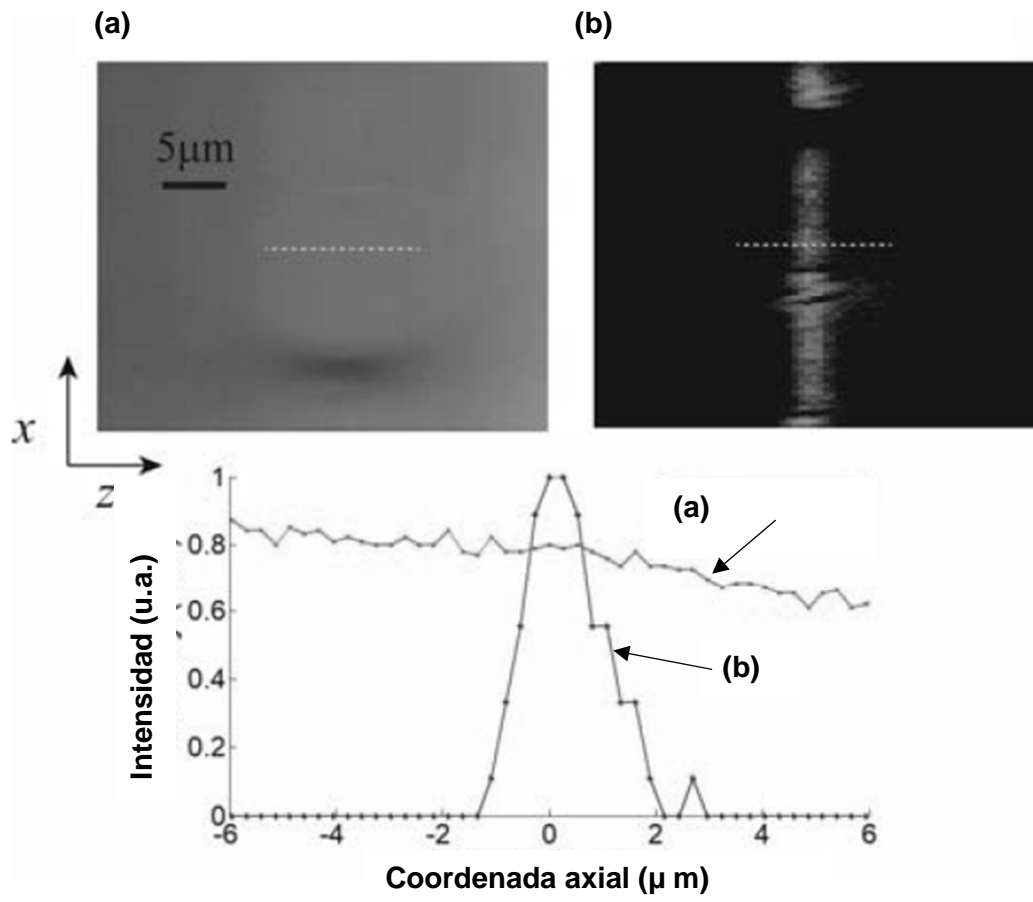


**Figura 6**





**Figura 7**



**Figura 8**