

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 379**

21 Número de solicitud: 201431546

51 Int. Cl.:

**G06T 15/00** (2011.01)

**G02B 21/22** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**21.10.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.04.2016**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID (100.0%)**

**Av. Gregorio Peces Barba, 1  
28919 Leganés (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**RIPOLL LORENZO, Jorge y  
ARRANZ DE MIGUEL, Alicia**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ AHIJADO, Ángel**

54 Título: **Microscopio y procedimiento para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras**

57 Resumen:

La invención describe un microscopio y procedimiento para obtener imágenes 3D de varias muestras transparentes o semi-transparentes que comprende fundamentalmente: provocar, manteniendo un ángulo de adquisición constante, un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra; obtener, para dicho ángulo de adquisición, una única imagen de proyección en 2D formada por un parámetro representativo para cada píxel; modificar el ángulo de adquisición mediante un giro relativo entre la lámina de iluminación y la muestra combinado con una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra, y repetir los pasos anteriores; y generar, a partir del conjunto de imágenes de proyección en 2D obtenidas, una imagen 3D de cada una de las muestras.

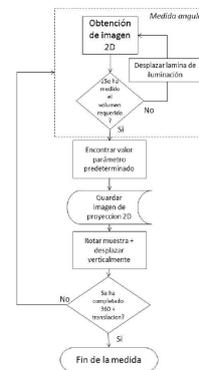


FIG. 6

**DESCRIPCIÓN**

Microscopio y procedimiento para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras

5

**OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención pertenece al campo de las técnicas de iluminación de haz plano utilizadas en los microscopios ópticos para la obtención de imágenes de varias muestras  
10 transparentes o semi-transparentes tales como embriones, tejidos y otras muestras biológicas, así como otros materiales.

Un primer objeto de la presente invención es un nuevo procedimiento capaz de obtener imágenes 3D de muestras transparentes o semi-transparentes con una calidad mayor que la  
15 de los microscopios ópticos actuales.

Un segundo objeto de la presente invención es un microscopio especialmente diseñado para llevar a cabo el procedimiento anterior.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los estudios de embriones y muestras biológicas similares a través de microscopio óptico presentan, a diferencia de lo que sucede con células individuales, problemas particulares relacionados con la absorción de la luz y la pérdida de resolución debida a la dispersión de  
25 la luz. Para solucionar estos problemas, en los últimos años se han desarrollado mejoras importantes sobre los microscopios de haz láser plano, cuya invención data del 1903. Véase, por ejemplo, el documento "Ultramicroscopy" de Siedentopf y Zsigmondy (Analen der Physik 10(1), 1903). Tras pequeñas mejoras propuestas por Voie et al, en J. Micros. 170, 1993; (técnica denominada OPFOS por los autores), o por Fuchs et al en Opt. Exp. 2002  
30 denominada "Thin laser light sheet microscope" o TSLIM, en 2004 el grupo de Stelzer presentó un microscopio de haz láser plano que denominó SPIM (Microscopio de Iluminación en Plano Selectivo, *Selective Plane Illumination Microscope* según sus siglas en inglés), que tiene aplicaciones tanto en la imagen in vivo como en tejido fijado y muestras transparentes o semi-transparentes en general.

35

Un microscopio de haz láser plano está formado fundamentalmente por una cámara acoplada a un objetivo de alta apertura numérica y dispuesta según una dirección

denominada “dirección de detección”, y un medio de iluminación capaz de emitir una lámina delgada de luz según una dirección denominada “dirección de iluminación” que es perpendicular a la dirección de detección, siguiendo la configuración original de Siedentopf y Zsigmondy acoplada a una cámara de detección. Con esta configuración, la cámara puede  
5 obtener una imagen 2D de fluorescencia de la parte de la muestra iluminada por la lámina o plano de iluminación. Si además se desplaza la muestra en la dirección del eje de detección y se toman varias imágenes 2D en diferentes posiciones, se genera un conjunto o pila de imágenes 2D donde cada una de las imágenes 2D corresponde a una posición del plano de iluminación con respecto a la muestra. Esta pila de imágenes 2D contiene información de la  
10 posición en z (profundidad de la muestra según la dirección de detección) obtenida al mover la muestra, y de las posiciones x e y, presentes en cada imagen 2D. La pila de imágenes 2D puede entonces fusionarse para generar una imagen 3D de la muestra, como se describe en el documento US 7,554,725 de Stelzer et al.

15 Un inconveniente de la técnica de microscopía de haz láser plano es que presenta peor resolución en el eje de detección que el plano de la imagen. Es decir, en la imagen 3D la resolución en los ejes x e y resulta más precisa que la resolución en el eje z. Para solucionar esta anisotropía, se ha desarrollado la técnica multi-view SPIM o mSPIM (ver documento US 2011/115895 de Huisken). Esta técnica consiste fundamentalmente incluir un brazo de  
20 iluminación adicional para obtener al menos dos medidas de iluminación opuestas 180 grados. Mediante un leve pivoteo de menos de 10 grados del plano de luz sobre el plano de iluminación se puede mejorar la resolución de la imagen. Si adicionalmente se incluye una cámara adicional, se pueden realizar cuatro medidas simultáneas correspondientes a todas las combinaciones posibles entre cámara/brazo de iluminación. Estas imágenes 2D  
25 posteriormente se fusionan para generar una única imagen en 3D de mayor calidad de la muestra en cuestión.

Otra de las formas propuestas para mejorar la anisotropía y la calidad de las imágenes es combinar varias medidas angulares en una única medida 3D. Es decir, se hace rotar la  
30 muestra alrededor de su propio eje, normalmente un eje vertical, de manera que se captan varias pilas de imágenes 2D (comúnmente denominadas “medidas angulares”), cada una de las cuales corresponde a un ángulo de rotación de la muestra diferente. Esta ha sido la propuesta publicada por S. Preibisch et al, Nature Methods 7 (2010), quienes proponen el uso de marcadores de referencia para poder alinear de forma apropiada estas medidas  
35 angulares.

Para una comprensión más clara de esta técnica, se adjuntan las Figs. 1a y 1b que

muestran dos ejemplos de microscopios (100) de haz láser plano. En la Fig. 1a se dispone la muestra (107) en un soporte (101) dentro de un baño (102). Un haz (103) de iluminación lineal Gaussiano, Bessel o Airy incide sobre una lente (104) cilíndrica que lo enfoca gracias a un objetivo (105) de iluminación para generar la lámina (106) de iluminación plana vertical.

5 Esta lámina (106) de iluminación plana vertical incide sobre la muestra (107) según la dirección de iluminación (DI), y la luz fluorescente (108) es recogida por un objetivo (109) de detección orientado según la dirección de detección (DD), que es perpendicular a la dirección de iluminación (DI). En la Fig. 1b se muestra un microscopio (100) similar, aunque en este caso la formación de la lámina (106) plana de iluminación tiene lugar mediante el  
10 escaneo vertical del haz (103) de iluminación lineal mediante un espejo galvanométrico (104') o similar. En ambos casos, el soporte (101) puede girar alrededor de su eje vertical para permitir la toma de varias medidas angulares de acuerdo con la técnica propuesta por Preibisch.

15 La Fig. 2 muestra un detalle de la formación de una pila de imágenes 2D de la muestra con un microscopio (100) de haz láser plano según la Fig. 1a o 1b. Se aprecia cómo la lámina (106) se desplaza según la dirección de detección, tomándose una imagen 2D por cada una de dichas posiciones. El resultado final es la obtención de una pila de imágenes 2D. Para llevar a cabo el método propuesto por Preibisch et al, este proceso se repite varias veces  
20 para diferentes ángulos de rotación de la muestra alrededor del eje vertical, lo que permite obtener una imagen 3D de la muestra con una mayor isotropía.

Sin embargo, la introducción de estas medidas angulares supone incrementar el tiempo de exposición y la duración del experimento de forma proporcional al número de medidas  
25 angulares. En efecto, dado que se desconoce la posición exacta del centro de rotación, fusionar todas las imágenes angulares obtenidas en un microscopio de haz láser plano requiere el uso de marcadores (fiducials) para generar la imagen 3D final (véase S. Preibisch, et al, Nature Methods 7, 2010), lo cual requiere una gran potencia de cálculo, capacidad de almacenamiento y complica la medida experimental.

30

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención resuelve el problema anterior gracias a un nuevo microscopio y procedimiento de generación de imágenes 3D que requiere mucha menos potencia de  
35 cálculo y capacidad de almacenamiento que las actuales técnicas de haz láser plano. Ello no sólo es ventajoso en lo que respecta a los requerimientos de un microscopio diseñado para llevar a cabo este procedimiento, sino que además permite generar las imágenes 3D

con una mayor resolución y una menor anisotropía. En el contexto de la adquisición de imágenes de muestras in vivo la rapidez en la obtención de las imágenes es crucial, ya que de ello depende que pueda obtenerse información útil para la comprensión de determinados procesos biológicos. Además, el nuevo microscopio y procedimiento permite obtener  
5 imágenes de varias muestras diferentes ubicadas verticalmente una encima de la otra, lo que no es posible con los equipos actuales.

En aras de asegurar la claridad de la descripción, se describe a continuación una serie de términos que se utilizarán en este documento.

10

Dirección de iluminación: Dirección a lo largo de la cual se proyecta la lámina o plano de iluminación que atraviesa la muestra.

15

Lámina de iluminación: Lámina delgada de luz emitida hacia la muestra según la dirección de iluminación. El plano que contiene la lámina de iluminación, denominado plano de iluminación, es normalmente vertical.

20

Dirección de detección: Dirección según la cual está dispuesto el objetivo de la cámara para obtener imágenes 2D de la muestra. Es perpendicular a la lámina de iluminación, y por tanto es normalmente horizontal. El objetivo de la cámara puede ser de magnificación alta o baja, y su apertura numérica alta o baja.

25

Imagen 2D: Cada una de las imágenes individuales que obtiene la cámara. Cada una de tales imágenes individuales corresponde a una posición de la lámina de iluminación con relación a la muestra.

30

Pila de imágenes 2D: Conjunto de imágenes 2D obtenidas por la cámara y que corresponden posiciones paralelas de la lámina de iluminación como resultado bien del desplazamiento de la muestra según la dirección de detección o bien del desplazamiento de la lámina de iluminación en la misma dirección.

35

Imagen 3D: Imagen generada a partir de un conjunto de pilas de imágenes 2D correspondientes a iluminar la muestra desde diferentes orientaciones.

Imagen de proyección: Imagen 2D que puede generarse iluminando la muestra y obteniendo, en el lado de la muestra opuesto a aquel desde el que se ha iluminado, una imagen de proyección que puede asimilarse a la “sombra” que

se ha proyectado. También se puede obtener a partir de una pila de imágenes 2D aplicando un parámetro a cada pixel de la imagen, por ejemplo un parámetro estadístico como la varianza, el valor máximo, el valor mínimo, el valor medio, la correlación entre pixeles, etc.

5

Ángulo de adquisición: Se trata del ángulo el plano horizontal entre la dirección de detección y un plano vertical de la muestra, por ejemplo el plano de simetría o similar en el caso de determinados organismos. Como se ha comentado, este permanece constante durante la adquisición de cada pila de imágenes 2D.

10

Los inventores de la presente invención han desarrollado un nuevo microscopio y procedimiento para la generación de la imagen 3D que combina las técnicas habitualmente utilizadas en microscopía de haz láser plano con las que se suelen emplear en microscopía OPT.

15

La técnica OPT (Tomografía de Proyección Óptica, *Optical Projection Tomography* según sus siglas en inglés), descrita en el documento US20060122498 A1, es relativamente similar a la tomografía por rayos X. Se basa fundamentalmente en iluminar ópticamente la muestra de forma homogénea y obtener, en el lado de la muestra opuesto a aquel desde el que se ilumina, una imagen que puede asimilarse a la “sombra” que proyecta la muestra sobre un plano, o en el caso de medir la fluorescencia, la emisión total del volumen iluminado. Esta “sombra” o emisión de fluorescencia, normalmente denominada imagen de proyección, tiene diferentes tonos de gris en función de la absorción de la luz y/o emisión de fluorescencia que se produce en diferentes partes de la muestra. Si se ilumina la muestra desde varios

20

ángulos, es posible implementar un algoritmo de reconstrucción sobre todas las imágenes obtenidas para generar una imagen 3D de dicha muestra. Este algoritmo de reconstrucción suele estar basado en resolver la transformada de Radon, originalmente desarrollada para la imagen 3D con rayos X.

25

Los microscopios tipo OPT (Optical Projection Tomography, Sharpe Science 2002), a diferencia de los microscopios de haz láser plano, iluminan la muestra completa de forma simultánea, y basan su reconstrucción 3D en las medidas angulares, de forma análoga a un Tomógrafo Computerizado de Rayos-X (TAC) pero con medidas ópticas, tanto de absorción como fluorescencia. Una desventaja de los microscopios OPT es la necesidad de usar bajas

30

aperturas numéricas para mantener toda o al menos la mitad de la muestra dentro del plano focal, reduciendo así tanto la sensibilidad como la resolución de estos aparatos. Por otro

35

lado, las medidas de OPT son sencillas de implementar, al consistir cada medida angular en

una única proyección del volumen completo, pudiendo utilizar algoritmos existentes como el Filtered Back Projection (Retroproyección Filtrada), o incluso modelar la dispersión de la luz presente en la muestra y obtener imágenes de muestras con un alto coeficiente de dispersión.

5

Las Fig. 3 muestra de manera esquemática el funcionamiento de un microscopio OPT (200). El montaje consiste fundamentalmente en un objetivo (201) de detección acoplado a una cámara y dirigido hacia la muestra (202) para recoger la fluorescencia o trans-iluminación (203) provocada por la iluminación homogénea emitida por un elemento que no se muestra en la imagen. La muestra (202), que está contenida en un baño (204) fijado a un soporte (205), gira en torno a su propio eje, normalmente un eje vertical, de manera que se toman varias imágenes correspondientes a diferentes ángulos. Posteriormente, se implementa la transformada inversa de Radon (usando la retroproyección filtrada, Filtered Backprojection, por ejemplo, u otro algoritmo de reconstrucción) para construir una única imagen 3D de la muestra.

15

El microscopio y procedimiento propuesto por los inventores de la presente solicitud combina características de ambas técnicas de un modo tal que se mejora la resolución y calidad de la imagen 3D final, combinando ambos equipos en uno sólo. El microscopio y procedimiento de la invención emplea, al igual que la técnica de haz láser plano, una lámina de iluminación para obtener información nítida del interior de la muestra. Esto permite aumentar la apertura numérica de la cámara, ya que la distancia entre el objetivo y el plano de iluminación es siempre conocida, mejorando así la resolución de las imágenes obtenidas. Por otra parte, como ocurre en la técnica OPT, el microscopio y procedimiento de la invención no almacena una imagen 2D por cada posición de la lámina de iluminación, sino que para cada ángulo de adquisición almacena únicamente un parámetro representativo de cada píxel. Es decir, para cada ángulo de adquisición se almacena una única imagen de proyección 2D (similar a la técnica OPT), en lugar de toda una pila de imágenes 2D (como en la técnica de haz de láser plano). Esto permite no sólo disminuir los requerimientos del sistema, sino también aumentar la velocidad de adquisición. Además, mediante una translación vertical y el uso de un contenedor en el que se puedan colocar varias muestras, esta nueva invención permite obtener imágenes de varias muestras dispuestas una encima de la otra, como se aprecia en la Fig. 4.

20

25

30

35

De acuerdo con esto, la presente invención describe un procedimiento para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras mediante un microscopio que comprende un medio de adquisición de imágenes dirigido hacia la colección de muestras según una

dirección de detección, y un medio de iluminación configurado para emitir una lámina de iluminación plana hacia la colección de muestras según una dirección perpendicular a la dirección de detección. Como se ha comentado anteriormente en este documento, la colección de muestras comprende varias muestras ubicadas una encima de la otra. El  
5 procedimiento comprende los siguientes pasos:

1) Provocar, manteniendo un ángulo de adquisición constante, un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra.

10 Como es conocido en la técnica, este desplazamiento relativo puede realizarse de dos modos: manteniendo la lámina de iluminación inmóvil y desplazando la muestra según la dirección de detección; o bien manteniendo inmóvil la muestra y desplazando la lámina de iluminación. En cualquiera de los casos, el hecho es que la lámina de iluminación realiza un “escaneo” de la muestra a lo largo de la dirección de  
15 detección.

2) Obtener, para dicho ángulo de adquisición, una única imagen de proyección en 2D formada por un parámetro representativo para cada píxel.

20 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el parámetro representativo para cada píxel es un parámetro estadístico, como por ejemplo el valor máximo, la varianza, el valor mínimo, la desviación estándar, el valor promedio, la correlación entre píxeles, etc. En este caso, la obtención del parámetro estadístico se puede llevar a cabo adquiriendo las imágenes en modo continuo para cada ángulo  
25 de adquisición. Es decir, provocando un movimiento relativo continuo entre la lámina de iluminación y la muestra según la dirección de detección a la vez que se adquieren imágenes a alta velocidad (más de 100 imágenes por segundo). Al estar interesados en la estadística de cada píxel, los tiempos de exposición pueden ser extremadamente cortos, con valores de señal ruido inferiores a los usados en un  
30 microscopio de haz láser plano.

De acuerdo con otra realización alternativa de la invención, el parámetro representativo para cada píxel es la suma de las intensidades de cada píxel. La suma de las intensidades de cada píxel se puede obtener provocando un movimiento  
35 relativo continuo entre la lámina de iluminación y la muestra según la dirección de detección a la vez que se mantiene abierta la exposición del medio de adquisición de imágenes. Es decir, en la imagen de proyección obtenida cada píxel tiene como valor

final la suma de intensidades que ese píxel ha recibido durante todo el proceso de desplazamiento de la lámina de iluminación a lo largo de la muestra.

- 3) Modificar el ángulo de adquisición mediante un giro relativo entre la lámina de iluminación y la muestra combinado con una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra, y repetir los pasos anteriores.

Una vez obtenida y almacenada la imagen de proyección para un ángulo de adquisición determinado, se modifica el ángulo de adquisición y se repite el proceso, y así sucesivamente para un número de ángulos de adquisición configurable, de manera que se obtiene un conjunto de imágenes de proyección en 2D. Esta información angular correspondería de forma efectiva a una medida de OPT realizada con un objetivo de apertura numérica alta, medida irrealizable con los requisitos de baja apertura numérica necesarios para OPT. Además, al no iluminar el volumen completo de la muestra simultáneamente se reducen drásticamente los efectos de fotoblanqueo y fototoxicidad.

Como se ha comentado con anterioridad, el hecho de que en esta técnica se obtenga y almacene únicamente una imagen de proyección en 2D para cada ángulo de adquisición contrasta con la técnica multi-ángulo de haz láser plano propuesta por Preibisch (Nat. Meth. 2010) o con el multiview SPIM propuesto por Huisken, en los cuales se almacena toda una pila de imágenes 2D por cada ángulo de adquisición, ya que el almacenamiento y procesamiento de toda esa información ralentiza considerablemente el proceso e impone mayores requisitos con relación al equipo necesario para llevarla a cabo.

Por otra parte, al paso de modificación del ángulo de adquisición se añade aquí una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra mediante el uso de un motor de largo recorrido. Es decir, se aplica lo que se conoce como helical OPT (hOPT), equivalente al CT helicoidal o espiral. Como se ha comentado, esto se puede hacer bien desplazando la muestra verticalmente, o bien desplazando la lámina de iluminación verticalmente junto con el sistema de detección. En cualquier caso, la combinación del giro con la traslación genera un movimiento helicoidal que permite obtener información de varias muestras dispuestas una encima de la otra o bien de una única muestra muy alargada, lo que no es posible con la técnica de haz láser plano actual.

Adicionalmente, en una realización preferida de la invención comprende además modificar la posición de la muestra dentro de un plano perpendicular al eje de giro de dicha muestra para centrar siempre la misma porción de la muestra frente a la dirección de detección. Es decir, la muestra se recentra en el campo de visión del microscopio mediante un movimiento en el plano mencionado (que también se puede definir como perpendicular a la traslación vertical, o plano que contiene las direcciones de detección e iluminación). Esto permite analizar tejidos o muestras muy grandes, lo cual no es posible actualmente.

5

4) Generar, a partir del conjunto de imágenes de proyección obtenidas, una imagen 3D de cada una de las muestras.

10

Por último, se implementa un algoritmo de reconstrucción a la información del conjunto de imágenes de proyección obtenidas para generar una única imagen 3D de la muestra. Por ejemplo, las imágenes de proyección se pueden introducir en un algoritmo de Filtered Back Projection o en un algoritmo de reconstrucción de proyección como la transformada inversa de Radon, generando la imagen 3D de la muestra.

15

Es importante resaltar que un microscopio haz láser plano convencional no obtiene sus imágenes 3D de esta forma. En esos casos, la imagen 3D se construye a partir de la pila de imágenes 2D obtenida, o en el caso del multi-angle SPIM de Preibsch o el mSPIM de Huisken, la fusión de varias pilas de imágenes 2D correspondientes a cada ángulo. En ninguna invención de haz láser plano en general se describe el uso de la transformada inversa de Radon para general una imagen 3D.

20

25

Adicionalmente, acuerdo con otra realización preferida de la invención, el procedimiento comprende además el paso de combinar varias imágenes 3D obtenidas usando diferentes parámetros para obtener una imagen 3D final mejorada. Por ejemplo, si a la imagen 3D que se obtiene usando como parámetro la intensidad máxima se le resta la imagen 3D que se obtiene usando la suma de intensidades, se puede mejorar el contraste eliminando el fondo. Por otro lado, es posible que la imagen 3D que se obtiene de la varianza proporcione información adicional que no tiene una imagen obtenida a partir de la intensidad, con más detalle anatómico, por ejemplo.

30

35

Un segundo aspecto de la invención está dirigido a un microscopio especialmente diseñado para llevar a cabo el procedimiento descrito que comprende un medio de adquisición de

imágenes dirigido hacia la colección de muestras según una dirección de detección, y un medio de iluminación configurado para emitir una lámina de iluminación plana hacia la colección de muestras según una dirección perpendicular a la dirección de detección, donde la colección de muestras comprende varias muestras ubicadas una encima de la otra.

5 Además el microscopio de la invención comprende:

a) Medios para provocar, manteniendo un ángulo de adquisición constante, un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra.

10

b) Medios para obtener, para dicho ángulo de adquisición, una única imagen de proyección en 2D formada por un parámetro representativo para cada píxel.

c) Medios para modificar el ángulo de adquisición mediante un giro relativo entre la lámina de iluminación y la muestra combinado con una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra.

15

d) Medios para generar, a partir del conjunto de imágenes de proyección en 2D obtenidas, una imagen 3D de cada una de las muestras.

20

En una realización preferida de la invención, los medios para provocar un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra están configurados para realizar un desplazamiento continuo.

25

En otra realización preferida de la invención, los medios para realizar una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra comprenden un motor eléctrico de largo recorrido.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

30

Las Figs. 1a y 1b muestran respectivamente una vista esquemática de dos ejemplos de microscopio convencional de tipo haz láser plano de acuerdo con la técnica anterior.

La Fig. 2 muestra un detalle de la adquisición de un conjunto de imágenes 2D de la muestra.

35

La Fig. 3 muestra una vista esquemática de un microscopio convencional de tipo OPT de acuerdo con la técnica anterior.

La Fig. 4 muestra un soporte diseñado para alojar la colección de muestras dispuestas una encima de la otra.

5 Las Fig. 5(a), 5(b), 5(c) y 5(d) muestran respectivamente: la Fig. 5(a) muestra un esquema numérico de una imagen 2D de un objeto; la Fig. 5(b) muestra ejemplos de proyecciones sobre la imagen 2D de la Fig. 5(a) correspondientes a diferentes parámetros para un ángulo de giro de 0°; la Fig. 5(c) muestra ejemplos de proyecciones sobre la imagen 2D de la Fig. 5(a) correspondientes a diferentes parámetros para un ángulo de giro de 90°; y la Fig. 5(d)  
10 muestra ejemplos de proyecciones sobre la imagen 2D de la Fig. 5(a) correspondientes al parámetro "Suma" para los ángulos de giro 0°, 90°, 180° y 270°.

La Fig. 6 muestra un diagrama de flujo del procedimiento que se lleva a cabo para obtener la imagen de proyección para cada ángulo.

15

## **REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION**

Las Figuras 5(a)-5(d) representan un ejemplo simplificado que muestra el proceso de obtención de imágenes de proyección angulares de un objeto bidimensional correspondientes a distintos parámetros. Los parámetros utilizados en este ejemplo son la  
20 media, el valor mínimo, la varianza, la suma y el valor máximo.

La Fig. 5(a) muestra el objeto con los valores obtenidos después de la adquisición de cinco imágenes correspondientes a un determinado ángulo de adquisición que, debido a la  
25 simplificación de este ejemplo, serían monodimensionales. Se podría decir que se trata de una pila de 5 imágenes 1D (cinco filas) que representan 5 secciones del objeto.

A partir de estos datos, se pueden generar varios parámetros de proyección. La Fig. 5(b) muestra un ejemplo de obtención de varias imágenes de proyección a partir de la pila de  
30 imágenes correspondiente a un ángulo de adquisición de 0 grados. Nótese que, en la presente invención, no es necesario almacenar todas las imágenes de la pila de imágenes obtenida, ya que el cálculo del parámetro puede realizarse a medida que se van obteniendo las imágenes durante el "escaneado" del objeto según la dirección de detección.

35 Una vez generada la imagen de proyección correspondiente, se rota la muestra y se adquiere una nueva pila de imágenes a partir de los cuales se obtendrá otra imagen de proyección. En caso de haber un desplazamiento vertical, normalmente éste tendría lugar

después de la rotación. La Fig. 5(c) muestra un ejemplo correspondiente a un ángulo de adquisición de  $90^\circ$  para los mismos parámetros. Por motivos de simplicidad, se ha utilizado la misma pila de imágenes que en la Fig. 5(b), aunque como es lógico en un caso real se obtendría una pila de imágenes diferente de la anterior.

5

Este proceso se repite para un número determinado de medidas angulares, en este ejemplo concreto cuatro medidas correspondientes a  $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  y  $270^\circ$ . El resultado se muestra en la Fig. 5(d), que muestra las cuatro imágenes de proyección correspondientes al parámetro suma. Estas imágenes de proyección se introducen a continuación en un código  
10 que resuelva la transformada inversa de Radon, por ejemplo, o en un código más avanzado de proyección tomográfica que tenga en cuenta la presencia de dispersión, generando la imagen 3D final.

El procedimiento completo se muestra en el algoritmo representado en la Fig. 6. En primer  
15 lugar, se toma una imagen 2D correspondiente a un ángulo de adquisición determinado. A continuación, se desplaza la lámina de iluminación y se toma otra imagen 2D. Este proceso se repite las veces que sea necesario hasta que se han tomado imágenes que abarcan todo el volumen requerido. A continuación, se calcula del parámetro determinado para cada uno de los píxeles de las imágenes 2D obtenidas, lo que da como resultado la imagen de  
20 proyección correspondiente a ese primer ángulo de adquisición. La imagen de proyección 2D resultante se almacena.

A continuación, después de imprimir a la muestra una rotación hasta un segundo ángulo de adquisición combinada con un desplazamiento vertical, se repiten las operaciones  
25 anteriores. Todo este proceso se repite hasta haber completado una vuelta completa alrededor de la muestra o las muestras. Por último, el conjunto de imágenes de proyección que se ha ido almacenando se introduce en un algoritmo para generar la imagen 3D final. Por ejemplo, empleando un algoritmo de tipo Filtered Back Projection o un algoritmo de transformada inversa de Radon.

30

Un ejemplo concreto de uso de este procedimiento podría consistir en una muestra de embrión de pez cebra que expresa una proteína. Este embrión se puede introducir en un contenedor transparente (un tubo FEP, por ejemplo), o puede embeber en agarosa de modo que se pueda desplazar en el plano de medida, y se pueda rotar en torno a un eje de  
35 rotación. Una vez colocada esta muestra sobre el microscopio de la invención, se procedería a encender la fuente de iluminación para crear un haz plano de luz. Una vez elegido el parámetro a guardar (la intensidad máxima de la pila de imágenes 2D, por ejemplo), se

procedería a mover el plano de luz con respecto a la muestra desde una posición inicial hasta una posición final, guardando la imagen de proyección en 2D que contiene la información estadística de este desplazamiento. Este proceso se repetiría para cada ángulo de medida hasta un total de  $M$  ángulos, generando una pila  $M$  imágenes de proyección.

- 5 Estas imágenes de proyección se introducirían en un algoritmo de Filtered Back Projection, por ejemplo, o en un algoritmo de reconstrucción de proyección predefinido, generando la imagen 3D de la muestra.

- 10 Otro ejemplo podría consistir en  $N$  muestras de tejido con tinción fluorescente, previamente clareado y fijado. Estas  $N$  muestras se pueden introducir en un único contenedor transparente, o se pueden embeber en agarosa de modo que se las pueda desplazar tanto en el plano de medida como verticalmente, y se pueda rotar el conjunto de muestras en torno a un eje de rotación. El resultado sería similar al que se muestra en la Fig. 4. Una vez colocadas estas muestras sobre el microscopio de la invención, se procedería a encender la
- 15 fuente de iluminación para crear un haz plano de luz. Una vez elegido el parámetro a guardar (la intensidad máxima de la pila de imágenes 2D, por ejemplo), se procedería a mover el plano de iluminación con respecto a la muestra desde una posición inicial hasta una posición final, guardando la imagen de proyección en 2D que contiene la información estadística de este desplazamiento. Una vez finalizado el barrido del plano de luz, se
- 20 procedería a la rotación, y, de forma simultánea, la translación vertical de la muestra. Este proceso se repetiría hasta que la muestra en su totalidad ha sido escaneada, requiriendo para ello realizar varias rotaciones completas con un total de  $M$  ángulos, generando una pila de  $M$  imágenes de proyección helicoidal. Estas imágenes de proyección se introducirían en un algoritmo de Filtered Back Projection con desplazamiento helicoidal, por ejemplo, o en un
- 25 algoritmo de reconstrucción de proyección con traslación vertical predefinido, generando la imagen 3D de todas las muestras de forma simultánea.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras mediante un microscopio, caracterizado por que el microscopio comprende un medio de adquisición de imágenes dirigido hacia la colección de muestras según una dirección de detección, y un medio de iluminación configurado para emitir una lámina de iluminación plana hacia la colección de muestras según una dirección perpendicular a la dirección de detección, donde la colección de muestras comprende varias muestras ubicadas una encima de la otra, comprendiendo el procedimiento los siguientes pasos:
- 10 - provocar, manteniendo un ángulo de adquisición constante, un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra;
- obtener, para dicho ángulo de adquisición, una única imagen de proyección en 2D formada por un parámetro representativo para cada píxel;
- 15 - modificar el ángulo de adquisición mediante un giro relativo entre la lámina de iluminación y la muestra combinado con una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra, y repetir los pasos anteriores; y
- generar, a partir del conjunto de imágenes de proyección en 2D obtenidas, una imagen 3D de cada una de las muestras.
- 20
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el parámetro representativo para cada píxel es un parámetro estadístico.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde el parámetro estadístico se selecciona de entre el valor máximo, la varianza, el valor mínimo, la desviación estándar, el
- 25 valor promedio y la correlación entre píxeles.
4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3, donde la obtención del parámetro estadístico se lleva a cabo provocando un movimiento relativo continuo entre
- 30 la lámina de iluminación y la muestra según la dirección de detección y adquiriendo imágenes a alta velocidad.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el parámetro representativo para cada píxel es la suma de las intensidades de cada píxel.
- 35
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde la suma de las intensidades de cada píxel se obtiene provocando un movimiento relativo continuo entre la lámina de

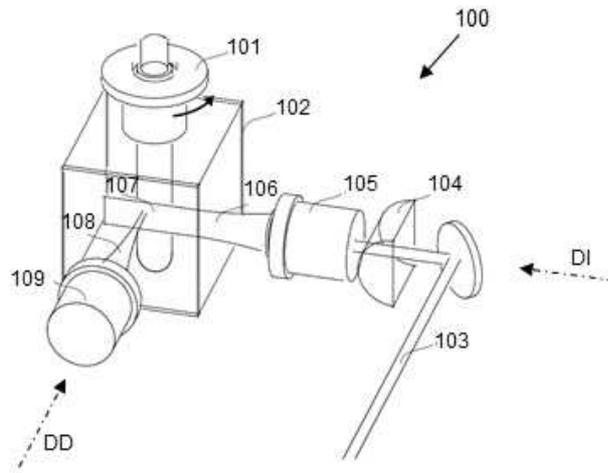
iluminación y la muestra según la dirección de detección a la vez que se mantiene abierta la exposición del medio de adquisición de imágenes.

- 5 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso de modificar el ángulo de adquisición comprende además modificar la posición de la muestra dentro de un plano perpendicular al eje de giro de dicha muestra para centrar siempre la misma porción de la muestra frente a la dirección de detección.
- 10 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso de generar una imagen 3D de la muestra comprende aplicar un algoritmo de retroproyección filtrada (Filtered Back Projection) al conjunto de imágenes de proyección obtenidas.
- 15 9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el paso de generar una imagen 3D de la muestra comprende aplicar la transformada inversa de Radon al conjunto de imágenes de proyección obtenidas.
- 20 10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende combinar varias imágenes 3D obtenidas empleando diferentes parámetros representativos para obtener una imagen 3D mejorada.
- 25 11. Microscopio para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras capaz de llevar a cabo el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende un medio de adquisición de imágenes dirigido hacia la colección de muestras según una dirección de detección, y un medio de iluminación configurado para emitir una lámina de iluminación plana hacia la colección de muestras según una dirección perpendicular a la dirección de detección, donde la colección de muestras comprende varias muestras ubicadas una encima de la otra, que además comprende:
- 30 - medios para provocar, manteniendo un ángulo de adquisición constante, un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra;
- medios para obtener, para dicho ángulo de adquisición, una única imagen de proyección en 2D formada por un parámetro representativo para cada píxel;
- 35 - medios para modificar el ángulo de adquisición mediante un giro relativo entre la lámina de iluminación y la muestra combinado con una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra; y

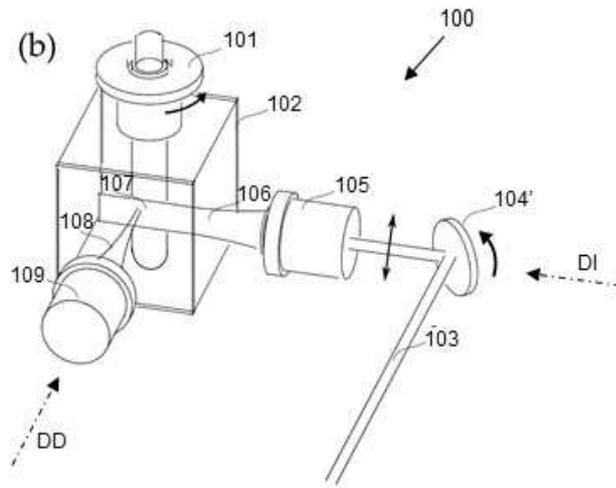
- medios para generar, a partir del conjunto de imágenes de proyección en 2D obtenidas, una imagen 3D de cada una de las muestras.

5 12. Microscopio de acuerdo con la reivindicación 11, donde los medios para provocar un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra están configurados para realizar un desplazamiento continuo.

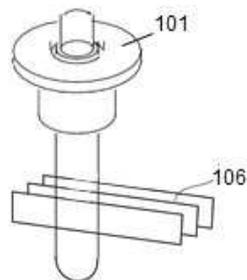
10 13. Microscopio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde los medios para realizar una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra comprenden un motor eléctrico.



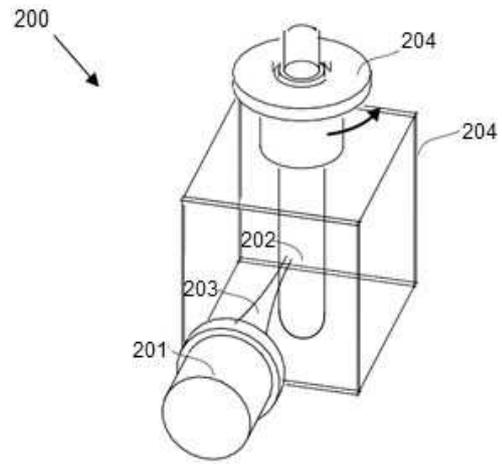
**FIG. 1a**



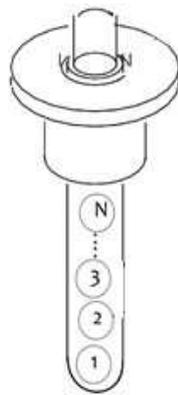
**FIG. 1b**



**FIG. 2**

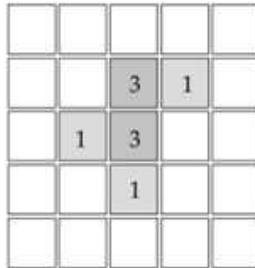


**FIG. 3**

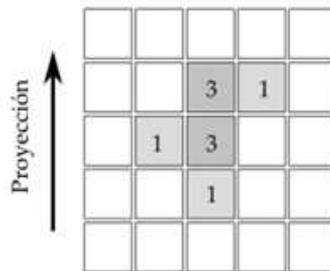
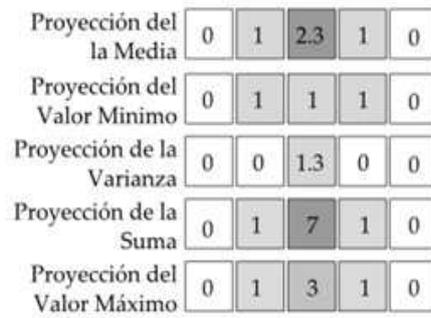


**FIG. 4**

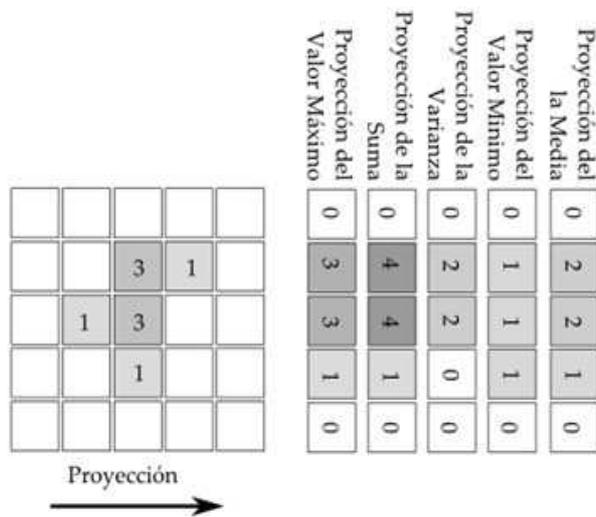
Distribución 2D del Objeto



**FIG. 5a**



**FIG. 5b**

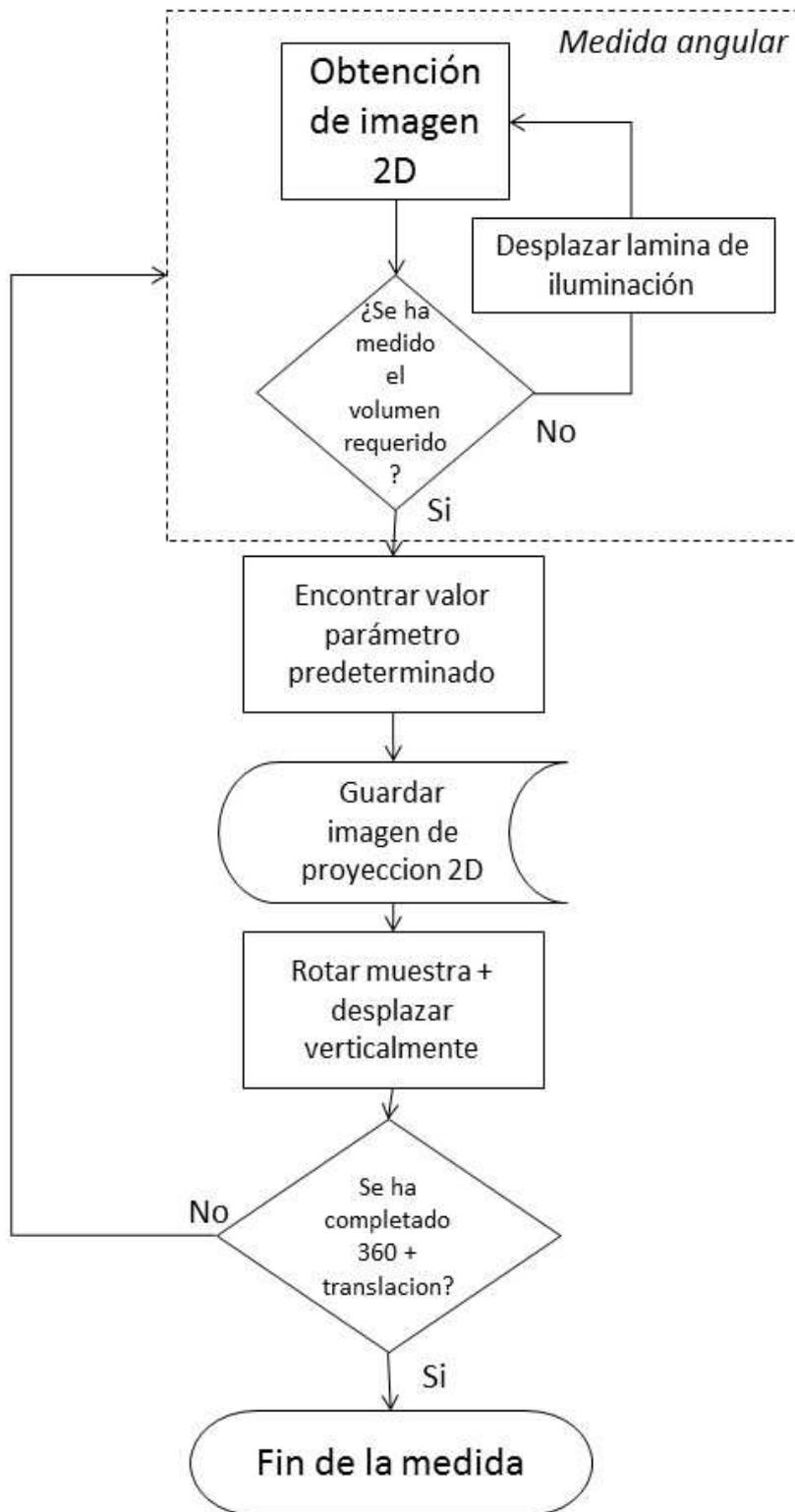


**FIG. 5c**

Proyección de la Suma para cada ángulo

0 grados	0	1	7	1	0
90 grados	0	4	4	1	0
180 grados	0	1	7	1	0
270 grados	0	4	4	1	0

**FIG. 5d**



**FIG. 6**



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201431546  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 21.10.2014  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **G06T15/00** (2011.01)  
**G02B21/22** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2009091566 A1 (TURNERY STEPHEN G et al.) 09.04.2009	1
A	US 6160908 A (HAKOZAKI HIROYUKI) 12.12.2000	1
A	US 2009213214 A1 (YAMADA TATSUKI) 27.08.2009	1
A	WO 2013176549 A1 (STICHTING VU VUMC) 28.11.2013	1
A	US 2013200255 A1 (SCHWARZBAND ISHAI et al.) 08.08.2013	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
21.04.2015

Examinador  
M. C. González Vasserot

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G06T, G02B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.04.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2009091566 A1 (TURNEY STEPHEN G et al.)	09.04.2009
D02	US 6'160908 A (HAKOZAKI HIROYUKI)	12.12.2000
D03	US 2009213214 A1 (YAMADA TATSUKI)	27.08.2009
D04	WO 2013176549 A1 (STICHTING VU VUMC)	28.11.2013
D05	US 2013200255 A1 (SCHWARZBAND ISHAI et al.)	08.08.2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia. Así, la invención reivindicada se considera que cumple los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicación industrial.

1.- El objeto de la presente solicitud de patente se refiere a un microscopio y procedimiento para la generación de imágenes tridimensionales de una colección de muestras. Pertenece al campo de las técnicas de iluminación de haz plano utilizadas en los microscopios ópticos para la obtención de imágenes de varias muestras transparentes o semi-transparentes tales como embriones, tejidos y otras muestras biológicas, así como otros materiales.

Un primer objeto de la presente solicitud de invención es un nuevo procedimiento capaz de obtener imágenes 3D de muestras transparentes o semi-transparentes con una calidad mayor que la de los microscopios ópticos actuales.

Un segundo objeto de la presente invención es un microscopio especialmente diseñado para llevar a cabo el procedimiento anterior.

2.- El problema planteado por el solicitante es un microscopio y procedimiento para obtener imágenes 3D de varias muestras transparentes o semi-transparentes que comprende fundamentalmente: provocar, manteniendo un ángulo de adquisición constante, un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra; obtener, para dicho ángulo de adquisición, una única imagen de proyección en 2D formada por un parámetro representativo para cada píxel; modificar el ángulo de adquisición mediante un giro relativo entre la lámina de iluminación y la muestra combinado con una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra, y repetir los pasos anteriores; y generar, a partir del conjunto de imágenes de proyección en 2D obtenidas, una imagen 3D de cada una de las muestras.

El documento D1 puede considerarse como el representante del estado de la técnica más cercano ya que en este documento confluyen la mayoría de las características técnicas reivindicadas.

Análisis de las reivindicaciones independientes

Reivindicación 1

El estado de la técnica más cercano al objeto de la invención está representado por el documento

D01, que divulga:

Un procedimiento para la generación de imágenes 3D de una colección de muestras mediante un microscopio, en el que el microscopio comprende un medio de adquisición de imágenes dirigido hacia la colección de muestras según una dirección de detección, y un medio de iluminación configurado para emitir una lámina de iluminación plana hacia la colección de muestras según una dirección perpendicular a la dirección de detección, donde la colección de muestras comprende varias muestras ubicadas una encima de la otra

No divulga y se diferencia en que:

No comprende el método los siguientes pasos:

- provocar, manteniendo un ángulo de adquisición constante, un desplazamiento relativo según la dirección de detección entre la lámina de iluminación y la muestra;
- obtener, para dicho ángulo de adquisición, una única imagen de proyección en 2D formada por un parámetro representativo para cada píxel;
- modificar el ángulo de adquisición mediante un giro relativo entre la lámina de iluminación y la muestra combinado con una traslación vertical relativa entre la lámina de iluminación y la muestra, y repetir los pasos anteriores; y
- generar, a partir del conjunto de imágenes de proyección en 2D obtenidas, una imagen 3D de cada una de las muestras.

La reivindicación 1 es nueva (Art. 6.1 LP 11/1986) y tiene actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986).

Análisis del resto de los documentos

De este modo, ni el documento D1, ni ninguno del resto de los documentos citados en el Informe del Estado de la Técnica, tomados solos o en combinación, revelan la invención en estudio tal y como es definida en las reivindicaciones independientes, de modo que los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia a una combinación que pudiera hacer evidente la invención definida por estas reivindicaciones y no se considera obvio para una persona experta en la materia aplicar las características incluidas en los documentos citados y llegar a la invención como se revela en la misma.