

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 185**

51 Int. Cl.:

**G06T 15/00** (2011.01)

**G03H 1/00** (2006.01)

**G03H 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2017 PCT/US2017/019512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017 WO17147528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2017 E 17757380 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022 EP 3420535**

54 Título: **Obtención de imágenes volumétricas optimizadas con iluminación de volumen selectivo y detección de campo de luz**

30 Prioridad:

**26.02.2016 US 201662300469 P**

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

**16.01.2023**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA**

**(100.0%)**

**USC Stevens Institute For Innovation, 1150 South**

**Olive Street Suite 2300**

**Los Angeles, CA 90015, US**

72 Inventor/es:

**TRUONG, THAI V.;**

**MADAAN, SARA;**

**HOLLAND, DANIEL B. y**

**FRASER, SCOTT E.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 932 185 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Obtención de imágenes volumétricas optimizadas con iluminación de volumen selectivo y detección de campo de luz

**Antecedente**

5 La presente memoria descriptiva se refiere a la optimización de obtención de imágenes volumétricas utilizando la detección de campo de luz con sistemas de obtención de imágenes de biomoléculas, tales como las plataformas de microscopía.

10 Diversos procedimientos biológicos pueden depender de la estrecha coordinación espacio-temporal entre las células a través del espacio tridimensional (3D) a escala del tejido. Por lo tanto, existe la necesidad de herramientas de obtención de imágenes volumétricas que puedan obtener imágenes con resolución celular, proporcionar cortes en 3D, y a velocidades lo suficientemente rápidas como para capturar de manera exacta los procedimientos dinámicos. En algunos casos, la necesidad de obtener imágenes volumétricas biológicas se satisface con enfoques de escaneo: la señal óptica se recoge un punto, una línea, o un plano a la vez, y luego la región de excitación se escanea en 3D, 2D, o 1D, respectivamente, para cubrir toda la región 3D de interés de la muestra. Debido a la naturaleza secuencial del procedimiento de escaneo, la velocidad de adquisición de datos puede ser lenta. Además, debido al escaneo

15 secuencial, la información de las diferentes partes de la muestra en 3D se recoge en diferentes momentos, por lo tanto, la información dinámica podría perderse o distorsionarse. Por lo tanto, existe la necesidad de una modalidad de obtención de imágenes volumétricas sincrónica en vivo, en la que una sola instantánea pueda capturar información espacial sobre un volumen axialmente extendido a escala del tejido, a la vez que mantiene una resolución de una o pocas células.

20 Una modalidad de obtención de imágenes existente que puede proporcionar capacidad de obtención de imágenes volumétricas sincrónica es la microscopía de campo de luz (LFM). Sin embargo, las técnicas de LFM utilizan una iluminación de campo amplio, que esencialmente ilumina la totalidad de la muestra, aunque una sola parte de la muestra sea capturada de manera significativa en la reconstrucción. Por lo tanto, la iluminación de campo amplio introduce un fondo y un ruido extraños, lo que puede degradar de manera potencial el contraste y la precisión de las

25 imágenes reconstruidas finales.

Noy Cohen describe en el documento *Optical Express*, volumen 22, número 20, 3 de octubre de 2014 en la página 24817 la mejora del rendimiento del microscopio de campo de luz utilizando la codificación del frente de onda.

30 El documento US 2012/200829 A1 describe un dispositivo de obtención de imágenes el cual puede incluir al menos un sensor de obtención de imágenes de un solo píxel configurado para detectar datos de imagen para un solo píxel a lo largo de una línea de visión. El dispositivo de obtención de imágenes también puede incluir al menos un espejo reorientable, del cual cada espejo reorientable está exclusivamente acoplado de manera óptica a uno o más de dicho al menos un sensor de obtención de imágenes de un solo píxel para desviar la línea de visión de ese sensor de obtención de imágenes de un solo píxel. El dispositivo de obtención de imágenes puede incluir además un controlador para reorientar de manera sincrónica cada uno de dicho al menos un espejo reorientable para escanear la línea de

35 visión a través de al menos un sector de una escena. El dispositivo de obtención de imágenes también puede incluir un circuito de lectura para leer los datos de imagen adquiridos de cada uno de dicho al menos un sensor de obtención de imágenes de un solo píxel. El dispositivo de obtención de imágenes puede estar configurado para tomar muestras de al menos dos dimensiones independientes de un campo de luz de cuatro dimensiones. También se divulgan un dispositivo de obtención de imágenes plenópticas y un dispositivo proyector plenóptico.

40 El documento US 2015/381908 A1 describe un sistema de obtención de imágenes que comprende una cámara (3) de campo de luz para registrar un campo de luz hiperespectral (CLF). El sistema también comprende un proyector (4) de luz para proyectar un campo de luz en luz visible (PLF). La cámara y el proyector comparten un eje óptico común. El proyector proyecta un campo (PLF) de luz en base al campo (CLF) de luz hiperespectral capturado por la cámara de campo de luz.

**Sumario**

La presente memoria descriptiva se refiere a sistemas y técnicas para optimizar la obtención de imágenes volumétricas utilizando iluminación de volumen selectivo (SVI) con detección de campo de luz utilizada en sistemas de obtención de imágenes biomédicas, tales como plataformas de microscopía.

50 En general, uno o más aspectos del objeto de la materia descrita en la presente memoria descriptiva pueden ser incorporados en uno o más sistemas que incluyen: una fuente de luz configurada para emitir una luz de iluminación que se propaga a través de un trayecto de luz de iluminación para iluminar una muestra tridimensional (3D); y un sistema óptico dispuesto con respecto a la fuente de luz para recibir un campo de luz, el cual proviene de la muestra en 3D iluminada, en el que el campo de luz se propaga a través de un trayecto de luz de detección; en el que la fuente

de luz, el sistema óptico, o ambos, son configurables para seleccionar un volumen de una iluminación confinada en 3D de la muestra en 3D en base a la muestra en 3D que se va a iluminar y un procedimiento de detección de campo de luz (LFD) que se va a aplicar.

5 Las realizaciones particulares del objeto de la materia descrita en la presente memoria descriptiva pueden ser implementadas para realizar una o más de las siguientes ventajas. Los sistemas y técnicas descritos pueden realizar ventajas asociadas con la proporción de la SVI donde sólo se ilumina la parte relevante de la muestra en 3D, reduciendo así de manera significativa la señal de fondo y proporcionando un mayor contraste y precisión para la reconstrucción de la imagen de campo de luz. Las técnicas divulgadas implementan una SVI de volumen óptico escaneado que proporciona una precisión de hasta el nivel de micrómetros en la definición de la SVI. Una SVI de volumen óptico estático reduce la probabilidad de daño fotoinducido a la muestra biológica durante la obtención de imágenes.

15 Las técnicas y los sistemas divulgados implementan capacidades de obtención de imágenes de detección de campo de luz de iluminación de volumen selectivo (SVI-LFD) dentro de la estructura de una plataforma de microscopía convencional, utilizando la misma configuración, con la misma muestra en estudio, para registrar una imagen en 3D de alta resolución, ópticamente seccionada (utilizando el modo de microscopía convencional), además de la imagen volumétrica reconstruida por campo de luz. Los enfoques de la SVI pueden mejorar la velocidad y la precisión de la reconstrucción computacional que se utiliza en la obtención de imágenes de campo de luz. Las técnicas de la SVI utilizan volúmenes de excitación más pequeños, y más restringidos, lo que permite una reconstrucción computacional más rápida, menos ruidosa y más robusta. Se implementa una técnica de obtención de imágenes de detección de campo de luz (LFD) de múltiple vista la cual realiza una resolución mejorada de una imagen volumétrica final mediante la combinación de datos de imagen capturados a partir de la obtención de imágenes de la muestra desde múltiples direcciones.

25 Los detalles de una o más realizaciones del objeto de la materia descrito en la presente memoria descriptiva se establecen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, aspectos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos, y las reivindicaciones.

### Descripciones de los dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo de un sistema de obtención de imágenes volumétricas empleado para proporcionar una iluminación de volumen selectivo (SVI) utilizando la detección de campo de luz.

30 Las Figuras 2A-2C muestran ejemplos de geometrías ópticas generales para implementar las técnicas de la SVI descritas en la presente memoria, aplicables a diversos enfoques de volumen óptico estático y de volumen óptico escaneado.

La Figura 2D muestra un ejemplo de una geometría óptica para implementar las técnicas de la SVI descritas en la presente memoria, de acuerdo con un enfoque de volumen óptico escaneado.

35 La Figura 3A muestra un ejemplo de una fibra de múltiple núcleo para su uso con una implementación endoscópica de las técnicas de obtención de imágenes de la SVI-LFD.

Las Figuras 3B-3F muestran ejemplos de geometrías ópticas para su uso con implementaciones endoscópicas de técnicas de obtención de imágenes de la SVI-LFD.

Las Figuras 4A-4C muestran ejemplos de geometrías ópticas para su uso con una implementación de la SVI utilizando técnicas de obtención de imágenes LFD de múltiple vista.

40 Los números de referencia y las designaciones similares en los distintos dibujos indican elementos similares.

### Descripción detallada

La Figura 1 muestra un ejemplo de un sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas empleado para proporcionar una iluminación de volumen selectivo (SVI) utilizando la detección de campo de luz. Por ejemplo, el sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas proporciona capacidades de campo de luz como el apoyo a la reconstrucción 3D de una muestra microscópica 126. De acuerdo con las realizaciones, el sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas puede emplearse para proporcionar imágenes en 3D a resolución celular o mejor, y seccionamiento en 3D, a velocidades que pueden capturar procedimientos dinámicos (por ejemplo, volumétricas de baja resolución/alta velocidad). Como se ilustra en la Figura 1, el sistema integra diversos componentes de hardware, software, y firmware que operan en conjunto para lograr las técnicas de iluminación de volumen selectivo de las realizaciones, de modo que ilumine una iluminación confinada en 3D de la muestra 126, la cual es una porción particular de la muestra en 3D que se ha determinado que es sustancialmente relevante para la obtención de imágenes

volumétricas. Es decir, la iluminación confinada en 3D es un volumen seleccionado de la muestra 126 en 3D para ser particularmente excitado por una luz de iluminación para la obtención de imágenes.

El sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas que se muestra en las Figura 1 incluye: un aparato 105 de obtención de imágenes volumétricas; un mecanismo 115 de LFD; una red 135; y un ordenador 140. El aparato 105 de obtención de imágenes volumétricas incluye diversos componentes del sistema 100 dispuestos para emitir luz para iluminar un volumen de la muestra 126 en 3D que se va a obtener. En algunas realizaciones, el sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas se implementa para proporcionar imágenes de campo de luz de agentes de contraste mejorados. Por ejemplo, las propiedades fotoquímicas y físicas de los agentes de contraste en la muestra 126 pueden ser cambiadas por la exposición a una luz de iluminación, ofreciendo un contraste mejorado en un volumen selectivo en 3D de la muestra 126. Una vez que las propiedades de los agentes de contraste han sido modificadas en un volumen selectivo, se pueden lograr la obtención de imágenes de LFD de alto contraste de dicho volumen incluso con iluminación convencional de campo amplio. Los agentes de contraste pueden incluir: proteínas fluorescentes fotoactivadas o fotoconvertibles, o partículas sintéticas fotoactivadas o fotoconvertibles, tales como, pero no limitado a, nanopartículas o puntos cuánticos.

Como se ilustra, el aparato 105 de obtención de imágenes volumétricas incluye: una fuente 106 de luz; un sistema 110 óptico; y un conjunto 125 de microscopio. El sistema 110 óptico incluye uno o más elementos ópticos dispuestos para ajustar la geometría óptica del aparato 105 para proporcionar trayectos ópticos a la muestra 126 en 3D y al mecanismo 115 de detección. Como ejemplo, el sistema 110 óptico se muestra incluyendo diversos elementos ópticos, tales como una o más lentes 112, y espejos 114. Sin embargo, diversos componentes del sistema 110 óptico pueden cambiarse, o configurarse de otro modo, según se considere necesario y/o apropiado para implementar una geometría óptica que corresponda a la(s) técnica(s) de obtención de imágenes SVI-LFD deseada(s). En algunas realizaciones, el sistema 110 óptico es un módulo complementario que puede adaptarse al conjunto 125 de microscopio, por ejemplo, que incluye componentes ópticos conmutables y geometrías ópticas. Además, en algunas implementaciones, el conjunto 125 de microscopio puede ser diseñado y fabricado originalmente con las capacidades de SVI-LFD integradas en él, e incluyendo todos los componentes necesarios, tales como el sistema 110 óptico. Se pueden combinar lentes adicionales y/u otros elementos ópticos para formar una lente objetivo, por ejemplo, del sistema 100. Estos elementos pueden instalarse, por ejemplo, montándose en una sección del conjunto 125 de microscopio. Además, se puede añadir un brazo de luz de SVI al conjunto 125 de microscopio. Por ejemplo, el brazo de luz de SVI puede acoplarse a un microscopio confocal de escaneo puntual a través de un divisor de haz parcialmente reflectante o un espejo dicroico (para luces de iluminación o detección que sean de diferentes colores).

El sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas puede incluir un aparato 105 de obtención de imágenes volumétricas que es capaz de ser configurado para implementar las técnicas de obtención de imágenes SVI-LFD descritas, de modo que reduzca de manera significativa un fondo de señal en comparación con algunas tecnologías de obtención de imágenes volumétricas existentes que operan de una manera la cual ilumina la totalidad de la muestra. Por lo tanto, el sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas puede emplearse para restringir la iluminación de la fuente 106 de luz a un volumen seleccionado de una iluminación confinada en 3D de la muestra 126, que puede ser cualquier volumen que sea menor que la totalidad de la muestra 126 en 3D. Por lo tanto, el sistema 100 realiza una solución que proporciona un mayor contraste y precisión de la reconstrucción de la imagen de campo de luz mediante el mecanismo 115 de detección de campo de luz (LFD).

El conjunto 125 de microscopio puede ser una plataforma de microscopía configurada para implementar las capacidades de obtención de imágenes de microscopía existentes. Por ejemplo, el conjunto 125 de microscopio es un microscopio confocal de escaneo puntual capaz de realizar un seccionamiento óptico de alta resolución en 3D de acuerdo con algunas modalidades existentes de obtención de imágenes de microscopía. Los datos de imagen de alta resolución recogidos a través de la capacidad de obtención de imágenes de alta resolución del conjunto 125 de microscopio pueden utilizarse para mejorar la velocidad, la resolución, el contraste, o la precisión de la reconstrucción de imagen de los datos de imagen SVI-LFD. En algunos casos, el seccionamiento óptico se realiza con una resolución de submicrómetros a 2 micrómetros. En algunas implementaciones, el conjunto 125 de microscopio es un microscopio de hoja de luz. Las funciones de microscopía asociadas con el conjunto 125 de microscopio pueden utilizar haces de luz que tengan propiedades de propagación diferentes (por ejemplo, ancho, divergencia, área de sección transversal, forma del haz) que los haces de luz utilizados en las funciones de obtención de imágenes SVI-LFD. La generación de una luz de iluminación que pueda ser empleada adecuadamente por cada uno de los modos de obtención de imágenes, respectivamente, puede implementarse utilizando componentes ópticos tales como lentes cilíndricas, lentes esféricas, difusores de ingeniería, prismas, y similares.

Por lo tanto, el sistema 100 de obtención de imágenes volumétricas es utilizable para registrar imágenes en 3D de alta resolución, o imágenes estructurales, además de las imágenes en 3D reconstruidas con campo de luz que tienen menor resolución, o imágenes de campo de luz. En algunos casos, las imágenes estructurales obtenidas utilizando las capacidades de microscopía del sistema 100, se utilizan para aumentar la reconstrucción computacional de las

imágenes de campo de luz. De manera conceptual, dado que ambas imágenes son de la misma región de la muestra, potencialmente separadas por tiempos cortos entre la captura de imagen, la información relativa al volumen de interés de la muestra puede obtenerse a partir de ambos modos de obtención de imágenes. En consecuencia, el contenido de alta resolución y rico en información de las imágenes estructurales puede utilizarse para guiar la reconstrucción de las imágenes SVI-LFD. En algunos casos, el uso de imágenes estructurales junto con la reconstrucción de campo de luz puede proporcionar ventajas tales como acelerar el procesamiento de la reconstrucción (por ejemplo, proporcionar una solución convergente más rápidamente), y/o restringir la reconstrucción para obtener resultados más precisos.

De acuerdo con las técnicas de la SVI, la fuente 106 de luz puede implementarse como mecanismos de iluminación utilizables con las plataformas de microscopía existentes. También se pueden utilizar láseres de onda continua para el contraste lineal de la señal, y láseres de impulsos para el contraste no lineal de la señal como fuente 106 de luz. De manera adicional o alternativamente, las técnicas de la SVI pueden implementarse con luz no coherente o de baja coherencia, tal como los diodos emisores de luz (LEDs). En el caso de utilizar mecanismos no coherentes para la fuente 106 de luz, la SVI ilumina un volumen extendido. En algunas implementaciones, la fuente 106 de luz es un mecanismo de luz coherente. En este caso, las regiones espaciales específicas de interferencia de luz constructiva y destructiva que se logran mediante el uso de luz de iluminación coherente pueden implementar los aspectos de la SVI de la obtención de imágenes de campo de luz. Los ejemplos de mecanismos de luz coherente utilizados para implementar la fuente 106 de luz pueden incluir la holografía, la interferometría y similares. Además, se puede utilizar una fuente 106 de luz para producir una luz de iluminación que tenga las propiedades necesarias para cambiar las propiedades fotoquímicas y físicas del agente o agentes de contraste en la muestra, ofreciendo un contraste mejorado en un volumen selectivo en 3D de la muestra. En algunas implementaciones, se pueden utilizar una o más fuentes de luz adicionales junto con la fuente 106 de luz. Por ejemplo, se puede utilizar una fuente de luz adicional para proporcionar la obtención de imágenes de campo de luz de los agentes que mejoran el contraste.

El mecanismo 115 de detección de campo de luz puede ser utilizado para detectar y generar datos de imagen en base a las técnicas de detección de campo de luz. Además, en una implementación, el mecanismo 115 de detección de LFD puede incluir una cámara que incluya una óptica que forme una imagen en el plano de un conjunto de microlentes que pueda redirigir, por ejemplo, el campo de luz a un sensor. En algunas implementaciones, el mecanismo 115 de LFD puede generar imágenes de LFD como información digital que muestra la imagen resultante directamente en la pantalla 145 del ordenador. El mecanismo 115 de LFD puede emplear otras formas de detección de campo de luz y de imágenes según como sea necesario o apropiado. Al incorporar las capacidades de obtención de imágenes SVI-LFD en el conjunto 125 de microscopio, se pueden diseñar componentes adicionales de obtención de imágenes en base al LFD como módulos complementarios a una plataforma de microscopía como mecanismo 115 de LFD. Como ejemplo, se puede añadir un trayecto de detección de cámara a la geometría óptica del aparato, y se incluye una cámara capaz de capturar imágenes de LFD en el mecanismo 115 de LFD.

Además, las técnicas de la SVI divulgadas en la presente memoria pueden utilizarse junto con otras tecnologías de LFD, incluyendo, pero sin limitarse a: codificación de frente de onda con una máscara de fase; modulador de luz espacial, o dispositivos similares; detección multicolor mediante el uso de filtros dicróicos y de paso de banda; diversas formas de fabricar e implementar el conjunto de microlentes, incluyendo, pero no restringido al, uso de gotas de aceite eléctricamente sintonizables para las lentes, o conjuntos de microlentes no uniformes o con forma; y similares.

El ordenador 140 incluye un procesador 142 y una memoria 144, y el ordenador 140 puede estar conectado a una red 135 de ordenador, la cual puede ser una red privada, una red pública, una red privada virtual, etc. La red 135 de ordenador puede implementarse como una red cableada (por ejemplo, Ethernet) o una red inalámbrica. Los diversos dispositivos del sistema 100, incluyendo el aparato 105 de obtención de imágenes volumétricas y el ordenador 140, pueden estar conectados a través de la red 135. Algunos ejemplos de redes de ordenador incluyen, pero no se limitan a, una red de área local (LAN), una red de área amplia (WAN), y el Internet. Como se muestra en la Figura 1, la red 135 de ordenador es una red cableada, de modo que el aparato 105 de obtención de imágenes volumétricas puede comunicar, o transmitir de otro modo, datos a través de una interfaz a uno o más componentes de este utilizando conexiones físicas, tales como conectores de Bus Serie Universal (USB). De manera adicional o alternativamente, los dispositivos pueden utilizar una conexión física directa que no necesita utilizar la red 135. En algunas implementaciones, la red 135 de ordenador puede ser una red de área local inalámbrica (WLAN), tal como una red IEEE 802.n. Por lo tanto, el aparato 105 de obtención de imágenes volumétricas y el ordenador 140, por ejemplo, están acoplados de manera comunicativa, y son capaces de transmitir datos de manera inalámbrica a través de la red 135 de ordenador.

El procesador 142 puede ser uno o más procesadores de hardware, los cuales pueden incluir cada uno múltiples núcleos de procesador. La memoria 144 puede incluir tanto una memoria volátil como una memoria no volátil, tal como la Memoria de Acceso Aleatorio (RAM) y la memoria Flash. El ordenador 140 puede incluir diversos tipos de medios y dispositivos de almacenamiento de ordenador, los cuales pueden incluir la memoria 144, para almacenar instrucciones de programas que se ejecutan en el procesador 142.

Tales programas pueden incluir el Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD, el cual puede ejecutarse de manera local en el ordenador 140, remotamente en un ordenador de uno o más sistemas de ordenador remotos (por ejemplo, en el sistema de servidor de un tercer proveedor accesible por el ordenador 140 a través de la red 135), o en una combinación de uno o más de cada uno de los anteriores. El Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD puede presentar una interfaz de usuario (UI) empleada para visualizar, o de otro modo ofrecer, una imagen 130 volumétrica reconstruida de la muestra en un dispositivo 145 de visualización del ordenador 140. El dispositivo 145 de visualización puede ser operado utilizando uno o más dispositivos 148 de entrada del ordenador 140 (por ejemplo, teclado y ratón o pantalla táctil). Cabe señalar que, aunque se muestran como dispositivos separados en la Figura 1, el dispositivo 145 de visualización y/o los dispositivos 148 de entrada también pueden estar integrados entre sí y/o con el ordenador 140, tal como en un ordenador de tipo tableta.

El Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD está configurado para analizar, procesar, y manipular los datos de la obtención de imágenes volumétricas asociados con la muestra, que se generan mediante las técnicas de la SVI de las realizaciones. El Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD puede implementar diversos aspectos de la SVI utilizados para seleccionar y realizar el análisis de volumen restringido en 3D de la muestra en 3D. Como ejemplo, para un volumen de interés dado, el Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD está configurado para determinar múltiples regiones de interés, y realizar el comando y/o control de los diversos componentes necesarios para realizar la excitación y la obtención de imágenes de las regiones de manera secuencial de acuerdo con las técnicas. Como otro ejemplo, el Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD puede implementarse para calcular, seleccionar, o controlar automáticamente otras facetas de la SVI, tales como el enfoque apropiado de la SVI (por ejemplo, volumen óptico estático de la SVI), el ajuste de la geometría óptica, la selección del modo de excitación, etc. Además, el Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD implementa diversos aspectos de las capacidades de obtención de imágenes de LFD del sistema 100. En algunas implementaciones, el Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD está configurado para generar datos de la obtención de imágenes volumétricas de la muestra en 3D realizando una reconstrucción computacional de las imágenes de LFD. En algunas implementaciones, el Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD está programado para controlar la iluminación de un volumen de interés, y efectuar el movimiento de cualquier componente electromecánico necesario para ajustar adecuadamente la óptica para realizar las operaciones de SVI-LFD (por ejemplo, el escaneo). Por ejemplo, el Software 146 de obtención de imágenes de SVI-LFD puede provocar la iluminación de la muestra en 3D de una manera estructurada o con patrones. La combinación de la iluminación con patrón y/o estructurada puede dar lugar a un campo de luz detectado que cubra el espacio 3D deseado de la muestra, y permitir una reconstrucción computacional optimizada de los datos de la imagen final capturados a partir de los campos de luz detectados.

Las Figuras 2A-2C muestran ejemplos de geometrías ópticas para implementar las técnicas de la SVI descritas en la presente memoria, de acuerdo con diversos enfoques de volumen óptico estático. En algunos casos, los enfoques de volumen óptico estático para implementar la SVI proporcionan potencialmente ventajas adicionales en comparación con otros enfoques descritos (se muestran en las Figuras 3A-3E y las Figuras 4A-4C). Por ejemplo, en los escenarios que implican la obtención de imágenes de muestras biológicas con volúmenes más grandes, las compensaciones de rendimiento en cuanto a la precisión (por ejemplo, la definición de los límites del volumen) pueden hacerse a favor o la facilidad de implementación en comparación con otros enfoques de SVI (por ejemplo, menos elementos ópticos que en los enfoques de endoscopia y de múltiple vista), y la disminución del daño potencial fotoinducido a la muestra.

Es común entre las geometrías ópticas para los enfoques de volumen óptico estático de la Figura 2A-2C que la luz de iluminación pueda formarse utilizando un haz de luz directo. En la presente implementación, se utiliza un haz de luz directo para dar forma a la luz de iluminación, y producir un volumen de luz espacialmente extendido que llene el volumen de interés deseado, es decir, la iluminación confinada en 3D de la muestra 205 en 3D. La Figura 2A muestra la muestra 205 como un espécimen biológico para ser visualizado volumétricamente de acuerdo con las técnicas de SVI-LFD. En algunas implementaciones, se pueden utilizar haces ópticos invariantes de la propagación, tales como los haces de Bessel o de Airy. Estos tipos de haces se pueden utilizar para obtener la ventaja potencial de una mayor extensión axial para una cintura del haz dada, lo cual mejora la precisión en la iluminación del volumen de excitación y da lugar a una iluminación confinada en 3D más precisa.

La Figura 2A muestra un enfoque de volumen óptico estático el cual emplea elementos ópticos dedicados para la luz 215 de iluminación para la excitación de la muestra 205, y el campo 225 de luz el cual proviene de la muestra 205, respectivamente, con el fin de lograr los aspectos de SVI de la obtención de imágenes volumétricas. Como se ilustra, la luz 215 de iluminación se emite en la muestra 205 a través de una lente 220 que es diferente de la lente 230 utilizada para propagar el campo 225 de luz. En algunas implementaciones, la lente 220 utilizada para la iluminación es una lente de objetivo de microscopio. En algunas implementaciones, la lente 230 utilizada para la detección es una lente objetivo de detección. Por lo tanto, la muestra 205 puede ser iluminada a través de un trayecto de luz de iluminación, en el cual se propaga la luz de iluminación, que está separada del trayecto 215 de luz de detección de luz, en el cual se propaga el campo de luz que emana de la muestra 205. Además, se ilustra que el trayecto de luz de detección de luz para el campo 225 de luz no es colineal al trayecto de luz de iluminación para la luz 215 de iluminación. Es decir,

los trayectos de luz que se recorren para la iluminación y la detección no siguen la misma línea. La Figura 2A muestra un eje óptico de iluminación que está en un ángulo  $\theta$  theta a partir de un eje óptico de detección. De acuerdo con las técnicas descritas, esta naturaleza no colineal del trayecto de luz de iluminación, para la luz 215 de iluminación, y el trayecto de luz de detección de luz, para el campo 225 de luz, permiten una iluminación confinada en 3D de la muestra 205 en 3D, y por lo tanto lograr la SVI. En algunos casos, la geometría óptica se ajusta de tal manera que el ángulo ( $\theta$ ) theta sea de  $90^\circ$  con el fin de lograr la SVI. En algunas realizaciones, es suficiente realizar la SVI ajustando la geometría óptica correspondiente de modo que disponga el trayecto de luz de detección de luz y el trayecto de luz de detección de luz en uno cualquiera de un intervalo de ángulos para  $\theta$  que es mayor que cero. Al emplear un eje de iluminación, con respecto al plano focal de la lente 220 que no es colineal al eje de detección, con respecto al plano focal de la lente 230, la iluminación de la muestra 205 se restringe a un volumen 3D de interés, minimizando así el fondo de la señal que puede ser perjudicial para el contraste final y la precisión de la reconstrucción computacional de las técnicas de obtención de imágenes de campo de luz.

La Figura 2B ilustra otra implementación para el enfoque de volumen óptico estático, en el cual la geometría óptica está dispuesta para emitir la luz 235 de iluminación a través de la misma lente que también se utiliza para la detección, es decir, la lente 220. En algunas implementaciones, la lente 220 es una lente objetivo de microscopio. El campo 240 de luz el cual proviene de la muestra 205 se propaga a través de la lente 220. Por lo tanto, como se ilustra, el trayecto de luz de iluminación y el trayecto de detección de campo de luz cruzan a través de la lente 220 única. Para lograr la SVI de acuerdo con la geometría óptica que se muestra en la Figura 2B, la luz de iluminación se envía a través de la lente 220 descentrada. En algunas implementaciones, la luz 235 de iluminación se entrega, a partir de la fuente de luz, por ejemplo, en un ángulo oblicuo al plano de imagen de la muestra 205. El trayecto de la luz de detección es colineal con el eje óptico del elemento 220 óptico común, formando un ángulo ( $\theta$ ) theta que es mayor que cero con el trayecto de luz de iluminación. La naturaleza ángulo oblicuo del trayecto de detección permite llevar a cabo múltiples trayectos de detección de manera simultánea, o secuencialmente, a través del mismo objetivo de microscopio, sin necesidad de rotar físicamente la muestra. En consecuencia, aunque se comparta una lente 220 común para la luz 235 de iluminación y el campo 240 de luz, los trayectos de iluminación y detección permanecen no colineales de manera similar a la que se muestra en la Figura 2A. Por lo tanto, empleando la estrategia de iluminación en ángulo oblicuo como parte de la geometría óptica se obtiene la SVI.

En algunas implementaciones, el ajuste de la geometría óptica correspondiente de modo que disponga el trayecto de luz de iluminación en uno cualquiera de un intervalo de ángulos que es a la vez mayor que cero, y no  $90^\circ$ , es suficiente para crear un trayecto de luz de iluminación oblicuo y optimizar la excitación al volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra 205. En algunos casos, el enfoque de iluminación de ángulo oblicuo de la Figura 2B puede utilizarse para implementar aspectos de la SVI para la obtención de imágenes realizadas por un conjunto de microscopio (se muestra en la Figura 1) además de algunas capacidades de microscopía existentes del microscopio, tales como el escaneo láser confocal de punto de trama. En algunos casos, esta implementación utiliza el modo de excitación de un fotón y geometrías ópticas conmutables para soportar, por ejemplo, el funcionamiento en el modo de obtención de imágenes de SVI-LDF o en el modo de microscopía confocal. Las implementaciones que implican el uso de imágenes basadas en SVI-LFD con imágenes adicionales, capturadas utilizando otro modo de microscopía, se discuten en detalle en referencia a la Figura 1.

Los enfoques de volumen óptico estático de las Figuras 2A-2B pueden emplear diversos modos de excitación lineal para captar el contraste de la señal óptica. Los modos de excitación lineal pueden incluir, pero no están limitados a: fluorescencia de excitación de un fotón; dispersión de luz elástica; y dispersión de luz inelástica (por ejemplo, dispersión Raman o Brillouin). En algunas implementaciones, donde el contraste de la señal es a través de la dispersión elástica de la luz de iluminación, las técnicas tales como la dispersión Raleigh o Mie, o combinaciones de estas, proporcionan un procedimiento libre de etiquetas para observar las estructuras y procedimientos biológicos. En los casos en los que el contraste de la señal de la SVI es través de la dispersión inelástica de la luz de iluminación, el contraste de la señal está libre de etiquetas y proporciona información espectroscópica sobre la muestra. Al emplear una excitación lineal, se puede generar una intensidad de señal que es proporcional a la primera potencia de la intensidad de la luz de iluminación, proporcionando así la restricción espacial necesaria para obtener la SVI.

La Figura 2C representa otro ejemplo de una geometría óptica utilizada para implementar el enfoque de volumen óptico estático para las técnicas de la SVI, utilizando un elemento óptico compartido para la iluminación y la detección, similar a la geometría óptica que se muestra en la Figura 2B. Sin embargo, como se ilustra en la Figura 2C que la luz 250 de iluminación y el campo 255 de luz que emana de la muestra 205 se propagan de manera colineal entre sí. Es decir, el trayecto de luz y el trayecto de detección de campo de luz están alineados a lo largo del mismo eje, en lugar de estar dispuestas de manera no colineal como en los enfoques óptico estáticos discutidos anteriormente (se muestran en las Figuras, 2A-2B). En la configuración geométrica óptica colineal, para evitar la función similar de algunos enfoques de microscopía existentes (por ejemplo, la iluminación de campo amplio) y sus inconvenientes, se utiliza la excitación no lineal de múltiples fotones.

Con el fin de lograr las técnicas de la SVI descritas, la geometría óptica de la Figura 2C también permite el uso de modos no lineales de excitación óptica para generar contraste de la señal. Por ejemplo, la excitación de múltiples fotones incluye la interacción de la muestra 205 con dos o más fotones casi simultáneamente para producir el contraste de la señal óptica. Estos contrastes de señal pueden incluir la fluorescencia excitada por dos fotones, la generación de segundo armónico, la fluorescencia excitada por tres fotones, y los procedimientos de orden superior. En estos modos de múltiples fotones, la intensidad de la señal es proporcional a la segunda (o tercera) potencia de la intensidad de excitación, para los procedimientos que implican dos (o tres) fotones de excitación, lo que conduce a un confinamiento natural del volumen de excitación en el espacio 3D, en los casos en que se utiliza un haz enfocado para iluminar la muestra (se muestra en la Figura 2D). Este confinamiento de la excitación no lineal puede ser aprovechado como un principio de trabajo clave de la implementación de los enfoques de la SVI, además de algunas capacidades existentes de los microscopios de escaneo láser de punto de trama de múltiples fotones.

Además, los enfoques de volumen óptico estático correspondientes a las geometrías ópticas que se muestran en las Figuras 2A y 2B también funcionan con excitación no lineal. Con la geometría óptica ilustrada en la Figura 2C, incluso con la luz 250 de iluminación y el campo 255 de luz dispuestos de manera colineal, el uso de la excitación óptica no lineal de múltiples fotones proporcionara una SVI eficiente debido al confinamiento no lineal de la excitación. En algunas implementaciones, la luz 250 de iluminación y el campo 255 de luz se reciben a través de la misma lente 260 objetivo de microscopio. Además, en algunos casos, el modo de señal se implementa como fluorescencia de excitación de múltiples fotones (por ejemplo, fluorescencia de dos fotones, generación de segundo armónico, fluorescencia excitada de tres fotones). Debido al confinamiento no lineal de la señal, cada uno de los enfoques de volumen óptico estático para la SVI descritos en la presente memoria debería proporcionar una SVI eficiente. El primer ejemplo que se muestra en la Figura 2C, en algunos casos, puede utilizarse para implementar la combinación de las técnicas de SVI-LFD con algunas técnicas de microscopía convencionales, tales como la microscopía de fluorescencia de múltiples fotones.

La Figura 2D muestra un ejemplo de una geometría óptica para implementar las técnicas de la SVI descritas en la presente memoria, de acuerdo con un enfoque de volumen óptico escaneado. De acuerdo con esta técnica, la SVI se logra porque la luz 265 de iluminación es un haz de luz enfocado que se utiliza para escanear selectivamente, o "pintar", el volumen de interés de la muestra 270, en lugar de iluminar toda la muestra. Dependiendo del tamaño y la forma de la región focal, el volumen de excitación se "pinta" (es decir, se rellena) mediante el escaneo en una, dos, o tres dimensiones. Es importante destacar que todas las diferentes manifestaciones del enfoque de volumen óptico estático descrito anteriormente son susceptibles al enfoque de volumen óptico escaneado. Además, en el enfoque de escaneo, la óptica de detección para capturar la imagen de campo de luz, tal como una cámara de detección, se expone durante el tiempo necesario para escanear todo el volumen confinado en 3D. Por lo tanto, un tiempo de exposición es suficiente para escanear la totalidad del volumen de interés de la muestra, evitando la necesidad de un escaneo fragmentario de segmentos del volumen de interés utilizando múltiples tiempos de exposición (por ejemplo, un tiempo de exposición para cada segmento que se va a escanear). En los casos en los que se implementa el escaneo rápido, por ejemplo, el hardware de escaneo con altas velocidades de rotación, se pueden realizar múltiples rondas de escaneo del volumen especificado en un solo tiempo de exposición. La realización de la SVI de acuerdo con las técnicas de volumen óptico escaneado puede proporcionar múltiples ventajas, tales como una mayor precisión (por ejemplo, hasta el nivel de micrómetros) en la definición de la SVI. Por lo tanto, las implementaciones de escaneo de la SVI pueden ser deseables en escenarios en los que las compensaciones de diseño del uso de hardware más sofisticado, en comparación con los enfoques de volumen óptico estático (se muestran en las Figuras 2A-2C), son tolerables para obtener imágenes más precisas.

Como se ilustra, una hoja 275 de luz escaneada puede formarse mediante la conformación de la luz 265 de iluminación en una hoja de luz estática 2D, utilizando diversos elementos ópticos dispuestos para enfocar la luz, tales como lentes cilíndricas. A continuación, la hoja 275 de luz puede ser escaneada en una tercera dimensión, para optimizar la iluminación del volumen de iluminación confinado en 3D de la muestra. En algunos casos, el escaneo se implementa mediante el escaneo de la región focal utilizando dispositivos de rotación/traslación incluidos en la configuración óptica, tales como galvanómetros o escáneres resonantes, o dispositivos óptico acústicos, tales como los deflectores óptico acústicos.

En algunos casos, una geometría óptica para el enfoque de volumen óptico escaneado ajusta la luz 265 de iluminación (se muestra a lo largo del eje x) en un ángulo  $\theta$  theta que es mayor que cero con respecto a la dirección 280 de detección de campo de luz (se muestra a lo largo del eje z). Por lo tanto, la luz 265 de iluminación, la cual es un haz de luz enfocado, aparecerá como una línea nominal dentro del campo de visión definido por la óptica de detección. A continuación, para lograr la SVI de un volumen 3D, la luz de iluminación puede ser escaneada en dos dimensiones.

El enfoque de escaneo puede implementar la SVI con excitación no lineal utilizando múltiples configuraciones ópticas, incluso en casos con trayectos de iluminación y detección colineales (se muestran en la Figura 2C), debido al confinamiento de la generación de contraste de la señal sólo en la región enfocada. Para mejorar la cobertura y reducir

el daño biológico fotoinducido, a menudo asociado con altas intensidades de luz, se pueden utilizar haces de excitación enfocados de baja apertura numérica, como se muestra en la Figura 1C, para tener una extensión axial extendida en la región focal. A continuación, el escaneo en 2D del punto de enfoque proporcionará automáticamente un volumen de excitación en 3D, logrando la SVI. Cabe señalar que el área de sección transversal más grande de los haces enfocados de baja apertura numérica tendrá un efecto mínimo en la resolución final alcanzada de la SVI-LFD, ya que la resolución en este caso no depende del tamaño del haz de iluminación, sino de las propiedades ópticas generales del brazo de LFD (apertura numérica de detección, longitud focal y apertura de la lente del tubo, parámetros del conjunto de lentes, tamaño de los píxeles de la cámara, etc.).

La Figura 3A muestra un ejemplo de una fibra 305a de múltiple núcleo para su uso con una implementación endoscópica de las técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD. Por ejemplo, un endoscopio está integrado en el sistema de obtención de imágenes volumétricas (que se muestra en la Figura 1) para proporcionar capacidades de obtención de imágenes de vídeo a la vez que se aplican técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD. Las implementaciones que involucran la endoscopia pueden proporcionar las ventajas asociadas con la realización de obtención de imágenes de SVI-LFD a distancia, o en lugares que de otro modo serían inaccesibles para algunas técnicas de obtención de imágenes basadas en la microscopía. La Figura 3A ilustra una fibra 305a de múltiple núcleo para suministrar la luz de iluminación para la excitación de una muestra, o para transmitir la luz detectada a lo largo del trayecto de luz de detección, siempre que se vaya a transmitir una imagen, de acuerdo con las realizaciones endoscópicas. Además, se puede utilizar una fibra de un único núcleo para el trayecto de luz de iluminación o de detección, siempre que sea necesario transmitir luz que no sea de imágenes a lo largo de los trayectos de la luz. Por lo tanto, la obtención de imágenes de SVI-LFD puede lograrse con un endoscopio, que tenga una fibra 305a de múltiple núcleo y/o una fibra de un único núcleo, o cualquier combinación múltiple de las mismas, como mecanismos de entrega de luz, que se utiliza con el sistema de obtención de imágenes volumétricas (se muestra en la Figura 1), de acuerdo con cualquiera de las técnicas de la SVI y las geometrías y configuraciones ópticas descritas anteriormente. Típicamente, en una aplicación de obtención de imágenes endoscópicas, los diversos componentes y conjuntos ópticos que están cerca de la muestra son de pequeño tamaño, lo que permite la entrega de proximidad y la recogida de luz hacia y a partir de la muestra.

La Figura 3B muestra un ejemplo de geometría óptica para su uso con una implementación endoscópica de las técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD. Como se ilustra en la Figura 3B que un haz 306 de luz de iluminación es escaneado por el dispositivo 315 de escaneo y acoplado de manera óptica en diferentes núcleos de una fibra óptica de múltiple núcleo, la cual es una parte de un endoscopio, utilizando una lente 310 de acoplamiento. Este haz de luz es transportado por el endoscopio a un lugar remoto que, de otro modo, es inaccesible para algunas técnicas de obtención de imágenes basadas en la microscopía. Dado que el haz de luz es transportado por múltiples núcleos, el haz de luz que sale del endoscopio e ilumina la muestra escanea o pinta un volumen 3D selectivo de la muestra de acuerdo con cualquiera de las técnicas de la SVI descritas anteriormente. Algunos ejemplos de dispositivos de escaneo son los galvanómetros, los escáneres resonantes, los deflectores acústico-ópticos, los dispositivos digitales de microespejos, que ejecutan un escaneo en 1, 2, o 3 direcciones, o en cualquier combinación de direcciones múltiples.

La Figura 3C muestra un ejemplo de otra geometría óptica para su uso con una implementación endoscópica de las técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD. En la Figura 3C, se utiliza una fibra 305c de múltiple núcleo para la entrega de la luz de excitación a partir del endoscopio 307 a la muestra iluminada, y se emplea la óptica de espacio libre para los aspectos de detección de campo de luz de la geometría óptica. La luz se ilustra como propagada a través de una lente 320 objetivo de iluminación, y enfocada a un punto y escaneada en dos dimensiones, o a una línea y escaneada en una dimensión en la cara proximal del haz de fibras. En algunos casos, el extremo distal, es decir, el extremo alejado de la muestra, del endoscopio se acopla al conjunto del microscopio del sistema de obtención de imágenes volumétricas (se muestra en la Figura 1). En este caso, tanto la excitación como la detección pueden realizarse utilizando una única lente objetivo, utilizando una geometría óptica que es similar a la que se representa en la Figura 2B, en referencia al enfoque de volumen óptico estático para la SVI. La Figura 3C muestra el uso de dos lentes, en la configuración de geometría óptica, la lente 320 objetivo de iluminación para recibir la luz de iluminación, y la lente 330 objetivo de detección para recibir el campo 335 de luz para la detección. En algunas implementaciones, la geometría óptica que se muestra en la Figura 3C puede ajustarse para disponer las dos lentes 320, 330 de objetivo en un ángulo  $\theta$  theta que es menor que  $90^\circ$ . En otra implementación, la geometría óptica puede ajustarse para incluir un prisma en miniatura para girar la luz 321 de iluminación mediante un ángulo de  $90^\circ$  con el fin de disponer el trayecto de luz de iluminación y el trayecto de luz de detección de manera ortogonal entre sí, con el fin de lograr las técnicas de la SVI como se describe para optimizar la excitación del volumen de la muestra.

La Figura 3D muestra un ejemplo de otra geometría óptica para su uso con una implementación endoscópica de las técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD. En el ejemplo que se muestra, una fibra 305d de múltiple núcleo es una fibra de entrega para el endoscopio 340, y se utiliza para entregar la luz 345 de excitación a una muestra. La geometría óptica también se muestra utilizando una lente 350 objetivo de iluminación y una lente 355 de tubo para

crear una imagen, de acuerdo con las técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD divulgadas en la presente memoria. En algunos casos, la lente objetivo de iluminación se implementa como una lente objetivo en miniatura. A continuación, la imagen se transmite a una cara distal del endoscopio 340 utilizando otra fibra 305e de múltiple núcleo. De manera similar a la óptica de la Figura 3C, la luz 345 de excitación es un haz que está enfocado a un punto, y escaneado en dos dimensiones, o a una línea y escaneado en una dimensión en la cara distal del haz de fibras. La Figura 3D se refiere a la representación de dos fibras 305d, 305e de múltiple núcleo como si estuvieran en el mismo endoscopio 340. Se ilustra una lente 360 objetivo de detección que recibe el campo de luz que se propaga para la detección, ya que se refleja, y se dirige hacia la otra fibra 305e de múltiple núcleo del endoscopio 340 utilizado para la obtención de imágenes. De manera alternativa, una implementación puede incluir que cada una de las fibras 305d,305e de múltiple núcleo esté presente en un endoscopio diferente, y, por lo tanto, tener dos endoscopios separados en la geometría óptica. En este caso, tanto los aspectos de excitación como de detección de las técnicas de la SVI-FLD pueden utilizar una sola lente objetivo, como se ha discutido en referencia a la Figura 3C. De manera alternativa, una implementación puede incluir múltiples fibras de único núcleo utilizadas para los aspectos de excitación y detección de la SVI-LFD que están dispuestas en un único o múltiples endoscopios. En otra implementación, la geometría óptica puede ser ajustada para incluir un prisma en miniatura, de manera similar a lo discutido en referencia a la Figura 3C.

La Figura 3E muestra un ejemplo de otra geometría óptica para su uso con una implementación endoscópica de las técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD. En este ejemplo, la endoscopia se realiza utilizando una fibra 365 de único núcleo para entregar la luz de excitación a partir de un endoscopio 370, en lugar de una fibra de múltiple núcleo como se muestra en las geometrías ópticas de la Figura 3A y la Figura 3D. La luz 375 de excitación se entrega como un haz, propagándose a través de una lente 380, que se escanea además utilizando un dispositivo 385 de escaneo, el cual puede ser un dispositivo de espejo de Sistemas Micro-Electromecánicos (MEMS). La Figura 3E indica que el dispositivo 385 de escaneo está configurado para rotar en la dirección x-y. Además, en algunas geometrías ópticas, se pueden utilizar múltiples dispositivos de escaneo. A continuación, la luz se muestra como recibida por una lente 390 objetivo de iluminación, y posteriormente reflejada en la dirección para la detección a través de la lente 395 objetivo de detección y a lo largo de la dirección 396 de detección. En algunas implementaciones, se pueden emplear dos dispositivos de escaneo. En el extremo proximal del endoscopio puede situarse un conjunto de microlentes (no se muestra) que se utiliza para crear la imagen de campo de luz, la cual luego se transmite a la cara distal del endoscopio 370, por ejemplo, utilizando otra fibra de múltiple núcleo. Por lo tanto, como ejemplo, una geometría óptima para la SVI basada en el endoscopio puede utilizar una fibra de único núcleo, y una fibra de múltiple núcleo.

La Figura 3F muestra un ejemplo de una geometría óptica en la que se utilizan fibras 400 y 401 para transmitir la luz de iluminación y de detección, respectivamente, y la luz de iluminación y de detección se propagan a través de un sistema 402 óptico común, siguiendo las diversas implementaciones descritas anteriormente para el caso en que no se utilizan fibras en el aparato de obtención de imágenes. Las fibras 401 y 402 ópticas pueden ser de múltiple núcleo o de único núcleo, y juntas forman el endoscopio 403 el cual permite la obtención de imágenes de SVI-LFD de muestras que de otro modo no serían accesibles espacialmente.

Las Figuras 4A-4C muestran diversos ejemplos de geometrías ópticas para su uso con una implementación de SVI utilizando técnicas de obtención de imágenes de LFD de múltiple vista. Cada uno de los enfoques e implementaciones anteriores utilizados para lograr las técnicas de obtención de imágenes de SVI-LFD divulgadas en la presente memoria, se han descrito en general como la obtención de imágenes de la muestra utilizando una dirección para la detección, capturando así los datos de imágenes de LFD a partir de un solo punto de vista. Sin embargo, la obtención de imágenes de LFD de múltiple vista implica el empleo de varias geometrías ópticas que permiten capturar un campo de luz de detección a partir de múltiples direcciones y/o vistas, lo cual resulta de manera efectiva en la obtención de imágenes del volumen de la muestra a partir de más de una dirección. Como ejemplo, una geometría óptica capaz de soportar imágenes de LFD de múltiple vista puede incluir el uso de múltiples pares de lentes objetivo sustancialmente ortogonales para la iluminación y la detección para obtener imágenes del volumen 3D de la muestra, de una manera algo similar a la de la geometría óptica que se muestra en la Figura 2A (utilizando una sola lente para la iluminación y la detección). La SVI se logra en cada uno de estos casos de obtención de imágenes de múltiple vista. En consecuencia, las técnicas de obtención de imágenes de LFD de múltiple vista pueden ofrecer diversas ventajas asociadas con la obtención de imágenes de un volumen de interés en 3D utilizando perspectivas múltiples y variadas. Por ejemplo, la reconstrucción computacional de las imágenes de LFD que se generan a partir de más de una dirección de acuerdo con las técnicas de múltiple vista, puede combinarse posteriormente para obtener una imagen final con mayor resolución y/o mejor cobertura espacial.

En algunas implementaciones la obtención de imágenes con más de una vista de la muestra puede lograrse rotando secuencialmente la muestra a través de las múltiples vistas; o/y empleando más de un par de sistemas ópticos de iluminación-detección, orientados a mirar la muestra a través de diferentes vistas, y las diferentes vistas son fotografiadas de manera simultánea o secuencialmente, sin necesidad de rotar físicamente la muestra. Los conjuntos

de datos de imagen resultantes a partir de las múltiples vistas podrían combinarse y reconstruirse luego para obtener una imagen final con mayor resolución y/o mejor cobertura espacial.

La Figura 4A muestra una geometría óptica para su uso con una implementación de SVI utilizando técnicas de obtención de imágenes de LFD de múltiple vista. Como se ilustra en la Figura 4A que la óptica de múltiple vista implica el uso de una única lente 405 objetivo primaria, y más de un conjunto 410a, 410b de microlentes de detección. Colocando el par de conjunto 410a, 410b de microlentes de detección, cada uno con su eje óptico realizando un ángulo finito con el eje óptico del objetivo 405 primario de microscopio, el campo 415 de luz puede ser capturado a partir de múltiples vistas, obteniendo así imágenes del volumen de la muestra a partir de múltiples direcciones. Además, la luz 420 de iluminación se propaga a lo largo de más de un eje de iluminación. La luz 420 de iluminación se refleja entonces utilizando un espejo 425, para ser dirigida hacia la muestra, creando así más de un volumen 430a, 430b de obtención de imágenes asociado con una vista diferente. En consecuencia, el campo 415 de luz capturado a partir de los volúmenes 430a, 430b iluminados por cada conjunto 410a, 410b de microlentes se captura además utilizando cámaras con el fin de generar imágenes de LFD correspondientes a la vista respectiva. En algunas realizaciones, se pueden utilizar más de dos conjuntos de microlentes en la geometría óptica, de modo que cubra todo el intervalo angular del espacio de campo de luz. La obtención de imágenes de campo de luz de múltiple vista descrita en la presente memoria, con conjuntos de microlentes de detección múltiple y cámaras, logra un régimen de detección equivalente a la captura de campo de luz de la muestra con una mayor apertura numérica y una mayor área del sensor de la cámara (que lo que puede lograrse con un solo conjunto de microlentes y una sola cámara).

En algunos casos, el número de elementos ópticos de detección (correspondientes al número de vistas de imágenes) implementados utilizando la configuración óptica de la Figura 4A, es una característica sintonizable que puede ajustarse para lograr un resultado deseable. El aumento del número de elementos de detección utilizados en la disposición óptica puede suponer una compensación. Por ejemplo, más conjuntos de microlentes utilizados puede capturar más vistas angulares, pero puede disminuir potencialmente la apertura numérica (y la resolución) de cada conjunto, a la vez que la resolución final reconstruida puede depender tanto del número de vistas como de la resolución intrínseca lograda en cada vista. En algunos escenarios, la determinación del número de conjuntos de microlentes utilizados, por ejemplo, puede depender de las variables de la obtención de imágenes, tales como la resolución deseada y el campo de visión de la muestra en 3D determinado. La detección de campo de luz con un número sustancialmente grande de conjuntos de microlentes orientados en ángulos finitos con respecto al eje óptico principal permite la captura de altas aperturas numéricas a través del objetivo primario de microscopio (es decir, más información angular), pero sin la penalización de la reducción de la cobertura axial (eje z).

La geometría óptica representada en la Figura 4A empleada para la obtención de imágenes de LFD de múltiple vista, también puede ajustarse para proporcionar técnicas de SVI. Por ejemplo, la luz 420 de iluminación se ilustra como entregada en paralelo al eje óptico principal del objetivo 405 primario de microscopio, ajustado para cubrir, en el plano xy, la sección transversal xy deseada del volumen de interés. Además, la luz 420 de iluminación se dirige a lo largo del eje óptico central del objetivo de microscopio y el trayecto de detección está a lo largo de una dirección de ángulo oblicuo del objetivo 405 de microscopio. La naturaleza en ángulo oblicuo del trayecto de detección permite que se lleven a cabo múltiples trayectos de detección de manera simultánea, o secuencialmente, a través del mismo objetivo 420 de microscopio, sin necesidad de rotar físicamente la muestra. Además, dado que los volúmenes de detección están en ángulo con respecto al eje óptico principal, se logra la SVI. En algunos casos, la óptica puede ajustarse adecuadamente permitiendo que los volúmenes de detección (detección) sean ortogonales al eje óptico principal (iluminación). En algunas implementaciones, el volumen 3D de la muestra se selecciona para las técnicas de la SVI utilizando una excitación óptica lineal. En algunas implementaciones, las técnicas de la SVI se logran utilizando excitación óptica no lineal de múltiples fotones. La Figura 4A representa dos vistas de detección en ángulo oblicuo, pero se pueden llevar a cabo más vistas para cubrir más del intervalo angular de campo de luz el cual proviene de la muestra. Por ejemplo, en el lado de la imagen del objetivo 405 de microscopio, se pueden utilizar divisores de haz de diversos tipos (por ejemplo, dicróicos o parcialmente reflectantes) para separar los trayectos de iluminación y detección en diferentes direcciones. Las múltiples vistas de detección se registran de varias maneras, por ejemplo, con múltiples conjuntos 410a, 410b de microlentes y sistemas ópticos de cámara orientados en los ángulos apropiados, como se representa en la Figura 4A. En algunos casos, se pueden utilizar múltiples trayectos de dirección de iluminación en ángulo oblicuo para proporcionar la SVI para los múltiples trayectos de detección en ángulo oblicuo.

En la Figura 4B se muestra otro ejemplo de una geometría óptica para su uso con una implementación de SVI que utiliza técnicas de obtención de imágenes de LFD de múltiple vista, donde se produce una superposición de la región entre múltiples vistas de imágenes. La región 435 sombreada representa una superposición entre los volúmenes detectados con las correspondientes vistas de imágenes, es decir, el volumen 440a de una primera vista de imágenes y el volumen 440b de una segunda vista de imágenes. En consecuencia, se obtiene un beneficio de obtención de imágenes de LFD de múltiple vista, ya que la reconstrucción computacional de las dos vistas representadas (que tienen un volumen de imágenes compartido que produce más datos de imágenes asociados con ese volumen en particular) puede proporcionar una imagen en 3D final del volumen 435 superpuesto con mayor resolución.

También, la iluminación que se muestra en la Figura 4B incluye múltiples iluminaciones 445a, 445b laterales situadas a ambos lados (es decir, a la izquierda, a la derecha) de, y formando un ángulo con respecto al eje de, una iluminación 445c central. Además, las iluminaciones 445a, 445b laterales son iluminaciones en ángulo oblicuo con respecto al eje óptico del objetivo de microscopio. La iluminación 445c central es una iluminación que se dirige a lo largo del eje central del objetivo de microscopio. La geometría óptica de la Figura 4B está configurada de tal manera que una iluminación 445b lateral derecha permite la SVI para la detección de la vista asociada con el volumen 440b, a la vez que una iluminación 445a lateral izquierda permite la SVI para el volumen 440a de la otra vista. Por lo tanto, la adquisición de la imagen de LFD puede implicar secuencialmente la obtención de imágenes de una vista asociada con la iluminación 445b lateral derecha y, a continuación, la obtención de imágenes de otra vista asociada con la iluminación 445a lateral izquierda. En consecuencia, cada vista de las imágenes de LFD de múltiple vista realizada puede tener una SVI de alto contraste óptimo. En algunas implementaciones, las técnicas de obtención de imágenes de vista múltiple pueden disminuir la tasa de obtención de imágenes asociada con el procedimiento en una tasa relacionada con el número de vistas. Por ejemplo, el ejemplo que se muestra en la Figura 4B que utiliza dos vistas de imágenes puede disminuir la tasa de obtención de imágenes por un factor de dos. Esto puede ser beneficioso en situaciones en las que la obtención de imágenes a alta velocidad no es tan deseable como la obtención de imágenes de alta resolución.

La Figura 4C muestra un ejemplo de otra geometría óptica para las técnicas de obtención de imágenes de LFD de múltiple vista, en la que los trayectos ópticos asociados con cada una de las múltiples vistas de obtención de imágenes están separados por la óptica. En la Figura 2C, se incluye en la geometría óptica un elemento óptico, que se muestra como un prisma 450 reflectante (espejado), para manipular la luz de una manera en la cual se separen los trayectos ópticos para las diferentes vistas de imágenes. El prisma 450 reflectante se ilustra como colocado en el lado de la imagen de la lente 455 de objetivo primario de microscopio. La luz 460a, 460b de iluminación se emite hacia el prisma 450 reflectante. En este caso, la iluminación se dirige a dos lados opuestos del prisma 450 reflectante, representativo de un punto de vista de imágenes correspondiente en base a cada lado de iluminación. La luz 460a (lado izquierdo) y 460b (lado derecho) de iluminación es entonces reflejada, o redirigida de otro modo, por la superficie del prisma 450 (en ángulo recto), en ambos lados, teniendo dos trayectos de iluminación separados. Cada trayecto de iluminación distinto propaga la luz 460a, 460b de iluminación a través de la lente 455 de objetivo primario para crear múltiples volúmenes iluminados de la muestra, correspondientes a una vista 465a, 465b de imágenes respectiva.

Adicionalmente, se muestra que los campos 462a, 462b de luz tienen trayectos ópticos separados, debido al prisma 450 reflectante. Por lo tanto, la geometría óptica permite detectar, utilizando conjuntos de microlentes, por ejemplo, el campo 462a de luz de una vista de imágenes y el campo 462b de luz de otra vista de imágenes en lugares separados. En algunos casos, esta disposición óptica proporciona más espacio, por ejemplo, para implementar una cámara de detección de campo de luz capturado por cada conjunto de microlentes. En algunas implementaciones, la óptica utilizada para disponer los trayectos ópticos separados es otro elemento óptico con propiedades reflectantes, tal como un espejo dicróico que transmite la luz de iluminación y refleja la luz detectada. En este caso, la luz de iluminación puede ser entregada a lo largo del eje óptico del objetivo 455 primario de microscopio. Aunque la Figura 4C muestra un ejemplo de una geometría óptica que utiliza dos superficies reflectantes para redirigir las diferentes vistas de imágenes, se pueden utilizar más de dos superficies (más de dos trayectos de iluminación y detección) en algunas implementaciones con el fin de cubrir todo el intervalo angular de campo de luz de regreso en la lente 455 objetivo de microscopio.

También se pueden utilizar otros tipos de mecanismos de iluminación en cada uno de los diversos enfoques e implementaciones descritos anteriormente en la presente memoria, para lograr adecuadamente los aspectos de SVI de las realizaciones. En diversas implementaciones, la iluminación de volumen selectivo se logra manipulando una naturaleza coherente de la luz de iluminación, que es característica de algunas tecnologías de emisión, tales como de luz como la holografía, la interferometría, y similares. En consecuencia, se pueden utilizar fuentes de luz coherentes para la iluminación de una muestra en cualquiera de las realizaciones de obtención de imágenes de SVI-LFD divulgadas, para lograr regiones espaciales específicas de interferencia de luz constructiva y destructiva, proporcionando así una iluminación selectiva en el volumen de interés deseado. En algunas implementaciones, las técnicas de luz coherente pueden generar un contraste de imagen utilizando una excitación óptica lineal, o una excitación óptica no lineal de múltiples fotones.

Las realizaciones del objeto de la materia y las operaciones funcionales descritas en la presente memoria descriptiva pueden implementarse en circuitos electrónicos digitales, o en software de ordenador, firmware o hardware, incluyendo las estructuras divulgadas en la presente memoria descriptiva y sus equivalentes estructurales, o en combinaciones de una o más de estas. Las realizaciones del objeto de la materia descrito en la presente memoria descriptiva pueden implementarse utilizando uno o más módulos de instrucciones de programa por ordenador codificados en un medio legible por ordenador para su ejecución por, o para controlar el funcionamiento de, un aparato de procesamiento de datos. El medio legible por ordenador puede ser un producto manufacturado, tal como un disco duro en un sistema de ordenador o un disco óptico vendido a través de los canales de venta al por menor, o un sistema integrado. El medio

legible por ordenador puede adquirirse por separado y codificarse posteriormente con uno o más módulos de instrucciones de programa de ordenador, tal como mediante la entrega de uno o más módulos de instrucciones de programa de ordenador a través de una red cableada o inalámbrica. El medio legible por ordenador puede ser un dispositivo de almacenamiento legible por máquina, un sustrato de almacenamiento legible por máquina, un dispositivo de memoria, o una combinación de uno o más de estos.

El término “aparato de procesamiento de datos” abarca todos los aparatos, dispositivos, y máquinas para el procesamiento de datos, incluyendo a modo de ejemplo un procesador programable, un ordenador, o múltiples procesadores u ordenadores. El aparato puede incluir, además del hardware, un código que crea un entorno de ejecución para el programa de ordenador en cuestión, por ejemplo, código que constituye el firmware del procesador, una pila de protocolos, un sistema de gestión de bases de datos, un sistema operativo, un entorno de ejecución, o una combinación de uno o más de estos. Además, el aparato puede emplear diversas infraestructuras de modelos de computación diferentes, tales como servicios web, computación distribuida e infraestructuras de computación en red.

Un programa de ordenador (también conocido como programa, software, aplicación de software, script, o código) puede ser escrito en cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, lenguajes declarativos o procedimentales, y puede ser desplegado en cualquier forma, incluyendo como un programa independiente o como un módulo, componente, subrutina, u otra unidad adecuada para su uso en un entorno computacional. Un programa de ordenador no se corresponde necesariamente con un archivo en un sistema de archivos. Un programa puede almacenarse en una porción de un archivo que contenga otros programas o datos (por ejemplo, uno o más scripts almacenados en un documento de lenguaje de marcas), en un único archivo dedicado al programa en cuestión, o en múltiples archivos coordinados (por ejemplo, archivos que almacenen uno o más módulos, subprogramas, o porciones de código). Un programa de ordenador puede desplegarse para ser ejecutado en un ordenador o en múltiples ordenadores situados en un sitio o distribuidos en múltiples sitios e interconectados por una red de comunicación.

Los procedimientos y flujos lógicos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser realizados por uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas de ordenador para realizar funciones operando sobre datos de entrada y generando salidas. Los procedimientos y flujos lógicos también pueden ser realizados por, y el aparato también puede ser implementado como, circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, un FPGA (conjunto de compuerta programable en campo) o un ASIC (circuito integrado de aplicación específica).

Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa de ordenador incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores de propósito general y especial, y uno cualquiera o más procesadores de cualquier tipo de ordenador digital. En general, un procesador recibe instrucciones y datos a partir de una memoria de sólo lectura, de una memoria de acceso aleatorio o de ambas. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para realizar instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. En general, un ordenador también incluirá, o estará operativamente acoplado para recibir datos a partir de o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar datos, por ejemplo, discos magnéticos, magneto-ópticos, u ópticos. Sin embargo, no es necesario que un ordenador disponga de tales dispositivos. Además, un ordenador puede estar integrado en otro dispositivo, por ejemplo, un teléfono móvil, un asistente digital personal (PDA), un reproductor de audio o vídeo móvil, una consola de juegos, un receptor del Sistema de Posicionamiento Global (GPS), o un dispositivo de almacenamiento portátil (por ejemplo, una unidad flash de bus serie universal (USB)), por nombrar sólo algunos. Los dispositivos adecuados para almacenar instrucciones y datos de programas de ordenador incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo, a modo de ejemplo, dispositivos de memoria de semiconductores, por ejemplo, EPROM (Memoria de Solo Lectura Programable y Borrable), EEPROM (Memoria de Solo Lectura Programable y Borrable Eléctricamente), y dispositivos de memoria flash; discos magnéticos, por ejemplo, discos duros internos o discos extraíbles; discos magneto-ópticos; y discos CD-ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria pueden ser complementados por, o incorporados en, circuitos lógicos de propósito especial.

Para proporcionar la interacción con un usuario, las realizaciones del objeto de la materia descrito en la presente memoria descriptiva pueden implementarse en un ordenador que tenga un dispositivo de visualización, por ejemplo, LCD (pantalla de cristal líquido), OLED (diodo emisor de luz orgánica) u otro monitor, para visualizar la información al usuario y un teclado y un dispositivo señalador, por ejemplo, un ratón o una bola de desplazamiento, mediante el cual el usuario puede proporcionar la entrada al ordenador. También se pueden utilizar otros tipos de dispositivos para proporcionar la interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensorial, por ejemplo, retroalimentación visual, auditiva, o táctil; y la entrada del usuario puede recibirse de cualquier forma, incluyendo la entrada acústica, verbal, o táctil.

El sistema computacional puede incluir clientes y servidores. Un cliente y un servidor en general están alejados entre sí y típicamente interactúan a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de

que los programas de ordenador se ejecutan en los respectivos ordenadores y tienen una relación cliente-servidor entre sí. Las realizaciones del objeto de la materia descrito en la presente memoria descriptiva pueden implementarse en un sistema de ordenador que incluya un componente de *back-end*, por ejemplo, como un servidor de datos, o que incluya un componente de *middleware*, por ejemplo, un servidor de aplicación, o que incluya un componente de *front-end*, por ejemplo, un ordenador cliente que tenga una interfaz gráfica de usuario o un navegador web a través del cual un usuario pueda interactuar con una implementación del objeto de la materia descrito en la presente memoria descriptiva, o cualquier combinación de uno o más de tales componentes de *back-end*, *middleware*, o *front-end*. Los componentes del sistema pueden estar interconectados por cualquier forma o medio de comunicación digital de datos, por ejemplo, una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), una interred (por ejemplo, el Internet) y redes entre pares (por ejemplo, redes ad hoc entre pares).

Aunque la presente memoria descriptiva contiene muchos detalles de implementación, éstos no deben interpretarse como limitaciones del ámbito de la invención o de lo que puede reivindicarse, sino más bien como descripciones de características específicas de realizaciones particulares de la invención. Determinadas características que se describen en la presente memoria descriptiva en el contexto de realizaciones separadas también pueden implementarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características que se describen en el contexto de una sola realización también pueden implementarse en múltiples realizaciones por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Además, aunque las características pueden ser descritas anteriormente como actuando en determinadas combinaciones e incluso reivindicadas inicialmente como tales, una o más características de una combinación reivindicada pueden en algunos casos ser eliminadas de la combinación, y la combinación reivindicada puede estar dirigida a una subcombinación o variación de una subcombinación.

Del mismo modo, aunque las operaciones se representan en los dibujos en un orden particular, esto no debe entenderse como que se requiera que tales operaciones se realicen en el orden particular que se muestra o en orden secuencial, o que se realicen todas las operaciones ilustradas, para lograr los resultados deseados. En determinadas circunstancias, las múltiples tareas y el procesamiento en paralelo pueden ser ventajosos. Además, la separación de diversos componentes del sistema en las realizaciones descritas anteriormente no debe entenderse como una exigencia de tal separación en todas las realizaciones, y debe entenderse que los componentes del programa y los sistemas descritos pueden en general integrarse juntos en un único producto de software o empaquetarse en múltiples productos de software.

Por lo tanto, se han descrito realizaciones particulares de la invención. Otras realizaciones están dentro del ámbito de las siguientes reivindicaciones. Además, las acciones mencionadas en las reivindicaciones pueden ser realizadas en un orden diferente y seguir alcanzando los resultados deseados.

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato (105) de obtención de imágenes volumétricas que comprende:

una fuente (106) de luz configurada para emitir una luz de iluminación que se propaga a través de un trayecto de luz de iluminación para iluminar una muestra (126) tridimensional (3D); y un sistema (110) óptico dispuesto con respecto a la fuente (106) de luz para recibir un campo de luz, el cual proviene de la muestra (126) en 3D iluminada, en el que el campo de luz se propaga a través de un trayecto de luz de detección;

en el que la fuente (106) de luz, el sistema (110) óptico, o ambos, son configurables para realizar una iluminación de volumen selectivo, la cual selecciona un volumen de una iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D en base a la muestra (126) en 3D que se va a iluminar y a un procedimiento de detección de campo de luz (LFD) que se va a aplicar, en el que la iluminación confinada en 3D es un volumen seleccionado de la muestra (126) en 3D que va a ser particularmente excitado por una luz de iluminación para la obtención de imágenes

en el que, de manera opcional, el aparato (105) comprende un endoscopio (340), y en el que el trayecto de luz de detección no es colineal al trayecto de luz de iluminación, y el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra en 3D se selecciona ajustando la geometría óptica en 3D de la luz de iluminación en relación con el sistema óptico, y en los que a) o b), en el que

a) el sistema (110) óptico comprende

un primer elemento óptico dispuesto para recibir la luz de iluminación que se propaga a través del trayecto de luz de iluminación para iluminar la muestra en 3D (126), y

un segundo elemento óptico dispuesto para recibir el campo de luz que se propaga a través del trayecto de luz de detección el cual proviene de la muestra (126) en 3D iluminada, en el que el primer elemento óptico y el segundo elemento óptico están dispuestos para ajustar la geometría óptica en 3D del trayecto de luz de iluminación en un ángulo  $\theta$  con el trayecto de luz de detección que es mayor que cero para seleccionar el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D, o

b) en el que el sistema óptico comprende un elemento óptico común dispuesto para recibir la luz de iluminación que se propaga a través del trayecto de luz de iluminación para iluminar la muestra en 3D, recibir el campo de luz que se propaga a través del trayecto de luz de detección el cual proviene de la muestra en 3D iluminada, y ajustar la geometría óptica en 3D de la fuente de luz para seleccionar el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra en 3D, y ya sea i) o ii), en el que

i) en el que el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D se selecciona utilizando una conformación de haz de luz enfocada de la luz de iluminación, y una geometría óptica en 3D de la fuente de luz ajustada para iluminar múltiples subregiones del volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D en un escaneo a través de la totalidad de la iluminación confinada en 3D seleccionada de la muestra (126) en 3D durante un tiempo de exposición, o

ii) en el que la luz de iluminación se puede utilizar para cambiar las propiedades fotoquímicas y físicas de uno o más agentes de contraste en la muestra (126) en 3D, ofreciendo un contraste mejorado en el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D, y una fuente (106) de luz de iluminación adicional y el sistema (110) óptico asociado para proporcionar imágenes de campo de luz de los agentes de contraste mejorados.

2. El aparato (105) de la reivindicación 1, en el que el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra en 3D se selecciona utilizando una excitación óptica lineal.

3. El aparato (105) de la reivindicación 1, en el que el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D se selecciona utilizando una excitación óptica no lineal de múltiples fotones y ajustando una geometría óptica en 3D de la fuente (106) de luz en relación con el sistema (110) óptico.

4. El aparato (105) de la reivindicación 1, en el que el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) se selecciona utilizando una conformación directa del haz de luz de la iluminación para producir un volumen de luz espacialmente extendido.
5. El aparato (105) de la reivindicación 1, que comprende componentes ópticos y geometrías ópticas conmutables, siendo el aparato un módulo complementario configurado para ser adaptado a un microscopio ya existente, o siendo un módulo integrado de un microscopio diseñado a partir de cero, teniendo con dicho microscopio múltiples capacidades de obtención de imágenes, en el que las múltiples capacidades de obtención de imágenes comprenden la realización de un seccionamiento óptico de alta resolución en 3D con una resolución de submicrómetros a 2 micrómetros.
6. El aparato (105) de la reivindicación 1, opción b), en el que la luz de iluminación se propaga a lo largo de un trayecto de ángulo oblicuo a través del elemento óptico común, y el trayecto de luz de detección es colineal con el eje óptico del elemento óptico común, formando un ángulo theta que es mayor que 0 con el trayecto de luz de iluminación.
7. Un sistema de obtención de imágenes volumétricas que comprende:
- el aparato (105) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3,
  - un mecanismo de detección de LFD dispuesto con respecto al aparato (105) para recibir el campo de luz, el cual proviene de la muestra (126) en 3D iluminada, y para capturar las imágenes de LFD proyectadas por el campo de luz;
  - un ordenador acoplado de manera comunicativa con el mecanismo de detección de LFD y configurado para generar datos de obtención de imágenes volumétricas de la muestra (126) en 3D realizando una reconstrucción computacional de las imágenes de LFD.
8. El aparato (105) de la reivindicación 1, en el que el volumen de la iluminación confinada en 3D se selecciona iluminando la muestra (126) en 3D de una manera con patrones o estructurada que da como resultado un campo de luz detectado que cubre un espacio 3D deseado de la muestra (126) en 3D, los patrones o estructuras utilizables para permitir una reconstrucción computacional optimizada de los datos de la imagen final a partir de los campos de luz detectados.
9. El aparato (105) de la reivindicación 1, en el que el sistema (110) óptico comprende una pluralidad de elementos ópticos dispuestos para ajustar la geometría óptica en 3D para crear una pluralidad de trayectos de luz de detección, cada uno de ellos en un ángulo respectivo con el trayecto de luz de iluminación, y utilizable para (i) seleccionar el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D, (ii) recibir el campo de luz que se propaga a través del trayecto de luz de detección a partir de múltiples vistas asociadas con los ángulos respectivos, y (iii) la reconstrucción computacional de las imágenes de LFD a partir de las múltiples vistas.
10. El aparato (105) de la reivindicación 1, en el que el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D se selecciona ajustando el sistema (110) óptico utilizando (i) una fibra de único núcleo para emitir la luz de iluminación que se propaga a través del trayecto de luz de iluminación para iluminar la muestra (126) en 3D, o (ii) una fibra de múltiple núcleo para emitir la luz de iluminación que se propaga a través del trayecto de luz de iluminación para iluminar la muestra (126) en 3D, o (iii) una combinación de una o más fibras de único núcleo y fibras de múltiple núcleo para emitir la luz de iluminación que se propaga a través del trayecto de luz de iluminación para iluminar la muestra (126) en 3D.
11. El aparato (105) de la reivindicación 1, en el que el volumen de la iluminación confinada en 3D de la muestra (126) en 3D se selecciona ajustando el sistema (110) óptico utilizando (i) una fibra de único núcleo para recibir el campo de luz el cual proviene de la muestra (126) en 3D iluminada, o (ii) una fibra de múltiple núcleo para recibir el campo de luz el cual proviene de la muestra (126) en 3D iluminada, o (iii) una combinación de una o más de las fibras de único núcleo y las fibras de múltiple núcleo para recibir el campo de luz el cual proviene de la muestra (126) en 3D iluminada.

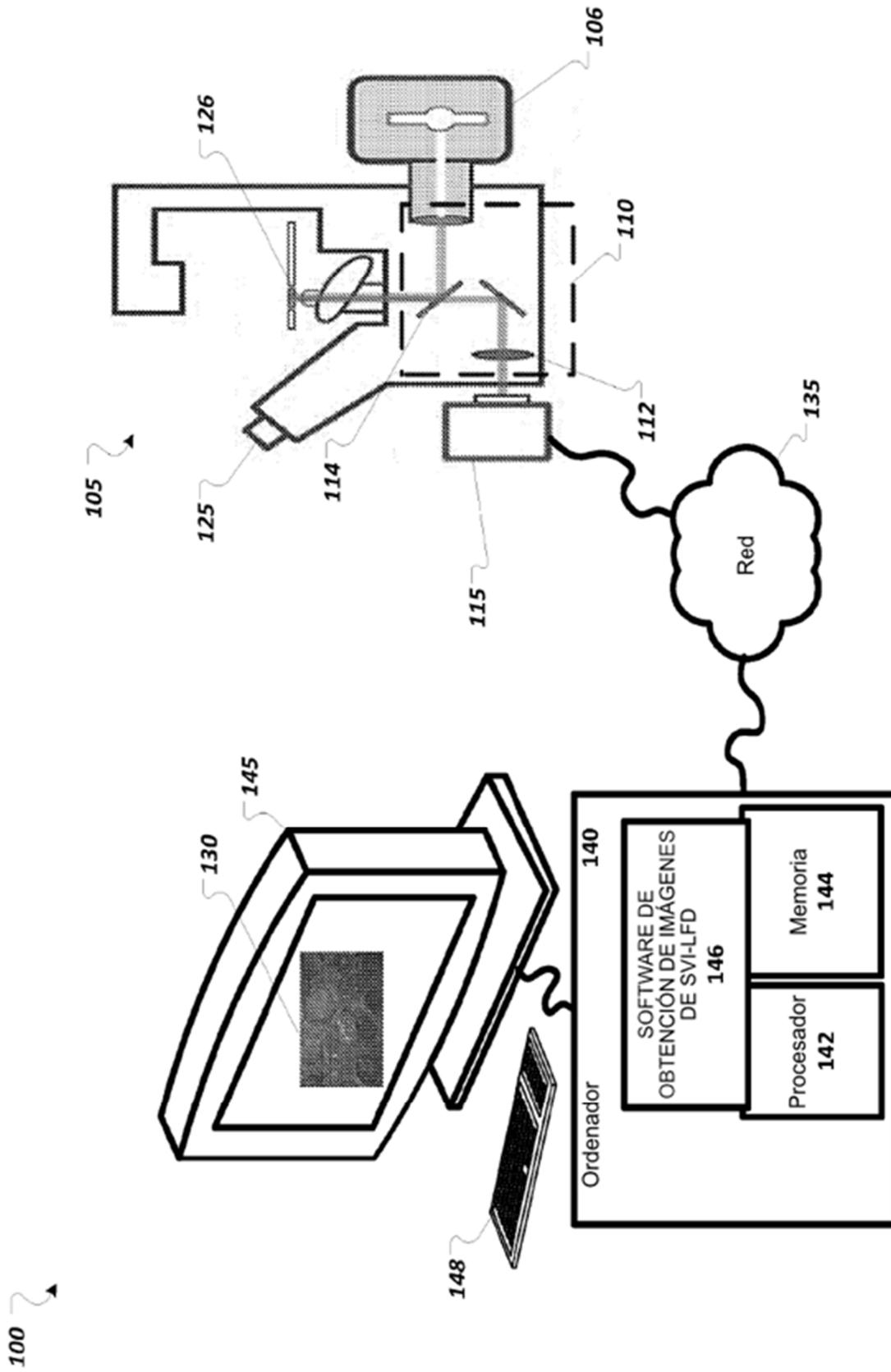


FIG. 1

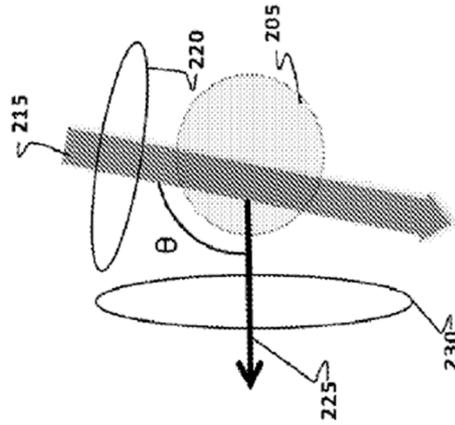


FIG. 2A

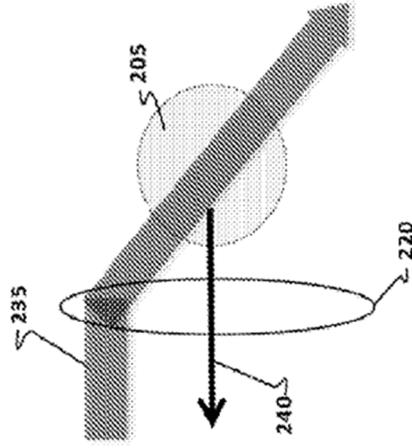


FIG. 2B

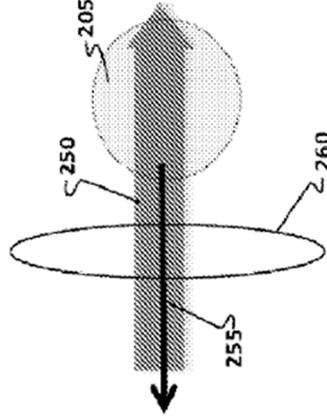


FIG. 2C

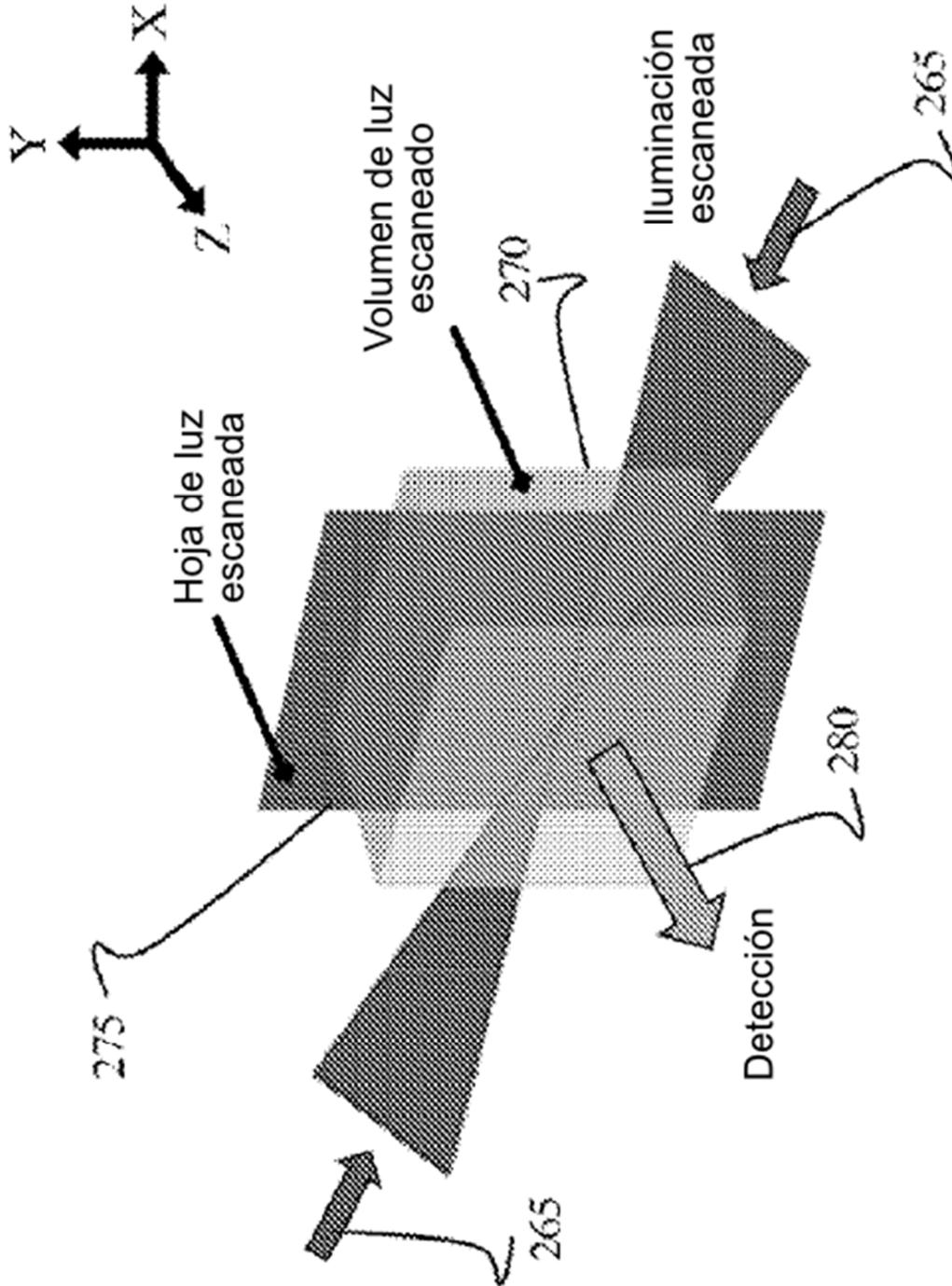


FIG. 2D

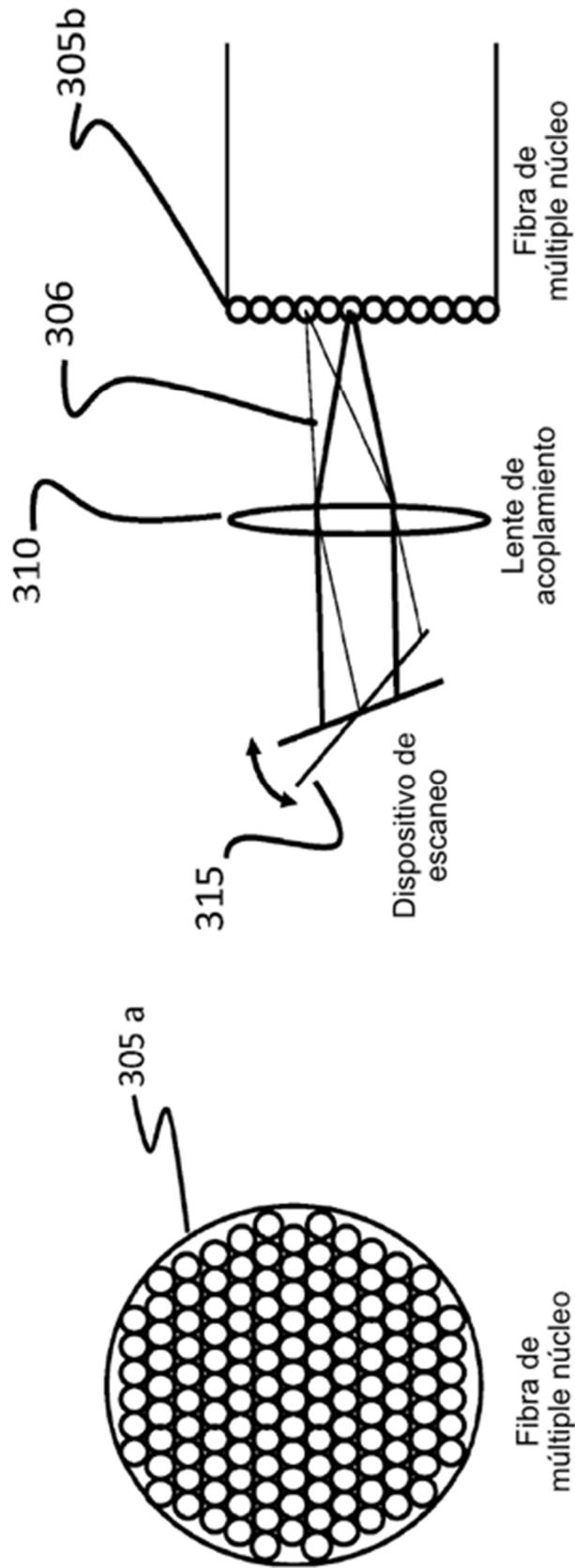
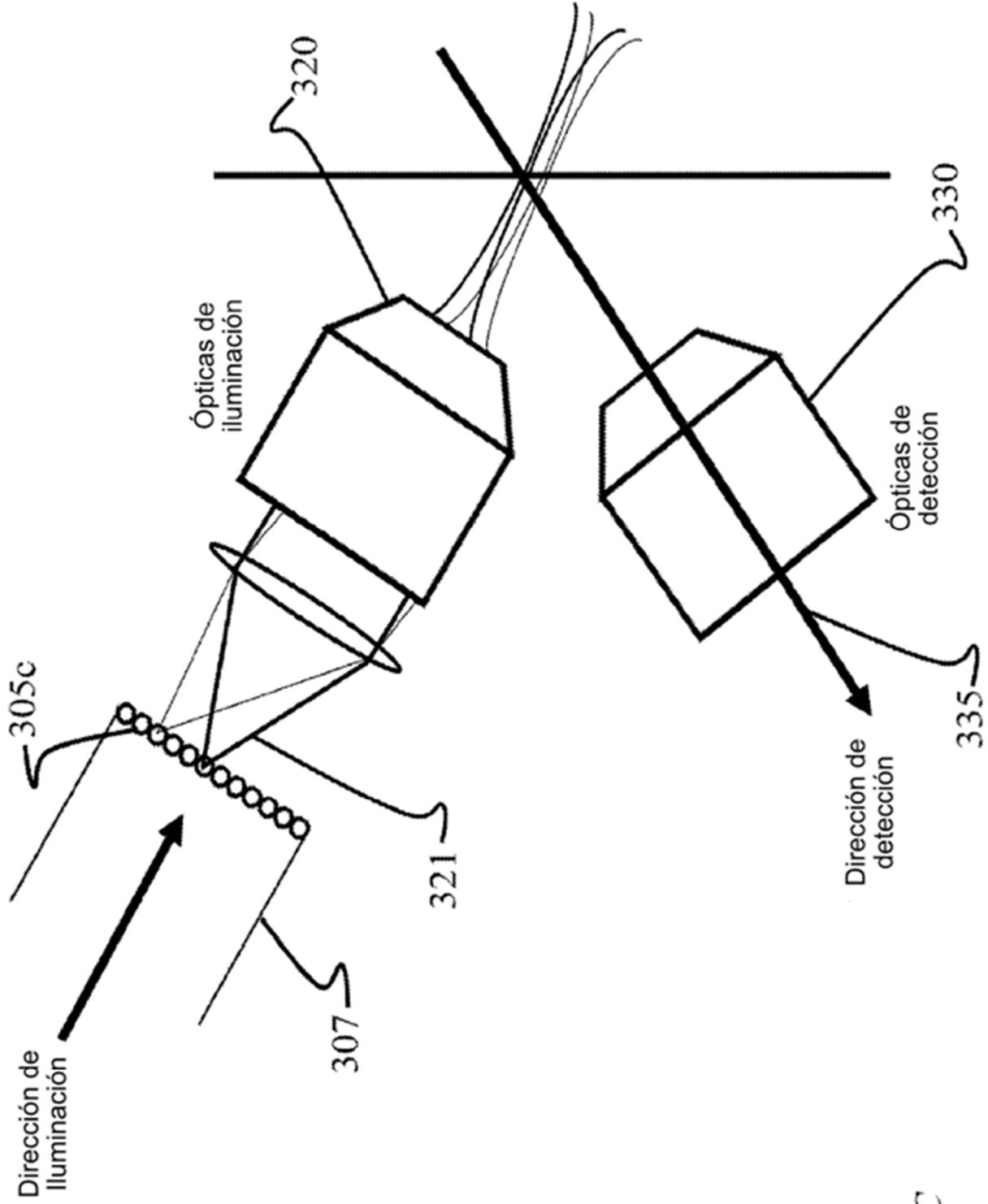


FIG. 3A

FIG. 3B



**FIG. 3C**

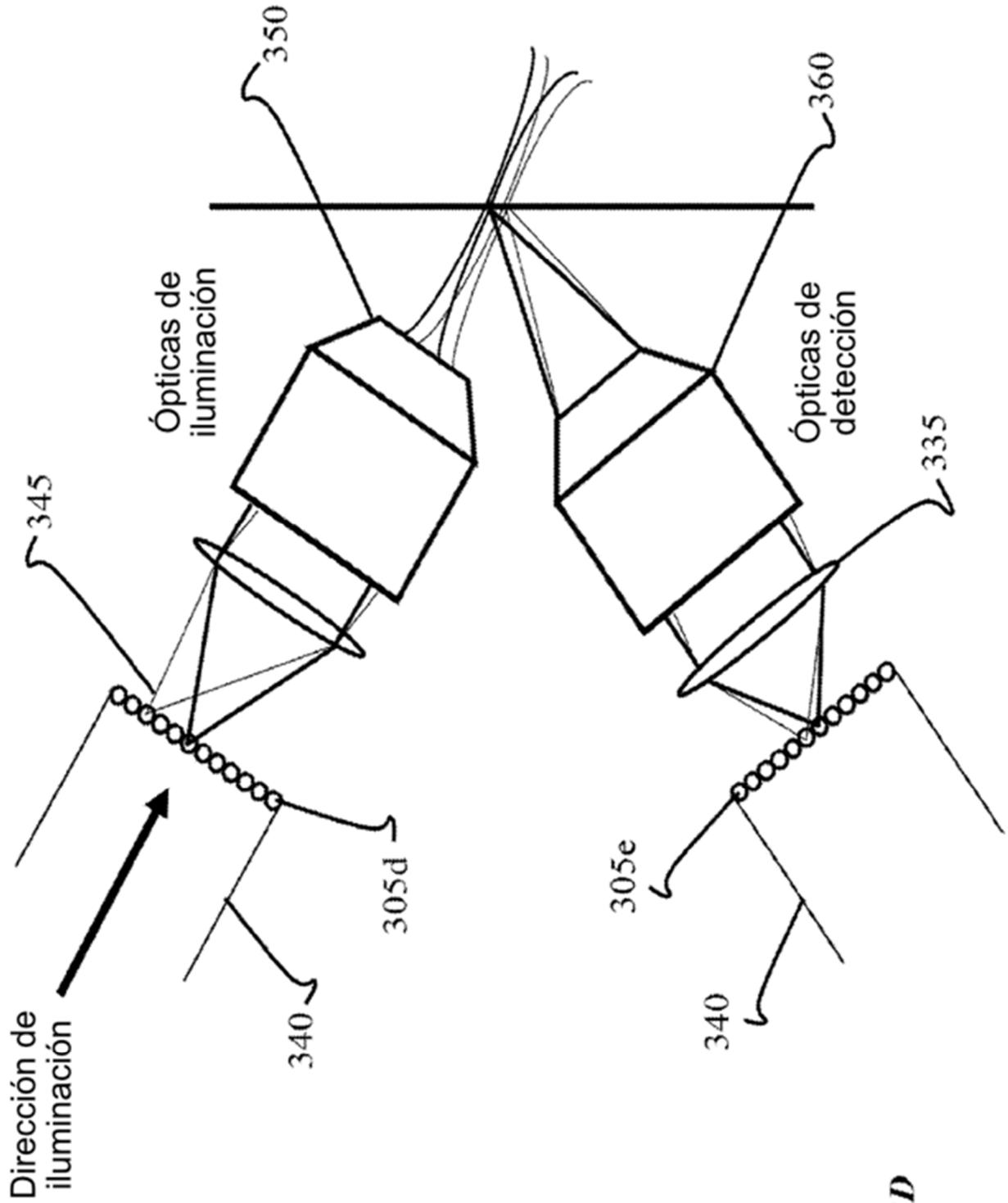


FIG. 3D

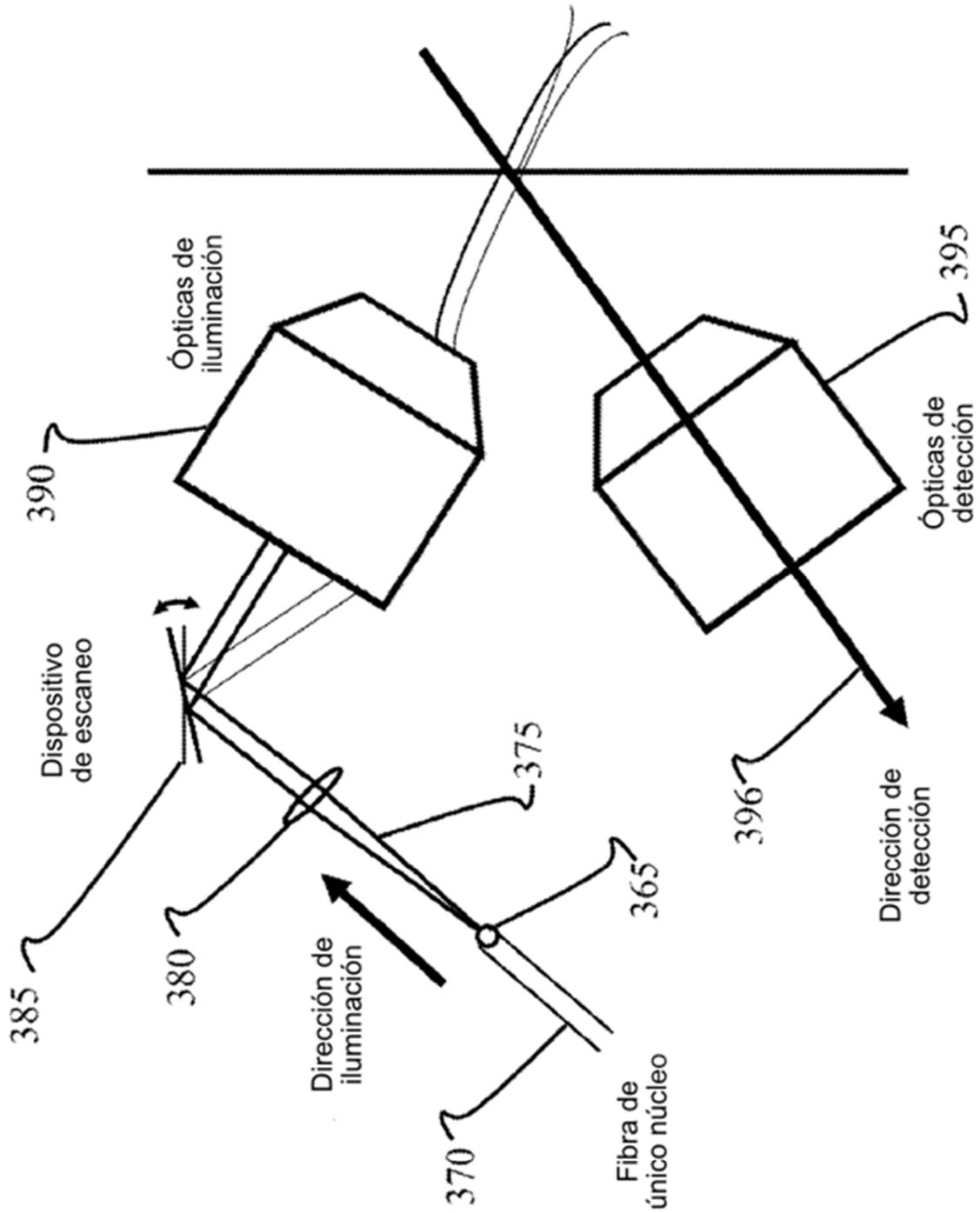


FIG. 3E

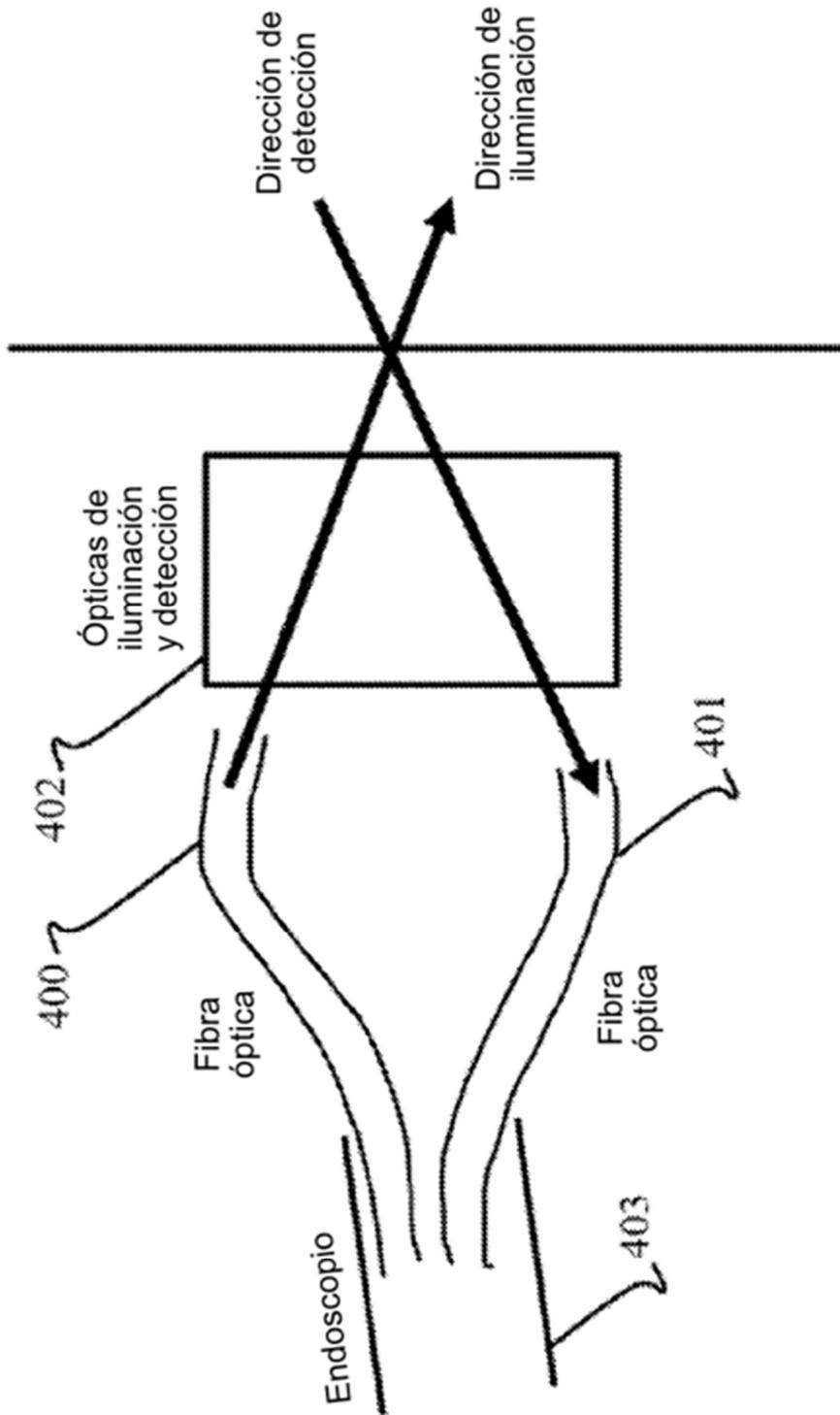


FIG. 3F

