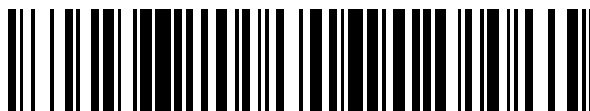


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 171**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61D 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2004 E 10184840 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2309245**

54 Título: **Métodos para proporcionar esperma animal clasificado por sexo**

30 Prioridad:

28.03.2003 US 458607 P

28.03.2003 US 458731 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2016

73 Titular/es:

**INGURAN, LLC (100.0%)
22575 State Highway 6 South
Navasota, TX 77868, US**

72 Inventor/es:

**DURACK, GARY;
LUDWIG, CINDY L.;
GRAHAM, JEFFREY A.;
CROWLEY, KATHLEEN S.;
HATCHER, JEREMY T.;
WESTFALL, LON A.;
HELBING, DAVID R.;
WALLACE, JEFFREY D.;
VANDRE, GARY P.;
DIDION, BRADLEY;
NAYAK, NIRAJ V. y
ANZAR, MUHAMMAD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 563 171 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

Métodos para proporcionar espermatozoides animal clasificados por sexo

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a aparatos y métodos para la recogida de semen animal, y más particularmente a aparatos y métodos que usan diversas técnicas, incluyendo citometría de flujo, para producir poblaciones de espermatozoides que están enriquecidas con células espermáticas que tienen poblaciones viables de células espermáticas clasificadas de acuerdo con las características de ADN para su uso por la industria de producción animal para preseleccionar el sexo de la descendencia animal.

La fertilización de animales por inseminación artificial (AI) y trasplante de embriones después de fertilización *in vitro* es una práctica establecida. En la industria de producción de ganado, la capacidad de influir en el resultado reproductivo hacia descendencia que tenga una o más características deseadas tiene ventajas obvias. A modo de ejemplo, sería un beneficio económico en la industria láctea preseleccionar la descendencia en favor del sexo femenino para asegurar la producción de vacas lecheras. Se han hecho esfuerzos hacia conseguir este objetivo usando citometría de flujo para clasificar células espermáticas X e Y, como se evidencia por las descripciones de las patentes de Estados Unidos Nº 6.357.307 (Buchanan, et al.), 5.985.216 (Rens, et al.), y 5.135.759 (Johnson). Sin embargo, ninguno de estos esfuerzos ha provocado la introducción de un sistema de alto rendimiento comercialmente satisfactorio capaz de producir volúmenes de producción de células espermáticas sexadas relativamente puras que tengan una movilidad suficiente para una fertilización eficaz.

En la técnica anterior se han descrito instrumentos para clasificar células (véase, p. ej., Seidel G E *et al.*, REPROD, 124(6), 2002, 733-743, WO 99/58955A1 y Shapiro H M *et al.*, CYTOMETRY, 41(1), 1983, 11-19). Sin embargo, a diferencia de la técnica anterior, la presente invención comprende un método inventivo para clasificar células espermáticas utilizando una pluralidad de citómetros de flujo que comparten un sistema de suministro de fluidos común.

Otros han intentado desarrollar tecnología que pueda usarse para procesar células espermáticas para obtener poblaciones de células espermáticas que estén enriquecidas con espermatozoides que tenga un cromosoma sexual deseado. Sin embargo, la tecnología existente está por debajo de las tecnologías de la invención descritas en este documento.

Por ejemplo, Johnson et al. (patente de Estados Unidos Nº 5.135.759) describe la separación de poblaciones de espermatozoides que albergan el cromosoma X e Y intactos de acuerdo con el contenido de ADN usando un citómetro de flujo/clasificador celular en poblaciones enriquecidas de espermatozoides que albergan el cromosoma X e Y. Como se ha descrito, el espermatozoides se combina con un colorante ADN selectivo a una temperatura de 30 a 39°C durante un periodo de 1 hora (39°C) a 1,5 horas (30°C). Entonces se usa un citómetro de flujo para medir la cantidad de luz fluorescente emitida según pasa el espermatozoides a través de un haz láser que excita el colorante. Como el espermatozoides que alberga el cromosoma X contiene más ADN que el espermatozoides que alberga el cromosoma Y, teniendo la mayoría de las especies de mamíferos una diferencia de aproximadamente el 3 al 5%, el espermatozoides que alberga el cromosoma X emite más luz fluorescente que el espermatozoides que alberga el cromosoma Y. Para explicar el hecho de que la medición de fluorescencia puede variar dependiendo de la orientación rotatoria de las células espermáticas, se usan dos foto detectores. El primero determina si las células espermáticas están orientadas apropiadamente, mientras que el segundo recoge la medición que se usa para clasificar el espermatozoides como que tiene el cromosoma X o Y. Se usa un oscilador que provoca que la corriente que contiene el espermatozoides se rompa en gotitas corriente abajo del sitio donde el espermatozoides pasa a través del haz láser. A las gotitas que contienen espermatozoides único de una intensidad fluorescente predeterminada se les da una carga y se desvían electrostáticamente en recipientes de recogida. La población de espermatozoides recogida enriquecida en género entonces se usa para microinyección, fertilización *in vitro*, o inseminación artificial.

Seidel et al. (documento WO 02/43574) también describe la separación de espermatozoides en poblaciones enriquecidas en género de células que albergan el cromosoma X e Y usando citometría de flujo. Seidel et al. describe la tinción de las células a una temperatura entre 30°C y 40°C.

La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Nº 2003/0157475 A1 (Schenk, 21 de agosto de 2003) describe un método para crioconservar células espermáticas que se han clasificado de acuerdo con el contenido de cromosoma X o Y. Como se indica en la misma, es deseable añadir un crioprotector a las células espermáticas antes de crioconservarse para proteger a las células espermáticas durante el proceso de crioconservación. Por ejemplo, el glicerol es un crioprotector que se añade habitualmente a células espermáticas bovinas antes de la crioconservación. Sin embargo, para obtener mejor protección del crioprotector, es deseable esperar a que el crioprotector se equilibre con las células espermáticas antes de someter a las células espermáticas a temperaturas por debajo de 0°C. Durante el periodo de equilibrado, el crioprotector penetra en la membrana celular para proporcionar protección intra-celular además de cualquier protección extra-celular proporcionada por el crioprotector. Por tanto, los métodos de crioconservación descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Nº

2003/0157475 A1 especifican que se añade un diluyente que contiene glicerol a las células espermáticas después de haberse refrigerado a aproximadamente 5°C. Entonces se permite que las células espermáticas y el glicerol se equilibren a 5°C durante cualquier periodo entre 1 y 18 horas antes de que las células espermáticas se sometan a temperaturas inferiores. La descripción recomienda un periodo de equilibrado entre tres y seis horas para obtener los mejores resultados.

Desafortunadamente, el tiempo y coste implicados en un periodo de equilibrado de 3 a 6 horas tendrán un impacto negativo sobre la rentabilidad de un proceso comercial de clasificación de esperma. Además, en el contexto de un proceso comercial de clasificación de esperma, se cree que la salud del esperma se mejora de forma general reduciendo el tiempo entre la recogida del esperma y la crioconservación (siendo equitativos otros factores). Desde este punto de vista también, sería deseable tener acceso a tecnología de crioconservación que no requiera un largo periodo de equilibrado para obtener los beneficios óptimos de un crioprotector. Además, se ha informado de que la tecnología de crioconservación conocida tiene un impacto perjudicial sobre la motilidad del esperma, que es indicativa de fertilidad disminuida del esperma. Por tanto, existe la necesidad de técnicas de crioconservación que conserven la salud del esperma en comparación con las técnicas convencionales.

Sumario de la invención

Esta invención se refiere a un método mejorado para procesar células espermáticas de acuerdo con la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama de flujo de trabajo para un proceso de clasificación de esperma ejemplar;

la Fig. 2 es un diagrama esquemático de un sistema de clasificación de gotitas por citometría de flujo;

la Fig. 3 es una vista lateral de un aparato de citometría de flujo para clasificación de gotitas que muestra un ensamblaje óptico de epi-iluminación que enfoca un haz de excitación sobre una corriente de fluido de movimiento ascendente generado por un sistema de boquilla;

la Fig. 4 es una vista final de una boquilla y porta-boquillas adecuados para el sistema de la invención;

la Fig. 5 es una vista seccional de la boquilla y porta-boquillas de la Fig. 4 tomada a través del plano de corte 5--5 en la Fig. 4;

la Fig. 6 es un diagrama esquemático de una célula espermática arrastrada en una corriente de fluido que se está examinando mediante un punto de iluminación con forma elíptica;

la Fig. 7 es un diagrama esquemático que muestra la envoltura angular para la orientación deseada de una célula espermática en que el haz de luz desde el sistema óptico impactará sobre una amplia cara de la célula generalmente de costado;

la Fig. 8 es una vista seccional transversal de un cuerpo de boquilla adecuado para el sistema de la invención;

Fig. 9 es una vista lateral del cuerpo de boquilla mostrado en la Fig. 8 que muestra una serie de planos de corte (A-A a H-H y J-J a K-K) a través del cuerpo de boquilla;

las Fig. 9A-9H y 9J-9K son vistas seccionales del cuerpo de boquilla mostrado en las Fig. 8 y 9 a lo largo de los planos correspondientes (A-A a H-H y J-J a K-K) de la Fig. 9;

la Fig. 10 es una vista en perspectiva de una sección transversal de un sistema de boquilla que tiene un deflector de orientación en la boquilla;

la Fig. 11 es una vista seccional transversal del sistema de boquilla mostrado en la Fig. 10;

la Fig. 12 es una vista seccional transversal parcial ampliada de una parte del sistema de boquilla mostrado en las Fig. 10 y 11;

la Fig. 13 es una vista seccional transversal parcial ampliada similar a la vista mostrada en la Fig. 12, pero tomada desde una dirección que es perpendicular a la dirección de visión en la Fig. 12;

la Fig. 14 es una vista lateral de un soporte de deflector que soporta una placa deflectora;

la Fig. 15 es una vista superior del soporte de deflector y la placa deflectora mostrados en la Fig. 14;

la Fig. 16 es una vista superior de un soporte de deflector orientado de forma rotatoria en una boquilla de modo que las patas de la placa deflectora se crucen en una línea que es paralela al eje principal de la elipse D en la boquilla;

5 la Fig. 17 es una vista superior de un soporte de deflector orientado de forma rotatoria en una boquilla de modo que las patas de la placa deflectora se crucen en una línea que es perpendicular al eje principal de la elipse D en la boquilla;

10 la Fig. 18 es una vista seccional transversal lateral de un sistema de boquilla que incluye un deflector que muestra una serie de planos de corte (A-A a E-E) a través de la boquilla y el deflector;

las Fig. 18A-18E muestran las áreas de flujo seccional transversal en diversos puntos en el sistema de boquilla mostrado en la Fig. 18;

15 la Fig. 19 es una vista seccional transversal similar a la Fig. 12 tomada a través de una boquilla que tiene una placa deflectora que es perpendicular al eje longitudinal de la boquilla;

la Fig. 20 es una vista seccional transversal de la boquilla mostrada en la Fig. 19 tomada a través del plano de corte 20-20 mostrado en la Fig. 19;

20 la Fig. 21 es una vista seccional transversal similar a la vista seccional transversal de la Fig. 18 que muestra un sistema de boquilla que tiene un conducto de introducción de muestra en una localización desplazada;

la Fig. 22 es una vista en perspectiva de un sistema de boquilla montado en una montura de boquilla;

25 la Fig. 23 es un diagrama esquemático de una pluralidad de células espermáticas alineadas que se están orientando de forma rotatoria según pasan a través de un miembro con orificio calibrado hacia de localización de examen;

la Fig. 24 es un diagrama esquemático que muestra la localización de rotura de gotitas corriente abajo de la boquilla;

30 la Fig. 25 es un diagrama esquemático de un sistema detector de rotura;

la Fig. 26 es una elevación frontal de un sistema de citometría de flujo;

35 la Fig. 27 es una vista en perspectiva ampliada de una parte del sistema mostrado en la Fig. 26 con partes del sistema retiradas por motivos de claridad;

la Fig. 28 es un diagrama esquemático de un sistema óptico de epi-iluminación;

40 la Fig. 29 es una vista en perspectiva de un sistema óptico de epi-iluminación;

la Fig. 30 es una vista lateral del sistema óptico de epi-iluminación mostrado en la Fig. 29;

la Fig. 31 es una vista superior del sistema óptico de epi-iluminación mostrado en las Fig. 29 y 30;

45 la Fig. 32 es una vista seccional del sistema óptico de epi-iluminación a lo largo del plano 32-32 de la Fig. 30;

la Fig. 33 es una vista seccional de una parte del sistema óptico de epi-iluminación a lo largo del plano 33-33 de la Fig. 31;

50 la Fig. 34 es una vista en perspectiva que muestra solamente elementos del sistema de filtración óptica que están en la parte posterior del filtro dicróico del sistema óptico de epi-iluminación mostrado en la Fig. 29;

55 la Fig. 35 es una vista en perspectiva de otro sistema óptico de epi-iluminación que incluye ajuste de traslado de la lente cilíndrica;

la Fig. 36 es un diagrama esquemático de una localización de examen que muestra un haz láser enfocado sobre una corriente de fluido corriente abajo de la boquilla a un ángulo oblicuo de incidencia;

60 la Fig. 37 es un diagrama esquemático de un sistema de calibración de clasificación de;

la Fig. 38 es un diagrama esquemático de un detector de epi-iluminación para su uso con la calibración de clasificación mostrada en la Fig. 37;

65 la Fig. 39 es un diagrama de bloques de un analizador digital de células (DCA) y regulador del procesador;

la Fig. 40 es un diagrama esquemático de un clasificador multi-canal que muestra dos canales;

la Fig. 41 es un diagrama de flujo de trabajo de un clasificador multi-canal que muestra cuatro canales;

la Fig. 42 es un diagrama de bloques de un analizador analógico de células (ACA);

la Fig. 43 es un gráfico que ilustra una corriente de pulsos de forma de onda desde una salida de fotodetector que detecta pulsos fluorescentes de células que fluyen a una tasa promedio de 10.000 células/segundo;

la Fig. 44 es una vista detallada de la Fig. 43 que ilustra la corriente desde una salida de fotodetector que detecta tres pulsos fluorescentes de tres células que fluyen a una tasa promedio de 10.000 células/segundo; una onda cuadrada de un oscilador de gotitas de 100 MHz se ha superpuesto sobre la ilustración para mostrar la sincronización entre los tres pulsos y los pulsos de onda cuadrada del oscilador de gotitas;

las Fig. 45-48 ilustran el movimiento de una célula espermática relativo a un punto de iluminación láser que tienen una anchura reducida;

la Fig. 49 es una ilustración ejemplar de la información digital correspondiente a una salida analógica variable en el tiempo de un fotodetector que detecta un único pulso de fluorescencia basado en 122 muestras a una tasa de muestreo continua de 105 MHz;

la Fig. 50 es un diagrama esquemático que ilustra la relación sincrónica entre pulsos de láser, emisiones de fluorescencia de una célula resultantes de los pulsos de láser y las muestras digitales de la salida del fotodetector;

la Fig. 51 es un diagrama esquemático que ilustra el modo en que las muestras digitales mostradas en la Fig. 50 forman una forma de onda del pulso;

la Fig. 52 es un diagrama esquemático de una forma de onda del pulso a partir de un célula espermática X sincronizada con la forma de onda del pulso de una célula espermática Y que muestra mayor intensidad de pico en la forma de onda del pulso para la célula espermática X;

la Fig. 53 es un diagrama esquemático de una forma de onda del pulso que muestra un umbral y una ventana de integración que pueden usarse para el análisis de pulsos;

la Fig. 54 es un histograma de una muestra que contiene células espermáticas X e Y que muestra la elevada resolución que se puede obtener con técnicas de barrido de ranura;

la Fig. 55 es un histograma de una muestra que contiene células espermáticas X e Y que muestra la resolución relativamente mala obtenida con iluminación convencional;

las Fig. 56-59 muestran histogramas de fluorescencia y diagramas de dispersión de picos frente al área para núcleos de espermia y células espermáticas vivas;

las Fig. 60-61 ilustran un modelo de cuatro componentes de un histograma de intensidad de fluorescencia para células espermáticas-la Fig. 60 muestra los datos sin procesar y la Fig. 61 muestra curvas modelo generadas mediante un algoritmo iterativo basado en los datos mostrados en la Fig. 60;

las Fig. 62-63 ilustran un modelo de tres componentes de un histograma de intensidad de fluorescencia para células espermáticas-la Fig. 62 muestra los datos sin procesar y la Fig. 63 muestra curvas modelo generadas mediante un algoritmo iterativo basado en los datos mostrados en la Fig. 62;

la Fig. 64 ilustra la naturaleza no lineal del elemento CSD; el panel superior muestra diagramas de M promedio para células espermáticas que albergan X y que albergan Y; el panel central muestra un gráfico de las primeras derivadas de estos diagramas de M promedio (es decir M') para valores de amplitud de señal menores de la altura del pico del pulso de emisión de fluorescencia que alberga Y promedio; y el panel inferior muestra la diferencia entre las primeras derivadas ($M'_X - M'_Y$) como una función de la amplitud de señal;

la Fig. 65 ilustra un sistema en que el elemento CSD es la pendiente computada de una línea que pasa a través de dos puntos sobre el pulso de emisión de fluorescencia;

las Fig. 66-69 ilustran la discriminación mejorada conseguida mediante el uso de la extracción del elemento CSD;

la Fig. 70 ilustra una región de clasificación bi-variada sobre un diagrama de dispersión de CSD frente a la dispersión del área de pulso;

la Fig. 71 ilustra re-análisis de citometría de flujo para un ensayo en que el panel de la izquierda corresponde con la estrategia de clasificación de alta recuperación/aceptación coincidente (estrategia de cancelación de ausencia de

coincidencia) y el panel de la derecha corresponde con la estrategia de clasificación de alta pureza/rechazo coincidente (estrategia de cancelación de coincidencia);

la Fig. 72 es un diagrama de flujo de trabajo del procesamiento de la señal digital;

la Fig. 73 es un ejemplo de una estrategia de agrupamiento de media k;

la Fig. 74 es una ilustración conceptual y representación gráfica de la aplicación de una regla de decisión por *Error Mínimo de Bayes* a los datos de las características pulso;

la Fig. 75 es una representación gráfica de los resultados obtenidos usando una regla de decisión por *Error Mínimo de Bayes* y umbralización de la distancia de Mahalanobis;

la Fig. 76 es una ilustración conceptual de la estadística de ventana móvil para proporcionar "olvido";

la Fig. 77 es una representación gráfica de la compensación de desviación;

la Fig. 78 ilustra una corriente de fluido que contiene una distribución ejemplar de partículas;

la Fig. 79 es un gráfico que muestra la pureza como una función de la tasa de suministro del fluido con una estrategia de clasificación de aceptación coincidente;

la Fig. 80 es un gráfico que muestra el porcentaje de partículas deseadas clasificadas satisfactoriamente en la población utilizable como una función de la tasa de suministro del fluido con una estrategia de clasificación de rechazo coincidente;

la Fig. 81 es un gráfico que muestra la relación inversa entre el porcentaje de gotitas coincidentes aceptadas para clasificación en una población de partículas deseadas en comparación con el porcentaje de gotitas coincidentes rechazadas para clasificación en esa población;

la Fig. 82 es un diagrama de flujo de decisiones que muestra el funcionamiento global de un aparato de clasificación;

la Fig. 83 es una elevación lateral de un citómetro orientado a producir una corriente de gotitas que tienen un componente de velocidad horizontal y un sistema de recogida para recoger las gotitas;

la Fig. 84 es una vista en perspectiva ampliada del sistema de recogida mostrado en la Fig. 83 mostrado con relación al sistema de boquilla y las placas deflectoras;

la Fig. 85 es un diagrama esquemático de una realización de un sistema de recogida;

la Fig. 86 es una elevación frontal de un dispositivo de intercepción del sistema de recogida mostrado en la Fig. 83;

la Fig. 87 es una elevación lateral de un dispositivo de intercepción del sistema de recogida mostrado en la Fig. 83;

las Fig. 88-95 muestran resultados gráficos de varios experimentos de centrifugación de esperma;

las Fig. 96-98 son diagramas esquemáticos que ilustran las etapas en un método de filtración;

la Fig. 99 es un diagrama esquemático de un sistema de filtración usado para filtrar células espermáticas;

la Fig. 100 es un diagrama esquemático de otro sistema de filtración usado para filtrar células espermáticas;

las Fig. 101 y 102 muestran resultados gráficos de experimentos de filtración de células espermáticas;

la Fig. 103 es un diagrama de flujo de trabajo para el método de crioconservación;

la Fig. 104 muestra resultados gráficos para un experimento de crioconservación de células espermáticas;

la Fig. 105 es un diagrama de flujo de trabajo para un método para procesar células espermáticas;

la Fig. 106 es una vista en perspectiva de un clasificador de partículas multi-canal con partes desprendidas para mostrar elementos internos del clasificador;

la Fig. 107 es una vista en perspectiva de un sistema colector que puede usarse para el suministro de fluido en el clasificador de partículas multi-canal de la Fig. 106;

la Fig. 108 es una vista en perspectiva del sistema colector de la Fig. 107 que muestra conexiones fluidas internas del sistema colector;

la Fig. 109 es una vista en perspectiva del clasificador de partículas mostrado en la Fig. 106 con elementos adicionales retirados o parcialmente retirados para mostrar mejor los elementos internos del clasificador;

la Fig. 110 es una elevación frontal del clasificador de partículas mostrado en la Fig. 106;

la Fig. 111 es una elevación lateral del clasificador de partículas mostrado en la Fig. 106 con la pared lateral de la carcasa retirada para mostrar elementos internos del clasificador;

la Fig. 112 es una elevación lateral del clasificador de partículas mostrado en la Fig. 106 (tomada desde el lateral opuesto al lado del que se tomó la Fig. 107) con la pared lateral retirada para mostrar elementos internos del clasificador;

la Fig. 113 es una vista en perspectiva del clasificador de partículas mostrado en la Fig. 106 tomada desde un ángulo por detrás del clasificador y con la cubierta posterior retirada para mostrar elementos internos del clasificador;

la Fig. 114 es una vista en perspectiva de una parte del clasificador de partículas mostrado en la Fig. 106 que muestra el montaje de múltiples sistemas de boquilla en un travesaño;

la Fig. 115 es una vista en perspectiva de una parte del clasificador de partículas mostrado en la Fig. 106 que muestra las posiciones relativas del sistema de recogida y otras partes del clasificador de partículas;

la Fig. 116 es un diagrama esquemático de un sistema de suministro de fluidos para un clasificador multi-canal;

las Fig. 117 y 118 son diagramas esquemáticos de dos diferentes sistemas divisores del haz láser;

las Fig. 119 y 120 son vistas en perspectiva de otro sistema multi-canal;

las Fig. 121-134 muestran resultados gráficos de diversos experimentos;

la Fig. 135 es un diagrama esquemático de un sistema de boquilla donde la boquilla dirige la corriente de fluido a través de un tubo capilar;

la Fig. 136 es un diagrama esquemático de un sistema de clasificación por foto deterioro;

la Fig. 137 es un diagrama esquemático de un sistema de clasificación alternativo basado en conmutación fluidica; y

la Fig. 138 es un diagrama esquemático de un sistema de clasificación alternativo basado en una corriente de interferencia de gotitas de alta velocidad que desvía segmentos concretos seleccionados de la corriente de fluido que porta las partículas analizadas.

Partes correspondientes se designan por números de referencia correspondientes en todos los dibujos. Lo siguiente es una lista de partes con los números de referencia asociados para cada parte. La lista de partes se proporciona con encabezamientos de sección que corresponden en general con los encabezamientos de sección en la memoria descriptiva para facilitar el uso de la lista de partes. Generalmente, cada sección de la lista de partes proporciona un número de referencia para las partes que se introducen por primera vez en la sección correspondiente de la descripción detallada.

Lista de partes con números de referencia asociados para cada parte

Resumen general

39	Recogida de semen
41	Marcaje del semen
41A	Adición de tampón
43	Control de calidad
47	Lavado
48	Fluido de tinción
49	Tinción
51	Incubación
53	Carga en el dispositivo de introducción de muestra del citómetro de flujo
54	Adición de fluido envolvente a través de citometría de flujo
55	Clasificación

	57	Recogida de esperma clasificado
	58A	Adición de fluido de recogida
	58B	Concentración de células espermáticas
	58C	Adición de criodiluyente
5	59	Carga del esperma clasificado en pajitas
	61	Crioconservación
	63	Envasado en nitrógeno líquido
	65	Distribución
	67	Venta
10	69	Almacenamiento
	71	Inseminación artificial

Citometría de flujo

15	1	Sistema (global)
	3	Suministro de fluido portador
	7	Suministro de fluido envolvente
	9	Aparato de citometría de flujo que tiene capacidades de clasificación
	15	Sistema de suministro de fluidos
20	17	Fluido portador
	19	Fluido envolvente
	21	Corriente de Fluido
	23	Corriente de Partículas
	25	Haz de radiación electromagnética
25	31	Emisión de radiación electromagnética desde las partículas
	33	Gotitas
	35	Partículas contenidas en las Gotitas

Aparato de citometría de flujo (un canal)

30	101	Sistema de boquilla
	103	Orificio de la boquilla
	105	Transductor
	107	Rotura de gotitas
35	109	Sistema óptico
	115	Localización de examen
	117	Fotodetector
	119	Sistema de clasificación
	123	Primer grupo o población diferente de gotitas
40	125	Segundo grupo o población diferente de gotitas
	2201	Sistema de recogida
	131	Procesador

Sistema de boquilla

45	133	Cuerpo de flujo cilíndrico
	135	Orificio longitudinal central
	137	Boquilla
	139	Cuerpo de boquilla con forma de embudo
50	141	Paso a través del cuerpo de boquilla
	145	Escariador con rosca interna
	149	Proyección o pasador roscado
	155	Sellamiento de junta tórica
	157	Conducto (aguja tubular)
55	167	Espacio anular (hueco)
	173	Orificio radial en el cuerpo de flujo (fluido envolvente)
	183	Segundo orificio radial (fluido envolvente adicional)
	189	Núcleo central del fluido portador
	191	Envoltura co-axial externa de fluido

Orientación de las células

	201	Célula espermática bovina
	205	Cabeza con forma de pala
65	207	Caras opuestas completamente planas
	209	Bordes estrechos

	211	Ecuador del esperma
	213	Núcleo
	215	Cola
	217	Longitud del núcleo
5	219	Longitud de la cabeza
	221	Anchura de la cabeza
	223	Longitud global
	225	Región localizada dentro del núcleo
	227	Dirección del flujo de la corriente
10	229	Envoltura angular en que el haz de luz impacta una cara amplia
	R1	Intervalo angular
	P	Plano

Diseño de la boquilla

15	231	Interior del cuerpo de boquilla
	233	Superficie interior del cuerpo de boquilla
	235	Primera región axialmente ahusada
	237	Segunda región axialmente ahusada
20	239	Tercera región axialmente ahusada
	247	Eje longitudinal de la boquilla
	249	Cuarta región interior de la boquilla
	251	Longitud axial de la cuarta región
	255	Miembro con orificio calibrado
25	257	Escariador en el Extremo frontal de la boquilla
	259	Primera zona de torsión
	261	Segunda zona de torsión
	263	Superficie de la primera zona de torsión
	267	Superficie de la segunda zona de torsión
30	271	Fuerzas de torsión
	273	Longitud axial de la primera zona de torsión
	275	Longitud axial de la primera región ahusada
	277	Longitud axial de la segunda región ahusada
	279	Longitud axial de la segunda zona de torsión
35	309	Superficie ascendente cónica del miembro con orificio calibrado
	315	Superficie descendente cilíndrica del miembro con orificio calibrado
	317	Longitud axial de la superficie ascendente cónica
	327	Longitud axial de la superficie descendente

Deflector de orientación

	2001	Deflector de orientación
	2003	Placa deflectora
	2005	Soporte de deflector
45	2007	Pata ascendente
	2009	Pata descendente
	2015	Línea de intersección
	2017	Eje central del cuerpo de boquilla
	2019	Borde curvado de la pata ascendente
50	2025	Distancia de la pata inferior que se extiende de forma descendente
	2027	Longitud global del soporte de deflector
	2029	Diámetro exterior del soporte de deflector
	2031	Diámetro interior del soporte de deflector
	2033	Distancia entre la línea de intersección y el centro de la boquilla
55	2035	Extremo corriente arriba del deflector
	2037	Superficie inclinada del soporte de deflector
	2039	Bordes laterales de la pata descendente
	2041	Borde descendente de la pata descendente
	2049	Hueco entre la placa deflectora y el soporte de deflector
60	2051	Superficie interna del soporte de deflector
	2053	Volumen tras la placa deflectora
	2055	Volumen interior de la boquilla
	2057	Eje longitudinal del Soporte de deflector cilíndrico
	2059	Línea a través del Eje principal de la elipse D
65	2061	Distancia entre la Aguja de inyección y el deflector
	2067	Extremo corriente abajo del soporte de deflector

	2069	Puntos de contacto entre el soporte de deflector y la boquilla
	2071	Juntas tóricas
	2077	Extremo corriente abajo del porta-boquillas (saliente)
	2079	Diámetro interior del saliente
5	2081	Parte de fluido envolvente entre la corriente central y la superficie de boquilla
	2087	Sección transversal corriente arriba (A)
	2089	Sección transversal en el deflector (B)
	2091	Sección transversal en el deflector (C)
	2093	Sección transversal en el deflector (D)
10	2094	Sección transversal corriente abajo del deflector (E)
	2097	Sistema deflector perpendicular
	2095	Burbuja de aire
	2099	Placa deflectora perpendicular
	2101	Borde curvado de la placa deflectora perpendicular
15	2103	Borde recto de la placa deflectora perpendicular
	2105	Junta tórica
	2107	Tope anular (plataforma) en la boquilla
	2109	Diámetro exterior de la aguja de inyección de muestra (conducto)
	2151	Sistema de boquilla que tiene un conducto de introducción de muestra desplazado

20

Montaje y ajuste de la boquilla

	331	Montura de boquilla
	333	Primera fase lineal
25	337	Segunda fase lineal
	339	Eje X
	341	Eje Y
	343	Tercera fase de rotación
	345	Eje Z
30	347	Miembro de primera fase fijo (no mostrado)
	349	Armazón para el Miembro de primera fase fijo
	355	Miembro de primera fase móvil
	357	Accionador (micrómetro) para la primera fase
	359	Miembro de segunda fase fijo
35	361	Miembro de segunda fase móvil
	363	Accionador (micrómetro) para la segunda fase
	365	Miembro de tercera fase fijo
	371	Miembro de tercera fase móvil
	373	Accionador (micrómetro) para la tercera fase
40	375	Dirección generalmente ascendente de la corriente que contiene células
	377	Ángulo de dirección ascendente

Transductor y formación de gotitas

45	379	Collarín
	381	Elemento piezoeléctrico (no mostrado)
	383	Terminales
	D	Diámetro de corriente

50 Detector de rotura

	389	Detector de rotura
	391	Microprocesador
	393	Fuente de luz
55	395	Fotoserie lineal (fotodiodos)
	401	Lente para el detector de rotura de gotitas
	405	Circuitos op-amp de corriente a voltaje
	407	Amplificadores de seguimiento/retención
	409	Generador de onda sinusoidal (señal de seguimiento/retención)
60	411	Convertor A/D
	412	Sistema de cámara
	413	Luz estroboscópica
	414A	Rejilla
	414B	Abertura con forma de ranura en la rejilla

65

Sistema óptico de epi-iluminación

	415	Sistema de epi-iluminación
	417	Instrumento de epi-iluminación
5	419	Eje óptico longitudinal
	425	Punto de iluminación
	427	Eje del haz de iluminación enfocado
	429	Base rectangular
	431	Filtro reflectante
10	435	Láser o lámpara de arco
	437	Ensamblaje de lente de acondicionamiento
	439	Abertura de entrada
	441	Pared lateral de una cámara dicroica
	443	Cámara dicroica
15	445	Arandela de retención
	447	Filtro de densidad neutra
	449	Lente cilíndrica
	455	Sostén de lente
	457	Contratuerca
20	459	Sección transversal elíptica del punto de iluminación
	461	Abrazaderas para el filtro reflectante
	463	Porta-filtros
	465	Cara angular del porta-filtros
	467	Aberturas en el porta-filtros
25	469	Fase lineal para el porta-filtros
	471	Eje X
	473	Larguero de soporte
	475	Accionador para la fase lineal
	477	Filtro dicroico
30	479	Abrazaderas para el filtro dicroico
	485	Armazón para el filtro dicroico
	487	Dirección de avance
	489	Eje óptico longitudinal del instrumento óptico
	491	Ensamblaje de lente de enfoque
35	497	Forma de onda de pulso fluorescente o señal emitida por la célula
	498	Función espacial de excitación
	501	Adaptador de microscopio
	503	Abertura en la pared frontal de la cámara dicroica
	505	Pared frontal de la Cámara dicroica
40	507	Tubo de enfoque
	509	Tubos de montaje de lente
	511	Lente de enfoque
	513	Dirección de retroceso
	515	Ajuste de enfoque telescópico
45	517	Luz emitida colimada
	519	Sistema de filtración
	521	Filtro de emisión
	523	Porta-filtros de emisión
	525	Abertura en la pared posterior de la cámara dicroica
50	527	Pared posterior de la cámara dicroica
	529	Ensamblaje de película de alineación
	531	Deslizador de la película de alineación
	533	Riel para los componentes del ensamblaje de filtro
	535	Porta-filtros para la película de alineación
55	539	Elemento de filtro de película
	541	Sujeciones para fijar el elemento de filtro al porta-filtros
	543	Ángulo para la película de alineación relativo al eje óptico
	545	Sujeciones para fijar el deslizador a la base
	547	Muecas paralelas en la base
60	549	Lente asférica
	551	Soporte para la lente asférica
	553	Armazón para la lente asférica
	557	Sujeciones para la lente asférica
	559	Filtro espacial
65	561	Placas de apertura
	563	Armazón para las placas de filtro espacial

	567	Ranura vertical
	571	Ranura horizontal
	573	Apertura
	575	Dimensión vertical
5	577	Dimensión horizontal
	579	Volumen de recogida
	583	Porta-placas
	587	Sujecciones para el porta-placas
	589	Miembro de refuerzo para las placas de apertura
10	449A	Ensamblaje de montaje ajustable
	449B	Muescas
	449C	Muescas
	450	Epi-iluminación que refleja emisiones de fluorescencia
	451	Filtro dicroico
15		<u>Fotodetector</u>
	591	Placa de montaje para el fotodetector
	595	Sujecciones para el fotodetector
20		<u>Ángulo de incidencia del haz</u>
	605	Distancia entre la localización de examen y el orificio de la boquilla
	609	Eje del haz
	A	Ángulo de incidencia
25		<u>Punto de iluminación enfocado</u>
	L1	Longitud a lo largo del eje principal
	W1	Anchura a lo largo del eje menor
30		<u>Sistema de clasificación</u>
	627	Dispositivo de carga
	629	Placas deflectoras cargadas
35	631	Elemento de carga
	633	Abertura en el elemento de carga
	635	Suministro de energía para las placas deflectoras
	5001	Ensamblaje de montaje ajustable
	5003	Cuadro de ajuste del ensamblaje de montaje
40	5005	Refuerzo del ensamblaje de montaje
	5007	Sujecciones
	5009	Muescas
	5011	Eje de traslado
	5013	Eje de traslado
45	5015	Cuadro de ajuste del ensamblaje de montaje
	5017	Sujecciones
	5019	Muescas
	5021	Soporte fijo
	5023	Sujecciones
50	5025	Resorte
		<u>Calibración de clasificación automatizada</u>
	4201	Sistema de calibración
55	4203	Detector de epi-iluminación
	4205	Cable de fibra óptica
	4207	Filtro dicroico
	4209	Sistema de lente
	4211	Emisión fluorescente desde partículas en las gotitas
60	4213	Fotodetector
	4215	Captador de haz
		<u>Corrección de fallos del sistema de clasificación</u>
65	5047	Sistema de eliminación de desechos para el elemento de carga
	5049	Sistema de eliminación de desechos para las placas deflectoras

	5051	Soporte para el elemento de carga
	5053	Conducto de vacío
	5055	Línea de vacío
	5057	Abertura adyacente al elemento de carga
5	5058	Conector
	5059	Línea de gas comprimido
	5061	Colector
	5063	Conductos de aire
	5064	Aberturas
10	5065	Conector
	5066	Lateral de la placa deflectora

Protección de la muestra clasificada

15	4033	Recipiente de recogida
	4041	Mecanismo de prevención de contaminación
	4043	Accionador neumático
	4045	Brazo oscilante
	4047	Extremo del brazo oscilante

20

Sistema de suministro de fluidos

	645	Bomba de jeringa
	647	Línea de flujo desde la bomba hasta el suministro de fluido portador
25	649	Recipiente para contener el suministro de fluido portador
	651	Línea desde la bomba hasta la aguja de inyección
	657	Línea de suministro desde la bomba de jeringa hasta la aguja
	659	Motor de velocidad variable
	661	Segundo recipiente para suministro de fluido envolvente
30	667	Línea de suministro para conectar el fluido envolvente al orificio radial en la boquilla
	669	Válvula de control en la línea de suministro
	671	Sistema de presión de gas para el fluido envolvente
	675	Fuente de gas presurizado
	679	Línea de aire para el gas presurizado
35	681	Regulador para controlar la presión suministrada al tanque de fluido envolvente
	683	Válvula de dos direcciones en la línea de aire

Control

40	689	Conversor A/D
	693	Intensidad relativa del haz experimentada por un punto que se mueve a través del punto de iluminación
	695	Intensidad relativa del pulso emitido desde el esperma que cruza el punto de iluminación
	d	Distancia entre la boquilla y la localización de rotura de gotitas

Procesamiento de la señal

	701	Señal de salida desde el fotodetector
	703	Señales del oscilador de generación de gotitas
	705	Procesamiento de la señal digital (Analizador digital de células)
50	707	Señal digital desde el A/D
	735	Terminal de PC/ordenador
	737	Reloj maestro (Señal sincronizada 128 x)
	739	Adquisición de datos (HH1')
	741	Parámetros de detección de inicialización (HH1)
55	745	Parámetros de discriminación de inicialización (HH2)
	747	Detección de pulso digital (HH3)
	749	Análisis de pulso digital - extracción de características (HH4)
	753	Área de pulso (HH5)
	755	Pico de pulso (HH6)
60	757	Discriminación de pulso (HH7)
	759	Clasificación (HH8)
	761	Análisis de desviación (HH9)
	763	Límite de decisión para las reglas de Bayes
	769	Inicializar
65	771	Comprobación del sistema
	773	Interacción del usuario

	775	Reintento (hasta tres veces)
	777	Descarga
	779	Control de calidad de las gotas
	781	Aspirar la muestra
5	783	Control de calidad de la muestra
	785	Inicio de la muestra
	787	Activar clasificación
	789	Muestra completa
	791	Continuación de la muestra
10	793	Desactivar clasificación
	795	Óptimo de discriminación X/Y
	797	Establecer discriminación X/Y
	799	Discriminación correcta
	801	Óptimo de velocidad
15	803	Establecer velocidad de jeringa
	805	Velocidad correcta
	807	Comprobación del sistema
	809	Reajuste del sistema
	811	Sistema correcto
20	813	Flujo funcionamiento global ejemplar
	825	Integrador
	827	Comparador anchura/área
	829	Calculador de umbral dinámico
	831	Discriminación de pulso
25	833	I/O de puerto JTAG
	837	Comparador de ventana (área)
	839	Anchura de pulso y circuito lógico activador
	841	Decisión de clasificación
	843	Controladores de I/O
30	845	Controladores auxiliares
	847	Placa del controlador de clasificación
	849	USB
	851	SDRAM de placa DSP
	853	Señal de clasificación
35	854	Filtro de paso bajo
	855	SDRAM de placa I/O
	857	I/O de procesador
	859	Bus I/O periférico
	861	Generador de pulsos de clasificación
40	863	Procesador de tratamiento de datos
	865	Procesador de detección de pulsos
	867	Procesador de extracción de características
	873	Procesador de clasificación
	875	RAM de placa DSP
45	OL	Relación inversa entre gotitas coincidentes en población utilizable en comparación con gotitas coincidentes en población no utilizable
	P1	Punto en la Línea OL correspondiente a pureza del 85%
	LL	Punto en la línea OL correspondiente a recogida del 60% de las partículas deseadas
	OR	Rango operativo (segmento de OL entre P1 y LL)
50	6000	Datos sin procesar
	6001	1ª Población de células no alineadas
	6003	2ª Población de células no alineadas
	6005	Población Y alineada
	6007	Población X alineada
55	6010	Datos sin procesar
	6011	Población de células no alineadas
	6015	Población Y alineada
	6017	Población X alineada
	<u>Sistema multi-canal</u>	
60	1001	Sistema multi-canal
	1003	Unidades de citometría de flujo
	1005	Suministro común de partículas
	1007	Fuente común de Radiación electromagnética
65	1009	Carcasa común
	1011	Entrada común para control

	1019	Salida común
	1021	Sistema común de suministro de fluidos
	1023	Sistema común de control de temperatura
	1025	Fuente común de energía
5	1027	Sistema común de recuperación de residuos
	1029	Sistema común de placa deflectora
	1031	Sistema común de limpieza

Carcasa común

10	1069	Base
	1071	Dos paredes laterales
	1073	Par inferior de topes
	1075	Panel de cubierta inferior
15	1077	Frontal de la carcasa
	1081	Par superior de topes
	1083	Panel de cubierta superior
	1085	Parte posterior de la carcasa
	1087	Armazón para el montaje de múltiples unidades de citometría
20	1089	Travesaño fijado a las paredes laterales de la carcasa (para fijar la montura de boquillas)
	1093	Placa de montaje inclinada que se extiende entre las paredes laterales

Suministro común de fluido

25	1105	Bomba para el fluido portador
	1107	Suministro común de fluido portador
	1115	Sistema de presión de gas para el fluido envolvente
	1117	Suministro común de fluido envolvente
	1121	Sistema colector
30	1123	Recipiente que contiene el suministro común de fluido portador
	1125	Soporte para el recipiente
	1133	Bloque de soporte
	1135	Cavidad para recibir el recipiente
	1137	Segunda cavidad para material tamponante
35	1139	Recipiente para material tamponante
	1141	Bomba de jeringa
	1147	Línea de suministro desde la bomba de jeringa hasta el colector
	1149	Válvula de desvío que controla el fluido portador y tamponante
	1155	Recipiente para el suministro común de fluido envolvente
40	1157	Línea de suministro desde el recipiente de fluido envolvente hasta el colector
	1161	Fuente de gas presurizado
	1163	Línea de gas
	1165	Regulador en la línea de gas
	1167	Válvula de dos direcciones para la línea de gas entre la fuente de gas y el tanque de fluido envolvente
45	1169	Línea de gas para presurizar un suministro de solución de limpieza
	1173	Tanque para la solución de limpieza
	1175	Válvula de dos direcciones para la línea de gas para la solución de limpieza
	1177	Colector
	1179	Bloque laminado
50	1181	Conductos
	1185	Círculo de flujo de fluido
	1189	Entradas conectadas a la bomba de jeringa
	1191	Entradas conectadas al suministro de fluido envolvente
	1193	Salidas para el fluido portador y el fluido envolvente
55	V1-V6	Válvulas para controlar el flujo a través de los conductos del colector
	1203	Miembro de armazón (para fijar el bloque colector)
	1205	Conectores roscados en bloque
	1207	Depósito de muestra
	V1A-V1D	Válvulas de dos direcciones (para controlar el flujo de fluido de muestra hasta las boquillas)
60	1217	Aguja del depósito de muestra
	1221	Sistema de residuos
	1223	Tanque de residuos (receptáculo)
	1225	Mecanismo tal como bomba de vacío (para generar vacío)
	1227	Líneas de residuos (que conectan las válvulas V1A-V1D al tanque de residuos)
65	1233	Filtro hidrófobo (en la línea que conecta el tanque de residuos y la bomba de vacío)
	1235	Círculo fluido para el fluido envolvente

V2A-V2D Válvulas de dos direcciones (para controlar el flujo de fluido envolvente a las boquillas)

1241 Línea de suministro de envolvente

1247 Líneas de residuos que conectan el circuito de flujo de fluido envolvente al tanque de residuos

5 Suministro común de energía y controles

1249 Suministro común de energía

1251 Sistemas comunes de suministro de energía

1253 Entrada común (GUI)

10 1255 Salida común (al microprocesador)

Control común de la temperatura

1257 Sistema de control de la temperatura

15 1259 Circuito de flujo de fluido (para control de la temperatura)

1263 Conductos de fluido (para el control de la temperatura en el bloque de soporte)

1265 Unidad de control

1269 Conductos de fluido (para el control de la temperatura en el colector)

V6 Válvula de retención

20

Haz de luz común y sistema divisor del haz

1270 Divisor del haz

1270A Primer haz desde el divisor del haz

25 1270B Segundo haz desde el divisor del haz

1271 Segundo divisor del haz

1271A Primer haz desde el segundo divisor del haz

1271B Segundo haz desde el segundo divisor del haz

1272 Tercer divisor del haz

30 1272A Primer haz desde el tercer divisor del haz

1272B Segundo haz desde el tercer divisor del haz

1273 Sistema de guía del haz

1279 Ensamblaje de filtro inferior

1281 Ensamblaje de espejo superior

35 1285 Base (para el ensamblaje de filtro inferior)

1289 Fase (para el ensamblaje de filtro inferior)

1291 Mecanismo para mover la fase (micrómetro)

1293 Plataforma basculante en la fase

1295 Espejo (en la plataforma)

40 1297 Base (para el ensamblaje de espejo superior)

1299 Fase (para el ensamblaje de espejo superior)

1301 Plataforma basculante (para el ensamblaje de espejo superior)

1303 Espejo (para el ensamblaje de espejo superior)

1305 Mecanismo para mover la Fase superior

45 1309 Placas de puntería (fijadas a la pared lateral de la carcasa)

1311 Orificios alineados de forma vertical (en las placas de puntería)

1315 1^{er} filtro reflectante

1317 2^o filtro reflectante

1319 3^{er} filtro reflectante

50 1321 4^o filtro reflectante

Placas deflectoras comunes

1331 Dos placas deflectoras comunes

55 1333 Armazón (para el montaje de las placas deflectoras comunes en la carcasa)

Sistema multi-canal modular

4001 Sistema multi-canal

60 4009 Unidad de citometría modular

4011 Alojamiento para la unidad modular

4013 Carcasa común

4015 Láser

4017 Sistema divisor y de guía del haz

65 4021 Orificio para que el láser entre en el alojamiento modular

4023 Placa para cubrir el orificio de salida

4025 Sistema de recogida para el sistema

Sistema de boquilla de tubo capilar

- 5 1335 Sistema de boquilla de tubo capilar
- 1337 Tubo capilar
- 1341 Cámara llena con medio transmisor de luz

Sistemas alternativos de clasificación

- 10 1351 Sistema de clasificación de foto deterioro
- 1353 Segundo láser
- 1355 Receptáculo de recogida
- 1357 Sistema de derivación de fluido
- 15 1359 Dispositivo de derivación de fluido
- 1361 Derivación capilar hasta el primer recipiente de recogida
- 1365 Derivación capilar hasta el segundo recipiente de recogida
- 1367 Transductor (para crear ondas de presión para controlar de forma selectiva la dirección del flujo de fluido)
- 1369 Tubo capilar en el extremo de la boquilla
- 20 1371 Sistema de clasificación de corriente de interferencia de gotitas
- 1373 Corriente de interferencia de gotitas de alta velocidad
- 1375 Sistema de generación de gotitas para la corriente de gotitas de alta velocidad
- 1377 Sistema de boquilla de alta velocidad
- 1379 Corriente de fluido de alta velocidad
- 25 1381 Transductor para la generación de corriente de interferencia de gotitas
- 1383 Gotitas de alta velocidad
- 1387 Placa deflectora eléctrica para la desviación de gotitas de alta velocidad
- 1389 Gotitas no cargadas
- 1391 Gotitas cargadas
- 30 1397 Segmento desviado de la corriente de fluido
- 1399 Intersección de la corriente de gotitas de alta velocidad con la corriente de fluido coaxial
- 1403 Capilares de recogida

Sistema de recogida

- 35 2201 Sistema de recogida
- 2203 Dispositivo de intercepción
- 2205 Superficie de impacto
- 2207 Recipiente de recogida
- 40 2211 Entrada de gotitas
- 2213 Depósito de pipeta
- 2215 Pipeta
- 2217 Pared interior de la pipeta
- 2225 Tubo guía
- 45 2227 Armazón del sistema de recogida
- 2229 Soporte circular
- 2231 Tornillo fijador para la altura del dispositivo de intercepción
- 2233 Placa de montaje
- 2235 Tornillos fijadores para el ajuste lateral
- 50 2241 Muesca lateral
- 2243 Bandeja para alojar los recipientes de recogida
- 2245 Ventana de salida
- 2247 Primer dispositivo de intercepción
- 2249 Segundo dispositivo de intercepción
- 55 2265 Gotitas dispersas

Fluido de recogida

- 2301 Fluido de recogida

60 Filtración

- 2401 Filtro
- 2403 Recipiente de recogida para filtración
- 65 2405 Suspensión concentrada que contiene células espermáticas
- 2409 Mecanismo de jeringa

- 2411 Filtro de cánula
- 2413 Fluido de resuspensión
- 2419 Segundo recipiente
- 2421 Jeringa para experimento de filtración
- 5 2423 Muestra para experimento de filtración
- 2425 Filtro para experimento de filtración
- 2427 Bomba de vacío para experimento de filtración
- 2431 Jeringa para experimento de filtración II
- 2433 Muestra para experimento de filtración II
- 10 2435 Filtro para experimento de filtración II
- 2437 Porta-filtros para experimento de filtración II

Crioconservación

- 15 2501 Ajustar la concentración
- 2503 Añadir crioprotector
- 2505 Añadir fuente de proteína
- 2507 Cargar en las pajitas
- 2509 Refrigerar hasta la temperatura de mantenimiento
- 20 2511 Mantener a temperatura de mantenimiento
- 2513 Refrigerar hasta temperatura próxima a la zona crítica
- 2515 Refrigerar a través de un intervalo de formación de cristales de hielo
- 2517 Sumergir en nitrógeno líquido

25 Sistema común de recogida

- 2801 Sistema común de recogida
- 2803 Armazón común para dispositivos de intercepción
- 2805 Cuba de residuos
- 30 2807 Bandeja para los recipientes de recogida

Sistema de láser pulsado

- 3001 Láser pulsado
- 35 3003 Detector de pulso de láser
- 3005 Pulso de láser
- 3007 Extinción de la vida del pulso de fluorescencia
- 3009 Muestra digital

40 **Descripción detallada de las realizaciones**

La realización de la presente invención se refiere a un sistema y método para la clasificación de células espermáticas X e Y.

45 **Resumen general**

- La Figura 1 es un diagrama de flujo de trabajo que proporciona una visión global de las etapas en un proceso de clasificación de espermatozoides ejemplar. El proceso empieza con la recogida de muestras puras de semen de uno o más animales macho (por ejemplo, toros) en la etapa 39. Las muestras de semen se marcan para su identificación en la etapa 41, se ponen en contacto con un tampón, en la etapa 41A y se transportan a una instalación de procesamiento. Además del tampón, también pueden añadirse aditivos en la etapa 41A, incluyendo, por ejemplo, una fuente de energía, una fuente de proteínas, un antibiótico, y/o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular. Puede realizarse un ensayo opcional de control de calidad en la etapa 43 para asegurar que la calidad de cada muestra (por ejemplo, motilidad del espermatozoides) es suficiente para indicar que el producto final probablemente cumplirá los criterios mínimos de calidad. Puede realizarse una etapa opcional de lavado en la etapa 47. En la etapa 47A se selecciona el protocolo de tinción que se usará para el procesamiento usando diversos protocolos de tinción para teñir alícuotas de la muestra y después analizando la capacidad de clasificación de cada alícuota para identificar un protocolo de tinción para esa muestra particular. La tinción de acuerdo con el protocolo de tinción seleccionado se realiza en la etapa 49 añadiendo un fluido de tinción
- 50 48 que contiene un colorante químico (por ejemplo, un colorante fluorescente ADN selectivo) a cada muestra. Además del fluido de tinción, también pueden añadirse aditivos en la etapa 48, incluyendo, por ejemplo, una fuente de energía, una fuente de proteínas, un antibiótico, y/o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular. Las muestras se incuban en la etapa 51 para permitir la captación del colorante por el espermatozoides. Después se carga una muestra en el dispositivo de introducción de muestra
- 60 de un citómetro de flujo en la etapa 53. El fluido de muestra se introduce en el citómetro de flujo junto con un fluido envolvente en la etapa 54. Además del fluido envolvente, también pueden añadirse aditivos en la etapa 54,
- 65

incluyendo, por ejemplo, una fuente de energía, una fuente de proteínas, un antibiótico, y/o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular. En la etapa 55 el citómetro de flujo clasifica las células espermáticas de acuerdo con una característica de ADN especificada, como se describirá a continuación. Según se recogen las células espermáticas clasificadas por el sistema de recogida del citómetro de flujo en la etapa 57, se añaden a un recipiente de recogida que contiene un fluido de recogida o criodiluyente en la etapa 58A. Además del fluido de recogida, también pueden añadirse aditivos en la etapa 58A, incluyendo, por ejemplo, una fuente de energía, una fuente de proteínas, un antibiótico, y/o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular. En este momento las células espermáticas están en una solución que se ha diluido por los diversos fluidos añadidos durante todo el proceso. Por consiguiente, la población de células espermáticas que tienen la característica de ADN deseada se concentran en la etapa 58B para su uso en inseminación artificial comercial. Se añade un criodiluyente a las células espermáticas clasificadas concentradas en la etapa 58C. Además del criodiluyente, también pueden añadirse aditivos en la etapa 58C, incluyendo, por ejemplo, una fuente de energía, una fuente de proteínas, un antibiótico, y/o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular. Las células espermáticas entonces se envasan en recipiente tubulares (mencionados en la industria reproductiva como "pajitas") en la etapa 59 y se crioconservan en la etapa 61. El esperma crioconservado se envasa para su almacenamiento en nitrógeno líquido en la etapa 63. El esperma crioconservado después se distribuye a través de un sistema de distribución comercial en la etapa 65 y se vende a criadores de animales en la etapa 67. Los criadores de animales pueden almacenar el esperma crioconservado en la etapa 69 hasta que estén listos para usar el esperma para inseminar de forma artificial un animal hembra (por ejemplo, vaca) en la etapa 71.

Recogida y dilución de muestras

Recogida de muestras

La muestra de esperma a clasificar puede ser una muestra recién recogida de un animal fuente, tal como una fuente bovina, equina, porcina, u otra fuente mamífera, o una muestra descongelada previamente crioconservada. Además, la muestra puede ser un único eyaculado, múltiples eyaculados combinados del mismo mamífero, o múltiples eyaculados combinados de dos o más animales.

Se conocen diversos métodos de recogida e incluyen el método de la mano enguantada, el uso de una vagina artificial, y electro-eyaculación. El esperma preferiblemente se recoge o se transfiere rápidamente en un recipiente aislado para evitar un rápido cambio de temperatura desde las temperaturas fisiológicas (típicamente aproximadamente de 35°C a aproximadamente 39°C). El eyaculado típicamente contiene de aproximadamente 0,5 a 15 billones de esperma por mililitro, dependiendo de la especie y animal particular.

Independientemente del método de recogida, puede extraerse una alícuota de la muestra de esperma y evaluarse para diversas características, tales como por ejemplo, concentración de esperma, motilidad del esperma, motilidad progresiva del esperma, pH de la muestra, integridad de la membrana del esperma, y la morfología del esperma. Estos datos pueden obtenerse por examen del esperma usando, por ejemplo, el analizador de motilidad de Hamilton-Thorn (IVOS), de acuerdo con procedimientos convencionales y bien conocidos (véase, por ejemplo, Farrell et al. *Theriogenology* (1998) 49 (4): 871-9; y patentes de Estados Unidos N° 4.896.966 y 4.896.967).

Dilución

La muestra de esperma puede combinarse con un tampón (en forma de un sólido o solución) para formar una suspensión de esperma. Entre otras cosas, el tampón puede potenciar la viabilidad del esperma tamponando la suspensión contra cambios significativos en el pH o la presión osmótica. Generalmente, un tampón es no tóxico para las células y es compatible con el colorante usado para teñir las células. Tampones ejemplares incluyen fosfatos, difosfatos, citratos, acetatos, lactatos, y combinaciones de los mismos. Los tampones actualmente preferidos incluyen TCA, TEST, citrato sódico, HEPES, TL, TES, ácido cítrico monohidrato, HEPEST (Gradipore, St. Louis, MO), PBS (Johnson et al., *Gamete Research*, 17: 203-212 (1987)), y PBS de Dulbecco (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Pueden combinarse uno o más tampones juntos o con aditivos como se analiza a continuación para formar una solución tamponada, y la solución tamponada puede combinarse con la muestra de esperma para formar una suspensión de esperma. Una solución tamponada también puede contener uno o más aditivos, como se describe en mayor detalle a continuación. Se describen soluciones tamponadas ejemplares en la Tabla I. Las soluciones tamponadas preferidas incluyen una solución que comprende base TRIS al 3%, ácido cítrico monohidrato al 2%, y fructosa al 1% (p/v) en agua a un pH de aproximadamente 7,0, una solución denominada como TCA n° 1 en la Tabla I, y una solución denominada como TCA n° 2 en la Tabla I.

TABLA I. Soluciones tamponadas

COMPONENTES	TCA nº 1	TCA nº 2	ENSAYO	Citrato Na	HEPES	TL
Cloruro sódico (NaCl)					7,6 g	5,84 g
Cloruro potásico (KCl)					0,3 g	0,23 g
Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)						2,1 g
Fosfato sódico monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)						0,04 g
Ácido (+)-2-hidroxipropiónico (Lactato Na)						3,68 ml
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)					0,1 g	0,08 g
Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES)					2,38 g	2,38 g
Tris(hidroximetil) amimonetano (TRIS base)	30,3 g	32,02 g	10,28 g			
Ácido cítrico monohidrato	15,75 g	18,68 g				
Citrato Na dihidrato				29 g		
Ácido 2-[(2-hidroxil-1,1-bis(hidroximetil)etil) aminoetanosulfónico (TES)			43,25 g			
Fructosa	12,5 g	2,67 g		10 g	2,52 g	
D-Glucosa			2 g			
Estreptamicina			0,25 g			
Penicilina-G			0,15 g			
Agua	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro
pH diana	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35
Osmolalidad diana (miliosmol/kg H ₂ O)	~314	~300	~302	~316	~298	~296

Como alternativa, el esperma puede combinarse con un inhibidor metabólico para formar una suspensión de esperma inhibido. Los inhibidores metabólicos causan que las células espermáticas emulen a las células espermáticas del epidídimo de un mamífero, tal como por ejemplo un toro, simulando el entorno fluido del epidídimo o el tracto epididimario del mamífero. Dicho inhibidor reduciría o inhibiría la motilidad y actividad metabólica del esperma. Los inhibidores ejemplares de esta clase incluyen inhibidores basados en carbonato, tales como por ejemplo aquellos descritos en Salisbury y Graves, J. Reprod. Fertil., 6: 351-359 (1963). Un inhibidor preferido de este tipo comprende NaHCO₃, KHCO₃, y C₆H₈O₇·H₂O. Un inhibidor más preferido de este tipo comprende 0,204 g de NaHCO₃, 0,433 g de KHCO₃, y 0,473 g de C₆H₈O₇·H₂O por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de NaHCO₃, 0,173 moles/l de KHCO₃, 0,090 moles/l y C₆H₈O₇·H₂O en agua).

Además de un tampón, la suspensión de esperma también puede contener un intervalo de aditivos para potenciar la viabilidad o motilidad del esperma. Aditivos ejemplares incluyen fuentes de energía, fuentes de proteínas, antibióticos, y composiciones que regulan las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular. Puede introducirse uno o más de estos aditivos en el tampón o solución tamponada antes de la formación de la suspensión de esperma o, como alternativa, pueden introducirse por separado en la suspensión de esperma.

Puede añadirse una o más fuentes de energía para minimizar o inhibir que las células espermáticas oxiden los fosfolípidos intracelulares y otros componentes celulares. Fuentes de energía ejemplares incluyen monosacáridos, tales como fructosa, glucosa, galactosa y manosa, y disacáridos, tales como sacarosa, lactosa, maltosa, y trehalosa, así como otros polisacáridos. Por ejemplo, la suspensión de esperma resultante puede incluir de aproximadamente un 1% (p/v) a aproximadamente un 4% (p/v) de la fuente o fuentes de energía. Si se incluye, la fuente de energía es preferiblemente fructosa y la suspensión de esperma contiene aproximadamente un 2,5% (p/v).

Para minimizar el impacto de la dilución, proporcionar soporte a las células, o dispersar las células por toda la suspensión, también puede incluirse una fuente de proteínas en el tampón, solución tamponada, o suspensión de esperma. Las fuentes de proteínas ejemplares incluyen yema de huevo, extracto de yema de huevo, leche (incluyendo homogeneizada por calor y desnatada), extracto de leche, proteína de soja, extracto de proteína de soja,

albúmina sérica, albúmina sérica bovina, suplemento sustituto de suero humano, y combinaciones de los mismos. La albúmina, y más particularmente la albúmina sérica bovina (BSA), es una fuente preferida de proteínas. Por ejemplo, si se incluye, la BSA puede estar presente en la suspensión de esperma en una cantidad de menos de aproximadamente el 5,0% (p/v), preferiblemente menos de aproximadamente el 2% (p/v), más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% (p/v), y mucho más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente el 0,1% (p/v).

El uso de una fuente de proteínas, tal como BSA, en solitario puede iniciar el proceso de capacitación en un porcentaje de las células espermáticas en la suspensión. Se prefiere que este proceso tenga lugar en el tracto reproductor femenino. Por lo tanto, para inhibir el inicio de la capacitación durante la dilución, así como durante la posterior tinción y clasificación, puede incluirse una fuente alternativa de proteínas o un sustituto proteico en la suspensión de esperma. La fuente alternativa de proteínas o sustituto proteico posee los efectos ventajosos de una fuente típica de proteínas, tal como BSA, además de la capacidad de inhibir el inicio de la capacitación en un porcentaje mayor de las células en la suspensión de esperma. Ejemplos de fuentes alternativas de proteínas incluyen suplemento sustituto de suero humano (SSS) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y BSA potenciador de colesterol, mientras que un ejemplo de un sustituto proteico incluye un alcohol polivinílico, tal como por ejemplo, un alcohol polivinílico de viscosidad baja a media generalmente de un peso molecular de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 60.000. Generalmente, si se incluye, estas composiciones estarán presentes en las mismas cantidades analizadas anteriormente con respecto a BSA, no excediendo generalmente el contenido total de albúmina del tampón o solución tamponada de aproximadamente el 5,0% (p/v).

Puede añadirse un antibiótico a la suspensión de esperma para inhibir el crecimiento bacteriano. Antibióticos ejemplares incluyen, por ejemplo, tilosina, gentamicina, lincomicina, espectinomina, Linco-Spectin® (clorhidrato de lincomicina-espectinomina), penicilina, estreptomina, ticarcilina, o cualquier combinación de los mismos. Los antibióticos pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 800 µg por ml de semen, independientemente de si el semen está puro, tamponado, o contiene sustancias adicionales, tales como por ejemplo, cualquiera de los aditivos mencionados en este documento. Los Certified Semen Services (CSS) y la National Association of Animal Breeders (NAAB) han aprobado directrices respecto al uso de antibióticos con respecto a la recogida y uso de esperma.

También puede incluirse una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular en la suspensión de esperma. Dicha composición puede proporcionar un efecto protector a las células espermáticas, tal como por ejemplo manteniendo la viabilidad o la motilidad progresiva del esperma. Ejemplos de dicha composición incluyen, por ejemplo, piruvato, vitamina K, ácido lipoico, glutatión, flavinas, quinonas, superóxido dismutasa (SOD), y SOD mimicos. Si se incluye en la suspensión de esperma, dicha composición puede estar presente en una concentración suficiente para realizar el efecto protector sin afectar de forma perjudicial a la salud del esperma. Intervalos de concentración ejemplares incluyen de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 50 µM dependiendo de factores tales como la composición particular que se esté usando o la concentración de esperma en la suspensión. Por ejemplo, puede estar presente piruvato en la suspensión de esperma en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, preferiblemente de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 40 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM a 25 mM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 mM a 15 mM, aún más preferiblemente de 15 mM, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 10 mM. Puede estar presente vitamina K en la suspensión de esperma en una concentración de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 100 µM, preferiblemente de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 100 µM, y más preferiblemente de aproximadamente 100 µM. Puede estar presente ácido lipoico en la suspensión de esperma en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1 mM, y más preferiblemente de aproximadamente 1 mM.

Tinción de las células a clasificar

Generalmente, las células espermáticas pueden teñirse formando una mezcla de tinción que comprende células espermáticas, un tampón, y un colorante. Las células espermáticas pueden obtenerse de una muestra de semen recién obtenida, como se ha analizado anteriormente con respecto a la recogida y dilución de muestras, o de una muestra de semen criopreservada descongelada.

Si la muestra de semen es una muestra descongelada previamente criopreservada, el esperma se descongela preferiblemente inmediatamente antes de la tinción. Generalmente, puede colocarse una pajita u otro recipiente de criopreservación que contenga el esperma congelado en un baño de agua, cuya temperatura está preferiblemente en exceso de la temperatura de transición vítrea de la membrana de las células espermáticas (es decir, aproximadamente 17°C), pero no tan elevada como para afectar de forma adversa a la salud del esperma. Por ejemplo, el esperma congelado puede descongelarse sumergiendo el recipiente de criopreservación en un baño de agua mantenido a una temperatura de aproximadamente 17°C a aproximadamente 40°C durante un periodo de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 90 segundos.

Una vez obtenidas, las células espermáticas pueden introducirse en la mezcla de tinción en forma de semen puro o en forma de una suspensión derivada del mismo, por ejemplo, una suspensión de esperma como se ha analizado anteriormente con respecto a la recogida y dilución de muestras.

- 5 El colorante puede estar en forma de un sólido puro o una composición líquida. El colorante también puede disolverse o dispersarse en un líquido no tamponado para formar una solución de colorante. Como alternativa, el colorante puede estar en forma de una suspensión de colorante que comprende un colorante y un tampón o solución tamponada que es biológicamente compatible con las células espermáticas. Se ha analizado anteriormente un intervalo de tampones y soluciones tamponadas ejemplares con respecto a la recogida y dilución de muestras.
- 10 Por ejemplo, entre los tampones que pueden usarse está una solución tamponante TCA que comprende base TRIS al 3%, ácido cítrico monohidrato al 2%, y fructosa al 1% en agua a un pH de aproximadamente 7,0, o una solución inhibidora basada en carbonato que comprende 0,204 g de NaHCO_3 , 0,433 g de KHCO_3 , y 0,473 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua). Por tanto, por ejemplo, puede formarse una mezcla de tinción combinado el semen puro con un colorante.
- 15 Como alternativa, la mezcla de tinción puede formarse combinando semen puro con un tampón o solución tamponada y un colorante. Además, la mezcla de tinción puede formarse combinando una suspensión de esperma con un colorante.

- 20 La mezcla de tinción puede formarse usando uno o más colorantes ADN selectivos excitables por luz UV o visible como se ha descrito previamente en la patente de Estados Unidos Nº 5.135.759 y el documento WO 02/41906. Colorantes selectivos ejemplares excitables por luz UV incluyen Hoechst 33342 y Hoechst 33258, cada uno de los cuales está disponible en el mercado en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Colorante ejemplares excitables por luz visible incluyen SYBR-14, disponible en el mercado en Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) y el conjugado bisbencimida-BODIPY® 6-[[3-((2Z)-2-[[1-(difluoroboril)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il]metileno]-2H-pirrol-5-il)propanoil]amino]-N-[3-(metil{3-[[4-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H,3'H-2,5'-bibencimidazol-2'-il]fenoxi]acetil)amino]propil}amino)propil]hexanamida ("BBC") descrito en el documento WO 02/41906. Cada uno de estos colorantes puede usarse solo o en combinación; como alternativa, pueden usarse otros colorantes excitable por luz UV y visible que penetran en las células, solos o en combinación con los colorantes mencionados anteriormente, con la condición de que el colorante no afecte de forma perjudicial a la viabilidad de las células espermáticas a un grado inaceptable cuando se usa en concentraciones que posibilitan la clasificación como se describe en otra parte.
- 30

- La concentración preferida del colorante ADN selectivo en la mezcla de tinción es una función de un intervalo de variables que incluyen la permeabilidad de las células al colorante seleccionado, la temperatura de la mezcla de tinción, la cantidad de tiempo permitido para que suceda la tinción, y el grado de enriquecimiento deseado en la posterior etapa de clasificación. En general, la concentración de colorante es preferiblemente suficiente para conseguir el grado deseado de tinción en un periodo razonablemente corto de tiempo sin afectar de forma sustancialmente perjudicial a la viabilidad del esperma. Por ejemplo, la concentración de Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYBR-14, o BBC en la mezcla de tinción generalmente será entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1,0 M, preferiblemente de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 700 μM , y más preferiblemente de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 200 μM . Por consiguiente, en una serie de condiciones de tinción, la concentración de Hoechst 33342 es preferiblemente aproximadamente 100 μM . En otra serie de condiciones de tinción, la concentración de Hoechst 33342 es aproximadamente 150 μM . En otra serie más de condiciones de tinción la concentración es preferiblemente aproximadamente 200 μM .
- 35
- 40

- 45 Además del tampón, pueden incluirse otros aditivos en la mezcla de tinción para potenciar la viabilidad o motilidad del esperma; estos aditivos pueden proporcionarse como parte de la fuente de esperma, la fuente de colorante, o por separado a la mezcla de tinción. Dichos aditivos incluyen fuentes de energías, antibióticos, composiciones que regulan las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular, y plasma seminal, las tres primeras de las cuales se han analizado anteriormente con respecto a la recogida y dilución de muestras, y la última de las cuales se analiza a continuación con respecto a los fluidos de recogida. Dichos aditivos pueden añadirse durante las técnicas de tinción de acuerdo con las mismas.
- 50

- En particular, se ha observado que la inclusión de una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular en la mezcla de tinción puede ayudar a mantener la viabilidad del esperma a elevadas temperaturas de tinción, a elevadas concentraciones de colorante, en periodos aumentados de tinción, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de estas composiciones y el uso de las mismas se ha analizado anteriormente con respecto a tampones y diluyentes. Dichas composiciones pueden añadirse durante las técnicas de tinción de acuerdo con las mismas.
- 55

- 60 La mezcla de tinción puede mantenerse a cualquiera entre un intervalo de temperaturas; típicamente, éste será dentro de un intervalo de aproximadamente 4°C a aproximadamente 50°C. Por ejemplo, la mezcla de tinción puede mantenerse a una temperatura "relativamente baja", es decir, una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 30°C. Como alternativa, la mezcla de tinción puede mantenerse dentro de un intervalo de temperatura "intermedia", es decir, una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 39°C. Además, la mezcla de tinción puede mantenerse dentro de un intervalo de temperatura "relativamente elevada", es decir, una
- 65

temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C. La selección de una temperatura preferida generalmente depende de un intervalo de variables, incluyendo por ejemplo, la permeabilidad de las células al colorante o colorantes que se estén usando, la concentración del colorante o colorantes en la mezcla de tinción, la cantidad de tiempo que las células se mantendrán en la mezcla de tinción, y el grado de enriquecimiento deseado en la etapa de clasificación.

La captación del colorante por las células espermáticas en la mezcla de tinción se deja continuar durante un periodo de tiempo suficiente para obtener el grado deseado de tinción del ADN. Ese periodo es típicamente un periodo suficiente para que el colorante se una al ADN de las células espermáticas de modo que puedan clasificarse las células espermáticas que albergan el cromosoma X e Y en base a la intensidad de fluorescencia diferente y medible entre los dos. Generalmente, éste será de no más de aproximadamente 160 minutos.

Fluido envolvente

Para clasificar las células espermáticas, las células teñidas se introducen como un fluido de muestra en la boquilla de un citómetro de flujo como se describe a continuación. Como parte del proceso, el fluido de muestra se rodea típicamente por un fluido envolvente. El fluido envolvente permite que las células espermáticas en el fluido de muestra se extraigan en una única línea en fila como se analiza a continuación. El fluido envolvente se recoge junto con las células espermáticas por el sistema de recogida del citómetro de flujo y por lo tanto forma parte del entorno post-clasificación para las células espermáticas. Por tanto, es deseable que el fluido envolvente proporcione un efecto protector a las células tras el contacto de las células por el fluido envolvente.

El fluido envolvente generalmente comprende un tampón o solución tamponada. Ejemplos de tampones y soluciones tamponadas y concentraciones ilustrativas de los mismos que pueden usarse en el fluido envolvente se han analizado anteriormente con respecto a la recogida y dilución de muestras. En un ejemplo particular, el fluido envolvente comprende solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco al 0,96% (p/v), BSA al 0,1% (p/v), en agua a un pH de aproximadamente 7,0.

Opcionalmente, el fluido envolvente también puede contener un intervalo de aditivos que son beneficiosos para la viabilidad o motilidad del esperma. Dichos aditivos incluyen, por ejemplo, una fuente de energía, una fuente de proteínas, un antibiótico, una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de forma intracelular y/o extracelular, una fuente alternativa de proteínas, y alcohol polivinílico. Cada uno de estos aditivos, y ejemplos de los mismos, se ha analizado anteriormente con respecto a la recogida y dilución de muestras. Dichos aditivos pueden añadirse al fluido envolvente de acuerdo con los mismos.

El fluido envolvente puede filtrarse opcionalmente antes de la etapa de clasificación. Los contaminantes que pueden estar presentes en el fluido envolvente, tales como particulados no solubles, pueden impedir la clasificación. Por lo tanto, el fluido envolvente puede filtrarse antes de su introducción en un citómetro de flujo. Dichos filtros y métodos para usar los mismos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, el filtro es una membrana de aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 0,5 micrómetros.

Las células teñidas pueden introducirse en el fluido envolvente en cualquier momento posterior a la tinción. Típicamente, se inyecta una corriente de las células teñidas en el fluido de muestra en una corriente de fluido envolvente dentro de la boquilla del citómetro de flujo. Inicialmente, no existe contacto sustancial del fluido de muestra y el fluido envolvente debido al flujo laminar de los fluidos como se analiza en mayor detalle a continuación. Es deseable que el fluido de muestra y el fluido envolvente permanezcan como corrientes de flujo sustancialmente diferentes hasta después de que las partículas (por ejemplo, las células espermáticas teñidas) en el fluido de muestra se hayan analizado. En algún punto, sin embargo, el fluido envolvente y las células del fluido de muestra entran en contacto entre sí. Por ejemplo en un citómetro de flujo de clasificación de gotitas (analizado a continuación) el fluido envolvente y el fluido de muestra empiezan a contactar entre sí según se están formando las gotitas corriente abajo de la localización de examen.

En el momento de la introducción de las células teñidas y el fluido envolvente, tanto las células teñidas como el fluido envolvente pueden estar a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 50°C. El fluido envolvente y las células teñidas pueden estar a la misma temperatura o a diferentes temperaturas, estando cualquiera de ellos a una temperatura mayor que el otro. Por consiguiente, en el momento de la introducción de las células teñidas y el fluido envolvente, tanto las células como el fluido envolvente están a la misma temperatura; por ejemplo, a una temperatura "relativamente baja", tal como por ejemplo de aproximadamente 5°C a aproximadamente 8°C; a una temperatura "intermedia", tal como por ejemplo de aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C; o a una temperatura "relativamente elevada", tal como por ejemplo de aproximadamente 40°C a aproximadamente 43°C.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La presente invención emplea tecnologías de la invención en citometría de flujo para la clasificación de células espermáticas X e Y. Con referencia ahora a las Fig. 2 y 3, se denomina una realización de un sistema de citometría

de flujo de la presente invención en su totalidad por el número de referencia 1. Como se comprobará, el sistema de citometría de flujo 1 es útil para clasificar y ordenar partículas, tales como células espermáticas, de acuerdo con características seleccionadas. En general, el sistema 1 comprende un suministro 3 de fluido portador 17 que contiene partículas a clasificar, un suministro 7 de fluido envolvente 19, un aparato de citometría de flujo que tiene capacidades de clasificación, generalmente denominado 9, y un sistema de suministro de fluidos 15 para suministrar los fluidos portador 17 y envolvente 19 desde los respectivos suministros 3, 7 a presión hasta el aparato de citometría de flujo 9. El aparato de citometría de flujo 9 está adaptado para recibir los fluidos portador 17 y envolvente 19, para combinar los fluidos 17, 19 para crear una corriente de fluido presurizado 21, para dirigir la corriente 21 que porta las partículas a través de un haz de radiación electromagnética enfocado 25 (por ejemplo, luz láser UV), y para analizar la radiación electromagnética 31 (por ejemplo, luz fluorescente) emitida por las partículas que pasan a través del haz enfocado 25. El aparato 9 también funciona descomponiendo la corriente 21 en gotitas 33 que contienen partículas a evaluar, y clasificando las gotitas 33 en base a las mediciones mencionadas anteriormente de acuerdo con una o más características de las partículas contenidas en las gotitas 33. Aunque este sistema puede usarse para analizar y preferiblemente clasificar cualquier tipo de partícula, tiene aplicación particular para la clasificación de células de acuerdo con una o más características deseadas de las células (por ejemplo, tamaño, contenido de ADN, forma, densidad, secuencia génica, etc.). Este sistema es especialmente adecuado para la clasificación de células espermáticas animales para uso comercial por la industria de producción animal para inseminación artificial in vivo o in vitro.

APARATO Y MÉTODO DE CLASIFICACIÓN DE UN CANAL

Aparato de citometría de flujo

El aparato de citometría de flujo 9 mostrado en la Fig. 3 comprende un sistema de boquilla, generalmente denominado 101, para suministrar una corriente de fluido 21 que contiene partículas (por ejemplo, células espermáticas teñidas) a través de un orificio de boquilla 103 a presión con las células sustancialmente en una fila única y, en el caso de células espermáticas, con las cabezas asimétricas de las células espermáticas sustancialmente en una orientación deseada que se describirá. Como en sistemas convencionales de clasificación de gotitas por citometría de flujo, se proporciona un transductor 105 opuesto al orificio de boquilla 103 para introducir energía acústica en la corriente de fluido 21 que causa que la corriente 21 se rompa en gotitas 33 que contienen células individuales en una localización de "rotura de gotitas" 107 espaciada del orificio de boquilla 103. El sistema 1 también incluye un sistema óptico, generalmente denominado 109, para enfocar un haz de radiación electromagnética 25 (por ejemplo, luz láser UV de 350-700 nm o visible) sobre la corriente de fluido 21 en una localización de "examen" 115 que, en el ejemplo descrito, está entre el orificio de boquilla 103 y la localización de rotura de gotitas 107. Por tanto, el ejemplo descrito es un sistema de chorro-en-aire. En otros ejemplos, la localización de examen 107 podría estar dentro del orificio de boquilla 103 o corriente arriba del orificio 103. En cualquier caso, las células están adaptadas para pasar a través del haz de luz 25 en la localización de examen 107, provocando la excitación de un colorante químico (u otro medio indicador) en las células para causar emisiones de fluorescencia 31 que tienen una longitud de onda diferente de la del haz 25 (por ejemplo, si la luz de iluminación 25 tiene una longitud de onda de aproximadamente 350 a 370 nm, las emisiones fluorescentes 31 pueden tener una longitud de onda de aproximadamente 460 nm). Un fotodetector 117 es operativo para detectar estas emisiones 31 y para convertirlas en señales eléctricas que se procesan y usan para clasificar las células de acuerdo con características seleccionadas, tales como el contenido de cromosoma X/Y de células espermáticas. El aparato de citometría de flujo 9 comprende adicionalmente un sistema de clasificación, generalmente denominado 119, para la clasificación de las gotitas 33 en diferentes grupos o poblaciones (por ejemplo, dos poblaciones 123,125) de acuerdo con la clasificación de las células contenidas en las gotitas 33 y un sistema de recogida, generalmente denominado 2201 (Fig. 2), para recoger las gotitas 33 y mantener la segregación de las diferentes poblaciones 123,125.

El funcionamiento del sistema 1 se controla por un procesador 131, tal como un microprocesador u otro control y/o procesador digital o analógico, o combinaciones de los mismos, que controla las diversas funciones de los componentes del sistema 1 de un modo a describir. De forma significativa, el procesador 131 también es sensible a la información de análisis de las partículas para controlar la salida del sistema 1 en base a estrategias de control y clasificación seleccionadas que implican diferentes parámetros, incluyendo la pureza deseada de una de las poblaciones clasificadas de partículas, la cantidad aceptable (o porcentaje) de partículas deseadas en una de las poblaciones en comparación con la cantidad (o porcentaje) de las partículas deseadas en una o más de las otras poblaciones, y otros parámetros, como se analizará posteriormente.

Sistema de boquilla

Con referencia a las Fig. 4 y 5, el sistema de boquilla 101 puede comprender, un cuerpo de flujo generalmente cilíndrico 133 que tiene un orificio longitudinal central 135 a través del mismo, y una boquilla 137 sobre el cuerpo de flujo 133 que tiene un cuerpo de boquilla con forma de embudo 139. Un conducto 141 se extiende a través del cuerpo de boquilla 139 de forma co-axial con el orificio 135 en el cuerpo de flujo 133 y termina en el orificio de boquilla 103 mencionado anteriormente en el extremo anterior de la boquilla 137. El cuerpo de boquilla 139 tiene un escariador con rosca interna 145 en su extremo posterior para recibir de forma roscada una proyección o pasador

roscado 149 en el extremo anterior del cuerpo de flujo 133 para conectar de forma desmontable la boquilla 137 al cuerpo de flujo 133, estando la conexión sellada por un sellamiento de junta tórica 155. Se entenderá que la boquilla puede conectarse de forma desmontable al cuerpo de flujo de otros modos o, como alternativa, las partes podrían formarse de forma integral como una pieza.

Las partículas se suministran a la boquilla 137 mediante un conducto 157 posicionado de forma co-axial en el orificio 135 del cuerpo de flujo 133. El diámetro exterior del conducto 157 es menor que el diámetro interior del orificio 135 de modo que se forma un espacio anular 167 alrededor del conducto 157. El conducto 157 es una aguja tubular (por ejemplo, una aguja de calibre 16 que tiene un diámetro interior de 0,25 mm (0,01 pulgadas)) que tiene un extremo frontal que se extiende dentro del escariador 145 en la parte posterior de la boquilla 137. El extremo posterior del conducto 157 está conectado al sistema de suministro de fluidos 15 para el suministro de fluido portador 17 (por ejemplo, una mezcla de tinción que contiene células espermáticas) hasta el conducto 157. El espacio anular 167 que rodea el conducto 157 está conectado mediante un orificio radial 173 en el cuerpo de flujo 133 al sistema de suministro de fluidos 15 para el suministro de fluido envolvente 19 en el espacio anular 167. Como se muestra en las Fig. 3 y 5, puede proporcionarse un segundo orificio radial opcional 183 en el cuerpo de flujo 133 que conecta el espacio anular 167 a otra línea (no mostrada) para el suministro de fluido envolvente adicional 19 a la boquilla 137.

Como en sistemas convencionales de citometría de flujo, el fluido envolvente 19 se introduce en el espacio anular 167 que rodea el conducto 157. La velocidad del fluido envolvente 19 según fluye pasada la punta del conducto 157 es mucho mayor que la velocidad del fluido portador 17 que sale del conducto 157, de modo que el fluido portador 17 y las células (por ejemplo, células espermáticas) contenidas en el mismo se aceleran por el fluido envolvente 19 hacia el orificio 103 de la boquilla 137. Esta aceleración funciona espaciando las células generalmente en una disposición de una sola fila para su análisis separado por el sistema óptico 109. El fluido envolvente 19 rodea el fluido portador 17, provocando que la corriente de fluido 21 tenga un núcleo central 189 de fluido portador 17 y una cubierta exterior co-axial 191 de fluido envolvente 19 que rodea el núcleo central 189 (véase la Fig. 6). Como entenderán los especialistas en citometría de flujo, el flujo laminar y el enfoque hidrodinámico del núcleo central 189 tiende a confinar las partículas al núcleo 189, con poca mezcla de los fluidos envolvente 19 y portador 17 en la boquilla 137. Además, el núcleo central 189 permanece esencialmente intacto dentro de la cubierta 191 según se mueve la corriente 21 a través del sistema de boquilla 101, hasta el momento en que se forman gotitas 33 en la localización de rotura 107. Este tipo de flujo co-axial es particularmente adecuado para citometría de flujo, porque las partículas a analizar están confinadas dentro del núcleo relativamente estrecho 189 de la corriente. Como resultado, un haz de luz 25 enfocado sobre el centro o núcleo 189 de la corriente 21 iluminará las partículas de modo que puedan analizarse sustancialmente una cada vez. Confinando el núcleo 189 dentro de un diámetro suficientemente estrecho, puede obtenerse una iluminación más uniforme de las partículas en el fluido central 189. Para buenos resultados analíticos, el diámetro del núcleo que contiene las partículas debe estar deseablemente dentro de un intervalo de 7 a 20 micrómetros, y de forma más deseable dentro de un intervalo de 7 a 14 micrómetros. El diámetro de la corriente central 189 puede aumentarse o disminuirse ajustando la tasa de suministro del portador 17 relativa a la tasa de suministro del fluido envolvente 19.

Orientación de las células

Para optimizar los resultados analíticos, es deseable que las partículas que tienen formas asimétricas estén en una orientación deseada cuando pasan a través del haz de luz desde el sistema óptico. Como saben los especialistas en la técnica, las emisiones de fluorescencia desde partículas asimétricas tienden a ser anisotrópicas (es decir, la intensidad de las emisiones no es uniforme en todas las direcciones). Como se usa en este documento, la expresión "orientación deseada" significa una orientación que permite que el sistema de procesamiento discrimine entre células que tienen diferentes características con una precisión en un intervalo del 70% al 100%.

Para ilustrar el punto, se ilustra una célula espermática bovina 201 en las Fig. 6 y 7. Típicamente, la célula tiene una cabeza con forma de pala 205 con caras opuestas relativamente planas por completo 207 y bordes estrechos 209, un núcleo 213 en la cabeza 205 que contiene la masa de ADN cromático de la célula, y una cola 215 que se extiende desde la cabeza 205 que proporciona la motilidad necesaria para una fertilización eficaz. La célula espermática bovina promedio 201 tiene una longitud de la cabeza 219 de aproximadamente 8 μm , una anchura de la cabeza 221 de aproximadamente 4 μm , y una longitud global 223 desde la parte frontal de la cabeza hasta el final de la cola de aproximadamente 100 μm . En la célula espermática bovina promedio 201, el núcleo 213 ocupa la mayoría del volumen de la cabeza y es solamente algo más pequeño que la cabeza del esperma 205. Por tanto, la longitud del núcleo 217 es casi igual a la longitud de la cabeza 219, siendo de nuevo de aproximadamente 8 μm de longitud. Se ha observado que en bovinos los cromosomas X/Y de las células espermáticas 201 están localizados en una región del núcleo 225 (Fig. 6) por debajo e inmediatamente adyacentes a la línea media longitudinal o ecuador 211 o el centro de la cabeza 205. Más específicamente, esta región sub-ecuatorial 225 se extiende no más de aproximadamente un 20% de la longitud del núcleo 217 sobre la mitad inferior (hacia la cola 215) del núcleo 213, y aún más específicamente no más de aproximadamente 1,0-1,5 μm por debajo del ecuador 211 del núcleo 213.

Cuando las células espermáticas pasan a través del haz de excitación 25, es deseable que las células estén sustancialmente en fila única y que la cabeza 205 de cada célula 201 esté orientada de forma sustancialmente

similar para reducir la variabilidad de orientación de una célula a otra y de este modo proporcione una medición más uniforme de las células. También se desea que las células tengan una orientación que posibilite la discriminación precisa entre células X e Y. De forma deseable, esta orientación es una en que la longitud de la célula espermática 201 está generalmente alineada con la dirección del flujo de la corriente 227 (ya sea con la cabeza hacia delante (mostrado en la Fig. 6) o con la cabeza hacia atrás) y en que la cabeza 205 de la célula espermática 201 está rotada sobre su eje longitudinal de modo que la cabeza 205 cae dentro de una envoltura angular 229 en que el haz de luz 25 desde el sistema óptico 109 impactará sobre una cara amplia 207 de la célula 201 generalmente de costado, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 7, en lugar de un borde estrecho 209 de la célula. Preferiblemente, la envuelta 229 que define la orientación deseada se genera por rotación de una célula espermática 201 a través de un intervalo angular de R1 relativo a un plano P que es generalmente perpendicular al haz de luz entrante 25, como se ve en una sección transversal tomada de forma transversal a través de la corriente 21. El intervalo R1 es preferiblemente de 0 a 90 grados. La boquilla puede configurarse para conseguir esta orientación deseada con una precisión de hasta el 90% o más.

La tolerancia para la orientación del esperma (es decir, el tamaño de la envuelta 229 definida por el intervalo angular R1) está relacionada con la apertura numérica de la lente usada para recoger las emisiones de fluorescencia 31 desde las células espermáticas. En el ejemplo mostrado en la Fig. 7, por ejemplo, el sistema óptico 109 tiene un volumen de detección 579 de emisión de fluorescencia 31 definido por un ángulo sólido de 55 grados. Cuando la orientación rotatoria de una cabeza de esperma 205 está fuera de la envuelta 229 definida por R1 según se mueve el esperma a través del haz 25, se recogerá una emisión de fluorescencia 31 relativamente más potente desde un borde 209 de la cabeza de esperma 205 por el sistema óptico 109, evitando que el procesador 131 correlacione la intensidad de la emisión de fluorescencia 31 con el contenido de cromosoma X/Y de la célula espermática 201. Sin embargo, el sistema óptico 109 no recoge las emisiones de fluorescencia 31 relativamente más potentes desde el borde estrecho 209 de las cabezas de esperma 205 siembre que la orientación rotatoria de una cabeza de esperma 205 esté dentro de la envuelta 229 según pasa a través de la localización de examen 115. Por tanto, en el ejemplo mostrado en la Fig. 7, la orientación de la célula espermática no provoca la recogida de las emisiones de fluorescencia de los bordes relativamente más potentes siempre que los bordes estrechos 209 de la cabeza de esperma 205 estén confinados dentro del ángulo R1. El ángulo sólido del volumen de recogida 579 puede disminuirse usando una lente con una apertura numérica más pequeña, aumentando de este modo el ángulo R1 y la tolerancia por esperma mal orientado. Sin embargo, esto también disminuye la cantidad de fotones que pueden recogerse por el sistema óptico 109, que puede influir sobre la medición de emisiones de fluorescencia 31 reduciendo la intensidad de las emisiones 31 detectadas por el fotodetector. Asimismo, si el sistema óptico 109 recoge emisiones de fluorescencia 31 con una lente de elevada apertura numérica para obtener una intensidad más potente de las emisiones de fluorescencia detectadas por el fotodetector, entonces disminuye la tolerancia por orientación de esperma. Por tanto, en el diseño de un sistema, se tiene que encontrar un equilibrio entre la tolerancia por orientación de esperma y la apertura numérica de la lente. El equilibrio óptimo dependerá de las capacidades de orientación y la sensibilidad óptica del sistema. Por ejemplo, se usa una lente que tiene una apertura numérica de 0,65.

Diseño de la boquilla

Como se muestra en las Fig. 8 y 9, el interior 231 del cuerpo de boquilla 139 corriente abajo del escariador 145 puede tener una superficie interior 233 que comprende una primera, segunda y tercera regiones axialmente ahusadas 235, 237, 239 para acelerar progresivamente la velocidad de la corriente de fluido 21 en una dirección corriente abajo hacia el orificio de boquilla 103. Como se ha indicado anteriormente, esta aceleración funciona espaciando las partículas (por ejemplo, células) en la corriente 21 de modo que asumen una formación de fila generalmente única de modo que puede analizarse sustancialmente una partícula cada vez. Al menos dos de estas regiones, y preferiblemente las tres 235, 237, 239, tienen formas generalmente elípticas (ovales) en las secciones transversales tomadas a ángulos rectos al eje longitudinal 247 de la boquilla 137, como se muestra en las Fig. 9A-9H y las Fig. 9J-9K. La superficie interior 233 del cuerpo de boquilla 139 también tiene una cuarta región 249, no ahusada, corriente abajo de las tres primeras regiones 235, 237, 239 e inmediatamente corriente arriba del orificio de boquilla 103 que puede estar formado en un miembro con orificio calibrado separado 255 fijado en un escariador 257 en la parte frontal del cuerpo de boquilla 139. Las formas de sección transversal generalmente elípticas de la primera 235 y segunda 237 regiones pueden orientarse en sustancialmente la misma dirección para definir una primera zona de torsión 259, y la forma de sección transversal generalmente elíptica de la tercera región 239, que constituye una segunda zona de torsión 261, está orientada a un ángulo (por ejemplo, aproximadamente 90 grados) relativa a las formas de sección transversal generalmente elípticas de la primera 235 y segunda 237 regiones. La orientación es tal que la superficie interior 233 del cuerpo de boquilla 139 aplica fuerzas de torsión a la corriente de fluido 21 y de este modo tiende a orientar las células espermáticas 201 en la orientación deseada indicada anteriormente según pasan a través del orificio de boquilla 103. Preferiblemente, la primera zona de torsión 259 tiene una longitud axial 273 de 3,0-4,5 mm y la primera 235 y segunda 237 regiones ahusadas que componen la zona 259 tienen longitudes axiales aproximadamente iguales 275, 277 (por ejemplo, aproximadamente 1,8 mm). La segunda zona de torsión 261 tiene una longitud axial 279 de 3,5-5,0 mm. La cuarta región 249 es preferiblemente de forma generalmente cilíndrica. Cada forma generalmente elíptica de sección transversal A-D (Fig. 8) en los límites de la primera 235, segunda 237 y tercera 239 regiones tiene un diámetro de eje principal y un diámetro de eje menor, cuyas dimensiones ejemplares se muestran en la Fig. 8 y la siguiente Tabla II.

TABLA II

Elipse	Diámetro de eje principal (mm)	Diámetro de eje menor (mm)	Proporción
A	7,0	6,0	1,2
B	6,1	5,3	1,15
C	2,1	2,1	1
D	0,9	0,2	1,45

Se entenderá que las dimensiones anteriores son ejemplares, y que también pueden ser adecuadas otras dimensiones y formas. Funcionalmente, los cambios en las proporciones entre los diámetros principal y menor, y las diferentes orientaciones de las formas elípticas de las regiones, crean fuerzas laterales que actúan sobre cada célula 201 y aplican una fuerza de torsión 271 que tiende a rotar la célula 201 sobre su eje longitudinal de modo que sus caras amplias 207 se alinean con el eje menor en la primera zona de torsión 259 y según la célula se retuerce suavemente (por ejemplo, 90 grados) se alinea con el eje menor de la segunda zona de torsión 261. Cada una de las superficies ahusadas 235, 237, 239 también sirve para acelerar la corriente 21 (y las células) que fluye a través de la boquilla 101. La aceleración puede aumentar más gradualmente en la primera 235 y tercera 239 regiones y más rápidamente en la segunda región 237. De nuevo a modo de ejemplo, el ahusamiento de la primera región 235 puede variar de aproximadamente 11-14 grados; el ahusamiento en la segunda región 237 puede variar de aproximadamente 42-48 grados; y el ahusamiento en la tercera región 239 puede variar de aproximadamente 8-12 grados. El cuerpo de boquilla 139 está formado por un material adecuado tal como plástico moldeado (ABS) o metal.

El miembro con orificio calibrado 255 (Fig. 8) se forma preferiblemente a partir de un material duro resistente al desgaste, tal como zafiro, que es capaz de trabajarse a máquina o formarse de otro modo con dimensiones precisas. El miembro con orificio calibrado 255 en sí mismo tiene, en un ejemplo, una superficie ascendente cónica 309 de sección transversal generalmente circular que disminuye en diámetro de aproximadamente 0,92 mm a aproximadamente 0,060 mm y tiene una longitud axial 317 de aproximadamente 0,54 mm y un ángulo de ahusamiento de aproximadamente 39 grados. El miembro con orificio calibrado 255 también tiene una superficie descendente generalmente cilíndrica 315 con un diámetro de aproximadamente 0,060 mm y una longitud axial 327 de aproximadamente 0,36 mm. Estas dimensiones son solamente ejemplares, y se entenderá que el miembro con orificio calibrado 255 puede tener otros tamaños y formas. Por ejemplo, la forma de la superficie ascendente 309 puede ser generalmente elíptica (oval) en sección transversal, y el diámetro del orificio 103 en el extremo corriente abajo de la boquilla 137 puede variar de 40 a 100 micrómetros o más. Es deseable que el tamaño del orificio 103 sea tal que las células que salen de la boquilla 101 estén en una formación sustancialmente de fila única dentro del núcleo 189 de la corriente 21 y sustancialmente en la orientación deseada, como se ha descrito previamente. Por ejemplo, en el caso de células espermáticas se ha encontrado que un orificio 103 que tiene un diámetro de aproximadamente 60-62 micrómetros en el extremo corriente abajo es adecuado. Preferiblemente, el orificio de boquilla 103 sirve para acelerar adicionalmente la corriente 21 y para conformar y dimensionar la corriente 21 para un espaciado de las células, orientación celular y formación de gotitas 33 óptimos, como se describirá.

La velocidad de la células según salen de la boquilla 137 dependerá de diversos factores, incluyendo la presión a la que se introduce el fluido envolvente 19 en el sistema de boquilla 101. A una presión de 1,88 bar (20 psi), las células saldrán del orificio de boquilla 103 del ejemplo anterior a una velocidad de aproximadamente 16,6 m/s como una corriente generalmente cilíndrica 21 que contiene células que están orientadas de forma sustancialmente similar en el núcleo 189 de la corriente 21. A una presión de envolvente de 2,07 bar (30 psi), la velocidad de las células será de aproximadamente 20,3 m/s. A diferentes presiones del fluido envolvente 19, variará la velocidad de la corriente 21.

Introducción de la corriente central en la zona de torsión

La orientación mejorada de las partículas puede obtenerse alterando el flujo de la corriente de fluido 21 a través de una boquilla de orientación de modo que la corriente central 189 que contiene las partículas a orientar (por ejemplo, células espermáticas) se dirija a lo largo de un paso de flujo, al menos una parte del cual está desplazado del centro de la boquilla de modo que las partículas se sometan a las fuerzas hidrodinámicas de orientación generadas por una boquilla mientras están en una localización que está desplazada desde el centro de la boquilla. Dirigir la corriente central 189 a lo largo de un paso de flujo desplazado también puede mejorar la orientación de las partículas en una boquilla tradicional (es decir, una que no tenga ninguna zona de torsión). En muchas boquillas, se puede determinar que una posición dada está desplazada del centro de la boquilla porque está desplazada desde un eje longitudinal de la boquilla. También puede reconocerse que una posición particular está desplazada del centro de una boquilla porque está desplazada del centro geométrico de un área de sección transversal de la boquilla a través de la cual fluye la corriente de fluido.

Pueden usarse varias técnicas para dirigir la corriente central 189 a lo largo de un paso de flujo que esté desplazado del centro de la boquilla. Por ejemplo, puede posicionarse un deflector de orientación en la boquilla para desviar la corriente central hasta un lateral de la boquilla. Asimismo, el conducto 157 para introducir la corriente central 189 que contiene las partículas de muestra puede reubicarse desde el centro tradicional de la boquilla hasta una localización desplazada. Además, se contempla que puede usarse un conducto de introducción de muestra desplazado 157 en combinación con un deflector de orientación. A continuación se analizan ejemplos de uso de un deflector de orientación y de uso de un conducto de introducción de muestra desplazado.

La orientación mejorada de las partículas (por ejemplo, células espermáticas) conseguida mediante el uso de un deflector de orientación y/o conducto de introducción de muestra desplazado 157 puede deberse a varios factores. Un factor es que la desviación de la corriente central 189 y/o un cambio en el tamaño y forma del área de flujo de sección transversal provoca la aplicación de fuerzas hidrodinámicas que tienden a orientar las partículas asimétricas. (Kachel, et al., *Histochemistry y Cytochemistry*, 25 (7): 774-80 (1977)). Otro factor es que se ha descubierto que las partículas asimétricas (en particular células espermáticas) tienden a orientarse según fluyen en una corriente de fluido en cercana proximidad a una superficie sólida. Por tanto, dirigiendo la corriente central 189 de modo que esté en cercana proximidad a la superficie interior de una boquilla o una superficie deflectora puede obtenerse una orientación mejorada de las partículas. Además, puede usarse un deflector y/o conducto de introducción de muestra desplazado junto con una boquilla de orientación que aplica fuerzas adicionales de orientación (por ejemplo, fuerzas de torsión) a las partículas asimétricas. En ese caso, el deflector puede funcionar dirigiendo la corriente de fluido de modo que la corriente central que contiene las partículas a orientar fluya a lo largo de un conducto que está desplazado del centro de la boquilla mientras las partículas se someten a las fuerzas de torsión generadas por una o más de las zonas de torsión.

Deflector de orientación

Las Fig. 10-13 muestran un deflector de orientación ejemplar, generalmente denominado 2001, posicionado en la boquilla de orientación 137 descrita anteriormente. Sin embargo, el deflector 2001 podría usarse junto con una boquilla diferente, incluyendo una boquilla no de orientación. El deflector 2001 se posiciona en la boquilla corriente arriba del orificio 103 y corriente abajo de la aguja de inyección de muestra 157. Con referencia a las Fig. 14 y 15, el deflector comprende una placa deflectora 2003 que se mantiene en su sitio mediante un soporte de deflector 2005. Como se muestra, la placa deflectora 2003 tiene forma generalmente de L y se construye de un material sustancialmente rígido, duradero y resistente a la corrosión (por ejemplo, acero inoxidable). La placa con forma de L 2003 tiene una pata ascendente 2007 y una pata descendente 2009, que son de forma deseable sustancialmente perpendiculares entre sí (por ejemplo, en aproximadamente 5 grados de ser perpendiculares). Como se muestra en los dibujos, las dos patas 2007, 2009 de la placa con forma de L 2003 se cruzan en una línea 2015 que es perpendicular al eje longitudinal 2017 de la boquilla 137 (Fig. 11). Como se muestra en la Fig. 14, la línea de intersección 2015 también está espaciada una corta distancia 2033 (por ejemplo, aproximadamente 0,3 mm) desde el eje longitudinal 2057 del soporte de deflector 2005. La pata ascendente 2007 de la placa con forma de L 2003 se extiende desde la línea de intersección 2015 desde el eje longitudinal 2017 de la boquilla 137 toda la trayectoria hasta el borde del soporte de deflector 2005, como se muestra en la Fig. 15. Por tanto, la pata ascendente 2007 se forma con un borde curvado 2019 que coincide íntimamente con la forma del soporte de deflector 2005. Como se muestra en la Fig. 14, la pata ascendente 2007 está inclinada a un ángulo AA de aproximadamente 15-25 grados desde la perpendicular al eje longitudinal 2057 del soporte de deflector 2005. La pata descendente 2009 de la placa con forma de L 2007 se extiende de forma descendente desde la línea de intersección 2015 de las dos patas 2007, 2009 una distancia 2025 de aproximadamente 2,0-2,5 mm a un ángulo BB que está en el intervalo de aproximadamente 60-80 grados desde la perpendicular hasta el eje longitudinal 2057 del soporte de deflector 2005.

El soporte de deflector 2005 está dimensionado y conformado para ajustar dentro de la boquilla 137, como se muestra en las Fig. 10-13. El soporte de deflector 2005 está preferiblemente hecho de un material moldeable (por ejemplo, polipropileno) aunque el soporte de deflector 2005 puede construirse de otros materiales. El soporte de deflector 2005, mostrado en las Fig. 14 y 15, generalmente se conforma como un revestimiento cilíndrico hueco de aproximadamente 4,0-4,5 mm de longitud global 2027. El soporte de deflector 2005 tiene un diámetro exterior 2029 de aproximadamente 5-6 mm y un diámetro interior 2031 de aproximadamente 2,5-3,5 mm. Si el soporte de deflector 2005 tiene que moldearse, puede proporcionarse una conicidad menor (no mostrada) sobre las superficies del soporte 2005 (por ejemplo, para permitir que el soporte de deflector se retire fácilmente de una máquina de moldeo por inyección). El extremo corriente arriba 2035 del soporte de deflector ejemplar 2005 tiene una superficie inclinada 2037 que está inclinada al mismo ángulo AA que la pata ascendente 2007 de la placa con forma de L 2003. La pata ascendente 2007 de la placa con forma de L 2003 empotra contra y está soportada por la superficie inclinada 2037 del soporte de deflector 2005. Los bordes laterales 2039 (Fig. 15) de la pata descendente 2009 de la placa con forma de L 2003 están parcialmente empotrados (por ejemplo, recibidos en muescas) en el soporte de deflector 2005 para mantener la placa deflectora 2003 en una posición en que la pata descendente 2009 abarque generalmente desde un lateral del soporte de deflector 2005 hasta el otro. El borde descendente 2041 de la pata descendente 2009 forma una línea recta que es generalmente perpendicular al eje longitudinal 2057 del soporte de deflector 2005. Hay un hueco 2049 (Fig. 14) entre el borde descendente 2041 de la pata descendente 2009 y la superficie cilíndrica interior 2051 del soporte de deflector 2005. El hueco 2049 proporciona comunicación fluida entre un volumen 2053 definido por las patas 2007, 2009 de la placa con forma de L 2003 y la superficie cilíndrica interior

2051 del soporte de deflector 2003 y el resto del volumen interior 2055 de la boquilla 137.

El soporte de deflector 2005 se posiciona de forma deseable dentro de la boquilla con el eje longitudinal 2057 del soporte de deflector 2005 generalmente alineado con el eje longitudinal 2017 de la boquilla 137 de modo que mantenga la placa con forma de L 2003 en la posición descrita anteriormente. De forma deseable, la placa deflectora ejemplar 2003 se orienta de forma rotatoria de modo que la línea de intersección 2015 de las dos patas 2007, 2009 de la placa 2003 sea paralela a una línea 2059 que discurre a través del eje principal de la elipse D, como se muestra en la Fig. 16. Sin embargo, el deflector ejemplar 2001 también funciona bien cuando la intersección 2015 de las dos patas 2007, 2009 de la placa con forma de L 2003 es perpendicular a la línea 2059 que discurre a través del eje principal de la elipse D, como se muestra en la Fig. 17. Además, el deflector puede tener cualquier orientación rotatoria. Como se muestra en la Fig. 12, la aguja de inyección de muestra 157 está de forma deseable a una distancia 2061 de aproximadamente 0,25-1,0 mm corriente arriba de la parte más superior 2035 del deflector 2001. De forma más deseable, la aguja de inyección de muestra 157 está aproximadamente 0,55-0,65 mm corriente arriba de la parte más superior 2035 del deflector 2001.

El soporte de deflector 2005 puede mantenerse en una posición deseada relativa a la boquilla de cualquiera de varios modos. Con referencia a la Fig. 14, el extremo corriente abajo 2067 del soporte de deflector 2005 está escalonado de modo que ajusta más lejos corriente abajo en la boquilla 137. El extremo escalonado corriente abajo 2067 del soporte 2005 es de forma circular y empotra contra la superficie interior de forma elíptica 233 de la boquilla 137. Por tanto, el contacto entre la superficie interior 233 de la boquilla 137 y el soporte de deflector 2005 está generalmente limitado a dos puntos 2069, como se muestra en la Fig. 13. Se posiciona un par de juntas tóricas 2071 alrededor del soporte de deflector 2005 entre la boquilla 137 y la proyección roscada 149 del cuerpo de flujo 133 (Fig. 11-13) y sellan el sistema de boquilla 101 frente a filtraciones. Las juntas tóricas 2071 pueden estar hechas de Viton®, o cualquier otro material similar. Las dos juntas tóricas 2071 se comprimen según se enrosca la boquilla 137 en la proyección roscada 149 para proporcionar un sellamiento estanco a fluidos. Se usan dos Juntas tóricas 2071 porque una única junta tórica no puede comprimirse dentro del espacio entre la boquilla 137 y el cuerpo de flujo 133 debido a la longitud 2027 del soporte de deflector 2005. Podría usarse cualquier cantidad de juntas tóricas o un tipo diferente de sellamiento, con la condición de que la cantidad de juntas tóricas u otro tipo de sellamiento se seleccione de modo que haya un sellamiento estanco a fluidos cuando la boquilla 137 se enrosca en el cuerpo de flujo 133. Esto dependerá de varios factores, incluyendo el tamaño y forma de la boquilla 137, el cuerpo de flujo 133, el soporte de deflector 2005, y las juntas tóricas 2071 así como el tipo de sellamiento. Las juntas tóricas 2071 también ayudan a mantener el soporte de deflector 2005 en la posición deseada. Las juntas tóricas 2071 ocupan el espacio alrededor del soporte de deflector 2005, restringiendo de este modo el movimiento de lado a lado del soporte de deflector 2005 dentro de la boquilla 137. Las fuerzas de fricción entre las juntas tóricas 2071 y el soporte de deflector 2005 también resisten el movimiento de rotación del soporte de deflector 2005.

Cuando la boquilla 137 se aprieta sobre el cuerpo de flujo 133 como se muestra en la Fig. 12, el extremo corriente abajo 2077 de la proyección roscada 149 del cuerpo de flujo 133, en forma de un saliente, es aproximadamente uniforme con la parte más superior 2035 del deflector 2001. Como resultado, el soporte de deflector 2005 se mantiene axialmente cautivo entre el cuerpo de flujo 133 (en el extremo corriente arriba 2035 del soporte de deflector 2005) y la superficie interior 233 de la boquilla 137 (en el extremo corriente abajo 2067 del soporte de deflector 2005). Pueden usarse otros mecanismos de retención. Como se muestra en los dibujos, el diámetro interior del saliente 2079 (Fig. 12) en el extremo corriente abajo de la proyección roscada 149 es casi igual al diámetro interno 2031 del soporte de deflector 2005.

Los especialistas en la técnica reconocerán que el flujo a través del sistema de boquilla 101 permanece laminar a pesar del deflector 2001 porque el área de pequeña sección transversal a través de la cual deben fluir los fluidos provoca un bajo número de Reynolds para el flujo. Como se muestra en la Fig. 11, el deflector desvía la corriente central 189 y la corriente envolvente 191 desde el eje longitudinal central 2017 de la boquilla 137 y hacia una superficie interior 233 de la boquilla 137. La corriente central 189 también puede fluir muy cerca de la superficie interior 233 de la boquilla 137 según pasa la corriente central 189 entre la transición entre la primera 259 y la segunda 261 zonas de torsión. Sin embargo, una parte 2081 de la corriente de fluido envolvente 191 permanece entre la corriente central 189 y la superficie interior 233 de la boquilla 137 de modo que las partículas en la corriente central 189 realmente no impactan o contactan con la superficie interior 233 de la boquilla 137. Más lejos corriente abajo en la boquilla 137, las fuerzas hidrodinámicas empujan la corriente central 189 de vuelta hacia el centro de la boquilla 137 (por ejemplo, en alineación con el eje longitudinal 2017 de la boquilla 137).

Con referencia a las Fig. 18A-18E, el deflector 2001 cambia la forma y reduce el tamaño del área de flujo de sección transversal en la boquilla 137. (Por motivos de claridad, las Fig. 18A-18E no muestran ninguna estructura de boquilla corriente abajo del deflector. El área de flujo en cada una de las Fig. 18A-18E se perfila en negrita por claridad.) Corriente arriba del deflector 2001 (Fig. 18A), área de flujo de sección transversal 2087 generalmente es circular o elíptica. En el extremo corriente arriba 2035 del deflector 2001, el área de flujo comienza a cambiar de una forma circular a una forma generalmente semi-circular 2089 en la intersección 2015 de las patas 2007, 2009 de la placa deflectora 2003 (Fig. 18B), aunque pueden ser adecuadas otras formas. Ahí el área de flujo de sección transversal 2089 es más pequeña que el área de flujo 2087 corriente arriba del deflector. La Fig. 18C ilustra el área de flujo 2091 según fluye el fluido a través de una parte del soporte de deflector 2005, y la Fig. 18D ilustra el área de flujo

2093 más lejos corriente abajo en el extremo corriente abajo 2041 de la pata descendente 2009 de la placa deflectora 2003. Se observará que el área de flujo 2093 es algo más grande que el área de flujo 2091 debido a la orientación angular de la pata descendente 2009 de la placa deflectora 2003. Corriente abajo de la placa deflectora 2003 (Fig. 18E) el área de flujo 2094 a través del deflector corresponde a la forma de la superficie interior 2051 del soporte de deflector 2005, que es circular en el dibujo ilustrado (pueden ser adecuadas otras formas). Corriente abajo del soporte de deflector 2005 las zonas de torsión 259, 261 de la boquilla 137 proporcionan de forma deseable fuerzas de torsión como se ha analizado anteriormente.

Como se muestra en la Fig. 11, se ha observado que una o más burbujas de aire 2095 pueden quedar atrapadas en el volumen 2053 entre la pata descendente 2009 de la placa con forma de L 2003 y el soporte de deflector 2005. Además, una parte de una burbuja 2095 puede extenderse a través del hueco 2049 entre el borde 2041 de la pata descendente 2009 y el soporte de deflector 2005. Por tanto, la burbuja o burbujas de aire 2095 pueden ocupar una parte del área de flujo de sección transversal corriente abajo de la pata descendente 2009 de la placa con forma de L 2003, quizá afectando al flujo de fluido a través de la boquilla 137. Se ha descubierto que el deflector ejemplar 2001 funciona bien tanto con como sin la burbuja o burbujas de aire 2095. Por tanto, puede usarse un deflector para orientar las células espermáticas sin implicación de ninguna burbuja.

Se muestra otro deflector de orientación ejemplar, generalmente denominado 2097, en las Fig. 19 y 20. El deflector 2097 comprende una placa deflectora semi-circular generalmente plana 2099 en la boquilla de orientación 137 analizada anteriormente. La placa deflectora 2099 se posiciona en la boquilla 137 corriente abajo del conducto de introducción de muestra 157 y generalmente perpendicular al eje longitudinal 2017 de la boquilla 137. La placa deflectora 2099 tiene un borde curvado 2101 que generalmente coincide con la curvatura de la superficie interior 233 de la boquilla 137 de modo que no haya huecos grandes entre el borde curvado 2101 de la placa deflectora 2099 y la superficie interior 233 de la boquilla 137. La placa deflectora 2099 también tiene un borde recto 2103 que se extiende una corta distancia pasado el eje longitudinal 2017 de la boquilla 137 de modo que esté aproximadamente alineada con el diámetro exterior 2109 del conducto de introducción de muestra 157. La placa deflectora 2099 se mantiene en posición por la fricción resultante de la compresión de la placa deflectora 2099 entre un sellamiento de junta tórica 2105, que es similar a los sellamientos de junta tórica 2071 descritos en relación con el deflector con forma de L2001 anterior, y un tope anular o plataforma 2107 formado sobre el interior de la boquilla 137. Como se muestra en la Fig. 19 el deflector de orientación 2099 funciona desviando la corriente de fluido de modo que la corriente central 189 que contiene las partículas a analizar esté desplazada del eje longitudinal central 2017 de la boquilla 137 a lo largo de una parte de su paso de flujo. Por ejemplo, la corriente central 189 puede dirigirse a lo largo de un paso de flujo que está desplazado del eje longitudinal 2017 de la boquilla 137 según fluye a través de la primera zona de torsión 259, así como al menos una parte de la segunda zona de torsión 261. Por consiguiente, las partículas (por ejemplo, células espermáticas) se someten a las fuerzas de torsión generadas por las zonas de torsión 259, 261 mientras están en una posición que está desplazada del eje longitudinal central 2017 de la boquilla 137.

Los especialistas en la técnica reconocerán que pueden hacerse cambios sustanciales a los deflectores ejemplares 2001, 2097 descritos anteriormente. Todo lo que se requiere es que el deflector se configure para desviar la corriente central 189 y la corriente envolvente 191 hacia una superficie interior de la boquilla o para causar que la corriente central 189 y envolvente 191 fluyan a través de un área de sección transversal que cambia en tamaño y/o forma. Además, se entiende que la estructura del deflector de orientación puede formarse de forma integral con la boquilla o formarse de forma integral con la boquilla y el cuerpo de flujo.

Conducto de introducción de muestra desplazado

La corriente central 189 puede dirigirse a lo largo de un paso de flujo que está desplazado del eje longitudinal central 2017 de la boquilla 137 reposicionando el conducto de introducción de muestra 157 desde su posición tradicional en el centro de la boquilla 137 hasta una posición desplazada. Por ejemplo, la Fig. 21 muestra un sistema de boquilla de introducción de muestra desplazado ejemplar 2151 que tiene un conducto de introducción de muestra desplazado 157. Excepto lo indicado, el sistema de boquilla 2151 es sustancialmente igual que el sistema de boquilla 101 mostrado en las Fig. 4 y 5. La diferencia significativa es que el conducto de introducción de muestra 157 se ha movido desde el centro de la boquilla 137 de modo que ya no está alineado con el eje longitudinal 2017 de la boquilla. Por tanto, la corriente central 189 está dirigida a las zonas de torsión 259, 261 de la boquilla de orientación 137 a lo largo de un paso de flujo que está desplazado desde el eje longitudinal 2017. Aunque el sistema de boquilla ejemplar 2151 mostrado en la Fig. 21 usa la boquilla de orientación ejemplar 137 descrita anteriormente, se contempla que el conducto de introducción de muestra desplazado 157 podría usarse con una boquilla de orientación diferente o una boquilla no de de orientación para orientar partículas en la corriente central 189.

Montaje y ajuste de boquilla

El cuerpo de flujo 133 y la boquilla 137 se montan en una orientación y posición seleccionadas mediante una montura de boquilla, generalmente denominada 331. La montura 331 puede comprender una pluralidad de fases (Fig. 22), incluyendo la primera y segunda fases lineales 333, 337 que proporcionan ajuste lineal del cuerpo de flujo 133 y la boquilla 137 a lo largo de los ejes X e Y 339, 341, respectivamente, y una tercera fase de rotación 343 que

proporciona ajuste de rotación alrededor del eje Z 345 correspondiente al eje longitudinal 2017 del cuerpo de flujo 133 y la boquilla 137. Estas fases 333, 337, 343 pueden ser de diseño convencional, estando disponibles en el mercado fases adecuadas, por ejemplo, en Newport Corporation de Irvine CA. En particular, la primera fase de movimiento lineal 333 comprende un miembro de primera fase fijo (no mostrado) montado sobre un armazón 349, un miembro de primera fase móvil 355 deslizable sobre el miembro de primera fase fijo a lo largo del eje X 339, y un accionador 357, por ejemplo, un micrómetro, para mover de forma precisa el miembro de primera fase móvil 355 hasta una posición seleccionada del eje X. La segunda fase de movimiento lineal 337 comprende un miembro de segunda fase fijo 359 montado sobre el miembro de primera fase móvil 355, un miembro de segunda fase móvil 361 deslizable sobre el miembro de segunda fase fijo 359 a lo largo del eje Y 341, y un accionador 363, por ejemplo, un micrómetro, para mover de forma precisa el miembro de segunda fase móvil 361 hasta una posición seleccionada del eje Y. La fase de rotación (tercera) 343 comprende un miembro de tercera fase fijo 365 montado sobre el miembro de segunda fase móvil 361, un miembro de tercera fase móvil 371 montado de forma rotatoria sobre el miembro de tercera fase fijo 365 para su rotación alrededor del eje Z 345, y un accionador 373, por ejemplo, un micrómetro, para rotar de forma precisa el miembro de tercera fase móvil 371 hasta una posición angular seleccionada relativa al eje Z 345. El ajuste en tres ejes proporcionado por estas fases 333, 337 343 permite que la boquilla 137 y la corriente de fluido 21 que sale del orificio de boquilla 103 se posicionen de forma precisa con relación al sistema óptico 109. La rotación de la boquilla 137 alrededor del eje Z 345 es particularmente útil porque posibilita que la corriente 21 que sale de la boquilla 137 se rote para poner las células (por ejemplo, células espermáticas) orientadas por la boquilla 137 en una posición en que el haz de luz 25 del sistema óptico 109 caerá sobre las superficies deseadas de la células (por ejemplo, las caras planas 207 de las cabezas de esperma 205), como se ilustra esquemáticamente en la Fig. 23. Pueden ser adecuadas otras monturas de boquilla. Por ejemplo, también puede usarse un sistema de montaje de boquilla de 4 ejes, que proporciona ajuste lineal a lo largo de los ejes X, Y y Z y ajuste rotatorio a lo largo del eje Z. Además, puede ser deseable usar una o más fases que tengan un elemento de alineación automatizado, tal como una fase de microtraslado controlada por servomotor o motor paso a paso (por ejemplo, número de parte M-110,2DG de Polytech PI, Inc. of Auburn, Michigan).

En la Fig. 36, por ejemplo, la boquilla 137 está orientada para dirigir una corriente 21 que contiene células a analizar en una dirección generalmente ascendente. El ángulo 377 entre la dirección de la corriente de fluido 21 y la horizontal está preferiblemente en el intervalo de 5 a 85 grados. Esta orientación es ventajosa porque se elimina fácilmente el aire atrapado en el sistema de boquilla 101. Además, la velocidad de la corriente de fluido 21 disminuye gradualmente bajo la fuerza de la gravedad antes de la recogida de las gotitas 33. Se cree que una deceleración más gradual de las gotitas 33 es menor estresante para las células que se están analizando lo que, en el caso de células espermáticas, puede resultante en una mayor motilidad del esperma clasificado después de su recogida. Por supuesto, la boquilla 101 puede posicionarse de modo que la corriente de fluido 21 tenga una velocidad sustancialmente descendente cuando sale del orificio 103 lo que es convencional para citómetros de chorro en aire.

Opcionalmente, los componentes del sistema de boquilla 101 tales como el cuerpo de flujo 133 y la boquilla 137 se recubren con un material no reflector, no emisor (por ejemplo, una pintura oscura mate o epoxi que no emite luz cuando se somete a luz láser UV) para reducir cualquier luz reflejada y/o emitida desde este elementos 133,137 que de lo contrario podría causal ruido de señal o tener otros efectos adversos sobre el sistema óptico 109.

Transductor y formación de gotitas

El transductor 105 para introducir energía en la corriente de fluido 21 comprende, en un ejemplo, un collarín 379 que contiene un elemento piezoeléctrico (no mostrado) fijado alrededor del cuerpo de flujo 133 del sistema de boquilla 101 (Fig. 3-5). El transductor es de diseño convencional, tal como está disponible en Beckman Coulter, Inc. como N° de parte 6858368. El transductor tiene terminales 383 para su conexión a una fuente adecuada de energía acústica de modo que pueda suministrarse energía a la corriente de fluido 21 a una frecuencia que causará que se rompa en gotitas 33 en la localización de rotura de gotitas 107 corriente debajo de la boquilla 137 una distancia d (Fig. 24). Como entenderán los especialistas en citometría de flujo, las características de la formación de gotitas están gobernadas por la siguiente Ecuación 1:

$$(V = f\lambda) \text{ Ecuación 1}$$

Donde V es la velocidad de la corriente 21; f es la frecuencia aplicada a la corriente de fluido 21 a través de la boquilla 137; y λ es la "longitud de onda" o distancia entre las gotitas 33. Es un principio conocido de la citometría de flujo que se formarán gotitas 33 en un patrón regular siendo la distancia entre gotitas 33 unas 4,54 veces el diámetro de la corriente 21. Como el diámetro D de la corriente 21 cerca de la boquilla 137 generalmente corresponde al diámetro del orificio de boquilla 103 en su extremo corriente abajo, la frecuencia a la que debe hacerse vibrar la corriente 21 (y la boquilla 137) para formar las gotitas 33 puede calcularse fácilmente usando la siguiente Ecuación 2:

$$(f = V/4,54D) \text{ Ecuación 2}$$

El transductor 105 puede hacerse funcionar para generar el intervalo de 30.000 - 100.000 gotitas 33 por segundo.

Por ejemplo, el transductor 105 puede generar 50.000 - 55.000 gotitas por segundo. Asumiendo que la frecuencia es de 55.000 ciclos por segundo (55 kHz), y asumiendo adicionalmente que la concentración de células en la corriente 21 es tal que las células salen de la boquilla 137 a una tasa sustancialmente coincidente de 55.000 células por segundo, entonces habrá, de promedio, una célula por gotita 33. (En realidad, algunas gotitas 33 no contendrán células, algunas contendrán una célula, y algunas contendrán más de una célula.) Por supuesto, cualquiera de los diversos factores puede cambiarse para variar este promedio, incluyendo un cambio en la frecuencia (f), el tamaño (D) de la corriente 21 (orificio 103) y la velocidad (V) de la corriente 21. De forma ideal, estos factores deben ser tales que se reduzca la cantidad de estrés conferida a las células durante el transcurso del proceso, especialmente en el caso de células espermáticas donde es importante la conservación de la motilidad.

Detector de rotura

Con referencia a la Fig. 2, puede emplearse un detector de rotura 389 para determinar la localización (por ejemplo, localización de rotura 107) en la que la corriente 21 empieza a formar gotitas libres 33. La localización de rotura 107 variará dependiendo de varios factores incluyendo la viscosidad de la corriente 21, la tensión superficial del fluido y la amplitud de vibración del transductor 105. Controlando la localización de rotura 107, puede variarse la amplitud del transductor 105 para mantener la localización de rotura 107 dentro de un intervalo dado de modo que el momento en que cada gotita 33 se rompe pueda predecirse de forma más precisa por el microprocesador 131. Esto permite que el microprocesador 131 controle de forma precisa la carga eléctrica de la gotita 33 que se consigue controlando de forma selectiva la carga de la corriente 21. Como la carga de la gotita 33 será la misma que la carga de la corriente 21 inmediatamente antes de la formación de gotitas 33, el microprocesador 131 controla la clasificación de las gotitas 33 cargando de forma selectiva la corriente 21, como se indica a continuación.

En general, un detector de rotura es para su uso con cualquier corriente continua de fluido que se esté descomponiendo en gotitas en una localización de rotura. (En la Fig. 2, el detector de rotura 389 está localizado corriente debajo de la boquilla 137 y la localización de examen 115.) Se muestra un detector de rotura ejemplar 389 de forma esquemática en la Fig. 25. Se posiciona una fuente de luz 393 en un lateral de la corriente 21 para iluminar la corriente 21 dentro del intervalo dado en que se mantendrá la localización de rotura 107. Una fotoserie lineal 395 posicionada en el otro lateral de la corriente 21 está adaptada para orientarse a lo largo de un eje sustancialmente paralelo a la corriente 21. Como resultado, la fotoserie 395 detecta la luz de la fuente de luz 393 que pasa a través de las gotitas 33 y proporciona señales de salida correspondientes a la luz detectada.

Las señales de salida se procesan para determinar la posición de la localización de rotura 107. Por ejemplo, las señales de salida pueden digitalizarse y proporcionarse al procesador 131 para su procesamiento. Como alternativa, como se muestra en la Fig. 25, la fuente de luz 393 puede ser un LED u otra fuente que genere una parte del infrarrojo cercano del espectro visible. La luz que pasa entre las gotitas 33 se aumenta por una lente 401 y se dirige hacia una serie lineal 8 por 1 de fotodiodos 395. Cada fotodiodo genera una corriente que es proporcional a la intensidad de luz que incide sobre el mismo. Esta corriente suministra a 8 circuitos op-amp de corriente a voltaje 405. El voltaje de salida de los op-amp es AC acoplada en 8 amplificadores de seguimiento/retención 407. La señal de seguimiento/retención 409 usada por los amplificadores se recoge desde el transductor 105. La salida desde el amplificador de seguimiento/retención se suministra al conversor A/D 411 de una unidad de microprocesador (MPU) 391. Los valores digitales computados por la MPU 391 se proporcionarán al microprocesador de control del sistema 131. Puede usarse una tabla de consulta y/o algoritmo por el microprocesador de control del sistema 131 para convertir entre la desviación de la localización de rotura 107 y el ajuste de voltaje para el transductor 105. Como alternativa, la salida de la MPU 391 puede ser una señal analógica tal como un voltaje DC que tiene una amplitud correspondiente a un cambio en la amplitud de vibración del transductor 105. El voltaje dc puede aplicarse a la entrada del amplificador de elevado voltaje que acciona el transductor de gotitas 105 para variar la amplitud de la vibración. Por tanto, dicho procesador 391 constituiría un control para recibir la señal de salida desde la fotoserie 395 y proporcionar una señal de localización correspondiente a una localización de la localización de rotura 107. Dicho procesador 391 también constituiría un control para recibir la señal de salida indicativa de la posición de la localización de rotura 107 de las gotitas 33 y variar el funcionamiento del transductor 105 como una función de la posición de la localización 107.

Como alternativa, como saben bien los especialistas en la técnica, puede usarse una videocámara y luz estroboscópica para supervisar y controlar la localización de rotura de gotitas. Por tanto, como se muestra en las Fig. 26- 27, puede proporcionarse un sistema de videocámara 412 y luz estroboscópica 413 para controlar la localización de rotura 107. Es deseable colocar la luz estroboscópica 413 detrás de una rejilla 414A (por ejemplo, una cubierta con una pequeña ranura; abertura conformada 414B) para limitar la cantidad de luz producida por la luz estroboscópica 413 que entra en el sistema óptico 109 (Fig. 27).

Sistema óptico de epi-iluminación

El sistema óptico 109 está adaptado para enfocar un haz de radiación electromagnética 25 (por ejemplo, un haz láser) sobre la corriente de fluido 21 como un punto de iluminación, de modo que las células a analizar pasen a través del punto. El haz 25 puede ser luz láser en la parte visible o ultravioleta del espectro, por ejemplo, que tiene una longitud de onda de aproximadamente 350-700 nm, aunque pueden usarse otras longitudes de onda. La

longitud de onda de la luz láser puede seleccionarse de modo que sea capaz de excitar un fluorocromo particular usado para analizar partículas. Si el sistema óptico 109 se usa para analizar células espermáticas teñidas con Hoechst 33342, por ejemplo, la longitud de onda puede seleccionarse para que esté en el intervalo de aproximadamente 350-370 nm. La salida de energía del láser puede variar entre 50 y 300 mW. Las células espermáticas pueden analizarse usando un láser de 200 mW, por ejemplo. Con referencia a las Fig. 28-34, el sistema 109 es un sistema de epi-iluminación 415 que comprende un instrumento, generalmente denominado 417, que tiene un eje óptico longitudinal 419. Como se usa en este documento, el término "epi-iluminación" significa un sistema óptico donde al menos algunas de las emisiones de fluorescencia desde las células que pasan a través del punto de iluminación se dirigen de nuevo a través del instrumento óptico a lo largo del mismo eje que el haz enfocado 25, pero en el sentido opuesto. Este tipo de sistema es ventajoso porque se requiere solamente una serie de ópticas, incluyendo solamente un fotodetector 117, a diferencia de los sistemas convencionales que detectan fluorescencia directa y lateral y que usan dos o más fotodetectores. Sin embargo, se entenderá que aunque se prefiere un sistema de epi-iluminación, muchos de los aspectos pueden aplicarse independientemente del tipo de sistema óptico usado.

El instrumento de epi-iluminación 417 puede comprender una base rectangular 429 que soporta una pluralidad de elementos ópticos. Estos elementos ópticos se describen a continuación, con ejemplos específicos de las dimensiones relevantes, longitudes focales, y números de parte. Como entenderán los especialistas en la técnica, esta información es solamente ejemplar, y pueden usarse elementos ópticos alternativos.

Con referencia a las Fig. 28-34, los elementos ópticos incluyen un filtro reflectante 431 que refleja un haz colimado 25 de luz desde un láser o lámpara de arco 435, por ejemplo, a través de un ensamblaje de lente de acondicionamiento 437 montado en una abertura 439 en una pared lateral 441 de una cámara dicroica 443 que se extiende desde la base 429. En este ejemplo particular, el ensamblaje de lente de acondicionamiento 437 comprende una arandela de retención 445, un filtro de densidad neutra 447, una lente cilíndrica 449, un sostén de lente 455 y una contratuerca 457. La lente cilíndrica 449 introduce una divergencia uni-dimensional en el haz 225 y lo dirige hacia los elementos ópticos (descritos a continuación) que conforman el haz para que tenga una forma de sección transversal deseada 459, preferiblemente generalmente elíptica. A modo de ejemplo, la lente cilíndrica 449 puede ser una lente plano-convexa que tiene una longitud focal de 16 mm. Opcionalmente puede instalarse un expansor de haz (no mostrado) en el instrumento 417 que permite hacer ajustes a la forma del punto elíptico de iluminación 459.

El filtro reflectante 431 se monta mediante abrazaderas 461 sobre la cara angular 465 de un porta-filtros 463 que tiene aberturas 467 en el mismo para permitir que el haz 25 refleje desde el filtro 431 hacia la óptica del instrumento 417. El soporte 463 se sujeta a una fase lineal 469 móvil a lo largo de un eje X 471 relativo a un larguero de soporte 473 fijado a la base 429 y la cámara dicroica 443, siendo la fase 469 móvil por medios adecuados 475 (por ejemplo, un micrómetro) para localizar de forma precisa el soporte 463 y el filtro reflectante 431 para reflejar el haz 25 en el instrumento 417 en la localización apropiada. Un filtro dicroico 477 se sostiene por abrazaderas 479 sobre un armazón 485 montado en la cámara dicroica 443 y funciona reflejando el haz conformado 25 en una dirección de avance 487 a lo largo de un eje 489 que, en este ejemplo particular, corresponde al eje óptico longitudinal 419 del instrumento. El haz 25 pasa a través de un ensamblaje de lente de enfoque 491 que enfoca el haz 25 sobre la corriente de fluido 21 como un punto de iluminación que tiene la forma generalmente elíptica mencionada anteriormente 459 (Fig. 6) con el eje principal de la elipse extendiéndose generalmente perpendicular a la dirección del flujo 227 de la corriente 21. Según pasa cada célula a través del punto de iluminación 459, se activa el colorante fluorescente (u otro agente indicador) en la célula para emitir luz fluorescente 31 (Fig. 23). En el caso de células espermáticas teñidas con un colorante fluorescente ADN selectivo, las células X tienen más ADN que las células Y, incluyen más colorante fluorescente, y emiten una señal más potente que las células Y (por ejemplo, un 3,8%), lo que proporciona una base para discriminar y clasificar células, como se describirá. El ensamblaje de lente de enfoque 491 incluye, en un ejemplo, un adaptador de microscopio 501 montado en una abertura 503 en una pared frontal 505 de la cámara dicroica 443, un tubo de enfoque 507, un par de tubos de montaje de lente 509, y la propia lente 511, que puede ser una lente plano-convexa de 12,5 mm de diámetro con una longitud focal de 16 mm, disponible en Oriel Corporation como número de parte 41209, y está recubierto con anti-reflectante para luz que tiene una longitud de onda en el intervalo de 340-550 nm. La lente 511 puede estar hecha de sílice fundida. También pueden ser adecuadas otras lentes de enfoque, tal como un objetivo de microscopía de fluorescencia de infinidad-correcta. El ensamblaje de lente de enfoque 491 tiene un ajuste convencional de enfoque telescópico 515 para enfocar el punto de iluminación de forma elíptica 459 sobre el núcleo 189 de la corriente 21.

La luz fluorescente saliente 31 emitida por las células según pasan a través del punto de iluminación 459 es de una longitud de onda diferente (más larga, debido al principio de desplazamiento de Stoke) que la luz láser entrante 25. Algunas de las emisiones de fluorescencia 31 se transmiten en una dirección de retroceso 513 a lo largo del eje del haz entrante de nuevo a través de la lente de enfoque 511 que recoge y colima la emisión de fluorescencia 31. Las emisiones de fluorescencia colimadas 517 pasan en una dirección de retroceso desde la lente 511 hasta el filtro dicroico 477, que transmite la emisión de fluorescencia 517. A modo de ejemplo, el filtro dicroico 477 puede ser un filtro disponible en Omega Optical como número de parte XF2001, 400DCLP.

El sistema óptico 415 incluye un sistema de filtración 519 posicionado hacia atrás del filtro dicroico 477 a lo largo del

eje óptico 419 del instrumento 417. En un ejemplo, el sistema de filtración 519 incluye un filtro de emisión 521 en un soporte 523 montado en una abertura 525 en una pared posterior 527 de la cámara dicróica 443. El filtro de emisión 521 atenúa cualquier dispersión de luz láser u otra radiación electromagnética indeseada que se transmita a través del filtro dicróico 477. A modo de ejemplo y no limitación, el filtro de emisión 521 puede ser un filtro de paso largo de película delgada adaptado para transmitir más del 90% de la luz que tiene una longitud de onda mayor de 408 nm, como está disponible en Omega Optical como número de parte XF3097. Un ensamblaje de película de alineación 529 está espaciado hacia atrás a lo largo del eje óptico 419 desde el filtro de emisión. Este ensamblaje incluye un deslizador 531 móvil sobre un riel 533 que se extiende de forma longitudinal de la base 429 paralelo al eje óptico longitudinal 419 del instrumento 417, un porta-filtros 535 fijado al deslizador 531, un elemento de filtro de película 539, y abrazaderas 541 para fijar el elemento de filtro de película 539 al porta-filtros 535 en un ángulo 543 relativo al eje óptico 419 del instrumento 417. El elemento de filtro de película 539 tiene el mismo grosor que el filtro dicróico 477 y funciona trasladando la emisión de fluorescencia colimada 517 de nuevo sobre el eje óptico 419 del instrumento 417. Las sujeciones 545 que se extienden a través de las muescas paralelas 547 en la base 429 sobre lados opuestos del riel 533 fijan el deslizador 531 a la base 429 en la posición deseada a lo largo del eje óptico 419. Espaciado a la parte posterior del ensamblaje de película de alineación 529 hay una lente asférica 549 mantenida por un soporte 551 montado en un armazón 553 que también es deslizable sobre el riel 533 y está fijado en una posición seleccionada por sujeciones adecuadas 557. La lente asférica 549 enfoca la emisión de fluorescencia colimada 517 sobre un filtro espacial, generalmente denominado 559, que filtra el reflejo o emisión desde fuentes diferente a las células a analizar. La lente asférica 549 puede ser, por ejemplo, una lente asférica de 12,5 mm de diámetro que tiene una longitud focal de 15 mm, que está disponible en Oriel Corporation. La lente 549 está preferiblemente recubierta con anti-reflectante para longitudes de ondas de emisión visibles pero está hecha de un material (por ejemplo, vidrio incoloro) que atenúa adicionalmente la transmisión de dispersión de luz láser.

Como se muestra en la Fig. 34, el filtro espacial 559 puede comprender, un par de placas de apertura 561 mantenidas de forma liberable por un armazón 563 montado sobre la base 429 del instrumento 417. Cada una de las placas 561 tiene una ranura 567, 571 en la misma, siendo una ranura 567 preferiblemente generalmente vertical y la otra 571 preferiblemente generalmente horizontal, siendo la disposición tal que las ranuras 567, 571 se crucen para formar una apertura 573. La apertura 573 puede ser generalmente de forma rectangular y puede tener una dimensión vertical 575 de 100 micrómetros y una dimensión horizontal 577 de 500 micrómetros. El tamaño y forma de la apertura 573 pueden variar (o incluso ajustarse cambiando placas de apertura), siempre que funcione eliminando los reflejos y la luz de cualquier fuente diferente al volumen de recogida 579. El armazón 563 que sostiene las placas de apertura 561 preferiblemente tiene dos partes, concretamente, un porta-placas 583 deslizable sobre el riel 533 de la base 429 y fijado en posición seleccionada por las sujeciones 587, y un miembro de refuerzo 589 para fijar las placas de apertura 461 en posición sobre el porta-placas 583.

La dimensión más pequeña (vertical) 575 de la apertura 573 en el filtro espacial 559 puede dimensionarse (o ajustarse) para posibilitar el uso de una técnica de "barrido de ranura" para evaluar la célula. Esta técnica se describe en mayor detalle en la sección "punto de iluminación enfocado" de esta memoria descriptiva.

Otro ejemplo de un sistema óptico de epi-iluminación, generalmente denominado 450, se muestra en la Fig. 35. Este sistema de epi-iluminación es sustancialmente igual que el sistema mostrado en las Fig. 28-34, excepto lo indicado. Una diferencia significativa es que el filtro dicróico 477 se ha remplazado con un filtro dicróico diferente 451 que transmite (en lugar de reflejar) el haz de iluminación 25 y refleja (en lugar de transmitir) las emisiones fluorescentes 31. Además, como las emisiones de fluorescencia 31 se reflejan por el filtro dicróico 451 en lugar de transmitirse, no existe necesidad de una película de alineación 539 en este ejemplo de un sistema óptico de epi-iluminación 450. Por tanto, el sistema de epi-iluminación 450 es justo un ejemplo del modo en que puede reconfigurarse el sistema óptico si se desea.

Además, la lente cilíndrica 449 se monta sobre un ensamblaje de montaje ajustable 449A. El ensamblaje de montaje 449A permite el movimiento de traslado en dos ejes de la lente cilíndrica 449 en un plano perpendicular al haz de iluminación 25. Sujeciones liberables (por ejemplo, tornillos (no mostrados)) se extienden a través de orificios con forma de muesca 449B (solamente uno de los cuales es visible en la Fig. 35). La liberación de las sujeciones permite el movimiento de traslado de la lente 449 en una primera dirección perpendicular al haz 25. Sujeciones similares (no mostradas) se extienden a través de orificios con forma de muesca 449C, que permiten el movimiento de traslado de la lente 449 en una segunda dirección perpendicular a la primera dirección. Esto permite un ajuste secundario de las posiciones relativas de la lente cilíndrica 449 y el haz 25 de modo que la intersección del haz 25 y la lente 449 pueda moverse a través de la superficie de la lente 449, causando de este modo ligeros cambios en el enfoque proporcionado por la lente cilíndrica 449. Una vez la lente 449 está en la posición deseada, las sujeciones pueden apretarse para mantenerla ahí.

Fotodetector

La fluorescencia emitida que pasa a través del filtro espacial 559 cae sobre un fotodetector 117 fijado a una placa de montaje 591 deslizable sobre el riel 533 de la base 429 en la parte posterior del instrumento de epi-iluminación 417 y fijable en posición fija por las sujeciones 595 (Fig. 32). El fotodetector 117 detecta las emisiones fluorescentes 31 y las convierte en señales eléctricas que pueden procesarse para analizar las características deseadas de las células,

como se describirá en mayor detalle posteriormente. El fotodetector 117 puede ser un dispositivo convencional, tal como un fotodetector disponible en Hamamatsu. El fotodetector 117 preferiblemente incluye un preamplificador y ganancia PMT que se optimiza para la intensidad de emisión producida por el sistema de epi-iluminación para las células teñidas particulares que se están analizando.

En general, la ganancia PMT se optimiza cuando se aplican entre aproximadamente 200 y 2000 voltios al tubo de vacío. En el caso de detectar emisiones fluorescentes a partir de Hoechst 33342, por ejemplo, la ganancia PMT se optimiza cuando se aplican entre aproximadamente 400-800 voltios al tubo de vacío. Un fotodetector particularmente deseable incluye una PMT que tiene un intervalo espectral de 185-830 nm (pico de 530 nm), una corriente de ánodo promedio máxima de 0,01 mA, una sensibilidad radiante de cátodo de 70 mA/W típica, una sensibilidad luminosa de cátodo de 140, μ A/lm, una sensibilidad luminosa de ánodo de 300 A/lm, una corriente residual de ánodo máxima de 1 nA (0,1 nA típico), y un tiempo de propagación de 1,4 nanosegundos. La PMT es amplificador de corriente continua acoplada que demuestra una ganancia plana hasta > 37 MHz, que tiene un pico de salida de 1 V en una carga de 50 Ω y un tiempo de recuperación de menos de 400 nanosegundos. También es deseable para el amplificador permitir un justo de alto voltaje para la compensación de variaciones de eficacia de PMT sin disminuir la proporción de señal a ruido hasta menos de 800 dB.

Ángulo de incidencia del haz

La Fig. 36 ilustra esquemáticamente una orientación deseable de la intersección del haz de luz y la corriente de fluido. Son de señalar varios puntos. Como se muestra, el haz de luz 25 se enfoca sobre la corriente 21 a una localización 115 que está solamente a una corta distancia 605 desde el orificio de salida 103 de la boquilla 137, preferiblemente menos de 1,0 mm, o incluso dentro de la boquilla 137, de modo que las células pasan a través del punto 459 mientras aún están sustancialmente en orientación deseada, como se ha descrito previamente. Esto es particularmente importante para células que son móviles en la corriente de fluido 21, incluyendo células espermáticas.

Otro punto a señalar es que el haz 25 de este ejemplo puede dirigirse hacia la corriente de fluido 21 a lo largo de un eje del haz 609 que cruza la corriente de fluido 21 en un ángulo de incidencia A que está sesgado (en 90 grados) relativo a un eje longitudinal de la corriente de fluido 21, como se observa desde un lateral de la corriente 21 (véase la Fig. 36). Cuando se clasifican ciertas partículas, se ha descubierto que la mejor discriminación de los diferentes tipos de partículas puede obtenerse iluminando la corriente 21 a un ángulo de incidencia diferente de 0°. Los núcleos del espermatozoide, por ejemplo, se iluminan de forma deseable a un ángulo de incidencia A que está en el intervalo de 5 a 45 grados. Otras partículas (por ejemplo, células espermáticas vivas) son más fáciles de examinar cuando el haz de luz 25 es generalmente perpendicular a la corriente de fluido 21 (es decir, cuando el ángulo A es de aproximadamente 0°). Por tanto, se contempla que el ángulo A puede ser cualquier ángulo.

La selección apropiada del ángulo A provoca una mejorada discriminación de señal a ruido en ciertas partículas y por tanto una discriminación más precisa basada en diferentes características de esas partículas (por ejemplo, los núcleos de espermatozoide con células espermáticas con cromosomas X e Y). Esta mejora puede deberse a varios factores, incluyendo la dispersión de luz láser que entra en la lente de enfoque 511. Como el punto de iluminación enfocado 459 es preferiblemente más ancho que la corriente 21, se crea un patrón de difracción en la intersección 115 del haz 25 y la corriente 21. Cuando el ángulo A es mayor de aproximadamente 12 grados, el patrón de difracción reflejado no cae sobre la lente 511. Otro factor puede ser que el ángulo oblicuo A permite que el haz 25 se enfoque muy cerca del orificio de boquilla 103, de modo que el cuerpo de boquilla 139 no interfiere con la lente 511. De forma relacionada, las células se alinean de forma más uniforme cerca de la boquilla 137, de modo que el enfoque del punto de iluminación 459 cerca de la boquilla 137 provoca una señal mejorada. Además, el perfil más "de frente" de la célula presentada a la lente 511 (haz 25) al ángulo oblicuo A reduce la variación de la intensidad de fluorescencia total causada por cualquier error de alineación de la células. A este respecto, en el caso de células espermáticas es preferible que el haz 25 caiga sobre una de las caras amplias 207 de cada célula espermática 201, como se ha analizado anteriormente, y que la boquilla 101 y el sistema óptico 109 se posicionen para conseguir este resultado.

Aunque se cree que un ángulo oblicuo de incidencia A es beneficioso en la clasificación de algunas partículas, se contempla que el ángulo de intersección entre el eje del haz y la corriente puede ser de 90 grados o cualquier ángulo oblicuo. También se espera que el ángulo óptimo de incidencia pueda variar ampliamente dependiendo de las propiedades de las partículas particulares que se estén analizando.

Punto de iluminación enfocado

Con referencia a la Fig. 6, se muestra el punto de iluminación enfocado de un ejemplo teniendo una forma generalmente elíptica (oval) 459 con una longitud L1 a lo largo de un eje principal que se extiende generalmente a ángulos rectos a la dirección del flujo de la corriente de fluido 227 y una anchura W1 a lo largo de un eje menor que se extiende generalmente paralelo a la dirección del flujo de la corriente de fluido 227. La anchura W1 puede ser menor que la longitud de la cabeza de la célula espermática 219, e incluso más preferiblemente menor que la longitud de la región 225 que contiene la masa de ADN cromático de la célula, que en el caso de una célula

espermática bovina 201 tiene una longitud de menos de aproximadamente 1 μm . Para una corriente 21 que tiene una corriente envolvente 191 que es de aproximadamente 60 μm de diámetro y una corriente central 189 que contiene células espermáticas bovina 201, una longitud L1 ejemplar es de aproximadamente 80 μm y una anchura W1 ejemplar es de aproximadamente 1,5 μm . Enfocando el punto de iluminación 459 hasta una anchura W1 que es menor que la longitud de la cabeza 205 de la célula espermática 201, o cualquier otra célula o partícula que se esté analizando, e incluso más preferiblemente menor que el diámetro de la región de ADN 225 de la cabeza 205 de la célula espermática 201, se consigue mayor resolución de señal, como entenderán aquellos familiarizados con las técnicas de "barrido de ranura". Ésta es una técnica por la cual un haz 25 se estrecha hasta tener una anchura menor que la longitud de una célula (es decir, la dimensión de la célula en la dirección del flujo de la corriente) de modo que según se mueve la célula a través del haz estrecho, las emisiones de fotones 31 de la célula se miden sobre la longitud de la célula, como se analizará posteriormente. De este modo, puede obtenerse información acerca de variaciones en la estructura, incluyendo material de ADN, a lo largo de la longitud de la célula. La técnica de barrido de ranura también es útil para identificar células "coincidente", es decir, células que están solapando o están muy juntas.

Como se ha mencionado previamente, el barrido de ranura también puede realizarse dimensionando la apertura 573 del filtro espacial 559 hasta tener una dimensión vertical 575 tal que solamente una parte de la luz emitida desde una célula, correspondiente a una fracción de la longitud de la célula en la dirección del flujo de la corriente, pase a través de la apertura hasta el fotodetector 117. Además, la resolución de la señal puede optimizarse ajustando la anchura del haz y/o el tamaño de la apertura del filtro espacial para trabajar juntos para proporcionar un punto de iluminación que esté adecuadamente conformado para el barrido de ranura.

Un modo de ajustar la forma del punto de iluminación 459 es cambiando a una lente cilíndrica diferente y/o haciendo un ajuste a un expansor de haz en el sistema óptico 109. Puede contemplarse cualquier método adicional para conformar el haz 25 para formar un punto de iluminación con forma elíptica 459. También pueden usarse y pueden contemplarse puntos de iluminación de otras formas y tamaños.

Sistema de clasificación

La Fig. 2 ilustra un ejemplo del sistema de clasificación 119. El sistema de clasificación 119 comprende un dispositivo de carga electrostática 627 para cargar y/o no cargar las gotitas 33 dependiendo de la clasificación de las partículas contenidas en las gotitas 33 (por ejemplo, el contenido de cromosoma X/Y de células espermáticas), y un par de placas deflectoras cargadas electrostáticamente 629 para la clasificación de las gotitas 33 en diferentes grupos 123, 125, de acuerdo con su carga. Es deseable recubrir las placas deflectoras 629 con un recubrimiento opaco de baja emisión (por ejemplo, epoxi o pintura) para limitar la luz reflejada o emitida por las placas deflectoras 629. Las placas deflectoras 629 pueden cargarse mediante cualquier suministro de energía adecuado 635. Generalmente es deseable que el potencial eléctrico entre las dos placas deflectoras completamente cargadas 629 esté en el intervalo de 2000-4000 voltios. Sin embargo, el potencial eléctrico entre las placas deflectoras 629 puede estar en cualquier parte entre aproximadamente 1000 y 6000 voltios.

El dispositivo de carga 627 comprende un elemento de carga 631 que tiene una abertura 633 en el mismo a través de la cual la corriente 21 pasa en una localización cerca de la localización de rotura de gotitas 107 (por ejemplo, en cinco longitudes de gotita o más cerca). Es deseable montar el elemento de carga 631 con un mecanismo que facilite el ajuste de la posición del elemento de carga 631 con respecto a la localización de rotura de gotitas 107. Como se muestra en las Fig. 26 y 27, por ejemplo, el elemento de carga 631 y las placas deflectoras 629 pueden unirse a un ensamblaje de montaje ajustable 5001 que permita el traslado en tres ejes y el ajuste de inclinación del elemento de carga 631 y las placas deflectoras 629 con respecto al sistema de boquilla 101. Para el traslado a lo largo de un eje 5011 paralelo a la corriente 21, el ensamblaje de montaje 5001 incluye un cuadro 5003 fijado a un refuerzo 5005 mediante sujeciones liberables 5007 que pasan a través de muescas 5009 en la placa 5003, estando orientadas las muescas 5009 generalmente paralelas al eje 5011. Para el traslado en un eje 5013 perpendicular a la corriente 21, se fija un segundo cuadro de ajuste 5015 al primer cuadro 5003 mediante sujeciones liberables 5017 que pasan a través de las muescas 5019 en el segundo cuadro de ajuste 5015, estando orientadas las muescas 5019 generalmente paralelas al eje 5013. El elemento de carga 631 y las placas deflectoras 629 se fijan al segundo cuadro de ajuste 5015. Por tanto, liberando las sujeciones 5007 y/o 5017, puede ajustarse la posición del elemento de carga 631 y las placas deflectoras relativa al sistema de boquilla 101 en un plano paralelo a la corriente de fluido 21 y después apretar las sujeciones 5007 y/o 5017 para fijar el ensamblaje de montaje 5001.

Para el traslado a lo largo de un tercer eje perpendicular a los dos primeros ejes 5011, 5013, el refuerzo 5005 se fija a un soporte fijo 5021 mediante sujeciones ajustables 5023 (por ejemplo, pernos con rosca atornillados en orificios de rosca en el soporte fijo 5021). Cada sujeción ajustable 5023 puede pasar a través de un resorte 5025 posicionado entre el refuerzo 5005 y el soporte fijo 5021. La cantidad de compensación de cualquier resorte 5025 puede ajustarse apretando o aflojando la sujeción respectiva 5023. Ajustando la compresión de todos los resortes 5025 en la misma cantidad se provoca el traslado a lo largo del tercer eje. El ensamblaje de montaje 5001 puede inclinarse en casi cualquier dirección cambiando la compresión relativa de uno o más de los resortes 5025 con respecto a uno o más de los otros resortes 5025.

Las posiciones relativas del elemento de carga 631 y las placas deflectoras 629 permanecen fijas unas con respecto a las otras porque todo se fija al mismo cuadro de ajuste 5015. Esto evita que el ajuste del ensamblaje de montaje 5001 afecte a la alineación del elemento de carga 631 con respecto a las placas deflectoras 629.

El elemento de carga 631 se conecta a un circuito eléctrico adecuado (por ejemplo, un circuito de carga selectiva de 90 voltios) bajo el control del procesador 131 y acoplado a un suministro de energía para aplicar una carga eléctrica al elemento de carga 631. El circuito se usa para cargar o no cargar la corriente 21 inmediatamente antes de la formación de una gotita 33 en la localización de rotura 107 dependiendo de si la gotita 33 contiene una partícula que tiene las características deseadas (por ejemplo, al menos una célula espermática viva con cromosoma X). El elemento de carga 631 se posiciona de forma electrostática cerca de la corriente 21 o cerca de las gotitas 33 formadas a partir de la corriente 21 para proporcionar una referencia eléctrica con respecto a la polaridad electrostática de la corriente 21. Las gotitas 33 portan la misma carga que la corriente 21 en el instante en que la gotita 33 se rompe desde la corriente 21. Las gotitas 33 cargadas o no cargadas entonces pasan entre las placas deflectoras 629 y se clasifican por carga en recipientes de recogida 2207 del sistema de recogida 2201. Aunque la clasificación produce dos grupos o poblaciones de gotitas 123, 125 en la Fig. 2, las partículas pueden separarse en cualquier cantidad de poblaciones de 1 a N clasificadas colocando diferentes cargas en las gotitas 33 en grupos respectivos, suministrando la cantidad apropiada de recipientes de recogida, estando cada uno posicionado para recoger una diferente población de gotitas.

Calibración automatizada del retardo de gotitas

En el sistema de clasificación 119 descrito anteriormente, el procesador 131 debe estimar el tiempo que le lleva a una partícula moverse desde la localización de examen 115 hasta la localización de rotura de gotitas 107 de modo que la carga (o ausencia de carga) a aplicar a la gotita 33 que contiene esa partícula se aplique cuando la partícula está en la última gotita adherida 33 en la localización de rotura 107. Si la configuración de retardo usada por el procesador 131 es incorrecta, las gotitas 33 no se clasificarán de acuerdo con sus contenidos. Asimismo, si la aplicación de cargas eléctricas a las gotitas 33 está incluso ligeramente fuera de fase con la formación de gotitas 33 esto puede degradar la clasificación porque ninguna de las gotitas 33 estará completamente cargada y las gotitas 33 que se supone que tienen carga neutra portarán una pequeña carga eléctrica positiva o negativa. Esto alterará las trayectorias de las gotitas 33 a través del campo eléctrico entre las placas deflectoras 629.

El mejor modo de verificar que el procesador 131 está usando la configuración apropiada de retardo o para ajustar la configuración de retardo de gotitas (es decir, calibrar la configuración de retardo de gotitas del sistema 9), es clasificar varias gotitas 33 y examinar los resultados. Variando de forma creciente la configuración de retardo y controlando los resultados, puede seleccionarse la configuración óptima de retardo. Tradicionalmente, esta calibración de clasificación se realiza manualmente. Recientemente, se han diseñado sistema de calibración automatizados para muestrear o examinar los contenidos de las gotitas en las corrientes de gotitas clasificadas y ajustar de forma automática la configuración de retardo sin intervención humana. Por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 6.372.506 (Norton) y 5.643.796 (van den Engh), describen ambos sistemas automatizados de calibración de clasificación. Las ventajas pretendidas de estos sistemas son que son menos laboriosos y son capaces de verificar la configuración de retardo durante todo el proceso de clasificación en lugar de justo durante la preparación inicial. Los inconvenientes son que son complicados y ocupan un espacio valioso innecesariamente.

(i) Detectores de epi-iluminación

Con referencia a la Fig. 37, un sistema automatizado de calibración continua 4201 para un sistema de citometría de clasificación de gotitas activadas por fluorescencia comprende uno o más detectores de epi-iluminación 4203 posicionados para detectar los contenidos de las gotitas 33 para verificar la configuración de retardo para la carga de las gotitas. Con referencia a la Fig. 38, cada detector de epi-iluminación incluye una fuente de luz (no mostrada), un cable de fibra óptica 4205, un filtro dicroico 4207, un sistema de lente 4209, un fotodetector 4213, y un sistema de control. El procesador 131 puede servir como sistema de control, pero podrían usarse otros procesadores o controles en su lugar.

La fuente de luz puede ser un láser en estado sólido de baja potencia especializado únicamente para el sistema automatizado de calibración 4201. Como alternativa, puede usarse un divisor del haz (no mostrado) para desviar una parte (por ejemplo, aproximadamente el 5%) de la energía en el haz 25 usado para el examen de las partículas en la corriente de fluido 21 hasta uno o más detectores de epi-iluminación 4203. Asimismo, el cable de fibra óptica 4209 puede posicionarse en un captador de haz 4215 (Fig. 26) para reunir la luz del haz 25 después de pasar a través de la localización de examen 115. La luz desde la fuente de luz debe incluir luz que tenga una longitud de onda capaz de excitar moléculas fluorescentes en las partículas que se están clasificando, causando de este modo emisiones de fluorescencia 4211 a partir de las partículas. Si las partículas se tiñen con Hoechst 33342, por ejemplo, la fuente de luz puede proporcionar luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 350 nm, aproximadamente 407 nm o cualquier otra longitud de onda capaz de excitar las moléculas de Hoechst 33342.

El cable de fibra óptica 4205 se extiende desde la fuente de luz hasta una localización corriente abajo de la

localización de examen 115. En un ejemplo, el cable de fibra óptica 4205 conduce hasta una localización adyacente a la trayectoria de una de las corrientes de gotitas según se mueve a través del campo eléctrico entre las placas deflectoras 629. El filtro dicróico 4207 se posiciona frente al extremo del cable de fibra óptica 4205. El filtro dicróico 4207 transmite luz que tiene las características espectrales de la luz conducida por el cable de fibra óptica 4205, pero refleja luz que tiene características espectrales de las emisiones de fluorescencia 4211. Por tanto, el filtro dicróico 4207 puede tener las mismas especificaciones que el filtro dicróico 477 descrito anteriormente en relación con el instrumento óptico de epi-iluminación 417. La longitud focal del sistema de lente 4209 se selecciona en base a la distancia esperada del detector 4203 desde las gotitas 33 de modo que el volumen de iluminación/detección de cada detector 4203 se aproximadamente igual al volumen de las gotitas 33.

Con referencia al ejemplo mostrado en la Fig. 37, se posiciona un detector de epi-iluminación 4203 adyacente a la trayectoria de cada una de las tres corrientes de gotitas clasificadas 4225, 4227, 4229 para detectar los contenidos de gotitas 33 en una corriente respectiva. El sistema de citómetro 9 incluye un soporte eléctricamente aislado 4221 para montar las dos placas deflectoras 629. El soporte tiene tres orificios 4223, uno adyacente a la trayectoria de cada corriente de gotitas clasificadas 4225, 4227, 4229. Se posiciona un detector de epi-iluminación 4203 en cada orificio 4223 para observar las gotitas 33 en una de las corrientes de gotitas 4225, 4227, 4229 a través del orificio respectivo 4223. Esta configuración compacta ocupa relativamente poco espacio y mantiene los componentes del sistema de calibración 4201 fuera del camino, proporcionando mejor acceso a otras partes del citómetro 9.

Si una gotita que contiene una partícula fluorescente pasa a través del volumen de iluminación/detección del detector 4203, ésta provocará un centelleo de emisiones de fluorescencia 4211, algunas de las cuales se recogerán por el sistema de lente 4209 y se reflejarán desde el filtro dicróico 4207 hasta el fotodetector 4213. Las señales del fotodetector 4213 se proporcionan al procesador 131. En base a las señales recibidas desde los fotodetectores 4213, el procesador 131 puede determinar los contenidos de las gotitas 33 en cada una de las corrientes de gotitas clasificadas 4225, 4227, 4229.

Si un detector 4203 no logra detectar un centelleo de emisión de fluorescencia 4211 cuando el procesador 131 espera que una gotita 33 que contiene una partícula fluorescente pase por ese detector 4203, el procesador 131 puede usar esa información para ajustar la configuración de retardo o ajustar la localización de la localización de rotura de gotitas 107. Asimismo, el procesador 131 puede hacer un ajuste si un detector 4203 detecta una emisión fluorescente 4211 cuando el procesador 131 no espera que una gotita 33 que contiene una partícula pase por el detector 4203. Además, el procesador puede comparar la frecuencia relativa de emisiones fluorescentes 4211 desde las corrientes clasificadas 4225, 4227, 4229 para ver si la frecuencia de las emisiones fluorescentes detectadas 4211 coincide con la frecuencia esperada. El procesador 131 también puede ajustar la amplitud de la carga aplicada al elemento de carga 631 para aumentar o disminuir la cantidad por la cual una corriente clasificada 4225, 4229 se desvía para maximizar la intensidad de las emisiones de fluorescencia detectadas 4211. Esto mantendrá la alineación de la trayectoria de las corrientes de gotitas desviadas 4225, 4229 de modo que las gotitas pasen directamente a través del volumen de recogida del detector de epi-iluminación. Como los detectores 4203 están posicionados para observar las corrientes 4225, 4227, 4229 según se mueven a través del campo eléctrico entre las placas deflectoras 629, el sistema de calibración tiene un tiempo de respuesta más corto que el que sería si observaran las corrientes 4225, 4227, 4229 en el área de caída libre corriente debajo de las placas deflectoras.

(ii) Corriente de ensayo de gotitas vacías

Una indicación sensible de la calidad de la calibración puede disponerse creando y controlando una corriente de ensayo de calibración que contiene sustancialmente sólo gotitas vacías 33. Con referencia al sistema de calibración de clasificación 4201 mostrado en la Fig. 37, las gotitas 33 que contienen partículas deseadas se clasifican en la corriente 4225 y las gotitas 33 que contienen cualquier otra partícula y la mayoría de las gotitas vacías 33 se clasifican en la corriente 4229 (es decir, la corriente de residuos). La corriente de ensayo 4227 se crea aplicando una carga neutra a al menos una fracción (por ejemplo, 1 de cada 10) de las gotitas vacías 33. Muchas gotitas 33 que se consideran "vacías" para los propósitos tradicionales de clasificación son realmente gotitas 33 para las cuales existe una probabilidad baja de que la gotita 33 contenga una partícula, en base al tiempo de llegada de las partículas a la localización de examen 115 y los límites estimados de formación de gotitas en la corriente de fluido 21. Estas gotitas "vacías" no deben clasificarse en la corriente de ensayo 4227 porque esto provocaría de forma inevitable la detección de algunas partículas en la corriente de ensayo 4227.

En su lugar, para la corriente de ensayo 4227 el procesador 131 debe seleccionar solamente gotitas 33 que el procesador 131 crea que tienen probabilidad cero de contener una partícula con el fin de crear una corriente de ensayo sustancialmente libre de partículas 4227. La probabilidad de que cualquier gotita 33 seleccionada aleatoriamente contenga una célula es conocida y es aproximadamente la tasa de análisis promedio de células dividida por la tasa de generación de gotitas. Esto significa que controlando la tasa de clasificaciones erróneas en la corriente de ensayo 4227 es posible estimar el ajuste fraccional de la relación de fase de la carga de gotitas necesaria para coincidir con la fase de formación de gotitas 33. Por ejemplo el procesador 131 puede seleccionar gotitas que estima que tienen una probabilidad del 15% o inferior de contener una partícula. El corte probabilista para una probabilidad sustancialmente cero puede seleccionarse en base a la velocidad de clasificación, la tolerancia de impurezas, o otros parámetros de clasificación, incluyendo el corte probabilidades mayores de que una

gota incluya una partícula para clasificación a alta velocidad o cuando hay mayor tolerancia de impurezas.

El fallo del procesador 131 en crear una corriente de ensayo sustancialmente libre de partículas 4227 (es decir, una corriente de ensayo 4227 en que la proporción de gotitas 33 que contienen partículas a la cantidad total de gotitas 33 concuerda con el corte probabilista usado para seleccionar gotitas 33 para la corriente de ensayo 4227), indicado por la detección de más de una cantidad umbral de gotitas 33 que contienen partículas en la corriente de ensayo 4227, es una indicación definitiva de clasificación sub-óptima e incita al procesador 131 a ajustar la configuración de retardo de gotitas. El nivel umbral se determina en relación al corte probabilista usado para seleccionar gotitas 33 para la corriente de ensayo 4227 y la cantidad total de gotitas 33 seleccionada para la corriente de ensayo 4227. De forma ideal, algunas gotitas 33 puede seleccionarse para la corriente de ensayo 4227 a pesar de que una o más partículas en la corriente de fluido 21 estén relativamente cerca de un límite de formación de gotitas estimado para la gotita respectiva 33 para hacer al sistema 4201 más sensible a configuraciones de retardo de gotitas ligeramente sub-óptimas.

Por supuesto, el sistema de calibración de clasificación podría aplicar una carga no neutra a y desviar gotitas seleccionadas para la corriente de ensayo. El orden relativo de la corrientes 4225, 4227, 4229 también podría reordenarse, aunque interponer la corriente de ensayo 4227 entre la corriente de residuos 4225 y la corriente de partículas deseadas 4229 reduce el riesgo de contaminación cruzada de la muestra clasificada por la corriente de residuos. Además, si las partículas no emiten luz fluorescente, pueden usarse diferentes detectores para detectar cualquier luz dispersada causada por las partículas en la corriente de ensayo.

(iii) Impacto del sistema de calibración de clasificación

El sistema automatizado de calibración 4201 puede funcionar para determinar de forma automática y establecer la relación de fase entre la formación de gotitas y la carga de gotitas en aproximadamente el 5% de la fase óptima (es decir, en +/- aproximadamente 18 grados). El sistema 4201 puede funcionar para determinar de forma automática y establecer la relación de fase en aproximadamente el 1% de la fase óptima (es decir, en +/- aproximadamente 3,6 grados). Además, el sistema de calibración 4201 puede funcionar para controlar de forma continua una sistema de clasificación de gotitas de alta velocidad y mantener de forma automática la relación de fase en aproximadamente el 10% de la fase óptima (es decir, en +/- aproximadamente 36 grados). Además, el sistema 4201 puede funcionar para controlar de forma continua un sistema de clasificación de gotitas de alta velocidad y mantener de forma automática la relación de fase en aproximadamente el 3% de la fase óptima (es decir, en +/- 10,8 grados).

Corrección de fallos del sistema de clasificación

De vez en cuando, una gotita 33 se apartará de su trayectoria normal y golpeará el elemento de carga 631 o las placas deflectoras 629. Si una o más gotitas 33 golpean el elemento de carga 631, el elemento de carga 631 puede no ser capaz de cargar las gotitas 33 apropiadamente. Además, la trayectoria normal de la gotita 33 a través del elemento de carga 631 puede llegar a obstruirse causando que incluso más gotitas 33 se acumulen en el elemento de carga 631. Además, si gotitas dispersas 33 golpean una placa deflector 629, pueden distorsionar o alterar de otro modo las líneas del campo eléctrico entre las placas deflectoras 629, cambiando de este modo la trayectoria de las corrientes de gotitas clasificadas 123, 125.

Por tanto, es deseable tener un sistema de eliminación de desechos para retirar los desechos del elemento de carga 631 y/o las placas deflectoras 629. En un ejemplo, mostrado en las Fig. 26 y 27, el sistema 9 incluye un sistema de eliminación de desechos 5047 para el elemento de carga 631 y un sistema de eliminación de desechos 5049 para las placas deflectoras 629.

Con referencia a la Fig. 27, el elemento de carga 631 se mantiene en posición mediante un soporte 5051 fijado al cuadro 5015 del ensamblaje de montaje ajustable 5001. Un conducto de vacío 5053 (mostrado en sombras) se extiende a través del soporte 5051 hasta una abertura 5057 adyacente al elemento de carga 631. El conducto de vacío 5053 está conectado a una fuente de vacío adecuada (no mostrada) por una línea de vacío 5055 unida a un conector 5058 sobre el soporte 5051. Se proporcionan controles adecuados para aplicar selectivamente un vacío en el conducto 5053 para vaciar cualquier material indeseado (por ejemplo, gotitas dispersas 33) del elemento de carga 631 y restaurar la función apropiada del elemento de carga 631.

De forma relacionada, como se muestra en la Fig. 27, un colector 5061 fijado al ensamblaje de montaje 5001 tiene una red de conductos de aire 5063 en el mismo (mostrado en sombras) conectada mediante una línea de aire 5059 y un conector 5065 a una fuente de aire comprimido u otro gas (no mostrado). Los conductos 5063 tienen aberturas 5064 posicionadas a lo largo del lateral 5066 en cada placa deflector 629 y las partes 5067 de los conductos 5063 que conducen a las aberturas 5065 están orientadas de modo que el aire comprimidos soplado a través del colector 5061 elimine cualquier gotita dispersa 33 u otros desechos de las placas deflectoras 629. Cualquier material soplado de las placas deflectoras 629 golpeará el panel de cubierta (no mostrado) y se drenará en un dispositivo de recogida de residuos adecuado (no mostrado).

Si el procesador u otro detector determina que gotitas dispersas 33 han golpeado el elemento de carga 631 o las

placas deflectoras 629, indicado por el sistema de calibración de clasificación descrito anteriormente por ejemplo, el procesador puede iniciar automáticamente un procedimiento o modo de corrección de fallos, que puede incluir aplicar un vacío al conducto 5053 para variar el material del elemento de carga 631 y/o enviar gas comprimido a través de los conductos 5067 para soplar el material de las placas deflectoras 629.

5

Protección de la muestra clasificada durante el modo de fallos

El sistema 9 también puede incluir un mecanismo de prevención de contaminación 4041 (Fig. 26), que puede activarse por el procesador 131 para limitar o prevenir la contaminación de la muestra clasificada cada vez que el sistema de clasificación esté en el modo de corrección de fallos. El mecanismo de prevención de contaminación incluye un accionador neumático 4043 funcional para mover selectivamente un brazo oscilante 4045 entre una posición de protección (mostrada en la Fig. 26) y una posición no de protección (no mostrada). En la posición de protección, el extremo 4047 del brazo oscilante 4045 cubre la abertura del recipiente de recogida 4033, evitando de este modo la recogida de gotitas 33 por el recipiente de recogida 4033. En la posición no de protección, el recipiente de recogida 4033 está sin cubrir. Normalmente, el brazo oscilante 4045 está en la posición no de protección, pero el procesador 131 causa que el accionador 4043 mueva el brazo oscilante 4045 a la posición de protección cada vez que el procesador 131 determina que hay riesgo de contaminación (por ejemplo, el sistema de boquilla 101 queda obstruido, la localización de rotura de gotitas 107 se vuelve inestable, o gotitas dispersas 33 han golpeado el elemento de carga 631 o las placas deflectoras 629). El extremo 4047 del brazo oscilante 4045 tiene forma de cuba para drenar cualquier fluido recogido por el brazo oscilante 4045 en el recipiente de residuos 4035.

Sistema de suministro de fluidos

El sistema 1 descrito anteriormente es capaz de producir de forma eficaz cantidades de partículas (por ejemplo, células espermáticas X) clasificadas por características seleccionadas. La tasa de producción puede aumentarse o disminuirse variando las tasas a las cuales el sistema de suministro de fluidos 15 (Fig. 2) suministra el fluido portador 17 y el fluido envolvente 19 a la boquilla 137. En un ejemplo, el sistema de suministro de fluidos incluye una bomba de jeringa 645, siendo un ejemplo de dicha bomba MICROLAB® Modelo PSD/3 disponible en Hamilton Company. La bomba 645 es funcional para suministrar fluido portador 17 a la boquilla 137 a una tasa de aproximadamente 20 µl/min. En general, la bomba 645 debe ser funcional para suministrar fluido de muestra 17 a la boquilla 137 a una tasa en el intervalo de 10-50 µl/min. La bomba 645 está conectada por la línea de flujo 647 al suministro 3 de fluido portador 17, que puede ser un recipiente adecuado 649 que contiene un volumen de material a analizar y clasificar. Cuando la temperatura de las partículas que se están analizando es un factor, como en el caso de células espermáticas, por ejemplo, la temperatura del recipiente 649 puede controlarse por un sistema de control adecuado de la temperatura, tal como baño de calentamiento/refrigeración (no mostrado). La bomba de jeringa 645 es móvil a través de una carrera de admisión para aspirar fluido portador del recipiente de suministro y a través de una carrera de descarga para distribuir fluido portador 17 a través de una línea de suministro 651 hasta la aguja de inyección 157 del sistema de boquilla 101. La bomba 645 se acciona preferiblemente por un motor de velocidad variable (no mostrado) bajo el control del procesador 131. A modo de ejemplo, la bomba 645 puede accionarse por un motor paso a paso que funciona a tasas selectivamente variables para bombear fluido portador 17 hasta la aguja 159 a tasas necesarias para obtener el rendimiento deseado. Pueden usarse otros tipos de dispositivos de suministro de fluidos en lugar de una bomba de jeringa. Para proporcionar solamente un ejemplo, el recipiente 649 puede presurizarse por una fuente de gas presurizado. Además, es deseable mantener las líneas 647, 651 tan cortas como sea posible de forma práctica porque el entorno de la línea es no conductor para la salud de las células sensibles (por ejemplo, células espermáticas) que pueden estar en el fluido portador 17.

El suministro 7 de fluido envolvente 19 comprende un segundo recipiente 661, por ejemplo, un tanque en la Fig. 2, que aloja un volumen apropiado de fluido envolvente 19 conectado al orificio radial 173 en el cuerpo de flujo 133 del sistema de boquilla 101 mediante una línea de suministro 667 que tiene una válvula de control 669 en la misma. En el ejemplo de la Fig. 1, el recipiente de fluido envolvente 661 está presurizado por un sistema de presión de gas 671 que comprende una fuente 675 de gas presurizado (por ejemplo, aire u otro gas, tal como nitrógeno) que comunica con el tanque 661 mediante una línea de aire 679 que tiene un regulador 681 en el mismo para controlar la presión suministrada al tanque 661. Una válvula de dos direcciones 683 en la línea de aire 679 es móvil entre una primera posición que establece comunicación entre el tanque 661 y la fuente de gas 675 y una segunda posición que vacía el tanque 661. El regulador de la presión de gas 681 es un regulador convencional preferiblemente bajo el control del procesador 131. Controlando la presión del tanque 661, también puede controlarse la presión a la cual se suministra el fluido envolvente 19 al cuerpo de flujo 133. Esta presión puede variar de 1,1 a 6,9 bar (16 a 100 psi).

En la Fig. 26 el sistema de suministro de fluidos 15, incluye un tanque de fluido envolvente (no mostrado) y una estación de muestra 4051. La estación de muestra incluye un recipiente de presión de dos partes 4053 adaptado para alojar un tubo de muestra 4055. La sección inferior 4057 del recipiente de presión es móvil en dirección ascendente y descendente relativa a la sección superior 4059 del recipiente de presión 4053 entre una posición abierta (mostrada en la Fig. 26), en que el tubo de muestra 4055 puede cargarse o descargarse, y una posición cerrada (no mostrada) en que las dos partes 4057, 4059 del recipiente de presión 4053 quedan juntas para formar un sellamiento para contener el gas presurizado usado para bombear fluido portador 17 desde el tubo de muestra 4055 hasta el sistema de boquilla 101.

Cuando el recipiente de presión está abierto un brazo oscilante retenido por resorte 4071 se mueve hasta una posición por debajo de la línea 651 que suministra fluido portador 17 al sistema de boquilla 101 (véase también la Fig. 119 n° 4071'). El brazo oscilante 4071 tiene forma de cuba y está adaptado para recoger fluido retrodescargado a través de la línea 651 y para drenar el fluido retrodescargado hasta el recipiente de residuos a través del acceso 4073. Según se mueve el recipiente de presión 4053 desde su posición abierta hasta su posición cerrada, una placa de leva 4075 unida a la sección inferior 4057 del recipiente de presión 4053 mueve el brazo oscilante 4071 contra su retención de resorte para despejar el área entre las dos secciones 4057, 4059 y permitir que el recipiente de presión 4053 se cierre.

Control

Haciendo referencia de nuevo a la Fig. 2, el microprocesador 131 (u otro control y/o procesador digital o analógico, o combinaciones de los mismos) controla el funcionamiento del sistema 1. Como se indica a continuación con respecto a la Fig. 39, el microprocesador puede implementarse como un procesador de control del sistema y cuatro procesadores para manipular el procesamiento de la señal. Como alternativa, algunas o todas las funciones pueden estar integradas en uno o más procesadores. Por ejemplo, el microprocesador de control del sistema (véase la Fig. 36) puede implementarse usando uno de los cuatro procesadores de procesamiento de la señal. Además, como se indica a continuación, el procesamiento de la señal puede implementarse por un circuito analógico (por ejemplo, un analizador analógico de células como se muestra en la Fig. 39) o una combinación de circuitería analógica y digital.

El microprocesador 131 proporciona señales de salida para controlar el sistema de suministro de fluidos 15 (indicado a continuación) en respuesta a señales de entrada recibidas desde el sistema de epi-iluminación 415, proporciona señales de salida para controlar los transductores 105 en respuesta a señales de entrada recibidas desde el detector de roturas 389, y proporciona señales de salida para controlar el sistema de clasificación 119 (indicado a continuación) en respuesta a señales de entrada recibidas desde el sistema de epi-iluminación 415. El microprocesador 131 puede proporcionar señales de salida a otras partes del sistema de citometría 9 como se indica en otra parte en este documento. Además, el microprocesador 131 puede adaptarse para procesar información y proporcionar señales de salida a tiempo real. En términos generales, la expresión "tiempo real" se refiere a operaciones en que el funcionamiento del procesador 131 coincide con la percepción humana del tiempo o aquellas en que la velocidad de funcionamiento del procesador 131 coincide con la velocidad de procesos físicos o externos relevantes. En un contexto, la expresión "tiempo real" puede indicar que el sistema reacciona a eventos antes de que los eventos queden obsoletos.

En general, las señales eléctricas del sistema de epi-iluminación 415 se convierten en información digital por un conversor A/D 689 que suministra la información digital correspondiente al microprocesador 131. En respuesta a la información, el microprocesador 131 controla un sistema de clasificación 119 y un sistema de suministro de fluidos 15, ambos descritos anteriormente.

Las señales eléctricas producidas desde el fotodetector 117 del sistema de epi-iluminación 415 son señales de voltaje analógicas variables con el tiempo indicativas de la amplitud de la fluorescencia emitida 31 en cualquier instante en el tiempo generadas por cada célula cuando se ilumina por el haz láser 25. Por tanto, las señales analógicas (también mencionadas como salida analógica) están en forma de pulsos de forma de onda variables con el tiempo 497 como se ilustra esquemáticamente en las Fig. 52 y 53. En general un pulso de forma de onda 497 se define como una forma de onda o una parte de una forma de onda que contiene uno o más pulsos o alguna parte de un pulso. Por tanto, la amplitud de cada pulso de forma de onda 497 en cualquier instante en el tiempo representa la velocidad relativa de la emisión de fotones 31 de cada célula en ese instante en el tiempo según la célula pasa a través del haz láser 25. Las células espermáticas bovinas con cromosoma X tienen un mayor contenido de ADN que las células espermáticas bovinas con cromosoma Y (por ejemplo, aproximadamente el 3,8%). Como resultado, las células X vivas marcadas con un colorante fluorescente como se ha indicado anteriormente producirán un pulso de diferente forma de onda 497 que los pulsos de cualquier otra célula marcada. Analizando los pulsos 497 como se indica a continuación (véase procesamiento de la señal, barrido de ranura, y diferencia de pendiente crítica), cada célula puede identificarse como una célula X o no identificarse como una célula X (~X). En general, como se usa en este documento, células X se refiere a células X vivas, células Y se refiere a células Y vivas y células ~X se refiere a la combinación de células Y vivas y células que por lo demás producen una emisión de fluorescencia detectable 31 pero que no pueden identificarse con una probabilidad razonable como células X vivas.

La sincronización de cada pulso de forma de onda 497 indica la posición de cada célula en la corriente 21. Como la tasa a la cual se suministra el fluido envolvente 19 a través de la boquilla 137 permanece constante, y como la distancia d (en la Fig. 25) entre la boquilla 137 y la localización de rotura de gotitas 107 es conocida, la posición de cada gotita 33 es conocida y las células, si las hay, dentro de cada gotita 33 son conocidas. Por tanto, el microprocesador 131 puede calcular el instante en el cual cada gotita en formación pasa a través del collarín de carga 631 y puede controlar la polaridad del collarín 631 y de este modo controlar si una gotita 33 se carga para su desviación por los elementos de carga 631 del sistema de clasificación 119. Como el microprocesador 131 conoce la tasa de formación de gotitas e identifica las células dentro de una gota como X o ~X, el microprocesador 131 conoce el contenido celular de cada gotita 33 y hace un seguimiento (o enumera) la cantidad de células en cada población

123, 125. Dependiendo de la estrategia de clasificación, véase a continuación, el microprocesador 131 determina las gotitas 33 que están cargadas para su desviación y las gotitas 33 que no están cargadas de modo que no se desvían.

5 **Procesamiento de la señal**

A. Introducción de muestreo digital

Como se ha descrito previamente, la interacción entre el haz láser 25 y la partícula produce una emisión "pulsada" de gotones 31 (por ejemplo, una emisión de fluorescencia) que se captura por la lente de recogida 511 del sistema óptico 109 y se suministra a un fotodetector 117. El fotodetector 117 convierte la energía de los fotones en cualquier instante en el tiempo en una salida de voltaje analógica de amplitud variable en el tiempo. Esta salida es una serie de pulsos de forma de onda 497 (Fig. 43 y 44) que contiene muchas características que pueden usarse para discriminar entre poblaciones de partículas. Entre estas características están la emisión total de fotones, la tasa de emisión de fotones como una función del tránsito espacial de la partícula a través del haz láser, la tasa máxima de emisión de fotones durante el tránsito, la tasa promedio de emisión de fotones durante el tránsito, y el tiempo requerido para el tránsito. La combinación de la geometría del haz láser 459, el tamaño de partícula, la distribución de la fuente de emisión a través del volumen de partícula y la velocidad de la partícula determina el espectro de frecuencias del pulso de forma de onda 497. Por ejemplo el sistema 1 usado con semen bovino descrito previamente ha determinado que cada célula 201 produce un pulso de forma de onda 497 de entre 800 ns y 1200 ns de duración. También se ha determinado que como función de la frecuencia, más del 97% de la energía en el pulso de forma de onda 497 se libera a frecuencias por debajo de 30 MHz. Este espectro de frecuencias se analizará posteriormente relacionado con el teorema de muestreo de Nyquist. Tomados juntos estos pulsos de forma de onda 497 forman una señal de salida 701 desde el fotodetector 117 que es una señal continua variable en el tiempo que representa el tránsito de la corriente de partículas a través del aparato. Además de las características de los pulsos individuales que se usan para discriminar entre poblaciones, la señal variable en el tiempo proporciona un registro preciso en cuando al espaciado relativo (tiempo y posición) entre las partículas individuales que pasan a través del aparato y la velocidad relativa de las partículas que se mueven a través del aparato. Este registro preciso de tiempo, posición y velocidad puede sincronizarse con las señales del oscilador de generación de gotitas 703 como se muestra en la Fig. 44 para determinar las partículas que son miembros de una gotita particular 33 formada por el aparato de generación de gotitas 105. Esta información puede usarse como base para determinar la "coincidencia" o la aparición de una partícula deseada e indeseada en una gotita individual 33. La capacidad de determinar de forma precisa la cantidad y clasificación de cada partícula en una gotita 33 permite una ordenación precisa y eficaz.

Puede emplearse procesamiento de señales digitales 705 como se ilustra en la Fig. 72 para analizar la detección de pulsos de fluorescencia 31 indicada por señales de salida muestreadas de forma sincrónica 701 desde el fotodetector 117. Este procesamiento se implementaría en un software de análisis de pulsos que emplea instrucciones y/o algoritmos, como se indica en este documento. La señal de salida analógica variable en el tiempo 701 del fotodetector 117 se proporciona a un conversor A/D (analógico/digital) 689 que la muestrea sincrónicamente. Muestrear sincrónicamente significa muestrear para producir información digital correspondiente a la salida analógica. Muestrear sincrónicamente también se menciona como muestrear de forma continua o adquisición de datos continuos. Como se indica a continuación, la tasa de muestreo depende del espectro de frecuencias de la salida analógica.

El conversor 689 proporciona una salida que incluye información digital 707 que se proporciona al microprocesador 131 u otro dispositivo de análisis digital que ejecuta el software de análisis de pulsos para analizar la información digital 707. En general, el software de análisis de pulsos incluiría detección de pulsos digitales, extracción de características de pulso y discriminación de pulsos.

50 **B. Frecuencia de muestreo y espectros de frecuencias de las señales**

La señal de salida 701 de la PMT 117 se captura por un conversor analógico a digital de alta velocidad 689 (ADC) que muestrea la salida output 701 de forma continua a una frecuencia de 105 MHz. Es bien comprendido que cuando se muestrea una señal variable en el tiempo es necesario que la frecuencia de muestreo sea al menos dos veces la frecuencia máxima contenida en la señal que se está muestreando.

Esto se conoce como el teorema de muestreo de Nyquist. Por esta razón la señal de salida 701 de la PMT 117 se envía primero a través de un filtro de paso bajo de 40 MHz 854 (véase la Fig. 39) para asegurar que la frecuencia máxima contenida en la señal 701 está por debajo del límite de 52,5 MHz impuesto por la tasa de muestreo. Es importante indicar que los sistemas óptico 109, fluido 15 y de detección del aparato 1 se han sintonizado para producir una forma de onda del pulso 497 que tiene características óptimas de frecuencia para el muestreo a la tasa de 105 MHz. La tasa de muestreo puede variarse entre aproximadamente 25 y 200 MHz.

65 **C. Procesamiento de pulsos**

El procesamiento de pulsos tiene lugar en cuatro (4) Procesadores de DSP TigerSharc que comparten memoria y

están conectados entre sí por puertos paralelos de alta velocidad. Como se ilustra en la Fig. 39, los cuatro procesadores son: 1) un procesador de tratamiento de datos 863 que recibe datos de un ADC de alta velocidad 689 que digitaliza las señales de salida 701 del fotodetector 117; 2) un procesador de detección de pulsos 865 que detecta los pulsos de forma de onda 497 representados por la información digital; 3) un procesador de extracción de características y discriminación 867 que extrae características de los pulsos detectados 497 y discrimina los pulsos 497 en base a las características extraídas; y 4) un procesador de clasificación 873 que determina una clasificación de ordenación para cada pulso 497 en base a las características extraídas y la discriminación, que determina las decisiones de clasificación para las células y gotitas correspondientes 33 y que está sincronizada con la formación de gotitas 105. En general un procesador 863, 865, 867, 873 completa una tarea y establece una "señal" de modo que los procesadores compañeros sepan que hay datos disponibles para procesar.

Cada procesador 863, 865, 867, 873 funciona independientemente de los otros, maximizando el rendimiento global porque no se interrumpen entre sí. Por tanto, cualquier procesador 863, 865, 867, 873 puede ser capaz de realizar cualquier función y uno o más procesadores o funciones pueden combinarse en un único procesador o repartirse sobre una pluralidad de procesadores. Las etiquetas del procesador 863, 865, 867, 873 usadas anteriormente y esta aplicación se usan por conveniencia únicamente y no pretenden ser limitantes de ningún modo.

Los cuatro procesadores 863, 865, 867, 873 están vinculados a una SDRAM de placa DSP 851 para intercambiar información y están vinculados a una entrada/salida (I/O) de procesador 857 para su sincronización y comunicación con un bus I/O periférico 859 conectado al PC 735 y el generador de pulsos de clasificación 861. El I/O de procesador 857 puede implementarse por dos o más procesadores de I/O SharcFIN conectados por un enlace de comunicaciones. Las señales de clasificación 853 se proporcionan al PC 735 mediante el bus I/O periférico 857 y se usan para controlar el generador de pulsos de clasificación 861 que controla la carga de gotitas 33.

El I/O de procesador 857 recibe la salida 707 desde el conversor analógico/digital (ADC) 689, por ejemplo, Bitware Corp. 105MHz/2-canales, 14 bit con capacidad de 105MHz/1-canal sostenido. El ADC 689 está conectado a la salida del fotodetector 117 para convertir sus señales analógicas variables con el tiempo de salida 701 en información digital 707 y también está conectado a una SDRAM de placa I/O 855 para almacenar los bloques de información digital desde el ADC 689.

En general, las señales analógicas de salida 701 del fotodetector 117 son indicativas de la característica A o característica B (por ejemplo, X o $\sim X$). El conversor A/D 689 convierte las señales analógicas de salida 701 del fotodetector 117 del sistema de citometría de flujo 1 en información digital correspondiente 707. Los procesadores 863, 865, 867, 873 analizan y clasifican la información digital 707 y proporcionan una señal de clasificación al sistema de clasificación 119 como una función de la información digital detectada y clasificada.

D. Adquisición de datos

Como se ha indicado previamente, la señal de salida 701 del fotodetector 117 se captura por un conversor analógico a digital de alta velocidad (ADC) 689 que muestrea la salida de forma continua a una frecuencia de 105 MHz. Los datos (información digital 707) se transfieren inmediatamente en bloques de memoria de alta velocidad (SDRAM de placa I/O) 855 que sirve para acumular los datos entrantes. Estos bloques de memoria 855 se organizan de un modo que mantiene la integridad y secuencia de la corriente de datos 707. Estos bloques de memoria 855 también son accesibles por los procesadores de procesamiento de señales digitales (DSP) 863, 865, 867, 873 mediante acceso directo a la memoria (DMA). De este modo los procesadores 863, 865, 867, 873 pueden acceder a los datos entrantes 707 sin interrumpir el ADC 689. Esto facilita una transferencia eficaz de los datos 707 a estos procesadores 863, 865, 867, 873 para la extracción de características, el análisis y la clasificación de ordenación. En todo este proceso, el procesador de tratamiento de datos 863 mantiene las muestras de pulso 707 en orden y tiempo indexados (relativos al reloj maestro 737, que es 128 veces la frecuencia de gotita 33) para conservar su referencia al "tiempo real" o el tiempo verdadero en que la célula pasa a través del haz láser 25. El ADC 689 rebota hacia atrás y hacia delante entre dos entradas, muestreando de forma continua las señales analógicas variables con el tiempo de salida 701 incluyendo los pulsos de forma de onda 497 y convirtiéndolas en información digital 707 que se proporciona en bloques 855 a la SDRAM de placa I/O bajo el control del procesador de tratamiento de datos 863, el procesador 863 reúne la información 707 en una corriente continua.

E. Parámetros de detección de inicialización

Para distinguir de forma eficaz sobre el ruido de fondo, debe proporcionarse al software de detección de pulso digital 747 información que indique la estadística de segundo orden del fondo de señales, es decir el conocimiento del comportamiento de la señal de voltaje de salida 701 desde el fotodetector 117 cuando no existe pulso de fluorescencia 497. Esta estadística puede aprenderla el software para parámetros de detección de inicialización 741 de un modo no supervisado durante el periodo de inicialización inmediatamente después del arranque del sistema 1. En general, un pulso puede definirse como 2 ó 3 desviaciones típicas a partir del nivel de fondo.

Debido a la posibilidad de que la introducción del fluido portador 17 en la corriente de fluido envolvente 191 pueda causar un cambio en la emisión de fluorescencia de fondo, el fluido portador 17 debe estar presente para la

inicialización de los parámetros de detección. La computación simple de la estadística de segundo orden de una secuencia de tiempo de valores de señales de voltaje de salida puede sobre-estimar la desviación típica del fondo (debido a la posible presencia de pulsos de fluorescencia 497 en la secuencia). Por lo tanto se prefiere un procedimiento iterativo para eliminar gradualmente este efecto. El software de detección de pulsos 747 consigue esto computando la estadística de la señal total 701 (fondo + pulsos), usando estos valores para aplicar la lógica de detección de pulsos, re-computando la estadística de las señales sin muestras detectadas como dentro de pulsos, y repitiendo este procedimiento hasta que convergen las estimaciones estadísticas del fondo (o se produce una cantidad máxima fija de iteraciones). Evaluando el fondo con células presentes, puede determinarse una indicación más precisa de la amplitud del pulso correcto esperado 497. La Tabla III resume el procedimiento de inicialización de detección para determinar los parámetros de detección para su uso por el software de detección de pulsos.

Algoritmo:	Parámetros de detección de inicialización
Entrada:	vector de números de coma flotante <i>PMTvolts</i> ; número de coma flotante <i>statWindowSize</i> , número entero <i>maxIterations</i>
Salida:	número de coma flotante <i>bckgrndMean</i> ; número de coma flotante <i>bckgrndSTD</i>
Procedimiento:	
1.	Inicializar el vector de fondo <i>bckgrnd</i> a las últimas muestras <i>statWindowSize</i> del vector <i>PMTvolts</i> y <i>numIterations</i> , <i>lastSampleMean</i> , y <i>lastSampleSTD</i> a cero: $bckgrnd = PMTvolts[l \text{ a } statWindowSize]$ $lastSampleMean = 0$ $lastSampleSTD = 0$ $numIterations = 0$
2.	Computar la media de la muestra y la desviación típica de la muestra de <i>bckgrnd</i> y incrementar el contador de iteración: $sampleMean = \frac{\text{suma}(bckgrnd)}{statWindowSize}$ $sampleSTD = \sqrt{(\text{suma}(bckgrnd - sampleMean)^2) / statWindowSize}$ $numIterations = numIterations + 1$
3.	Comprobar la convergencia o cantidad máxima extraordinaria de iteraciones: $exitFlag = ((sampleMean - lastSampleMean < eps \wedge$ $(sampleStd - lastSampleStd < eps \vee$ $(numIteration > maxIterations))$ Si <i>exitFlag</i> es cierto, se va a la etapa 6 (lo demás continúa con la etapa 4).
4.	Aplicar el algoritmo de detección de pulsos, obteniendo vectores de muestras de pulso y nuevas estimaciones de muestras de fondo: $[pulse, bckgrnd] = pulse_detect(bckgrnd, sampleMean, sampleSTD)$
5.	Registrar las estimaciones estadísticas a partir de esta iteración y repetir $lastSampleMean = sampleMean$ $lastSampleSTD = sampleSTD$ Ir a la etapa 2.
6.	Establecer las estaciones estadísticas de fondo para la estadística de muestras y salir: $bckgrndMean = sampleMean$ $bckgrndSTD = sampleSTD$

Tabla III. Inicialización, de parámetros del algoritmo de detección de pulsos.

En general, el conversor A/D 689 convierte las señales analógicas de salida 701 del fotodetector 117 en la correspondiente información digital 707 indicativa de la característica A o característica B (por ejemplo, X o -X). El Procesador de señales digitales 865 determina las características de fondo de las señales variables con el tiempo de salida 701 a partir de la información digital 707 correspondiente a las mismas, detecta los pulsos de forma de onda 497 a partir de la información digital 707 como una función de las características de fondo determinadas, y proporciona una señal de clasificación 853 al sistema de clasificación 119 como una función de los pulsos detectados 497.

F. Parámetros de discriminación inicial

Similares a los parámetros de detección (y posterior a su inicialización como se muestra en la Tabla III), pueden inicializarse los parámetros para su uso en un algoritmo de discriminación de un modo no supervisado. A diferencia de los parámetros del algoritmo de detección, sin embargo, no es necesario un procedimiento iterativo. En este caso, el software para inicializar los parámetros de discriminación 745 detecta un número pre-establecido (por

ejemplo, 100.000) de pulsos de fluorescencia 497, computa las características a usar para la discriminación para cada pulso detectado 497, y usa un procedimiento de agrupación (véase la Tabla IV para un resumen de los procedimientos de agrupación candidatos) para asignar estos pulsos 497 a poblaciones de interés (por ejemplo, X, ~X).

5

Nombre del algoritmo	Aproximación del algoritmo
Media k	Minimización iterativa (local) de la suma de la distancia al cuadrado (Euclidiana o de Mahalanobis) entre puntos dentro de cada población [1]
Media k difusa	Expectación-maximización del modelo mixto (Gaussiano) [2]
Aglomerativo jerárquico	Fusión de los grupos "más cercanos" (partiendo con cada dato puntual como su propio grupo) hasta alcanzar la cantidad deseada de grupos. Diversas medidas para la determinación de los grupos "más cercanos" incluyen distancia entre puntos más próximos, distancia entre puntos más lejanos, distancia entre medias de grupo, y distancia promedio entre puntos. [1]

Tabla IV. Resumen de las aproximaciones de agrupación en consideración para su uso en inicialización de parámetros con algoritmo de discriminación.

La Fig. 73 contiene un ejemplo de los resultados de aplicación de un procedimiento de agrupación de media k para definir la población 1 y la población 2 en base a la estadística de distribución. La estadística de segundo orden de estas poblaciones entonces se usa para establecer los parámetros necesarios para la discriminación (los coeficientes de una función de decisión polinomial de 1^{er} o 2^o). La Tabla V resume el procedimiento de inicialización de discriminación.

10

Algoritmo:	Parámetros de discriminación de inicialización
Entrada:	Matriz de números de coma flotante <i>detectedPulseData</i> , vector de números de coma flotante <i>popPriorProbabilities</i>
Salida:	Para cada población de clase <i>i</i> : matriz de números de coma flotante <i>W_i</i> , vector de números de coma flotante <i>w_i</i> , número de coma flotante <i>w_{io}</i>
Procedimiento:	1. Computar los valores de características de los pulsos detectados (n valores por pulso, donde n es la dimensionalidad de espacio de características): $feature\ Values = feature_extract(detectedPulseData)$ 2. Agrupar los valores de características en el espacio de características para obtener miembros de la población $poblaciones = grupo(featureValues)$ 3. Computar la estadística de 2^o orden de poblaciones: (para $i = 1$ a m, donde m es el número de poblaciones/clases) (para $j = 1$ a n, donde n es dimensionalidad del espacio de características) $popMean_i[j] = \frac{\text{suma}(featureValues[poblaciones_i, j])}{n^o \text{ de muestras en } poblaciones_i}$ (para $k = 1$ a n, donde n es dimensionalidad del espacio de características) $tmpVal[j,k] = (featureValues[poblaciones_i, j] - poblacionMean_i[j]) \cdot (featureValues[poblaciones_i, k] - poblacionMean_i[k])$ $popCovariance[j,k] = \frac{\text{suma}(tmpVal[j,k])}{n^o \text{ de muestras en } poblaciones_i}$ 4. Computar coeficientes de función de discriminación polinomial: (para $i = 1$ a m, donde m es el número de poblaciones/clases) $W_i = -1/2 \cdot popCovariance_i^{-1}$ $w_i = popCovariance_i^{-1} popMean_i$ $w_{io} = -1/2 \cdot \ln([popCovariance_i]) - 1/2 popMean_i^T \cdot popCovariance_i^{-1} popMean_i + \ln(popPriorProbabilities_i)$

Tabla V. Inicialización de parámetros del algoritmo de discriminación.

En general, el conversor A/D 689 convierte las señales analógicas de salida 701 del fotodetector 117 en la correspondiente información digital 707 indicativa de la característica A o característica B (por ejemplo, X o ~X). El

procesador de señales digitales 867 genera parámetros de discriminación inicial correspondientes a la información digital 707, discrimina la información digital como una función de los parámetros de discriminación inicial, y proporciona una señal de clasificación 853 al sistema de clasificación 119 como una función de la información digital discriminada.

5

G. Detección de pulso digital

La primera etapa del procesamiento es la detección de pulsos que realiza el procesador de detección de pulsos 865 para determinar si una forma de onda particular es un pulso de forma de onda 497 correspondiente a la emisión de fluorescencia 31 de una célula. El procesador 865 ejecuta un algoritmo de detección de pulsos que identifica conjuntos de muestras con probabilidad de representar a las partículas buscadas para clasificarlas o a las partículas a evitar porque son contaminantes potenciales de una población. En el caso de la clasificación de esperma bovino, se añade un colorante para inactivar la emisión 31 de las células no viables, lo que hace que las intensidades de pulsos asociadas sean $\sim 1/3$ de la intensidad de una célula viva. Las células no viables no se consideran como blancos de clasificación ni como contaminación potencial. No se consideran como pulsos 497 detectados. Los pulsos 497 de las células vivas se detectan mediante el seguimiento de la intensidad de muestras para un número sucesivo de muestras que sobresalen de los niveles de fondo. Una vez que este nivel cruza un umbral determinado estadísticamente, el procesador 865 salta a un tiempo posterior que es aproximadamente 75% del ancho de pulso esperado 497 para una célula viva. Si el nivel está todavía por encima del umbral, la serie de muestras se considera como un pulso 497. Las muestras de los pulsos detectados 497 se transfieren a un bloque de memoria usada por el procesador de extracción de características 867.

Un enfoque de detección de anomalías estadísticas es un ejemplo que se puede emplear por el software de detección de pulsos digitales 747 aunque se considera que se pueden usar otros enfoques para identificar y/o aislar los pulsos digitalizados 497. Esencialmente, las muestras digitales 707 de las señales de voltaje de salida 701 del fotodetector 117 que detecta la fluorescencia que resultan estadísticamente anómalas respecto al fondo se consideran como parte de un pulso 497. Para tener una robustez adicional (para reducir al mínimo la detección de ruido), se pueden incluir criterios temporales adicionales.

La detección de pulso procede del siguiente modo. Cuando la señal de salida de voltaje 701 del fotodetector 117 no es un pulso, se calcula la distancia de Mahalanobis respecto al fondo de las muestras entrantes 707 de la señal 701 y se compara con un umbral prefijado. Si la distancia de una muestra dada excede el umbral, se considera como el comienzo potencial de un pulso 497 y el software de detección de pulsos empieza a acumular las muestras entrantes. Si el siguiente número predeterminado de muestras (por ejemplo, 25) también supera el umbral, se considera que ha comenzado un pulso 497 y la acumulación continúa hasta que se satisfacen los criterios de final de pulso; de otro modo, el búfer se vacía y se reanuda la comprobación de comienzo de un pulso. Mientras se detecta un pulso 497, si una muestra está por debajo del umbral, se considera como el final potencial de un pulso y se registra la ubicación del búfer (pero se continúa almacenando en el búfer la información de la muestra). Si el siguiente número predeterminado de muestras (por ejemplo, 25) también está por debajo del umbral, se considera que el pulso 497 ha terminado y el pulso 497 consta de las muestras almacenadas en el búfer hasta la ubicación registrada. La Tabla VI resume el algoritmo de detección de pulsos, y la Fig. 49 proporciona una ilustración de los resultados de la detección de pulsos en un pulso de fluorescencia 497 adquirido digitalmente.

Algoritmo:	Detección de pulso de fluorescencia digital
Entrada	vector de números de coma flotante <i>digSamples</i> , número de coma flotante <i>bkgndMean</i> , número de coma flotante <i>bkgndSigma</i> , número de coma flotante <i>pulseStartThresh</i> , número de coma flotante <i>pulseEndThresh</i> , número entero <i>numStartSamples</i> , número entero <i>numEndSamples</i>
Salida:	vector de números de coma flotante <i>pulseBuffer</i>
Procedimiento:	Inicializar <i>inPulseFlag</i> = 0, <i>pulseStartCount</i> = 0, <i>pulseEndCount</i> = 0 Para cada muestra en <i>digSamples</i>, calcular la distancia de Mahalanobis respecto al fondo: $mhDist[i] = \frac{(digSample[i] - bkgndMean)}{bkgndSigma}$ 3. Si <i>inPulseFlag</i> no está fijado, ir a la etapa4, si no ir a la etapa6. 4. Si <i>mhDist</i> > <i>pulseStartThresh</i>, colocar la muestra en <i>pulseBuffer</i>, aumentar <i>pulseStartCount</i>, e ir a la etapa5; si no fijar <i>pulseStartCount</i>=0, ir a la etapa 2. 5. Si <i>pulseStartCount</i> > <i>numStartSamples</i>, fijar <i>inPulseFlag</i> e ir a la etapa2. 6. Si <i>mhDist</i> < <i>pulseEndThresh</i>, colocar la muestra en <i>pulseBuffer</i>, fijar <i>lastPulseSample</i> en la posición actual del búfer, aumentar <i>pulseEndCount</i>, e ir a la etapa7; si no fijar <i>pulseEndCount</i> a cero e ir a la etapa2. 7. Si <i>pulseEndCount</i> es mayor que <i>numEndSamples</i>, regresar <i>pulseBuffer</i>[1 a <i>lastPulseSample</i>] y salir.

Tabla VI. Resumen de la detección de pulso digital de fluorescencia.

45

En general, el conversor A/D 689 convierte las señales analógicas de salida 701 del fotodetector 117 en la información digital correspondiente 707 que indica la característica A o la característica B (por ejemplo, X o -X). El procesador de señales digitales 865 analiza la información digital y el procesador 873 proporciona una señal de clasificación 853 al sistema de clasificación 119 en función de la información digital detectada.

H. Extracción y discriminación de características

La siguiente etapa del procesamiento es la extracción de características realizada mediante el procesador de extracción y discriminación de características 867. Este procesador responde a los indicadores establecidos por el procesador de detección de pulsos 865. Las muestras de los pulsos detectados se colocan en la memoria compartida con el procesador de extracción de características 867. Para cada pulso 497 se determinan las características tales como el área, el ancho del pulso, la altura del pulso, el coeficiente de correlación gaussiana y/u otras características. En algunos casos los pulsos 497 se determinan como "dobletes" o inválidos y las características no se extraen. Para el caso de esperma bovino 201 sólo se extraen las características para los pulsos 497 que tienen la amplitud y el ancho general de una célula viva X o Y. De manera característica, la amplitud del pulso para una célula espermática viva se encuentra entre aproximadamente 700 y 900 mV, aunque este intervalo puede ser tan amplio como de 500 a 1000 mV. Una vez que se extraen las características, éstas se comparan con los espacios de características definidos para la población o poblaciones seleccionadas para clasificación. Si las características coinciden con los espacios de características identificadas para la clasificación, entonces el procesador 867 establece una señal que indica un comando de clasificación positiva para el procesador de clasificación 873. En general, la clasificación de una célula particular la hace por el procesador de discriminación 867 y la decisión de separación la hace el procesador de clasificación 873.

La información digital 707 que representa la emisión de fluorescencia 31 (y por lo tanto las características de las células correspondientes que las crearon) la discrimina el software 757 en base a caracteres o características específicas que muestran un comportamiento estadístico marcadamente diferente en el espacio de características (el espacio ortogonal n-dimensional formado por n características como ejes) para las diferentes poblaciones de interés. Por lo tanto, la primera etapa al analizar la información digital 707 para la discriminación es el cálculo de estas características, un proceso llamado extracción de características realizado por el software de análisis de pulsos 749 ejecutado por el procesador 867. La Tabla VII enumera las diversas características posibles que el software 749 puede usar para esta aplicación. Se seleccionarán una o más de estas características para formar el espacio de características para la clasificación. Debe señalarse que hay características adicionales que proporcionan una mejor separación de modo que esta lista es sólo un ejemplo, no es integral. Por ejemplo, el software 749 puede emplear una subrutina 753 para determinar el área de pulso 497 y/o puede emplear una subrutina 755 para determinar el pico de pulso 497.

Nombre de la característica	Descripción de la característica
Área de pulso	Aproximado por la suma (o promedio) de las muestras de pulso
Pico del pulso	Máximo valor de las muestras de pulso
Área "interna" de pulso	Suma (o promedio) de las muestras TBD internas de pulso (centrada en el promedio de pulso)
Ancho de pulso	Número de muestras en el pulso.
"Gaussianidad" de pulso	MSE (error promedio al cuadrado) o coeficiente de correlación de pulso con una forma gaussiana con la misma estadística de segundo orden.
"Pico retardado" del pulso	Valor posterior al pico (o promedio) del pulso en muestras TBD
Diferencia crítica de pendiente (CSD)	Pendiente de pulso en un punto a lo largo del pulso en el cual la diferencia entre la primera derivada de un pulso producido por las partículas que tienen la característica A y la primera derivada de un pulso producido por las partículas que tienen la característica B se encuentra en un máximo o próximo a éste.

Tabla VII. Resumen de las características posibles que se está considerando usar en un análisis de pulso digital en relación con la extracción de características.

I. Barrido de ranura

En general, el haz elíptico 459 proporcionado por el sistema de iluminación 109 mide las diferencias relativas de contenido de ADN en las células. La resolución puede mejorarse aún más al analizar la fracción del pulso 497 de la emisión de fluorescencia 31 detectada por el fotodetector 117 que es más probable que contenga las características que se están evaluando. Un fenómeno biológico de ciertas células (por ejemplo, esperma bovino) es la localización de los cromosomas X e Y en la región subecuatorial 225 que está inmediatamente adyacente a la línea media longitudinal o ecuador o centro del núcleo 213 de la célula 201 y que tiene una longitud de aproximadamente 1 μm . (Véase la Fig. 6). En realidad, los cromosomas X/Y no están necesariamente centrados en el núcleo 213. Por lo tanto, la resolución puede mejorarse al convertir la salida analógica variable en el tiempo 701 del fotodetector 117 en

información digital 707 y analizar una porción de la información digital correspondiente a la fracción del pulso 497 de la emisión de fluorescencia 31, por ejemplo, correspondiente a la luz emitida desde la región circumequatorial 225 tal como 20-60% y en particular 20-30% del pulso de ondas centrado alrededor del pico del pulso 497.

5 Como se señaló anteriormente, se puede emplear el barrido de ranura para obtener la medición de fluorescencia de una porción de la cromatina de cada célula en lugar de obtenerla de la cromatina en su totalidad. El haz elíptico 459 proporcionado por el sistema de epi-iluminación 415 como se mencionó antes mide las diferencias relativas del contenido de ADN en las células en secciones específicas de la cromatina, para mejorar la resolución de las células X y las células ~X en relación entre sí. Como se señaló anteriormente, la técnica de medición de barrido de ranura es un enfoque de medición de fluorescencia que enfoca el haz de excitación 25 de modo que la dimensión del tamaño del haz enfocado 459 es mucho menor que el diámetro de una célula, como se muestra en la Fig. 6. De esta forma, el haz láser 25 explora la célula 201 a medida que la célula pasa a través del haz de forma elíptica 459. El pulso de forma de onda 497 resultante producido por el fotodetector 117 en la salida 701 que detecta la emisión de fluorescencia 31 que resulta de la iluminación del barrido de ranura contiene información acerca de la localización de la fluorescencia a lo largo de la longitud de la célula 201. Según se muestra en las Fig. 45-48, a medida que la célula 201 atraviesa el haz de forma elíptica 459, los pulsos de ondas que varían con el tiempo 497 (línea roja/anaranjada) son la convolución de la intensidad relativa del haz (línea azul) y la intensidad relativa del pulso emitido (que corresponde a la emisión de fluorescencia de la tinción excitada por el haz elíptico a medida que la célula atraviesa el haz y que varía debido a que la distribución de la fluorescencia a lo largo del eje de la célula varía).

20 Al iluminar sólo una fracción de la cromatina de la célula en un momento, la salida analógica resultante que varía con el tiempo 701 del fotodetector 117 contiene información específica de la localización de la fluorescencia dentro de la cromatina a lo largo del eje longitudinal de la célula 201. Aunque la emisión de fluorescencia 31 detectada del barrido de ranura es menor que la emisión 31 detectada de la exploración realizada por un haz 25 con un ancho de haz equivalente al diámetro de la célula, lo que da como resultado pulsos de onda 497 del barrido de ranura con una amplitud de pulso inferior, la mayor parte de la diferencia entre las células con cromosoma X y las células con cromosoma Y aparece en el centro del 20-30% al 20-60% del pulso de forma de onda 497. Si sólo se considera el área rectangular 725 en la Fig. 53 para discriminar los células espermáticas X-Y, entonces se puede medir una diferencia relativa mayor entre la variación localizada en el contenido de ADN dentro de la sección de la cromatina que corresponde a la región rectangular 725 debido a la presencia de los cromosomas X e Y dentro de esa región comparado con el contenido total de ADN de las células. Por ejemplo, las células espermáticas bovina X e Y tienen una diferencia en contenido de ADN total de aproximadamente el 3,8%. La emisión de fluorescencia 31 de los cromosomas X e Y estará contenida en la región rectangular 725. Si esta región rectangular 725 representa el 20% del pulso de forma de onda 497 total correspondiente a una emisión de fluorescencia 31, entonces existirá una diferencia del 14% en el contenido de ADN relativo dentro de la región. Al medir las diferencias relativas de contenido de ADN de secciones específicas de la cromatina, se mejora la resolución de la diferenciación de las célula espermáticas X e Y (por ejemplo, del 3,8% al 14%). La Fig. 54 ilustra la resolución que se puede alcanzar usando iluminación de barrido de ranura y procesando las áreas de sólo el 20% central del pulso 497 (es decir, la región rectangular 725 de la Fig. 53). El histograma de la Fig. 54 permite identificar un porcentaje muy alto (por ejemplo, 98%) de esperma que alberga cromosoma X y esperma que alberga cromosoma Y con un alto grado de confianza (por ejemplo, 95%). En comparación, el histograma de la Fig. 54, que ilustra la resolución que se puede obtener cuando se utilizan técnicas de iluminación convencionales, muestra que el barrido de ranura ofrece una mejora significativa con respecto a los resultados obtenidos usando técnicas convencionales de iluminación.

45 Dos enfoques que se pueden emplear para obtener el área 725 de la porción central del pulso de forma de onda 497 como se ilustra en la Fig. 53 son el procesamiento de las señales digitales (DSP) del fotodetector digitalizado 117 de salida analógica que varía en el tiempo 701, como se analiza en esta sección, o la integración analógica usando un umbral analógico desencadenante, como se indica a continuación. Según se observa en este documento, el procesamiento del DSP implica un muestreo continuo de la salida analógica que varía en el tiempo 701 del fotodetector 117 para obtener información digital 707 correspondiente a la salida 701 y aplicar algoritmos DSP a la información digital 707 para extraer las características, como por ejemplo el tamaño del área, de la información digital correspondiente a la porción central 725 del pulso de forma de onda 497 que corresponde a la diferencia en el contenido de ADN como resultado de la presencia de un cromosoma X o Y en diferentes células 201. Como un ejemplo sencillo, el 20% del centro del área total de cada pulso de forma de onda 497 se determinaría analizando la información digital 707 correspondiente al mismo. El análisis se usaría para generar un histograma tal como el ilustrado en la Fig. 53.

J. Barrido de láser pulsado

60 En un ejemplo, se contempla que, por ejemplo, el sistema 1 incluye un láser de pulsos para iluminar las células. En El barrido de ranura (como se ha descrito anteriormente) puede emplearse o no. Por ejemplo, se puede usar un láser de estado sólido de modo cerrado, para emitir una serie de pulsos electromagnéticos con un ancho de pulso (duración) de 1 a 100 picosegundos a una frecuencia de pulso de aproximadamente 50 a 150 MHz y a una potencia de salida promedio de aproximadamente 100 a 500 milivatios. Un láser adecuado es un láser Vanguard 350 de estado sólido de modo cerrado (disponible en Spectra-Physics, Mountain View, CA 94039), que puede funcionar para emitir una serie de pulsos de aproximadamente 12 picosegundos de ancho (duración) a una frecuencia de

aproximadamente 85 millones de pulsos por segundo y a una potencia promedio de aproximadamente 350 milivatios. Dado que los 350 mW de potencia se liberan en descargas sumamente cortas de sólo 12 picosegundos, la potencia de salida máxima de dicho láser es varios cientos de veces (por ejemplo, aproximadamente 800 veces) mayor que la potencia promedio.

La salida de un láser de esas características puede describirse como una onda cuasi continua porque, para muchas aplicaciones, la velocidad de repetición de pulso es suficientemente rápida como para aproximarse a una salida de onda continua. En efecto es posible hacer funcionar el sistema como se ha descrito anteriormente con un láser de onda cuasi continua prácticamente de la misma forma que como se haría funcionar con un láser de onda continua. Esto proporciona ciertas ventajas porque los láser de estado sólido habitualmente funcionan de manera más eficaz, requieren sistemas de refrigeración menos extensos y requieren menos mantenimiento que la mayoría de los demás láser.

Un láser de estado sólido de pulsos de onda cuasi continua también puede proporcionar relaciones señal a ruido significativamente mejores usando las técnicas de procesamiento de señales digitales. Se puede incluir un circuito de sincronización y se puede hacer funcionar para producir una señal de temporización indicativa de la llegada de los pulsos láser a la localización de examen 115 (es decir, el área donde el haz láser 25 ilumina la corriente 21). Por ejemplo, el circuito de sincronización puede ser un detector de pulso láser 3003 como se muestra en la Fig. 40 para detectar luz correspondiente al pulso láser incluyendo la luz dispersa generada por la interacción de cada pulso láser con la corriente de fluido 21 y/o incluyendo la luz de los pulsos láser. Alternativamente, para láser que se pueden disparar, se puede proporcionar una señal activadora al microprocesador 131 y/o al conversor A/D 689 para sincronizar cualquiera o ambos pulsos láser, como se observa a continuación con respecto a la Fig. 50. En cualquiera de los ejemplos, la sincronización del pulso láser proporcionaría una señal del oscilador para el sistema.

Con referencia a la Fig. 50, un diagrama de sincronización ilustra la relación de sincronización entre los pulsos láser LP, la emisión de fluorescencia FE desde una célula como resultado de la excitación repetida por los pulsos láser LP a medida que la célula pasa a través del haz de luz 459 y las muestras digitales DS de la salida del fotodetector 701. Según se muestra en las figuras 45-49, a medida que una célula pasa a través del haz láser 459, la emisión de fluorescencia 31 varía según la cantidad de iluminación de la porción de la célula que genera la emisión de fluorescencia 31. La Fig. 50 ilustra veinte pulsos láser (20) LP1-LP20 que inciden sobre una célula a medida que la célula pasa por la zona de examen 115 de un citómetro de flujo 1. Cada pulso láser LP1-LP20 corresponde a una emisión de fluorescencia FE1-FE20, respectivamente, la cual decae exponencialmente después de la excitación prácticamente instantánea por parte del pulso láser.

El microprocesador 131 puede controlar el conversor A/D 689 (véase la Fig. 40) para que el conversor 689 muestree la señal de salida 701 del fotodetector 117 en el pico o cercano a éste de cada emisión de fluorescencia FE1-FE20, como se indica por las muestras digitales DS1-DS20, respectivamente. En otras palabras, el circuito de sincronización sincroniza la velocidad de muestreo del conversor A/D 689 con la emisión de fluorescencia FE1-FE20. La señal digital resultante producida por el tránsito de una partícula a través de la zona de examen 115 es el equivalente funcional de la señal digital que se habría producido por la digitalización de pulsos de ondas 497 de un láser de onda continua. Como se muestra en la Fig. 51, por ejemplo, considerando solamente la intensidad de fluorescencia durante las muestras digitales DS1-DS20 y sin tener en cuenta la caída de intensidad de fluorescencia entre los pulsos láser LP1-LP20, la intensidad de fluorescencia como una función del tiempo es un pulso de forma de onda 497. Esto permite la extracción de características por parte del microprocesador 131 a partir de la señal digital 707 generada por el láser de pulsos para analizar la célula que proporciona las emisiones de fluorescencia FE1-FE20. En un ejemplo, se puede usar un fotodetector más sensible con un tiempo de respuesta relativamente rápido, de aproximadamente unos 2 nanosegundos o menos para detectar con mayor precisión la emisión de fluorescencia.

Por lo tanto, el láser de pulsos proporciona ventajas en un sistema de citometría de flujo 1 en que es posible usar un láser de pulsos de menor potencia para obtener sustancialmente el mismo análisis que se obtendría con un láser de onda continua que funcionara a una potencia promedio mucho mayor que la potencia promedio del láser de pulsos. Aún más, la potencia máxima de un láser de pulsos tiende a saturar los fluoróforos de modo que la emisión de fluorescencia se maximiza reduciendo así la relación señal a ruido de las señales de salida del fotodetector. En otras palabras, al usar un pulso láser que contiene mucha más energía de la que se requiere para saturar el fluoróforo, las variaciones en la salida del láser no dan como resultado variaciones en la emisión de fluorescencia 31.

Los especialistas en la técnica reconocerán que hay muchas maneras de hacer que un láser emita una serie de pulsos. Se entiende que se podrían usar otros láser de pulsos, incluyendo otros láser de modo cerrado, láser de conmutación de Q y de vaciado de cavidad, en lugar del láser de modo cerrado abalizado anteriormente. De igual manera, serán evidentes muchas otras maneras de controlar el tiempo del muestreo digital y procesar la información resultante basándose en la descripción previa. Por ejemplo, el muestreo digital se podría cronometrar para que haya un retardo diferente (o ningún retardo) entre un pulso láser y una muestra digital. Asimismo, el número de muestras digitales por pulso o el número de pulsos que transcurren entre el muestreo digital también se puede variar.

K. Estimación de las características de la población

Como se ha indicado anteriormente, la citometría de flujo se puede usar para discriminar células espermáticas bovinas que albergan X de las células espermáticas bovinas que albergan Y en base a su diferencia relativa del 3,8% en el contenido de ADN. La discriminación se logra mediante el análisis de las características de la señal que varía en el tiempo 701 que se produce por el fotodetector 117 usado para registrar la emisión de fluorescencia 31 a medida que las células teñidas pasan a través de la localización de examen 115. Esta interacción se ilustra en las Fig. 45-48. Las Fig. 45-48 ilustra el modo en que se genera un pulso de forma de onda 497 por las emisiones de fluorescencia 31 resultantes de la interacción entre el haz láser 25 y un célula espermática teñida 201. El pulso de emisión 497 es la integral de convolución de la función espacial de excitación y la función espacial de emisión de la célula 201. Las características del pulso de forma de onda 497 de fluorescencia se usan para clasificar una célula como X, Y o indeterminada. En un ejemplo, la discriminación X-Y depende de dos características de pulso: la altura del pico del pulso y el área del pulso.

Estas características se ilustran en el pulso de ejemplo que aparece en las Fig. 52 y 53. Las Fig. 52 y 53 son los ejemplos de pulsos 497 de células espermáticas que albergan X y que albergan Y. Los pulsos 497 se generaron a partir de un modelo informático que asumió iluminación de excitación con un haz láser 25 que tenía un punto de iluminación de forma elíptica 459 con una cintura de haz gaussiano W1 de 2 μm (Fig. 6) y donde la diferencia de contenido de ADN estaba distribuida uniformemente a través del 20 por ciento central de la célula 201. Estas suposiciones son representativas de la iluminación de barrido de ranura de las células espermáticas bovinas 201 con una diferencia localizada de ADN analizada en más detalle anteriormente. La integración de los pulsos 497 da como resultado una diferencia promedio del 3,8% entre el área del pulso 497 para un célula X y el área del pulso 497 para un célula Y.

Es posible generar gráficos de dispersión e histograma del pico del pulso 497 y las características del área para las células y los núcleos teñidos. Las Fig. 56-59 contienen histogramas de la característica del área para los núcleos y las células vivas teñidos, además de gráficos de dispersión del área del pulso 497 y las características del pico para los núcleos y las células vivas teñidos. Algunos de los elementos que pueden limitar la discriminación de las células vivas y en último término la velocidad de separación de las células son evidentes en estos gráficos. En particular, el histograma de células vivas de la Fig. 57 y en menor grado el histograma de los núcleos (Fig. 56), tienen un borde izquierdo que es característico de los histogramas de intensidad de fluorescencia para células espermáticas de mamífero. Se ha determinado que el borde izquierdo se genera por una o más poblaciones de las células levemente desalineadas (es decir, células que generan emisiones de fluorescencia relativamente más débiles debido a las desviaciones leves de la alineación óptima, pero que no están tan lejos de la alineación como para causar la emisión de fluorescencia relativamente más brillante 31 del borde estrecho 209 de la cabeza del esperma 205 a recoger por el sistema óptico 109). Sólo aproximadamente la mitad de las células X pueden identificarse fácilmente en el histograma del área de células vivas. El resto se superpone con la población de células Y y las poblaciones de células no alineadas. Aun cuando se añade la altura del pico del pulso, como se muestra en los gráficos de dispersión en las Fig. 56-59, la clasificación de células que albergan X puede estar significativamente limitada.

Las Fig. 60-61 ilustran la superposición de las distribuciones de poblaciones X e Y. En las Fig. 60-61, se aplicó un modelo informático de cuatro componentes a los datos sin procesar 6000 (Fig. 60) para estimar la estadística de población para dos poblaciones de células no alineadas (6001, 6003), células Y vivas y alineadas (6005) y células X vivas y alineadas (6007) (Fig. 61). Es aconsejable discriminar las poblaciones X e Y como una función del coeficiente de la variación (CV) de las poblaciones X e Y. Por ejemplo, es aconsejable reducir al mínimo el coeficiente de variación (CV) de las poblaciones X e Y para mejorar la discriminación. En particular, cuando se desea una población de células X clasificadas, es aconsejable que el CV de la población de células X sea menor del 1,5%, de forma más deseable de aproximadamente el 1,3% e incluso de forma más deseable menor del 1,3%. Tradicionalmente, el CV de una distribución de intensidad de fluorescencia de células espermáticas se ha considerado con respecto a las funciones de distribución para sólo dos poblaciones (X e Y). El control de calidad en lo que se refiere al CV se ha limitado a la estimación subjetiva sin procesar del CV de las poblaciones X e Y para decidir si vale la pena continuar con el análisis o la clasificación.

Una función del microprocesador 131 es proporcionar una estimación automatizada del CV de la población X usando el modelo de cuatro componentes ilustrado en las Fig. 60-61. Para estimar los CV de las poblaciones presentes en una distribución de características (por ejemplo, área de pulso), es necesario estimar la estadística de segundo orden de las distribuciones de población. Esto puede lograrse aplicando un modelo de una forma conocida y buscando el mejor ajuste de ese modelo a los datos observados.

Dado que se esperan datos con una distribución normal, se ha elegido un enfoque que consiste en una estimación de densidad no paramétrica de ventana de Parzen (utilizando una función de núcleo gaussiano) seguida de la aplicación de un modelo paramétrico de mezcla gaussiana. Específicamente, el modelo de cuatro componentes ilustrado en las Fig. 60-61 constan de una suma (o mezcla) de cuatro distribuciones gaussianas de una variable y estos cuatro componentes son las distribuciones de características correspondientes a células X alineadas, células Y alineadas y una población de células no alineadas de dos componentes. De este modo los parámetros que caracterizan el modelo son las medias de población (promedios) (4), desviaciones/variaciones típicas de población (4) y las probabilidades previas (% esperado de la distribución general) (4). Estos 12 parámetros luego se pueden

variar para lograr un mejor ajuste del modelo al histograma de datos observados. Con los parámetros del componente modelo así estimados, se puede determinar una estimulación del CV de una población de interés (en particular, células X) a partir de la desviación típica y la media de la población estimadas:

$$5 \quad CV = \frac{\text{desviación típica} \cdot 100\%}{\text{Media}}$$

Para reducir la complejidad computacional, se han establecido limitaciones en el modelo para reducir la magnitud del espacio paramétrico. En particular, las desviaciones típicas de los componentes del modelo correspondientes a las poblaciones alineadas X y las alineadas Y se han limitado para que sean iguales. Además, los componentes alineados X y alineados Y se han limitado para conformar el mismo porcentaje de la mezcla total, por lo tanto las poblaciones no alineadas se suponen en 50% de células X y 50% de células Y.

La estimación de densidad no paramétrica se aplica antes del ajuste del modelo para obtener una estimación mejorada de la función total de densidad (siendo la suma de las densidades de los componentes) subyacente a los datos sin procesar del histograma. La técnica específica aplicada se conoce como "ventana de Parzen" (Duda, Hart y Stork, 2001), que aquí utiliza una función de núcleo o ventana gaussiana debido a la naturaleza supuesta de suma-de-Gauss de la densidad subyacente. La desviación típica del núcleo gaussiano se elige para que sea un 1% del número de clases pobladas del histograma; este valor se ha observado en forma empírica para proporcionar un suavizado adecuado pero no excesivo del histograma. Cada punto de datos en el histograma contribuye así con una función del núcleo centrada en la clase del histograma que contiene el punto de datos. El cálculo de densidad se obtiene luego como la suma de las funciones del núcleo.

La metodología elegida para la variación de los parámetros del modelo para lograr el mejor ajuste a los datos se conoce como Maximización de Expectativas (Véase Duda R.O., Hart, P.E., y Stork, D.G., 2001, *Pattern Classification 2ª Ed.*, John Wiley & Sons; y Moore, A., "Very Fast EM-based Mixture Model Clustering using Multiresolution kd-trees," en M. Keams y D. Cohn, Eds., *Advances in Neural Information Processing Systems*, páginas 543-549, 1999, Morgan Kaufman).

La implementación algorítmica específica utilizada es la siguiente:

1) Se establecen las condiciones iniciales para los parámetros del modelo. Los dos máximos locales superiores en el cálculo de densidad de Parzen se usan como las localizaciones medias X e Y (la amplitud inicial de los máximos para ambas poblaciones X e Y que se están estimando como la amplitud del pico derecho). Se estima la variación inicial de la población X e Y como la variación de los datos a la derecha del mínimo local que tiene lugar entre los picos izquierdo y derecho en relación con el sitio del pico derecho. Además, las probabilidades iniciales previas de la población X e Y se establecen como el porcentaje de todos los puntos que caen a la derecha de este mínimo local. Las estimaciones iniciales de la densidad gaussiana de la población X e Y luego se calculan usando estos parámetros y se restan del cálculo total de la densidad de Parzen. La media y la variación de los restantes puntos de datos luego se calculan y se usan para inicializar el modelo de población no alineado de dos componentes del siguiente modo. Las dos medias de población se suponen (arbitrariamente) como que están a una separación de un 5% (2,5% arriba y debajo de la media no alineada general). Dada una suposición (inicial) de previos iguales y variaciones iguales, entonces, las variaciones del componente se dan como:

$$45 \quad \sigma_{1,2}^2 = \sigma_{tot}^2 - \frac{1}{4} (\mu_2^2 - \mu_1^2)$$

donde σ^2 es la varianza y μ es la media de la población respectiva.

2) Las estimaciones actualizadas de la estadística de población del componente (medias, desviaciones típicas y previos) se calculan usando el cálculo de densidad de Parzen. La ubicación de cada clase del histograma se pondera en los cálculos estadísticos por la estimación de densidad de Parzen en ese intervalo. Además, cada punto de datos contribuye a todos los cálculos estadísticos de población del componente ponderados por el grado al cual se considera que ese punto pertenece a una población dada, basándose en los parámetros de población del componente actual. Este grado de pertenencia se determina como la razón de un valor dado de densidad de probabilidad (gaussiana) de población del componente a la suma de todos los valores de densidad de probabilidad de población del componente en el punto de datos. Por lo tanto tenemos (para todos los puntos de datos x en el histograma, las poblaciones $c_p \in \{c_x, c_y, c_u\}$, y el vector del parámetro de población $\theta_p = [\mu_p, \sigma_p, P_p]$) pertenencias del componente de población usadas en el cálculo de las estimaciones de parámetros actualizados dados por:

$$60 \quad P(c_p | x, \theta_p) = P_p \cdot \frac{1}{\sigma_p \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(x - \mu_p)^2}{2\sigma_p^2} \right]$$

$$\text{Pertenencia}(c_p | x, \theta_p) = \frac{P(c_p | x, \theta_p)}{\sum_{n \neq p} P(c_n | x, \theta_n)} \cdot \text{EstimaciónDensidadParzen}(x)$$

Las medias y las variaciones actualizadas luego se calculan usando los valores de la estimación de densidad de Parzen ponderados por estos valores de pertenencia, con los previos actualizados dados por la pertenencia promedio para cada población del componente sobre todos los puntos de datos.

- 5 3) El procedimiento de actualización del parámetro sigue hasta que todos los parámetros alcanzan un estado estacionario (es decir, dejan de cambiar en forma significativa de una iteración de actualización a la siguiente (o hasta que tiene lugar un número máximo permitido de iteraciones)).

10 Como se ha mencionado anteriormente, las poblaciones X e Y alineadas están limitadas en este procedimiento para tener la misma variación y probabilidad previa. Esta limitación se logra al usar el promedio de la variación X e Y y los valores previos calculados a través del procedimiento anterior en cada iteración.

15 Alternativamente, puede aplicarse un enfoque de modelo similar a un modelo de tres componentes (Fig. 62-63) en el cual las células que comprenden a las dos poblaciones no alineadas 6001, 6003 en el modelo de cuatro componentes se consideran como una única distribución gaussiana 6011 en lugar de dos subpoblaciones diferentes. Las células no alineadas pueden modelarse como tercera distribución gaussiana (mostrada en la Fig. 63) que tiene una media y desviación típica determinadas por un mejor ajuste del borde izquierdo y el pico principal izquierdo de los datos sin procesar 6010 (mostrado en la Fig. 62). El modelo de tres poblaciones también ha estimado datos estadísticos para la población Y alineada 6015 y la población X alineada 6017. Una ventaja del modelo de tres
20 componentes es que requiere sólo un espacio de parámetros de 9 dimensiones (en comparación con el espacio de parámetros de 12 dimensiones necesario para el modelo de cuatro componentes). Sin embargo, se ha descubierto que el modelo de cuatro componentes da lugar típicamente a una función de densidad estimada que coincide mejor con los datos sin procesar.

25 Los especialistas en la técnica reconocerán que se puede usar una amplia diversidad de técnicas estadísticas para estimar las características de las poblaciones X alineada e Y alineada. Por lo tanto, pueden implementarse el modelo de cuatro componentes, el modelo de tres componentes u otros modelos por cualquier algoritmo informático paramétrico o no paramétrico para estimar las características de las poblaciones de células X alineadas y/o células Y alineadas.

30

L. Selección de las condiciones de tinción en base al CV

35 Varios factores afectan a la eficacia de clasificación de células teñidas de una población en subpoblaciones enriquecidas de células. Entre estos factores se encuentra la cantidad de fluorescencia diferencial entre las diversas subpoblaciones de células dentro de una población teñida. La fluorescencia diferencial está afectada por la absorción de colorante, que varía dependiendo de factores de tinción, como por ejemplo, la concentración del colorante, la duración del período de tinción, la temperatura a la que se produce la tinción, y la cantidad y concentración de todos los aditivos que pueden estar incluidos con el colorante o agregados a la mezcla de tinción. Por consiguiente, se pueden hacer ajustes a cualquiera o a todos esos factores para aumentar la eficacia de
40 clasificación (la velocidad a la que las células se pueden separar en al menos una subpoblación enriquecida de células con cierto grado de pureza y/o una pérdida mínima de las células deseadas) de la población de células teñidas. Aún más, se puede aumentar la eficacia de un sistema de clasificación de múltiples muestras ajustando uno o más de esos factores para cada muestra, contrarrestando de ese modo cualquier variación entre muestras. En el contexto de la clasificación de esperma bovino, por ejemplo, se puede mejorar la eficacia de clasificación ajustando
45 uno o más de los factores de tinción anteriores de una muestra de semen a la siguiente para contrarrestar las variaciones entre toros o las variaciones entre muestras de un mismo toro.

Una determinación del coeficiente de variación ("CV") para una característica de emisión de fluorescencia dada de una población de células clasificarse es una manera de determinar si se pueden hacer ajustes a las condiciones de
50 tinción para alcanzar la eficacia de clasificación deseada. Por ejemplo, se pueden ajustar las condiciones de tinción como una función del CV de cualquier característica extraída del pulso de onda generado por el desplazamiento de una célula a través de la localización de examen, tal como cualquier característica indicativa de la intensidad de fluorescencia total o la intensidad de fluorescencia máxima (incluidas la intensidad de fluorescencia total y la intensidad de fluorescencia máxima). Como se ha analizado con más detalle anteriormente, el CV es un indicador de la homogeneidad o uniformidad de una distribución de una propiedad o característica medibles de una población,
55 como por ejemplo una característica de emisión de fluorescencia de una subpoblación particular de una población dada. El CV se puede determinar dividiendo la desviación típica de la característica medida de una muestra entre el la media de la muestra. El CV también se puede determinar automáticamente mediante el sistema de citometría de flujo 9, tal como mediante la implementación del algoritmo de estimación del CV iterativo que se ha analizado en
60 detalle anteriormente. Cuanto menor es el CV mayor es la homogeneidad o la uniformidad de la distribución de la característica medida.

Aplicado a la tinción y separación de células espermáticas, el CV de una característica de emisión de fluorescencia particular para una muestra de células espermáticas que albergan el cromosoma X e Y puede estar afectado por las
65 condiciones de tinción. La concentración del colorante, la duración del período de tinción, la temperatura de la mezcla de tinción, y/o la cantidad y concentración de aditivos afectan al CV de una característica de emisión de

fluorescencia dada. Aumentar la concentración del colorante, la duración del período de tinción, y la temperatura de la mezcla de tinción y/o reducir la cantidad o la concentración de aditivos generalmente disminuirá el CV. Dichas condiciones se pueden alterar individualmente o combinadas. Además, si uno de esos factores es tal que tendiera a aumentar el CV de una característica de emisión de fluorescencia, tal como por ejemplo, acortar el período de tinción, entonces cualquiera o más de las otras condiciones se podrían ajustar de modo que contrarresten el efecto de la primera, tal como por ejemplo, aumentar la concentración de colorante, siendo el resultado general una disminución en el CV de la característica de emisión de fluorescencia a un nivel suficiente para alcanzar la eficacia de clasificación deseada.

Por consiguiente, manipulando cualquier factor o cualquier combinación de dichos factores de este modo, el CV de una característica de emisión de fluorescencia de poblaciones que albergan el cromosoma X e Y se puede disminuir hasta un valor que permita la clasificación de la muestra de espermatozoides en una subpoblación de semen enriquecido por sexo, que comprenda un porcentaje de pureza deseado de células que albergan el cromosoma X.

Desafortunadamente, los cambios que tienden a disminuir el CV del espermatozoides que alberga el cromosoma X pueden tener consecuencias negativas como el incremento del coste o la disminución en la motilidad o fertilidad del espermatozoides. Por ejemplo, en igualdad de condiciones de otros aspectos es deseable utilizar menores concentraciones de colorante y períodos de tinción más cortos para minimizar el efecto nocivo del proceso de tinción sobre el espermatozoides. Teniendo esto en mente, se puede predeterminar un CV al cual se pueda alcanzar una eficacia de clasificación aceptable. A partir de entonces, una fracción de la muestra de células a clasificar se tiñe y se somete a análisis de citometría de flujo. Se determina una característica de emisión de fluorescencia de la fracción, y la fracción se clasifica en subpoblaciones en base a esa característica. Se determina el CV de la característica de fluorescencia con respecto a las células de una de las subpoblaciones (una subpoblación enriquecida). Si el CV de la característica de emisión de fluorescencia de las células de la subpoblación enriquecida es igual a o menor que el CV predeterminado al cual se produce la clasificación, entonces la muestra de células restante se tiñe de acuerdo con las condiciones según las cuales se tiñó la fracción. A partir de entonces la muestra se clasifica, por ejemplo, según los métodos descritos en este documento. Si el CV de la característica de emisión de fluorescencia particular de las células de la subpoblación enriquecida es mayor que el CV predeterminado al cual se produce la clasificación, entonces se analiza otra fracción de la misma muestra de manera similar, pero en condiciones de tinción que se cree que alcanzarán un CV aún menor. En tal situación, el CV se puede disminuir mediante, por ejemplo, el incremento de la duración del período de tinción, el incremento de la concentración del colorante, el incremento de la temperatura a la que se tiñe la fracción o cualquier combinación de los mismos. Esta serie de etapas (es decir, la eliminación de una fracción de la muestra a clasificar, el ajuste de las condiciones de tinción, y la determinación del CV) se repite hasta que se determine que el CV de la característica de emisión de fluorescencia particular de las células de la subpoblación enriquecida es igual a o menor que el CV predeterminado. A partir de entonces, el resto de la muestra se tiñe consecuentemente y se puede clasificar. La muestra de células puede comprender una muestra de semen, y las células de la subpoblación enriquecida comprenden células que albergan el cromosoma X.

Por consiguiente, para un ejemplo existe un proceso para evaluar una serie de condiciones para teñir una población de células a clasificar, comprendiendo la población un primer tipo de células y un segundo tipo de células. El proceso comprende (a) teñir una fracción de la población de células con un colorante fluorescente de acuerdo con una serie de condiciones de tinción; (b) exponer las células teñidas a radiación electromagnética a medida que las células teñidas se hacen pasar a través de una localización de examen de un citómetro de flujo a una velocidad, R; (c) determinar una característica de emisión de fluorescencia de las células expuestas; (d) usar la característica de emisión de fluorescencia para clasificar las células en dos o más subpoblaciones, siendo una de las subpoblaciones una subpoblación enriquecida del primer tipo de células; (e) determinar un coeficiente de variación para la característica de emisión de fluorescencia de las células de la subpoblación enriquecida; y (f) determinar si es necesario modificar alguna de las condiciones de tinción según las cuales las células se van a teñir o la velocidad, R, a la que las células teñidas se hacen pasar a través de la localización de examen del citómetro de flujo. En otro ejemplo, se tiñe otra fracción de la población de células de acuerdo con una serie diferente de condiciones de tinción y se repiten las etapas (b) a (e) con esa fracción. Este proceso se puede llevar a cabo en dos, tres, cuatro o cualquier número de fracciones adicionales. En otro ejemplo más, se extraen múltiples fracciones de células de la muestra al mismo tiempo. Cada fracción puede teñirse simultáneamente, o cada fracción puede teñirse después de que la fracción previa haya pasado a través del citómetro de flujo. En el primer anterior, cada fracción puede teñirse según su propia y única serie de condiciones de tinción y la etapa (f) puede comprender el uso de los CV respectivos para determinar una serie de condiciones de tinción a utilizarse para teñir otras células. En el último caso, se pueden alterar las condiciones de tinción de las fracciones teñidas posteriormente de acuerdo con la determinación de la etapa (f) con respecto a una fracción analizada previamente. El proceso se repite hasta que se determina que el CV es aproximadamente igual a o menor que un CV específico (por ejemplo, 1,3 %).

Alternativamente, una vez que se ha predeterminado un CV al que se puede obtener una eficacia de clasificación aceptable, se puede teñir toda la muestra de células. Una fracción de la muestra de células se retira y se somete al análisis por citometría de flujo. Se determina una característica de emisión de fluorescencia de la fracción y se utiliza para clasificar las células en dos o más subpoblaciones. El CV de la característica de fluorescencia se determina con respecto a las células de una subpoblación enriquecida. Si el CV de la característica de emisión de fluorescencia de las células de la subpoblación enriquecida es igual a o menor que el CV predeterminado al que se

produce la clasificación, entonces el resto de la muestra de células se clasifica después de eso. Si el CV de la característica de emisión de fluorescencia particular de las células de la subpoblación enriquecida es mayor que el CV predeterminado al que se va a producir la clasificación, entonces se analiza de manera similar una segunda fracción de la misma muestra y se determina el CV de la característica de fluorescencia. El CV de la segunda fracción se puede disminuir, por ejemplo, incrementando la duración del período de tinción, incrementando la concentración del colorante o mediante cualquier combinación de los mismos. Esta serie de etapas (es decir, la retirada de una fracción de muestra a clasificar y una determinación del CV) se repite hasta que se determine que el CV de la característica de emisión de fluorescencia particular de las células de la subpoblación enriquecida es igual a o menor que el CV predeterminado. Después de eso, el resto de la muestra se puede clasificar, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en este documento. En particular, la muestra de células comprende una muestra de semen, y las células de la subpoblación enriquecida comprenden células que albergan el cromosoma X.

En consecuencia, otro ejemplo es un proceso para evaluar una serie de condiciones para teñir una población de células a clasificar; la población que comprende un primer tipo de células y un segundo tipo de células. El proceso comprende (a) teñir una fracción de la población de células con un colorante fluorescente de acuerdo con una serie de condiciones de tinción; (b) exponer las células teñidas a radiación electromagnética a medida que las células teñidas se hacen pasar a través de una localización de examen de un citómetro de flujo a una velocidad, R; (c) determinar una característica de emisión de fluorescencia de las células expuestas; (d) usar la característica de emisión de fluorescencia determinada para clasificar las células en dos o más subpoblaciones, siendo una de las subpoblaciones una subpoblación enriquecida del primer tipo de células; (e) determinar un coeficiente de variación para la característica de emisión de fluorescencia de las células de la subpoblación enriquecida; (f) determinar si es necesario modificar alguna de las condiciones de tinción según las cuales se va a teñir la fracción de células o la velocidad, R, a la que las células teñidas se hacen pasar a través de la localización de examen del citómetro de flujo; y (g) aplicar la condición de tinción modificada al resto de la población de células. En otro ejemplo, se repiten las etapas (a) a (f) al menos una vez con al menos otra fracción de la población de células. Las etapas (a) a (f) se pueden repetir una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o una mayor cantidad de veces. En otro ejemplo, se extraen múltiples fracciones de células de la muestra al mismo tiempo. Cada muestra puede teñirse simultáneamente, o cada una puede teñirse posteriormente a la fracción previa que está pasando a través del citómetro de flujo. En el último caso, se puede alterar la posterior tinción de las fracciones de acuerdo con la determinación de la etapa (f) con respecto a una fracción analizada previamente. En otro ejemplo más, el proceso comprende adicionalmente, antes de la etapa (g), seleccionar la condición de tinción modificada que produzca el coeficiente de variación más bajo para la característica de emisión de fluorescencia. En otro ejemplo más, el proceso comprende la repetición de las etapas (a) a (e) hasta que el coeficiente de variación de la característica de emisión de fluorescencia de al menos una de las fracciones sea de aproximadamente el 1,3% o menor. En otro ejemplo, el proceso comprende adicionalmente, antes de la etapa (g), seleccionar la condición de tinción modificada que produzca un coeficiente de variación de aproximadamente 1,3 o menor.

Además de realizar dicho análisis antes de clasificar la muestra entera como se ha detallado anteriormente, puede realizarse un análisis similar durante el proceso de tinción y clasificación de la muestra en un esfuerzo por asegurar el mantenimiento de la eficacia de clasificación. En consecuencia, en otro ejemplo, se determina el CV de una característica de emisión de fluorescencia de las células de una subpoblación enriquecida de una fracción de una muestra que se ha teñido previamente, una porción de la cual se está clasificando, como se ha descrito anteriormente. Los ajustes a las condiciones de tinción según las cuales se tiñeron estas muestras, se hacen de acuerdo con los métodos analizados anteriormente con respecto a los ajustes previos a la clasificación.

La selección de un CV predeterminado en que se consiga una eficacia de clasificación aceptable se basa en varios factores, incluyendo por ejemplo, el tipo de células que se están clasificando, la velocidad de clasificación y el grado de pureza deseado con respecto a la clasificación de la población en subpoblaciones enriquecidas. En general, se selecciona un CV que permita la clasificación al porcentaje de pureza deseado de la subpoblación enriquecida, minimizando al mismo tiempo la cantidad de tiempo necesaria para lograrlo, tal como por ejemplo, consiguiendo un grado de pureza de la subpoblación enriquecida del 85% minimizando al mismo tiempo la duración del período de tinción. Teniendo en cuenta estos factores, el CV de la característica de emisión de fluorescencia de las células de una subpoblación enriquecida es generalmente entre aproximadamente el 2,0% y aproximadamente el 1,0%.

M. Extracción de características por diferencia crítica de pendientes

El microprocesador 131' con procesamiento de señales digitales (DSP) ilustrado en la Fig. 40 que se emplea como parte de un clasificador de células permite extraer las características del pulso de emisión de fluorescencia de resolución temporal, en particular las características que no se pueden obtener fácil o económicamente usando tecnología analógica. En particular, una característica de pulso que presenta propiedades no lineales y que mejora significativamente la separación y por lo tanto la resolución de las partículas A y B (por ejemplo, mejora la discriminación de células espermáticas vivas, y células espermáticas X alineadas) es una característica a la que se le llama diferencia crítica de pendientes (CSD). La CSD es una cuantificación de la pendiente del pulso de emisión de fluorescencia a una amplitud de señal donde la diferencia entre la primera derivada de un pulso producido por la partícula A (por ejemplo, una célula que alberga X) y la primera derivada de un pulso producido por la partícula B (por ejemplo, un célula que alberga Y) se acerca a un máximo.

Las funciones que describen los pulsos de emisión de fluorescencia pueden expresarse en términos de la amplitud de la señal como una función de tiempo: $y = x(t)$. Dentro del contexto de detección de las características de la CSD, se puede definir una función que describa los pulsos de emisión de fluorescencia en términos del tiempo de duración del pulso en función de la amplitud de la señal. Esta función puede denominarse una función de M. La función de M se obtiene al transponer la función de pulso de emisión de fluorescencia según se muestra a continuación.

Función de pulso de emisión de fluorescencia: $y=x(t)$

Función de M: $t = M(y)$

t = duración del pulso

y = amplitud de la señal

La comparación de las funciones M para esperma bovino X e Y típicos ilustra el poder de discriminación de la característica de CSD. El panel superior de la Fig. 64 muestra los gráficos M promedio para células espermáticas que albergan X y células espermáticas que albergan Y. El panel central en la Fig. 64 muestra una gráfica de las primeras derivadas de estos gráficos M promedio (es decir M') para los valores de amplitud de señal menores que la altura de los picos del pulso de emisión de fluorescencia promedio para células espermáticas que albergan Y. En este gráfico se puede observar que a medida que la amplitud de la señal se aproxima a la altura de los picos promedio del pulso de los portadores de Y, la diferencia entre las primeras derivadas (M'y y M'x) aumenta en forma significativa. Representado gráficamente en el panel inferior de la Fig. 64 se encuentra la diferencia entre las primeras derivadas (M'x - M'y) como una función de la amplitud de la señal; la característica de CSD cuantifica la pendiente de M (M') para un pulso individual cerca de la región donde ocurre la máxima diferencia entre las primeras derivadas (o la pendiente en un punto correspondiente en la función del pulso de emisión de fluorescencia). Para discriminar células espermáticas que albergan X y células espermáticas que albergan Y, se determina la CSD para cada pulso en el punto donde el borde principal del pulso corta el umbral de CSD, como se muestra en las Fig. 62-63. En algunos ejemplos, la CSD puede depender de las características del haz de iluminación como el ancho del haz ya sea que el haz continuo o de pulsos. A continuación se analiza un algoritmo para determinar la CSD con respecto a la Fig. 65.

La Figura 64 ilustra que en algunos casos la característica de CSD tiene una naturaleza no lineal, como en el caso de la clasificación de poblaciones de células espermáticas X-Y. La diferencia entre las derivadas (M'x - M'y) aumenta a medida que el umbral de CSD se acerca al pico del pulso Y. La característica no lineal de esta diferencia coloca el valor promedio de las células Y no alineadas y alineadas a un 45% por debajo del valor promedio de las células X alineadas en el espacio de características de CSD. La desviación típica en el espacio de características de CSD de las células X alineadas en gran medida no se ve afectado (es decir similar al observado en los espacios de característica del pico o área). Es esta naturaleza de alta ganancia no lineal de la característica CSD la que aumenta el número de células X alineadas que pueden discriminarse con exactitud.

Un método computacionalmente eficaz para determinar el valor de CSD para un pulso dado se ilustra en la Fig. 65. Un umbral de CSD puede determinarse como una función de una altura del pico de los pulsos de emisión de fluorescencia. En particular, se puede determinar en base a la altura máxima promedio de los pulsos de emisión de fluorescencia. El umbral de CSD se mantiene en un punto donde aproximadamente un 25% de los picos de pulso de células vivas alineadas cae dentro del umbral o por debajo de éste. Por consiguiente, el umbral de CSD se ajusta dinámicamente durante la clasificación en base a una distribución en proceso de alturas de los picos (es decir, en relación con un promedio de altura de los picos). Por ejemplo, el umbral puede basarse en un promedio en proceso ponderado de alturas de pico (donde se otorga más peso a las mediciones más recientes que a las más antiguas). El valor de CSD es la pendiente de una línea que pasa a lo largo de dos puntos en el pulso. Estos puntos son el umbral de pulso de CSD y el pico del pulso. Por lo tanto, en este ejemplo el valor de CSD es sólo una aproximación de la pendiente del pulso de forma de onda 497 en la intersección del borde principal del pulso y el umbral de CSD. Sin embargo, otros métodos de computación del valor de CSD para un pulso dado son fácilmente evidentes, algunos de los cuales pueden proporcionar valores de CSD más precisos si se desea.

En otro ejemplo, el umbral de CSD se ajusta dinámicamente como una función del CV de la extracción de características de CSD para una subpoblación de partículas. En el caso de clasificación de células espermáticas, por ejemplo, aumentando el umbral de CSD desde un nivel relativamente bajo (es decir, el umbral de detección de pulsos) el umbral de CSD alcanzará un nivel que dará como resultado un aumento importante en el CV de la CSD de las células Y pero que todavía es suficientemente bajo de modo que el aumento en el CV de la CSD de las células X es significativamente más bajo en comparación con el aumento del CV en las células Y. Este efecto se puede observar en la distribución de la CSD como un despliegue en abanico de una subpoblación en la distribución general de la CSD. Se puede obtener una buena discriminación de la característica de CSD manteniendo el umbral de la CSD en este nivel.

Debe señalarse que el poder discriminatorio de la característica de CSD se mejora usando el enfoque de barrido de ranura para la citometría de flujo. La forma del haz de luz 459 puede influir sobre la forma del pulso de forma de onda 497. Por ejemplo, al usar un haz de luz 459 que tiene un ancho relativamente pequeño W1, una diferencia de fluorescencia localizada en una partícula de muestra (por ejemplo, la diferencia de intensidad de fluorescencia

localizada resultante de la localización del cromosoma X o Y en la región central 225 de un núcleo de esperma 213) tiene una mayor influencia sobre la primera derivada del pulso de ondas. En consecuencia, pueden usarse técnicas de barrido de ranura en combinación con extracción de características de CSD. Por el contrario, el uso de un haz láser con una cintura de haz que es demasiado grande (por ejemplo, igual o mayor que el diámetro de las partículas) puede evitar el uso eficaz de la característica de CSD para discriminar las partículas. Para el ancho de la cintura del haz, el intervalo aceptable del haz de iluminación enfocado dependerá de varios factores incluyendo el tamaño y la forma de las partículas, la distribución del colorante dentro de las partículas que se están analizando y la cantidad de diferencia entre los pulsos de ondas característicos para las partículas a discriminar. En el caso de células espermáticas, la extracción de características CSD de los pulsos de ondas 497 generados mediante la excitación de células espermáticas bovina 201 con un haz láser que presenta una cintura de haz de menos de 3 μm ha funcionado bien como se indica a continuación. Desde luego, se considera la extracción de características de CSD con cualquier forma de barrido de ranura como se analiza en la sección de barrido de ranura.

El uso de la característica de la CSD aumenta sustancialmente el rendimiento del sistema, en particular en el caso de la clasificación de poblaciones de células espermáticas X-Y porque permite la recogida de muchas más células X alineadas. Debido a la superposición en las poblaciones definida en los espacios de características pico frente a área o tiempo de propagación frente a área, no más de aproximadamente el 70% de células X alineadas pueden discriminarse con una certidumbre de aproximadamente el 85% o mayor. Cuando se usa la característica de la CSD, puede discriminarse el 95% o más de las células X alineadas, lo que aumenta significativamente el porcentaje de células X vivas que se pueden recoger sin reducir la pureza de la población de las células X recogidas por debajo de un nivel deseado de pureza.

Esto se observa gráficamente en los datos de células vivas mostrados en las Fig. 66-69. La naturaleza no lineal de la característica de CSD permite que las células X se aislen para la clasificación. La selección bruta en CSD aplicada en el gráfico de dispersión que se muestra en la Fig. 68 da como resultado un área de población de células X un 70% pura. Cuando se aplica discriminación de clasificación bivariable en los espacios de características de área y CSD (Fig. 68), puede discriminarse > 95% de las células X alineadas para la clasificación. Los datos en las Fig. 66-69 se obtuvieron sobre una producción total de células de aproximadamente 22.000 células vivas por segundo en un canal de un sistema de citometría de cuatro canales (véase el análisis del sistema multi-canal más adelante). Aun habilitando la detección de coincidencias (pureza alta), se recogieron más de 6.000 células X por segundo a un nivel de pureza de al menos el 85% de pureza.

Las Fig. 66-69 ilustran una ventaja de la característica de CSD cuando se usa para discriminar células espermáticas que albergan X y células espermáticas que albergan Y. Las Fig. 66 y 67 son histogramas de la característica del área de los pulsos de emisión de fluorescencia para el espacio de características definido en los gráficos de dispersión que se muestran en las Fig. 68 y 69. En la Fig. 68, la característica de CSD ha movido la mayoría de los células Y alineadas y no alineadas completamente fuera de la pantalla del gráfico de dispersión. Esto deja una población X con una pureza del 70% en el marco del gráfico de dispersión, que es lo que se muestra en el histograma del área del pulso en la Fig. 66. La discriminación no CSD se muestra en el gráfico de dispersión del área de pulso/tiempo de propagación mostrado en la Fig. 69. Las células X alineadas constituyen aproximadamente el 30% del histograma del área correspondiente (Fig. 67). Más del 95% de las células X alineadas pueden recogerse a una pureza > 85% usando la característica de CSD para la discriminación. En comparación, no se puede discriminar más del 70% de las células X alineadas usando el espacio de características tradicional a la derecha.

Se han completado varias clasificaciones de células vivas usando la técnica de discriminación bivariable del CSD con respecto al área de pulso. La Figura 70 es un ejemplo de cómo se puede usar una región de separación fijada en este espacio bidimensional de características para excluir las células no alineadas y las células Y. La Figura 70 ilustra una región de separación bivariable fijada en un gráfico de dispersión de CSD con respecto a la dispersión del área de pulso. Obsérvese cómo la región de clasificación baja por debajo de la característica del área para valores altos de CSD (CSD aumenta de izquierda a derecha y el área aumenta de abajo hacia arriba) y se mueve más alto en la característica de área mientras la CSD disminuye a valores más bajos. La región de clasificación bivariable establecida en el gráfico anterior de dispersión de CSD con respecto al área de pulso se usó para clasificar células espermáticas X a una velocidad de decisión de separación > 6000 células X por segundo con una velocidad de entrada de células vivas de 26.000 células por segundo. La pureza basada en un reanálisis de citometría de flujo fue del 87%.

La característica de CSD permite una estrategia de separación de alto rendimiento, interrupción en no coincidentes (es decir, aceptación de coincidentes o alta recuperación). En algunos ejemplos, una característica de pulso podría proporcionar una separación muy cercana a la línea de base y por lo tanto una clasificación exacta del 100% de las células espermáticas X e Y vivas. Esta condición permitiría separar las células a velocidades razonablemente altas sin descartar las gotitas que contienen las dos, una célula clasificada como X y una como no-X (ya sea desconocida o Y). Esta estrategia de separación se conoce como estrategia de alta recuperación o aceptación de coincidentes. Se realizó un experimento para ensayar esto usando la característica de CSD. Se realizaron las separaciones de aceptación de coincidentes con una velocidad de entrada de 12.000 células X vivas por segundo en un canal de un citómetro de flujo de cuatro canales. El 77% de las células X se alinearon adecuadamente, haciendo que 4.600 células X por segundo estuvieran potencialmente disponibles para la clasificación. En estas condiciones, se

separaron 4.300 células por segundo en la población de células X. Un análisis de pureza posterior indicó una pureza de esta clasificación de > 87% sin corrección para células muertas y un 89% con corrección para células muertas. Inmediatamente después se realizó una clasificación de detección de pureza elevada, de rechazo de coincidentes en las mismas condiciones. Se observó una velocidad de recogida de 3200-3500 células por segundo. El análisis de pureza indicó una pureza de un 92% sin corrección para células muertas y una pureza de un 94% con corrección para células muertas.

Los resultados del experimento anterior indican que a una velocidad de entrada de 12.000 células vivas por segundo, > 92% de las células X alineadas se pueden recoger a una pureza de > 85%. Esta es una indicación de que la característica de CSD proporciona una clasificación con una precisión del 95% de todas las células X alineadas. En estas circunstancias, el rendimiento del clasificador de células está limitado principalmente por la alineación correcta de las células.

La Figura 71 ilustra un ejemplo de un nuevo análisis de citometría de flujo para un ensayo en la cual el panel izquierdo corresponde a la estrategia de clasificación de aceptación de alta recuperación/coincidencia (estrategia de interrupción en no coincidentes) y el panel derecho corresponde a la estrategia de separación de rechazo de pureza elevada/coincidencia (estrategia de interrupción en coincidentes). El panel izquierdo (87% puro) es de una velocidad de salida de 4.400 células X por segundo de interrupción en no coincidentes. El panel derecho es de una clasificación completada en las mismas condiciones excepto que fueron interrumpieron las gotitas que contenían células contaminantes. La pureza para esta clasificación fue de aproximadamente el 92%. Estas clasificaciones demuestran que las clasificaciones de alta recuperación, interrupción en no coincidentes son posibles cuando se usa la característica de CSD para la discriminación.

El uso de la característica de CSD no está limitado a la clasificación de células espermáticas o a una especie particular de células espermáticas. Como apreciarán los especialistas en la técnica de la descripción anterior, la característica de CSD puede adaptarse para mejorar la discriminación entre cualquier grupo de partículas que genere pulsos de señal que tengan características diferentes de derivadas de primer orden independientemente de la causa de la diferencia.

N. Discriminación

Una vez las características de los pulsos se han extraídos por el software de análisis de pulsos 749, la discriminación (por ejemplo, clasificación) de pulsos la realiza el software de discriminación de pulsos 757 ejecutado por el procesador 867 empleando una aplicación de lógica como puede ser la regla de decisión de *Riesgo mínimo de Bayes*. Esta regla es una modificación de una regla de decisión de *Error mínimo de Bayes* que permite la asignación (y el ajuste) de costos dispares asociados con la toma de diferentes decisiones de clasificación (por ejemplo, discriminación) erróneas.

El *Error mínimo de Bayes* calcula el *límite de decisión* 763 o la *superficie de decisión* como la superficie de igual probabilidad a *posteriori* entre poblaciones en el espacio de características. Para el caso de las distribuciones de probabilidad gaussianas (supuestas) esta superficie es en general cuadrática, aunque en ciertas condiciones puede ser lineal (o puede aproximarse mucho por un hiperplano). La decisión de clasificación (por ejemplo, discriminación) se lleva a cabo calculando primero las probabilidades a *posteriori* para un punto dado en el espacio de características (en general en las densidades de probabilidad condicional de clase y las probabilidades conocidas/supuestas de población a *priori* usando la Regla de Bayes) y eligiendo luego la etiqueta de la clase como la de la población que tiene la mayor probabilidad a *posteriori*.

El *Riesgo mínimo de Bayes* incluye un factor para permitir el ajuste del límite de la decisión 763 en el caso deseado para asignar diferentes costos por hacer diferentes errores de clasificación (por ejemplo, puede ser más costoso clasificar células "Y" como células "X" que viceversa). En esta aplicación, esto permite una compensación entre la pureza y la recuperación de la muestra separada. En esta regla de decisión, el "riesgo" de asignar cada etiqueta de clase posible a un punto en el espacio de características se calcula como la suma de las probabilidades a *posteriori* de pertenencia a cada población multiplicada por el costo asociado con clasificarlas como la población actual dada la pertenencia verdadera a la otra población. El cuadro VIII resume el procedimiento para la clasificación de *Error mínimo de Bayes*. Se debe tener en cuenta que para las densidades gaussianas de múltiples variables, la evaluación de la regla de Bayes para obtener las probabilidades a *posteriori* puede reducirse a la evaluación de la función cuadrática observada en la Tabla VIII, dado que los coeficientes W , w , y w_0 son como los calculados en el procedimiento de inicialización de parámetros del algoritmo de discriminación dado en la Tabla V. La Fig. 74 muestra un ejemplo gráfico de la clasificación por este procedimiento. La ilustración de la izquierda es una ilustración esquemática de las dos poblaciones 1 y 2 y el límite de decisión 763 que separa las poblaciones. El histograma a la derecha muestra dos conjuntos concéntricos de elipses que definen las regiones X e Y, donde el límite de la decisión 763 es una línea definida por la intersección de las elipses.

Algoritmo: Clasificación de pulso de fluorescencia de Error Mínimo de Bayes (discriminación)	
Entrada: vector de números de coma flotante <i>pulseFeatures</i> , para cada población de clase <i>i</i> : matriz de números de coma flotante <i>W_i</i> , vector de números de coma flotante <i>w_i</i> , número de coma flotante <i>w_{i0}</i>	
Salida: número entero <i>classLabel</i>	
Procedimiento:	
1.	Para cada clase/población <i>i</i> , calcular el valor de la función discriminante <i>g_i</i> : $g_i = pulseFeatures^t \cdot W_i \cdot pulseFeatures + w_i^t \cdot pulseFeatures + w_{i0}$
2.	Para cada clase/población <i>i</i> , calcular el valor del riesgo de la función <i>risk_i</i> : Inicializar <i>risk_i</i> =0, luego para cada clase/población <i>j</i> : $Risk_i = risk_i + cost_{ij} * g_j$
3.	Buscar <i>j</i> s.t. $risk = \min(risk_j) \vee i$. Regresar <i>classLabel</i> = <i>j</i> y salir.

Tabla VIII. Resumen de la clasificación (discriminación) de pulso digital de fluorescencia por la regla de decisión de Error mínimo de Bayes.

Por motivos de robustez adicional, se lleva a cabo una etapa adicional en la clasificación de pulsos digitales de fluorescencia. Se calcula la distancia de Mahalanobis de un pulso en el espacio de características de la población asignada por el Error mínimo de Bayes, y si es mayor que un umbral, el pulso se marca como "no clasificado" o alguna otra indicación apropiada de que no es probable que sea un miembro de alguna población conocida. La Fig. 75 ilustra el efecto de esta etapa adicional, usando nuevamente las características calculadas de los datos de pulso de fluorescencia adquiridos en forma digital.

En general, el conversor A/D 689 convierte las señales analógicas de salida 701 del fotodetector 117 en la información digital correspondiente 707 que indica la característica A o la característica B (por ejemplo, X o ~X). El procesador de señales digitales 865 extrae características de la información digital y el procesador 873 proporciona una señal de clasificación 853 al sistema de clasificación como una función de las características extraídas.

O. Clasificación de ordenación y sincronización de gotitas

El cuarto procesador de clasificación 873 administra la clasificación de gotitas, ejecuta la estrategia de clasificación y suministra un pulso desencadenante de separación 853 que está sincronizado con la gotita seleccionada para la clasificación. Este procesador 873 recibe información de clasificación de células del procesador de discriminación 867 y relaciona esa información al oscilador de generación de gotitas 703 (es decir alinea la posición de partículas clasificadas para la ordenación en una población con la formación de gotitas). Determina si hay coincidencia dentro de una gotita y maneja esa coincidencia basándose en estrategias de clasificación predeterminadas. Mantiene un FIFO de todas las clasificaciones de células y decisiones de clasificación de gotitas que establece el retardo correcto entre el momento en el que la partícula se observó en tiempo real y el momento en el que la partícula llega a la última gotita unida. Producirá un pulso de salida adecuadamente cronometrado 853 de la polaridad y la amplitud apropiada para cada gotita seleccionada para la clasificación.

En general, el conversor A/D 689 convierte las señales analógicas de salida 701 del fotodetector 117 en la información digital correspondiente 707 que indica la característica A o la característica B (por ejemplo, X o ~X). El procesador de señales digitales 867 discrimina la información digital 707 que indica la característica A o que indica la característica B (por ejemplo, X o ~X) y proporciona una señal de clasificación 853 al sistema de clasificación 119 en función de la información digital discriminada.

En general, los procesadores de señales digitales 863, 865, 867, 873 incluyen instrucciones para detectar pulsos de ondas representados por la información digital, las instrucciones para extraer las características en los pulsos detectados y las instrucciones para discriminar los pulsos detectados como una función de sus características extraídas. Además, los procesadores incluyen instrucciones para definir un límite de decisión 763 que discrimina entre las características extraídas que representan las características A y las características extraídas que representan la característica B. Aún más, los procesadores 863, 865, 867, 873 pueden ajustar optativamente la ubicación relativa del límite de decisión 763 con respecto a las características extraídas que representan la característica A y con respecto a las características extraídas que representan la característica B como una función de al menos uno de lo siguiente: (1) la pureza de al menos una población con respecto a las partículas con la característica A o a las partículas con la característica B, y (2) la cantidad de las partículas con la característica A y las partículas con la característica B en al menos una población en relación a la cantidad total de partículas con la característica A y de partículas con la característica B en la corriente. Por ejemplo, el procesador puede mover el límite de decisión 763 para incluir menos de la población 1 y más de la población 2, o viceversa, en base a la salida de una muestra particular o en base a la salida deseada (por ejemplo, como se ha indicado anteriormente en lo que se refiere a la regla de decisión de Riesgo mínimo de Bayes para ajustar el límite de decisión para costos dispares).

P. Compensación de la desviación

Dado que con el transcurso del tiempo los pulsos de forma de onda correspondientes a la emisión de fluorescencia pueden variar o presentar dispersión con el transcurso del tiempo (por ejemplo, debido a variaciones de tinción,

cambios de temperatura, tiempo de muestra y/u otros factores) el sistema puede emplear optativamente el software de análisis de dispersión 761 (Fig. 72) que define umbrales dinámicos que varían para compensar cualquier efecto de dispersión. En particular, los umbrales de detección de pulsos empleados por el software 747 pueden ajustarse para cualquier variación lenta en las características de fondo de la señal, y el algoritmo de discriminación del software 757 puede ajustar el límite de decisión 763 (Fig. 74) para responder a cualquier dispersión en las poblaciones en el espacio de características.

En el caso del algoritmo o algoritmos empleados por el software de detección de pulsos 747, el software de compensación de desviación 761 logra la compensación de la desviación actualizando las estimaciones de desviación típica y media de fondo en base a estimaciones estadísticas de muestras calculadas dentro de una ventana móvil de una longitud dada de muestras (por ejemplo, 10-100 muestras) finalizando con la muestra actual. Dada la tasa de dispersión lenta (supuesta) en relación con la frecuencia de adquisición de datos, las estadísticas de fondo no necesitan actualizarse con cada muestra; mejor, las actualizaciones de estadísticas de fondo pueden ocurrir periódicamente (por ejemplo, cada 6 segundos; ver el carácter de referencia 795 y la Fig. 82). Además, la ventana puede contener una ponderación menor que la unidad para permitir un índice de "olvido" para restar peso a las muestras anteriores con respecto a las muestras más recientes en los cálculos estadísticos. La Fig. 76 ilustra el concepto del cálculo estadístico (promedio) dentro de una ventana móvil sin y con un índice de "olvido".

Similar a la compensación de desviación del algoritmo de detección, el o los algoritmos de discriminación empleados por el software de discriminación de pulsos 757 logran una compensación de desviación mediante actualizaciones periódicas de las estadísticas de segundo orden de las poblaciones en el espacio de características. En este caso, sin embargo, sólo aquellos valores de la característica de los pulsos asignados a una población dada se usan para actualizar las estadísticas de esa población. Nuevamente, la ponderación no unitaria se puede usar para incluir un índice de "olvido". La Fig. 77 muestra una ilustración conceptual de los efectos de aplicar esta técnica a las poblaciones en el espacio de características. La Fig. 77 ilustra un ejemplo de la compensación de desviación para las estadísticas de población en el espacio de características. El amarillo indica la población 1 (X), el verde la población 2 (Y), los rombos los cálculos promedio de la clase (con una ilustración exagerada de desviación) y las flechas de bloque los cambios en los cálculos de covarianza de la población reflejados en la deformación de las elipses de sigma constante.

En general, el procesador de señales digitales 863 emplea un umbral de detección para analizar la información digital, donde el umbral es una función de un cálculo promedio de fondo y una desviación típica de las señales muestreadas de salida que varían con el tiempo calculadas dentro de una ventana móvil de muestras que finalizan con la muestra actual.

Q. Ventaja de técnicas completamente digitales sobre técnicas analógicas

Una de las ventajas principales de usar un sistema totalmente digital para la clasificación es que no hay ningún "tiempo muerto" asociado con la detección y el análisis de un pulso. Con sistemas analógicos siempre hay un "tiempo de conmutación" finito requerido para que los componentes electrónicos se reinicien después de que suceda y se detecte un pulso. Este tiempo generalmente se encuentra en el orden de al menos un microsegundo. Como el sistema digital capta una corriente continua realmente no tiene ningún tiempo muerto.

Otra ventaja de un sistema digital es la capacidad de mirar hacia adelante y hacia atrás en el tiempo en torno a un pulso clasificado para ordenación. En general, el procesamiento de señales digitales requiere aproximadamente cinco (5) períodos de gotitas para el análisis. Preferiblemente, el retardo de tiempo entre la iluminación de las gotitas 115 y la formación de las gotitas 107 es aproximadamente de siete (7) períodos de gotitas. Esto permite al sistema clasificar una partícula específica basándose en la probabilidad de que contaminará a la población utilizable según se indica por las características de la partícula específica y basándose en la proximidad de la partícula específica a otra partícula clasificada. Como un ejemplo, el procesador de clasificación 873 puede rechazar una partícula visualizada como que tiene una probabilidad del 50% de ser una célula X viva mientras que el procesador de clasificación 873 puede aceptar una partícula visualizada como que tiene una probabilidad del 50% de ser una célula X viva cuando la partícula es coincidente con una segunda partícula visualizada como que tiene una probabilidad del 95% de ser una célula X viva.

R. Análisis analógico de células

También se contempla que las señales de salida que varían en el tiempo, provenientes del fotodetector, pueden procesarse por circuitos analógicos 819, como por ejemplo un conjunto de puertas programable de campo, que puede ser menos costoso que un analizador de células digital. La Fig. 42 es un diagrama funcional de un ejemplo de un analizador analógico de células que puede emplearse como parte del sistema. La Fig. 53 ilustra gráficamente el análisis analógico. Se fija un umbral para producir un factor desencadenante basado en la altura del pulso. El umbral abre una ventana de integración que controla un integrador analógico para acumular carga. La ventana permanece abierta ya sea durante un período fijo o hasta que la amplitud del pulso cae por debajo del umbral desencadenante. De esta forma, sólo el área de la porción del pulso dentro de la ventana de integración se usa para las mediciones relativas de fluorescencia.

Con referencia a la Fig. 42, la salida 701 del fotodetector 117 se suministra a un integrador 825 que integra la señal de salida 701 en sincronía con el oscilador de gotitas 703. La señal integrada se suministra a un comparador de ancho/área 827 para comparar el nivel de la señal integrada con un nivel de umbral que define un pulso (por ejemplo, un pulso puede definirse como una señal integrada con un 40% de certeza a un umbral determinado). Un calculador del umbral dinámico A 829 funciona de forma similar a la compensación de desviación observada anteriormente en que sigue el nivel de señal integrada y varía el nivel del umbral que utiliza el comparador de ancho/área como una función de las variaciones en el nivel de señal integrada promedio.

La señal discriminada por el pulso se suministra a un comparador de ventana 837 para confirmar que el área de pulso está dentro de un intervalo aceptable. La señal discriminada por pulsos también se suministra a un circuito de ancho de pulso y lógica desencadenante 839 para confirmar que el ancho de pulso está dentro de un intervalo aceptable. Si el área y el ancho son aceptables, la lógica proporciona una señal desencadenante a un controlador de I/O 843 que indica la decisión de clasificación 841. Por lo tanto, el comparador de ventana 837 y el ancho de pulso y lógica desencadenante 839 toman la decisión sobre si una célula debe clasificarse como una célula X o una célula $\sim X$.

El controlador de I/O 843 proporciona la decisión de clasificación 841 a la placa del controlador de clasificación 847 en forma de una señal X o $\sim X$. El controlador de I/O 843 también incluye una interfaz de bus universal en serie (USB) 849 para conectar al PC 735 y puede tener un puerto I/O para conectar a los controladores auxiliares 845 de los otros canales. El analizador analógico de células también incluye un puerto de grupo de acceso de ensayo conjunto (JTAG) 833 para programar el comparador de ancho/área, el comparador de ventana y el ancho de pulso y lógica desencadenante.

También se contempla que el analizador analógico de células puede emplearse simultáneamente con el analizador digital de células 705. Por ejemplo, el analizador analógico se puede usar para ajustar los umbrales de voltaje usados por el analizador digital. Por otro lado, el analizador digital se puede usar para identificar diversas características del pulso y esta información de características se puede usar para configurar el analizador analógico de células, en particular si se implementa con un conjunto de puertas.

Estrategias de control

En general, el microprocesador 131 se programa para implementar estrategias de control y de separación que tienen el propósito de optimizar la eficacia del sistema 1 en cuanto a la producción y/o la pérdida de las partículas deseadas para afrontar cualquier requisito de costo del producto separado. Esto puede incluir, por ejemplo, equilibrar la necesidad de pureza elevada de al menos una población recogida y la necesidad de recuperar al menos un porcentaje mínimo de partículas deseadas de la muestra que se está separando. Lograr tal equilibrio es importante, en particular en el contexto de las aplicaciones comerciales donde el costo y la rentabilidad son consideraciones importantes.

Con este fin, el microprocesador 131 implementa una estrategia de control que es una serie de instrucciones y/o algoritmos que controlan las variables del sistema como por ejemplo la velocidad de suministro de fluido y/o los parámetros de clasificación. El microprocesador también implementa una estrategia de clasificación que define el proceso de decisión para determinar cómo se separa cada partícula o grupo de partículas. Cada estrategia de control específica puede emplear una o más estrategias de clasificación. Se pueden usar diversas estrategias de clasificación en factores tales como la estrategia de control seleccionada, el sistema de detección de partículas y/o la información relacionada con la distribución de partículas en la corriente de fluido.

Con respecto a la distribución de partículas, la Fig. 78 ilustra una corriente de fluido que contiene un ejemplo de distribución de partículas. En este ejemplo específico, la corriente está formada por una boquilla similar a la boquilla descrita anteriormente y contiene una mezcla de partículas que tienen diferentes características A y B, por ejemplo, células espermáticas X e Y. Según se muestra, por lo general las células se ubican una detrás de otra en una serie que puede considerarse como que conforman conjuntos secuenciales de partículas. Estos conjuntos incluyen los conjuntos de primera partícula donde cada uno está formado por una o más partículas que tienen una característica A (por ejemplo, indican que tienen una célula espermática X viva), los conjuntos de segunda partícula donde cada uno está formado por una o más partículas que tienen una característica B (por ejemplo, indican que tienen una célula espermática Y o, más en general, una célula espermática que no es una célula X viva ($\sim X$), como por ejemplo una célula Y o una célula X o Y muerta) y los conjuntos de tercera partícula donde cada uno está formado por dos o más partículas con menos espacio entre sí donde al menos una de ellas tiene la característica A y al menos una de ellas tiene la característica B (por ejemplo, una o más células espermáticas X y uno o más células espermáticas $\sim X$). Los conjuntos de tercera partícula también se denominan de aquí en adelante como conjuntos de partículas "coincidentes".

Que una partícula específica se considere como que conforma un conjunto en sí misma o una parte de otro conjunto dependerá principalmente de su posición espacial y/o de la separación en relación con las partículas adyacentes. Por ejemplo, en un sistema de clasificación de gotitas, los diversos conjuntos de partículas estarán definidos por las

partículas en las gotitas. En un sistema de clasificación de foto deterioro donde se usa un haz láser para destruir (matar o dañar de otro modo) los conjuntos de partículas seleccionadas con el fin de proporcionar una población recogida que tenga un contenido deseado, según lo tratado a continuación en la sección de "Separación por foto deterioro", los diversos conjuntos de partículas estarán definidos por la proximidad espacial de las partículas, es decir, si la separación espacial entre las partículas es suficiente como para permitir la clasificación precisa de las partículas y/o la destrucción de una o más partículas no deseadas usando el haz láser sin destruir también una o más partículas deseadas. De igual manera, en un sistema de clasificación por conmutación de fluidos donde las porciones de la corriente que contienen las partículas seleccionadas se desvían para proporcionar una población recogida con un contenido deseado, como se trata a continuación en el sistema de "Separación por desviación de fluido", los diversos conjuntos de partículas estarán definidos por la proximidad espacial de las partículas, es decir, si la separación espacial entre las partículas es suficiente como para permitir la clasificación precisa de las partículas y/o la desviación de las partículas seleccionadas.

Se observará a partir de lo anterior que la decisión de clasificación aplicada a los diferentes conjuntos de partículas puede variarse, según el resultado o la producción deseada del sistema. Por ejemplo, en un sistema de clasificación de gotitas, la estrategia de clasificación usada puede depender del tratamiento de gotitas "coincidentes", es decir, las gotitas que contienen los conjuntos de tercera partícula. En la manipulación de células espermáticas bovina en un sistema y método de clasificación de gotitas por citometría de flujo como se describe en este documento, por ejemplo, para mejorar el número de células espermáticas X en al menos una población recogida, puede ser aconsejable usar una estrategia donde cada gotita coincidente que contenga una célula espermática X se acepte y se separe como si contuviera sólo células espermáticas X, aunque la gotita también pueda contener una célula espermática -X (**estrategia de aceptación de coincidentes**). Por otro lado, para mejorar la pureza de las células espermáticas X recogidas en la población establecida, es posible que sea aconsejable rechazar cada gotita coincidente que contenga una célula espermática -X aunque la misma gotita también pueda contener una célula espermática X (**estrategia de rechazo de coincidentes**). En general, según se señalará a continuación, hay muchas estrategias de control que pueden emplearse para maximizar la producción de partículas y hay muchas estrategias de clasificación que pueden emplearse con cada estrategia de control en particular. Las estrategias pueden aplicarse a diversas técnicas de clasificación usando la citometría de flujo, como la clasificación de gotitas, la clasificación por foto deterioro y la clasificación por conmutación de fluidos. Aún más, las estrategias anteriores se pueden usar para separar cualquier tipo de partícula de acuerdo a cualquier característica o características deseadas de la partícula.

Según un ejemplo, el microprocesador controla la velocidad a la cual el sistema de suministro de fluidos suministra el fluido que contiene las partículas como una función de otras variables del sistema. Por ejemplo, el microprocesador puede controlar la velocidad de suministro de fluido como una función de un resultado de producción deseado. Ya que el microprocesador determina la identidad de cada partícula y determina si ésta se dirige al menos a una población recogida, el microprocesador puede determinar y controlar el resultado de producción mediante la variación de la estrategia de control y/o mediante la variación de la estrategia de clasificación. Un resultado deseado de producción en general puede definirse como al menos uno de los siguientes: (1) la pureza de al menos una población recogida con respecto a las partículas con la característica A o a las partículas con la característica B (**"alta recuperación"**), y (2) la cantidad de partículas con la característica A en la población establecida en relación con la cantidad total de partículas con la característica A en la corriente o la cantidad de partículas con la característica B en la población establecida con relación a la cantidad total de partículas con la característica B en la corriente (**"pureza elevada"**). Como otro ejemplo, el sistema puede emplear una velocidad de suministro de fluido sustancialmente constante y el microprocesador puede controlar los parámetros de clasificación como una función de un resultado deseado de producción. En este último ejemplo, el resultado deseado de producción en general puede definirse como una combinación de (1) la pureza de las partículas en al menos una población recogida y (2) la cantidad de partículas deseadas disponibles en la corriente pero no incluidas en la población establecida (**"caudal constante"**).

En general, se puede asumir que cuando se separan dos poblaciones, una célula identificada podría tener una probabilidad de 50/50 de formar parte de una población o de la otra. Sin embargo, también se contempla que una célula no identificada en realidad puede tener una probabilidad diferente a la de 50/50 de formar parte de una población o de la otra. Esta otra probabilidad puede determinarse mediante un análisis empírico o por otras características con respecto a la muestra que se está separando.

A continuación se analizan en más detalle varias estrategias diferentes de control.

A. Estrategia de control de alta recuperación

Un tipo de estrategia de control puede denominarse como una estrategia de control de "alta recuperación". El objetivo de esta estrategia es maximizar el número de partículas deseadas separadas en la población de las partículas deseadas siempre que la pureza de esa población se encuentre en un nivel de pureza aceptable o por encima de éste.

De acuerdo con esta estrategia, los conjuntos de primera partícula descritos anteriormente se clasifican en la

población de las partículas deseadas porque cada uno de estos conjuntos contiene una o más partículas que tienen una característica A deseada. Los conjuntos de tercera partícula también se separan en la población de partículas deseadas (aceptación de coincidentes) porque cada uno de estos conjuntos también contiene a una o más partículas que tienen una característica A deseada, aunque esté acompañada de una partícula más que tenga la característica B. Por otra parte, se rechazan los conjuntos de segunda partícula (es decir, no separados en la población de partículas deseadas) porque no contienen una partícula que tenga la característica deseada. Para optimizar la producción usando esta estrategia, el microprocesador aumenta la velocidad de suministro de fluido siempre que la pureza de la población recogida se encuentre en un nivel aceptable o por encima de éste. Dicho de otra forma, la velocidad de suministro de fluido se aumenta siempre que el nivel probable de contaminación de la población de las partículas deseadas se encuentre en un nivel aceptable o por debajo de éste.

Como un ejemplo, se puede considerar el uso de una estrategia de control de alta recuperación para la separación de las células espermáticas X e Y en la corriente de fluido de la Fig. 78. El resultado deseado puede ser separar todas las células X en una población de células X siempre que la población permanezca en un nivel de pureza aceptable o por encima de éste, por ejemplo, siempre que $X/(X+Y)$ sea mayor del 85% o algún otro nivel aceptable. Para obtener este resultado, los conjuntos de primera partícula se separan en una población de células X porque contienen sólo una o más células X. Los conjuntos de tercera partícula también se separan en la población de células X porque también contienen una o más células X, aunque también pueden contener una célula Y (o $\sim X$). Los conjuntos de segunda partícula se separan en alguna otra población porque no contienen una o más células X. En este ejemplo, la velocidad a la cual el sistema de suministro de fluidos suministra el fluido que contiene las células a la boquilla seguiría aumentando siempre que la pureza de la población de células X sea mayor del 85%. Por el contrario, si la pureza de la población de células X desciende por debajo del 85%, se reduce la velocidad de suministro de fluido.

En el contexto de un sistema de clasificación de gotitas, se conoce que de acuerdo a la ecuación de Poisson para cualquier velocidad dada de generación de gotitas, el número de gotitas de varias células aumentará a medida que aumente la velocidad de suministro de células. En otras palabras, el aumento de la velocidad de suministro de fluido que contiene las células aumentará el número de gotitas de varias células. Por consiguiente, si se usa la estrategia de clasificación de aceptación de coincidentes y las gotitas coincidentes que contienen conjuntos de tercera partícula se separan en la población de las partículas deseadas, el aumento de la velocidad de suministro de fluido dará lugar a una disminución en la pureza de la población recogida porque a velocidades mayores de suministro de fluido se generan y se recogen más gotitas coincidentes. La Figura 79 ilustra este resultado para un fluido de 2 (dos) partículas de modo que se captura el 100% de las partículas deseadas. Como se muestra, a velocidades muy bajas de suministro de fluido (velocidad FDR de suministro de fluido en el eje x), la pureza (eje y) de la población resultante recogida es muy alta porque se están generando y recogiendo muy pocas gotitas coincidentes que contienen conjuntos de tercera partícula. A medida que aumenta la velocidad de suministro de fluido (la velocidad FDR de suministro de fluido aumenta hacia la derecha en el eje x), el porcentaje de gotitas coincidentes generado aumenta dando como resultado la recogida de más gotitas coincidentes y reduciendo la pureza de la población utilizable (a lo largo del eje y). En el ejemplo específico ilustrado, la velocidad de suministro de fluido es de 30K partículas/segundo a una pureza de aproximadamente el 80%.

Los resultados de usar una estrategia de alta recuperación pueden ser notables, como se ilustra por medio de un ejemplo sencillo donde las células espermáticas X e Y se separan usando un proceso de clasificación de gotitas. Supongamos, por ejemplo, que las gotitas se generan a una velocidad de 60 K/s y que las células espermáticas se suministran a la localización de examen a una velocidad de 30 K/s. Según la ecuación de Poisson, si todas las gotitas que contienen células X se separan en la población de células X, incluyendo gotitas coincidentes que contienen células X e Y, se recogerán aproximadamente 15.000 células X cada segundo. La población recogida incluirá aproximadamente 2.600 células Y, reduciendo la pureza de la población con respecto a las células X a aproximadamente el 85,2%. Sin embargo, el número de células X recogidas (15.000) representa un aumento sustancial respecto a una estrategia donde las gotitas coincidentes no se recogen, como en la estrategia o modalidad de pureza elevada que se analiza a continuación. En la modalidad de pureza elevada, la operación a una frecuencia de gotitas de 40 K/segundo y a una velocidad de suministro de células de 40 K/segundo (10 K células/segundo más que en el ejemplo anterior de la modalidad de alta recuperación), sólo se recogen aproximadamente 11.800 células X cada segundo o aproximadamente 3.800 células X menos que en la estrategia de alta recuperación. Aún más, cuando se usa la estrategia de pureza elevada, se pierden o se desechan aproximadamente 9.200 células X porque las gotitas coincidentes no se separan en la población de células X. Por consiguiente, si es aceptable menos del 100% de pureza, quizá sea aconsejable usar la modalidad de alta recuperación para aumentar el número de células X recogidas o, dicho de otra forma, para disminuir el número de células X perdidas.

En resumen, en la estrategia de control de alta recuperación usando la estrategia de clasificación de aceptación de coincidentes, la velocidad de suministro de partículas está relacionada inversamente con la pureza de la población recogida de las partículas deseadas (denominada en ocasiones como la población "utilizable").

B. Estrategia de control de pureza elevada

Un segundo tipo de estrategia de control puede denominarse como una estrategia de control de "pureza elevada". El objetivo de esta estrategia es mantener en un alto nivel la pureza de la población recogida en lo que se refiere a las partículas que tienen una característica deseada, siempre que la cantidad de partículas deseadas en la población recogida en relación con el número total de partículas deseadas disponibles en la corriente se encuentre en una cantidad aceptable o por encima de ésta (es decir, siempre que la cantidad de partículas deseadas en la corriente que no se recogen permanezca por debajo de una cantidad aceptable). De acuerdo con esta estrategia, los conjuntos de primera partícula descritos anteriormente se separan en la población de las partículas deseadas porque cada uno de estos conjuntos contiene a una o más partículas que tienen una característica deseada A y porque estos conjuntos no contienen ninguna partícula contaminante. Por otro lado, los conjuntos de segunda y tercera partícula se separan en una o más poblaciones "inutilizables" (rechazo de coincidentes) porque contienen partículas contaminantes (es decir, partículas con la característica B). Para optimizar la producción usando esta estrategia de "pureza elevada", el microprocesador aumenta la velocidad de suministro de fluido siempre que la cantidad de partículas deseadas que se separan en la población utilizable en relación con el número total de partículas deseadas disponibles en la corriente permanezca en una cantidad aceptable o por encima de ésta.

Como un ejemplo, se puede considerar el uso de una estrategia de control de pureza elevada para la separación de las células espermáticas X e Y en la corriente de fluido de la Fig. 78. El resultado deseado puede ser separar todas las células X en una población de células X siempre que la cantidad de células X recogidas de la corriente permanezca en una cantidad aceptable o por encima de ésta, por ejemplo, al menos el 60%. Para obtener este resultado, los conjuntos de primera partícula se separan en la población utilizable porque contienen sólo una o más células X. Por otro lado, los conjuntos de segunda y tercera partícula se separan en una o más poblaciones inutilizables porque contienen una o más células contaminantes (~X). En este ejemplo, la velocidad a la cual el sistema de suministro de fluidos suministra el fluido que contiene las células a la boquilla seguiría aumentando siempre que la cantidad de células X que se recoge en la población utilizable como un porcentaje de la cantidad disponible total de células X que se han separado permanezca en un 60% o mayor. Por el contrario, si la cantidad de células X que no se recogen en la población utilizable aumenta por encima de un 40% del número total de células X disponibles que se han separado, la velocidad de suministro de fluido disminuye.

Según se ha observado anteriormente en el contexto de un sistema de clasificación de gotitas, se sabe que el aumento de la velocidad de suministro de fluido aumentará el número de gotitas con varias células, y por lo tanto el número de gotitas coincidentes que contienen conjuntos de tercera partícula. Ya que las gotitas coincidentes no se separan dentro de la población de células X recogidas cuando se usa una estrategia de clasificación de rechazo de coincidentes, esto significa que el aumento de la velocidad de suministro de fluido dará lugar a un aumento en la cantidad de células X vivas perdidas a la población inutilizable.

La Figura 80 ilustra este resultado para un fluido de dos (2) partículas para que la población utilizable tenga un 100% de pureza de las partículas deseadas. Según se muestra, a velocidades muy bajas de suministro de fluido (FDR en el eje x), el porcentaje de partículas deseadas en la población utilizable es muy alto porque se están generando y rechazando muy pocas gotitas coincidentes. A medida que aumenta la velocidad de suministro de fluido (la FDR aumenta a la derecha en el eje x), el porcentaje de gotitas coincidentes que contienen conjuntos de tercera partícula aumenta y se rechazan más conjuntos de ese tipo. Esto reduce la cantidad de partículas deseadas que se separan en la población utilizable en relación con la cantidad total de partículas deseadas disponibles en la corriente (es decir, el porcentaje de partículas deseadas de la corriente que se recogen en la población utilizable). En el ejemplo específico ilustrado, la velocidad de suministro de fluido es de aproximadamente 40 K partículas/segundo y aproximadamente el 75% de las partículas deseadas se separan hacia la población utilizable.

En resumen, en la estrategia de control de pureza elevada que implementa la estrategia de clasificación de rechazo de coincidentes, la velocidad de suministro de partículas está relacionada inversamente con el porcentaje de partículas deseadas en la población recogida (es decir, pureza elevada de partículas deseadas en la población utilizable).

C. Estrategia de control de caudal constante

Un tercer tipo de estrategia de control puede denominarse como una estrategia de control de caudal constante. En esta estrategia, el microprocesador mantiene la velocidad de suministro de fluido constante (o dentro de un intervalo constante) y varía el porcentaje de gotitas coincidentes recogidas (o rechazadas) siempre que la pureza de al menos una población recogida se encuentre en un nivel aceptable o por encima de éste y siempre que la cantidad de partículas deseadas en esa población se encuentre en una cantidad aceptable en relación con una cantidad total de partículas deseadas que se han procesado. Dicho de otro modo, la velocidad de suministro de fluido es constante y el porcentaje de gotitas coincidentes aceptadas (o rechazadas) varía siempre que el nivel probable de contaminación de la población utilizable se encuentre en un nivel aceptable de pureza o por debajo de éste y siempre que la cantidad probable de partículas deseadas que se pierde a una población diferente de la población establecida (utilizable) esté en una cantidad aceptable o por debajo de ésta.

Como ejemplo, considérese el uso de una estrategia de control de caudal constante para la separación de la corriente de fluido que se muestra en la Fig. 78. El resultado deseado puede ser separar las células espermáticas X

en una población utilizable que tenga una pureza de al menos el 85% y recoger al menos el 60% de las células X que se encuentran en la corriente para que no más del 40% de las células X se separen en la población inutilizable. En este ejemplo, se mantendría constante la velocidad a la cual el sistema de suministro de fluidos suministra las partículas y se variaría el porcentaje de recogida o rechazo de conjuntos de tercera partícula (conjuntos coincidentes) siempre que la pureza de la población utilizable en lo que se refiere a las células X sea igual o mayor del 85% y siempre que el porcentaje de células X separadas en la población inutilizable sea menor del 40% de modo que el porcentaje de partículas deseadas separadas en la población utilizable sea igual o mayor del 60% (**estrategia de clasificación de aceptación de coincidentes variable**). A medida que aumenta el porcentaje de los conjuntos de tercera partícula aceptados, la pureza de la población utilizable disminuye, pero la cantidad de partículas deseadas (por ejemplo, células X) que se separan en la población inutilizable disminuye. Por el contrario, a medida que disminuye el porcentaje de los conjuntos de tercera partícula aceptados, la pureza de la población utilizable aumenta, pero la cantidad de partículas deseadas (por ejemplo, células X) que se separan en la población inutilizable aumenta.

Como se ha indicado anteriormente, se sabe a partir de la ecuación de Poisson que el número de gotitas de varias células (y por lo tanto el número de gotitas coincidentes que contienen conjuntos de tercera partícula) es constante para una velocidad constante de suministro de fluido (célula). Como el número de gotitas coincidentes es constante en esta estrategia de control, el porcentaje de gotitas coincidentes clasificadas en la población utilizable repercutirá tanto en la pureza de la población utilizable como en la cantidad de células X que se desechan por separarse hacia la población inutilizable. Esto es porque el porcentaje de células Y (o $\sim X$) no deseadas en gotitas coincidentes que se aceptan y se separan hacia la población inutilizable recogida está inversamente relacionado con el porcentaje de células X en gotitas coincidentes que se rechazan y por lo tanto no se separan dentro de la población utilizable recogida.

La Figura 81 ilustra la estrategia de control de velocidad de suministro de fluido constante en un sistema y método de clasificación de gotitas de citometría de flujo como se describe en este documento implementando una estrategia de clasificación de rechazo de coincidentes variable para un líquido de 2 (dos) partículas. Como se muestra, la línea OL ilustra la relación inversa entre el porcentaje de gotitas coincidentes rechazadas (eje x) comparado con el porcentaje de gotitas coincidentes aceptadas (eje y). Cuando hay un porcentaje muy bajo de gotitas coincidentes aceptadas, hay un porcentaje muy alto de gotitas coincidentes rechazadas. Por el contrario, cuando hay un porcentaje muy alto de gotitas coincidentes aceptadas, hay un porcentaje muy bajo de gotitas coincidentes rechazadas. La línea OL ilustra esta relación inversa y representa la línea de operación de la estrategia de clasificación de aceptación de coincidentes variable a una determinada velocidad constante de flujo de la partícula. En el punto P en la Fig. 81 sobre la línea de operación OL, la pureza de la población utilizable es un porcentaje dado que depende del caudal de la partícula, por ejemplo, un 85% de pureza. A medida que aumenta el porcentaje de gotitas coincidentes aceptadas (a la izquierda y arriba) sobre la línea de operación OL, el número de partículas no deseadas que se separan hacia la población utilizable aumenta y la pureza disminuye por debajo de un 85%, que puede que sea inaceptable. A medida que disminuye el porcentaje de gotitas coincidentes aceptadas (a la derecha y abajo) a lo largo de la línea de operación OL, la pureza supera el 85% y es aceptable.

En el punto LL sobre la línea de operación OL, se rechaza el 75% de las gotitas coincidentes (es decir, se separan hacia la población inutilizable) de modo que el porcentaje de partículas deseadas que se desecha por separarse hacia la población inutilizable es un porcentaje dado basado en la velocidad de suministro de partículas, por ejemplo, 40%. A medida que aumenta el porcentaje de gotitas coincidentes rechazadas (a la derecha y abajo) sobre la línea de operación OL, el porcentaje de partículas deseadas que se separa hacia la población utilizable disminuye (por ejemplo, a $<60\%$), lo que puede llegar a ser inaceptable. A medida que disminuye el porcentaje de gotitas coincidentes rechazadas (a la izquierda y arriba) sobre la línea de operación OL, el porcentaje de partículas deseadas separadas hacia la población utilizable aumenta (por ejemplo, a $>60\%$) y es aceptable. Por lo tanto, para una estrategia de control de caudal constante que implementa una estrategia de clasificación de aceptación de coincidentes variable, el microprocesador puede dirigir el sistema para que el porcentaje de gotitas coincidentes aceptadas y rechazadas varíe en un intervalo operativo entre el punto P1 y LL como se indica con la flecha OR. Se debe tener en cuenta que el intervalo operativo OR puede abarcar más, o menos de la línea de operación, según el nivel de tolerancia para impurezas y la pérdida de las partículas deseadas hacia la población inutilizable.

En resumen, en la estrategia de control de caudal constante usando la estrategia de clasificación de aceptación de coincidentes variable, el porcentaje de conjuntos de tercera partícula que se acepta está inversamente relacionado con la pureza de la población utilizable e inversamente relacionado con la cantidad de partículas deseadas desechadas por separarse hacia una población inutilizable.

D. Resumen de estrategias de control

La siguiente Tabla resume las estrategias de control indicadas anteriormente.

ESTRATEGIA DE CONTROL	ALTA RECUPERACIÓN	PUREZA ELEVADA	CAUDAL CONSTANTE
Parámetro controlado	Velocidad de suministro de fluido	Velocidad de suministro de fluido	Parámetros de clasificación
Parámetro de control:	Pureza de la población	Cantidad de partículas deseadas en la población	Pureza de la población Y cantidad de partículas deseadas en la población
Estrategia de clasificación	Aceptación de coincidentes	Rechazo de coincidentes	Aceptación de coincidentes variable
Estrategia de clasificación X/Y	Recogida de gotitas X y gotitas de X+~X; rechazo de gotitas ~X	Recogida de gotitas X; rechazo de gotitas X+~X y de gotitas ~X	Recogida de gotitas X; varía el porcentaje de gotitas recogidas X+~X; rechazo de gotitas ~X
Definición	La velocidad de suministro de fluido se aumenta siempre que la pureza de la población con respecto a las partículas X se encuentre en un nivel aceptable o por encima de éste.	La velocidad de suministro de fluido aumenta mientras la cantidad de partículas deseadas en la población utilizable con relación a la cantidad total de partículas X en la corriente se encuentre en una cantidad aceptable o por encima de ésta.	El porcentaje de las gotitas coincidentes en la población aumenta siempre que la pureza de la población con respecto a las partículas X se encuentre en un nivel aceptable o por encima de éste; <u>para continuar la operación</u> , la cantidad de partículas deseadas en la población utilizable en relación a la cantidad de partículas X en la corriente debe ser igual a la cantidad aceptable o estar por encima de ésta.
Definición inversa	La velocidad de suministro de fluido se aumenta siempre que la probabilidad de contaminación de la población utilizable esté en un nivel aceptable de pureza o por debajo de éste.	La velocidad de suministro de fluido se aumenta siempre que la probabilidad de pérdida de la cantidad de partículas deseadas hacia una población inutilizable esté en una cantidad aceptable o por debajo de ésta.	La velocidad de suministro de fluido se aumenta siempre que la probabilidad de contaminación de la población utilizable se encuentre en un nivel aceptable de pureza o por debajo de éste Y siempre que la probabilidad de pérdida de la cantidad de partículas deseadas hacia la población inutilizable esté en una cantidad aceptable o por debajo de ésta.
Resultado deseado	> la pureza mínima aceptable; por ejemplo, >85% de pureza	> la cantidad mínima aceptable; por ejemplo, >60% de partículas deseadas capturadas (<40% de partículas deseadas perdidas)	> la pureza mínima aceptable y > la cantidad mínima aceptable; por ejemplo, >85% de pureza y >60% de partículas deseadas-capturadas (<40% de partículas deseadas perdidas)

De forma relacionada, una muestra separada obtenida usando una de las estrategias de control anteriores se puede combinar con una segunda muestra para obtener una muestra final (por ejemplo, comercial) que presente las características deseadas. Por ejemplo, una muestra separada según la estrategia de pureza elevada para producir una población 100% pura se puede combinar con una población del mismo volumen separada a una pureza del 80% para producir una muestra final que tenga una pureza del 90%. O en el caso de células espermáticas separadas a una pureza elevada, una cantidad de la alícuota de las células espermáticas separadas puede combinarse con una cantidad de la alícuota de células espermáticas sin separar para producir una muestra final de la pureza deseada a un costo más bajo que si se separara toda la cantidad de células espermáticas usando cualquiera de los métodos de clasificación anteriores.

La descripción anterior de las estrategias de control supone la identificación y separación precisa de cada gotita incluyendo cada gotita coincidente. En la práctica, la exactitud del 100% no es posible por diversas razones. Por consiguiente, para reducir al mínimo la contaminación, quizá sea aconsejable rechazar las partículas que no pueden clasificarse con certidumbre como pertenecientes a la población deseada. Por otro lado, si ciertas partículas pueden identificarse y clasificarse como que pertenecen a la población deseada dentro de una cierta probabilidad seleccionada (por ejemplo, mayor del 50% en el caso de células espermáticas), quizá sea aconsejable clasificar las partículas como pertenecientes a la población deseada para que no se pierdan hacia la población inutilizable. Por lo tanto, según se ha analizado previamente, partículas tales como células espermáticas pueden aceptarse o rechazarse para separarlas en una población de células deseadas en base a la probabilidad de que tales partículas pertenezcan a la población utilizable.

Los términos "utilizable" e "inutilizable" como se utilizan en la tabla anterior y en esta solicitud se usan por comodidad únicamente y no pretenden ser limitantes de ninguna manera. Por lo tanto, una población "utilizable" incluye cualquier "primera" población, independientemente de cómo se utilizará o de si se utilizará y una población "inutilizable" incluye cualquier "segunda" población diferente de la población utilizable, independientemente de cómo se utilizará o de si se utilizará. De igual manera, una población "deseada" significa cualquier población que se separa según las características de partícula seleccionadas.

El microprocesador y su software de procesamiento de señales constituyen un sistema para procesar las señales eléctricas del fotodetector para clasificar las partículas (por ejemplo, partículas en general y partículas de células espermáticas en particular) según las características de las partículas y para obtener información relacionada con la distribución de las partículas como se ha descrito anteriormente con respecto a la Fig. 78. Además, el microprocesador constituye un sistema de control que responde al software de procesamiento de señales para variar la velocidad a la cual el sistema de suministro de fluidos suministra las partículas al sistema de boquilla como una función de la información obtenida en relación con la distribución de las partículas. Además, el microprocesador constituye un sistema de control de respuesta al software de procesamiento de señales para variar la estrategia de clasificación como una función de la información obtenida en relación con la distribución de las partículas.

En general, el microprocesador constituye un sistema de control que responde a la información recibida del aparato de citometría de flujo para controlar el sistema de clasificación con el fin de variar su estrategia de clasificación o para controlar el sistema de suministro de fluidos. En otras palabras, el microprocesador es capaz de operar en una primera modalidad para variar la estrategia de clasificación, es capaz de operar en una segunda modalidad para controlar el sistema de suministro de fluidos, es capaz de operar en una tercera modalidad para variar la estrategia de clasificación y para controlar el sistema de suministro de fluidos y puede ser capaz de operar en otras modalidades. Cuando opera en la primera o tercera modalidad, el microprocesador es capaz de variar la velocidad a la cual se suministra el fluido como una función de al menos una de las siguientes: (1) la pureza de al menos una población con respecto a partículas con la característica A o partículas con la característica B y (2) la cantidad de partículas con la característica A o partículas con la característica B en al menos una población en relación con la cantidad total de partículas con la característica A o partículas con la característica B en la corriente.

Sistema de recogida

Se necesita un sistema de recogida para recoger las gotitas después de que pasan entre las placas deflectoras. El sistema de recogida para un citómetro convencional puede estar formado tan solo por recipientes de recogida dispuestos para atrapar las gotitas en las diferentes corrientes de gotitas después de que pasen entre las placas deflectoras. Se pueden usar sistemas similares de recogida convencionales.

Sin embargo, es posible que sea difícil usar un sistema de recogida convencional donde la boquilla esté orientada para dirigir la corriente de fluido en un ángulo ascendente, lo que da un componente horizontal a la velocidad de las gotitas. Un asunto es que las gotitas se desplazarían cierta distancia horizontal a lo largo de sus trayectorias curvas antes de comenzar el movimiento descendente que sería apropiado para llegar a un recipiente de recogida. Por ejemplo, si la boquilla está apuntada hacia arriba entre 45° y 60° y las gotitas salen a una velocidad entre 15 m/s y 20 m/s, las gotitas estarán a una distancia horizontal de varios metros de la boquilla antes de alcanzar el ápice de sus trayectorias y comenzar un movimiento descendente. Por lo tanto, las corrientes de gotitas ocuparían un gran espacio de laboratorio. Además, en un intervalo de varios metros también podría ser difícil asegurar que las gotitas llegaran a los recipientes de recogida adecuados. Las trayectorias de las corrientes de gotitas pueden cambiar cuando cambian una o más condiciones de funcionamiento para el citómetro (por ejemplo, ajuste de la velocidad de suministro de fluido que da como resultado un cambio en la velocidad del líquido en el orificio de la boquilla). Los cambios en las trayectorias de las corrientes de gotitas se verán magnificados por la distancia que recorren las gotitas. Por lo tanto, los cambios en las trayectorias que no provocan un cambio apreciable en la ubicación de las gotitas en un punto relativamente próximo a la boquilla podrían provocar un cambio significativo en la ubicación de las gotitas en un sitio que esté más lejos de la boquilla. Como se ha analizado anteriormente, algunos sistemas emplean la retroalimentación a la formación de gotitas y/o sistemas de suministro de fluidos de la muestra que podrían dar lugar a corrientes de gotitas que alteren constantemente sus trayectorias. También es posible que se desee variar la presión a la cual el fluido envolvente se suministra a la boquilla. Las corrientes de aire, las variaciones de temperatura y las variaciones de humedad también podrían alterar las trayectorias de las corrientes de gotitas. Cualquier factor que pueda cambiar la trayectoria de las corrientes de gotitas también podría requerir la reubicación de los recipientes de recogida para que las gotitas sean recibidas en los recipientes apropiados de recogida. Por contraste, las trayectorias de las corrientes de gotitas en un citómetro convencional que tenga una boquilla que apunte hacia abajo son menos susceptibles a la variación. Por ejemplo, el hecho de que las corrientes de gotitas tengan una velocidad inicial sustancialmente descendente significa que la variación en la velocidad del líquido en el orificio no da como resultado ninguna variación significativa en las trayectorias. Además, los recipientes de recogida están relativamente cerca de la boquilla lo que hace que el sistema de recogida sea más tolerante a las variaciones de trayectorias en las corrientes de gotitas.

Las Fig. 83-85 muestran un ejemplo de un sistema de recogida, denominado de forma general 2201, que se puede usar para recoger las gotitas separadas en un sistema. El sistema de recogida es particularmente adecuado para la

recogida de gotitas 33 cuando el sistema de boquilla del citómetro 101 está orientado a dirigir la corriente de fluido 21 en un ángulo ascendente o cualquier otro ángulo que tenga un componente horizontal. A medida que las gotitas pasan entre las placas deflectoras 629, se separan en corrientes de varias gotitas 123, 125 (por ejemplo, dos) que tienen diferentes trayectorias curvas. Como se muestra en las Fig. 84 y 85, la trayectoria de cada corriente de gotitas conduce a uno de dos dispositivos interceptores de gotitas 2203. Si las gotitas se separan en más de dos corrientes de gotitas, se deberá proporcionar otro dispositivo interceptor para cada corriente de gotitas adicional. Por lo tanto, el número de dispositivos interceptores en un sistema de recogida dependerá del número de corrientes en las que se están separando las gotitas.

Cada dispositivo interceptor 2203 en el sistema de recogida de ejemplo tiene una superficie de impacto 2205 ubicada para cubrir la trayectoria de una de las corrientes de gotitas para desviar las gotitas que avanzan por esa trayectoria hacia un recipiente de recogida 2207 colocado debajo de cada dispositivo interceptor. Las superficies de impacto están fabricadas preferiblemente de un material flexible. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que los materiales flexibles amortiguan el impacto de las gotitas que chocan contra la superficie del dispositivo interceptor, reduciendo así el daño a las partículas (por ejemplo, células espermáticas) en las gotitas. Por ejemplo, los dispositivos interceptores pueden estar fabricados de polipropileno, polietileno u otros polímeros similares. Con referencia a las Fig. 86 y 87, los dispositivos interceptores 2203 se han fabricado cortando una entrada para las gotitas 2211 (por ejemplo, una ventana rectangular) en un lado de la ampolla 2213 de una pipeta 2215. Por lo tanto, una porción de la pared interior 2217 de la ampolla opuesta a la entrada de la gotita forma una superficie de impacto curva 2205 que cubre la trayectoria de la corriente de gotitas respectiva. Convenientemente, el tubo de la pipeta sirve de guía 2225 para dirigir el líquido desde la superficie de impacto al recipiente de recogida.

Con referencia a la Fig. 84, los dispositivos interceptores están sujetos a un marco del sistema de recogida 2227, que los mantiene en su lugar. Para tener en cuenta la variabilidad en las trayectorias de las corrientes de gotitas, es deseable permitir el ajuste de las posiciones de los dispositivos interceptores. Por ejemplo, la altura vertical de cada dispositivo interceptor puede ajustarse deslizando el tubo guía hacia arriba y hacia abajo en un orificio circular a través de un soporte 2229. Cuando el dispositivo interceptor está a la altura deseada, puede ajustarse un tornillo de fijación 2231 para sostenerlo a esa altura. El soporte puede adjuntarse a una placa de montaje 2233 que está adjuntada al marco del sistema de recogida, por ejemplo por tornillos de fijación 2235 (por ejemplo, dos tornillos de fijación). Los tornillos de fijación 2235 pasan a través de una ranura horizontal 2241 en la placa de montaje para permitir el ajuste lateral del dispositivo interceptor. Después del ajuste, los tornillos de fijación pueden ajustarse para mantener al soporte circular en la ubicación deseada. Los especialistas en la técnica reconocerán que se podría usar una variedad de otros dispositivos de sujeción para ajustar la posición del dispositivo interceptor. Los recipientes de recogida 2207 se mantienen debajo de los dispositivos interceptores en las ranuras 2241 en una bandeja 2243 para sostener los recipientes de recogida. Por lo tanto, se puede mover cada recipiente de recogida dentro de una ranura respectiva según sea necesario para que se mantenga en posición debajo del dispositivo interceptor respectivo. Además, si se desea se puede proporcionar un baño de agua (no se muestra) alrededor del recipiente de recogida para controlar la temperatura de los contenidos del recipiente de recogida.

Con referencia a la Fig. 85, se ha cortado una ventana de salida 2245 (por ejemplo, una ventana rectangular) en la parte trasera de uno de los dispositivos interceptores 2247 para permitir que una o más corrientes de gotitas pase a través del dispositivo interceptor. Se coloca un segundo dispositivo interceptor 2249 detrás de la ventana de salida para interceptar las gotitas que pasan por esta ventana. Por ejemplo, una ventana de entrada para el segundo dispositivo interceptor puede ser aproximadamente del mismo tamaño que la ventana de la salida del ejemplo del primer dispositivo interceptor. Por razones que serán evidentes, es deseable que la ventana de salida sea significativamente más pequeña que la ventana de entrada para el primer dispositivo interceptor. Por ejemplo, un ejemplo de una ventana de entrada para el primer dispositivo interceptor es cerca de 5/8 pulg. de alto y cerca de 3/8 pulg. de ancho (1,95 cm alto y 0,952 cm ancho). Por contraste, un ejemplo de una ventana de salida puede ser de 1/8 pulg. (0,32 cm) de alto y 5/16 pulg. (0,79 cm) de ancho.

Durante el funcionamiento del citómetro, el sistema de recogida funciona para interceptar las gotitas en las corrientes separadas. Las gotitas interceptadas luego bajan a través de los tubos de guía 2225 de los dispositivos interceptores 2203 y a los recipientes de recogida 2207. En un caso en el cual un citómetro tiene una boquilla de citómetro ascendente que dirige las corrientes de gotitas a lo largo de las trayectorias curvas, por ejemplo, los dispositivos interceptores permiten que las gotitas sean interceptadas en un punto de su trayectoria que está significativamente más cercano a la boquilla en comparación con el punto en el cual se recogerían las gotitas mediante un sistema de recogida convencional (es decir, un sistema de recogida sin dispositivos interceptores). La interceptación de las corrientes de gotitas en un punto relativamente cercano a lo largo de sus trayectorias arqueadas (por ejemplo, mientras están todavía moviéndose hacia arriba) reduce la cantidad de variación en la ubicación de las gotitas al momento en que las gotitas se encuentran por primera vez con el sistema de recogida. En consecuencia, el sistema de recogida puede tolerar más variación en las trayectorias de las corrientes de gotitas que las que podría tolerar un sistema de recogida convencional. De igual manera, las gotitas tienen menor probabilidad de estar sometidas a corrientes de aire gracias a sus recorridos más breves hacia el sistema de recogida.

Se debe establecer un equilibrio entre mover los dispositivos interceptores 2203 más cerca de la boquilla 101 para aumentar la tolerancia para las variaciones de trayectorias y mover los dispositivos interceptores más lejos del

orificio de la boquilla para reducir o minimizar la fuerza del impacto cuando las gotitas golpean contra los dispositivos interceptores, como por ejemplo colocar los dispositivos interceptores para que intercepten las corrientes de gotitas prácticamente en el ápice de sus trayectorias. En consecuencia, la mejor ubicación para los dispositivos interceptores dependerá de la durabilidad de las partículas (por ejemplo, células espermáticas) a separar, las velocidades de las gotitas, y la magnitud esperada de la variación en las trayectorias de la corriente de gotitas. En el caso de gotitas que contengan espermatozoides que tengan una velocidad en el orificio de la boquilla de cerca de 16 a 20 m/s, por ejemplo, los dispositivos interceptores pueden colocarse en el intervalo de 4-6 pulgadas (10,16-15,24 cm) del orificio de la boquilla. En el sistema en que un primer dispositivo interceptor tiene una ventana de salida y se coloca un segundo dispositivo interceptor detrás del primer dispositivo interceptor, por ejemplo, el primer dispositivo interceptor puede estar en un intervalo de aproximadamente 4 y 5 pulgadas (10,2 y 12,7 cm) de la boquilla. El segundo dispositivo interceptor puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a 6 pulgadas (12,7 a 15,2 cm) de la boquilla. De forma más deseable, el segundo dispositivo interceptor está aproximadamente a 5,5 pulgadas (13,97 cm) de la boquilla.

La configuración en la cual se coloca un dispositivo interceptor 2203 para interceptar las gotitas que pasan a través de una ventana de salida de otro dispositivo interceptor es particularmente ventajosa cuando no es primordial la pureza de una de las poblaciones separadas (por ejemplo, células espermáticas portadores del cromosoma Y en el caso de células espermáticas separados para usar en la cría de vacas lecheras). Los especialistas en la técnica sabrán que el citómetro puede producir una cantidad de gotitas dispersas 2265 (por ejemplo, una nube de gotitas dispersas) que tengan un contenido desconocido además de las gotitas en las corrientes separadas según se muestra en la Fig. 85. El primer dispositivo interceptor se debe colocar de modo que la corriente de gotitas que se está separando para la población con mayor tolerancia a las impurezas, golpee la superficie de impacto 2205 del primer dispositivo interceptor, y la corriente para la cual la pureza es sumamente crítica pase a través de la ventana de salida 2245 y golpee la segunda superficie de impacto del segundo dispositivo interceptor.

De esta manera la mayoría de las gotitas dispersas se recoge en el recipiente de recogida 2207 que contiene la población para la cual la pureza no es tan importante, como se muestra en la Fig. 85 y no contaminará a la población para la cual la pureza es crítica. También al interceptar y recoger las gotitas dispersas, se evita la necesidad de limpiar tan a menudo como en el caso de que las gotitas dispersas se salieran del sistema de recogida. En contraposición al primer dispositivo interceptor, el segundo dispositivo interceptor sólo desvía las gotitas que pasan por la ventana más pequeña de salida. Esto facilita el mantenimiento de la pureza de la población recogida por el segundo dispositivo interceptor.

Los especialistas en la técnica reconocerán que el sistema de recogida ejemplar podría modificarse fácilmente de varias maneras. Por ejemplo, sería posible construir un dispositivo interceptor de gotitas que tenga debajo de éste un recipiente de recogida formado de manera integral (o unido de otro modo). De igual manera, aunque los dispositivos interceptores en el ejemplo mostrado en las Fig. 83-87 son pipetas modificadas, se comprende que los dispositivos interceptores 2203 pueden ser de una gran variedad de formas. Por ejemplo, cada dispositivo interceptor puede comprender una lámina plana o curva, una cuchara, un cuenco u otra forma similar. El único requisito es que el dispositivo interceptor funcione correctamente para interceptar las gotitas que avanzan por una trayectoria respectiva de una corriente de gotitas y para desviar las gotitas interceptadas en un recipiente de recogida. Sin embargo, una ventaja de construir los dispositivos interceptores a partir de un producto fácilmente de obtener y de un costo relativamente bajo, como por ejemplo una pipeta, es que quizá sea más económico reemplazar y eliminar los dispositivos interceptores usados después de pasar cada muestra, en lugar de limpiar los dispositivos interceptores cada vez que se pasa una muestra. Esto podría ayudar a reducir los costos del funcionamiento del sistema de recogida.

Fluido de recogida

Las células espermáticas separadas se recogen en un recipiente que contiene un fluido de recogida 2301 (Fig. 56 y 57). En general, el objetivo del fluido de recogida incluye amortiguar el impacto de las células espermáticas con el recipiente de recogida y proporcionar un soporte líquido para las células. De acuerdo con estas consideraciones, el fluido de recogida puede contener un tampón y una fuente proteica.

Antes se dieron ejemplos de tampones que se pueden usar en el fluido de recogida con relación a la recogida y dilución de muestras. Habitualmente, estos tampones tendrán una concentración entre aproximadamente 0,001 M y aproximadamente 1,0 M y tendrán un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8,5; preferiblemente de aproximadamente 7,0. Por ejemplo, el fluido de recogida contiene el tampón que contiene 0,96% (p/v) de PBS de Dulbecco a un pH de aproximadamente 7,0. En otro ejemplo, la solución tamponada contiene 0,204 g de NaHCO_3 ; 0,433 g de KHCO_3 y 0,473 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de NaHCO_3 ; 0,173 moles/l de KHCO_3 y 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua).

Si se incluye, la fuente proteica puede ser cualquier fuente proteica que no interfiera con la viabilidad de las células espermáticas, y sea compatible con el tampón o solución amortiguada particular que se utilice. Algunos ejemplos de fuentes proteicas comunes son la leche (incluso la homogeneizada por calor y la descremada), el extracto lácteo, la yema de huevo, el extracto de yema de huevo, la proteína de soja y el extracto de proteína de soja. Dichas proteínas

se pueden encontrar en una concentración entre aproximadamente 1 % (v/v) y aproximadamente 30 % (v/v), preferiblemente entre aproximadamente 10 % (v/v) y aproximadamente 20 % (v/v), y mejor si es de aproximadamente 10 % (v/v). Aunque la leche se puede usar en combinación con un tampón o solución amortiguada, en general se usa a falta de éstos, ya que la leche misma es una solución que se puede utilizar para los mismos fines que un tampón o solución amortiguada. En tales casos, el fluido de recogida contendría entre aproximadamente 80 % (v/v) y aproximadamente 90 % (v/v) de leche.

Además o en lugar de la fuente proteica, el fluido de recogida también puede contener plasma seminal. El plasma seminal presenta ambos beneficios el de mejorar la viabilidad y motilidad de las células espermáticas y el de estabilizar la membrana de éstos (evitando de esa manera la capacitación de las células espermáticas durante la recogida y el almacenamiento). Maxwell et al., *Reprod. Fert. Dev.* (1998) 10: 433-440. Los métodos para obtener plasma seminal son bien conocidos por los especialistas en la técnica, como queda demostrado en la publicación de Maxwell et al. El plasma seminal puede provenir del mismo mamífero del que se obtuvo la muestra de semen, de un mamífero diferente de la misma especie o de un mamífero de diferente especie. Habitualmente, el porcentaje de plasma seminal estará en el intervalo entre aproximadamente 0,5 % (v/v) y aproximadamente 10 % (v/v). Si se usa en combinación con una fuente proteica, como por ejemplo yema de huevo o leche, el porcentaje total de plasma seminal y fuente proteica estará en el intervalo entre aproximadamente 1 % (v/v) y aproximadamente 30 % (v/v). En dichas circunstancias, el porcentaje de plasma seminal será inversamente proporcional al porcentaje de fuente proteica. Opcionalmente, el fluido de recogida puede también contener una diversidad de aditivos que son beneficiosos para la viabilidad o la motilidad de las células espermáticas.

Ejemplos de dichos aditivos incluyen, por ejemplo, una fuente de energía, un antibiótico y una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción de intracelular o extracelular, cada uno de los cuales se ha analizado anteriormente con relación a la recogida y dilución de muestras. Dichos aditivos se pueden añadir al fluido de recogida de acuerdo con eso.

Alternativamente, y en lugar de usar un fluido de recogida, las células separadas se pueden recoger en un recipiente que contiene o está recubierto con un criodiluyente utilizado en las etapas posteriores de crioconservación. Las células clasificadas se recogen en un criodiluyente. En otro ejemplo, las células recogidas se clasifican en un criodiluyente comprende agua, Triladyl® (Minitube, Verona, WI, que comprende glicerol, tris, ácido cítrico, fructosa, 5 mg/100 ml de tirosina, 25 mg/100 ml de gentamicina, 30 mg/100 ml de espectinomicina, y 15 mg/100 ml de lincomicina), yema de huevo y ácido pirúvico. En otro ejemplo más, el fluido de recogida es el criodiluyente que comprende 25 g de Triladyl®, 25 g de yema de huevo y 10 mM de ácido pirúvico en 75 ml de agua.

Se debe entender que las concentraciones porcentuales de proteína en el fluido de recogida descritas en este documento son las previas al agregado de las células espermáticas separadas por flujo. El agregado de las células separadas por flujo diluirá la concentración final del fluido de recogida en aproximadamente 1/20 de la concentración previa al agregado de las células separadas por flujo. Por lo tanto, en donde, por ejemplo, el fluido de recogida contiene aproximadamente 10 % (v/v) de yema de huevo, una vez que las células separadas por flujo se recogen en el recipiente de recogida que contiene el fluido de recogida, la concentración final de yema de huevo se reducirá a aproximadamente 0,5 % (v/v).

Pre-tratamiento de los dispositivos interceptores y/o recipientes de recogida

A fin de minimizar el posible daño a las partículas (p. ej., células espermáticas) que se pueden separar, los dispositivos interceptores 2203 y/o recipientes de recogida 2207 (Fig. 56-60) se pueden tratar antes de su uso. Dicho tratamiento previo puede consistir en, por ejemplo, poner en contacto o sumergir los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida en un baño que contenga una preparación que sirva para minimizar el impacto entre la partícula y el dispositivo interceptor. Después de retirar los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida del baño, una cierta cantidad de la preparación permanecerá en los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida y servirá como agente tampón para las partículas de las gotitas. La preparación, por lo tanto, debe tener las características adecuadas para proporcionar el efecto tampón deseado. Además, la preparación también debe ser compatible con la partícula o célula que se va a separar, el fluido envolvente y el fluido de recogida. De acuerdo con estas consideraciones, la preparación usada para tratar los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida puede contener un tampón, un fluido envolvente, un fluido de recogida, un criodiluyente, cualquier componente del fluido envolvente, del fluido de recogida y del criodiluyente, o cualquier combinación de éstos. Los tampones, soluciones tamponadas, fluidos envolventes y fluidos de recogida utilizados para la tinción y separación de las células espermáticas se han descrito anteriormente. Por consiguiente, en un ejemplo, los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida están en contacto (p. ej., sumergidos o frotados con) fluido envolvente. En otro ejemplo, los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida están en contacto con el fluido de recogida. Aún En otro ejemplo, (os dispositivos interceptores y los recipientes de recogida están en contacto con un criodiluyente que se describe a continuación.

El contacto o inmersión de los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida con la preparación debe producirse durante un período suficiente para permitir que la preparación se adhiera a las superficies de los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida. Tal período es generalmente menor de aproximadamente 90 minutos, preferiblemente menor de aproximadamente 60 minutos, mejor si es entre aproximadamente 30 y

aproximadamente 60 minutos, y mejor aún si es de aproximadamente 60 minutos. Todavía En otro ejemplo, los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida están solamente en contacto con la preparación antes de su uso.

- 5 En lugar del contacto o en combinación con el contacto de los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida con la preparación antes descrita, los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida también se pueden poner en contacto con componentes específicos contenidos en el fluido envolvente, el fluido de recogida, y/o el criodiluyente, como por ejemplo, BSA, SSS, yema de huevo, extracto de yema de huevo, leche (incluso leche homogeneizada por calor y descremada), extracto de leche, proteína de soja, y extracto de proteína de soja. En
- 10 consecuencia, en un ejemplo, los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida se ponen en contacto con fluido envolvente y a continuación con 0,1 % (v/v) de albúmina de suero bovino. En otro ejemplo, los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida se ponen en contacto con fluido envolvente y a continuación con 10 % (v/v) de yema de huevo. En otro ejemplo, los dispositivos interceptores y los recipientes se sumergen en fluido de recogida y a continuación se ponen en contacto con 0,1 % (v/v) de albúmina de suero bovino. En otro ejemplo, los
- 15 dispositivos interceptores y los recipientes de recogida se sumergen en fluido de recogida y a continuación se ponen en contacto con 10 % (v/v) de yema de huevo.

A pesar de que los dispositivos interceptores y los recipientes de recogida reciben el mismo tratamiento previo en cada ejemplo descrito anteriormente, es posible utilizar diferentes protocolos de tratamiento previo para los

20 dispositivos interceptores y los recipientes de recogida. Asimismo, algunos de los dispositivos interceptores o recipientes de recogida pueden recibir un tratamiento previo y otros de los dispositivos interceptores o recipientes de recogida pueden recibir un tratamiento previo diferente. Ciertas ventajas del tratamiento previo también pueden obtenerse mediante el tratamiento previo sólo de los dispositivos interceptores o sólo de los recipientes de recogida.

25 **Concentración**

Como se ha indicado anteriormente, el esperma separado recogido por el citómetro de flujo se ha diluido mediante la adición de diversas soluciones tamponadas y diluyentes, el líquido de tinción, el fluido envolvente y el fluido de recogida. De manera característica, la concentración de células espermáticas después de la separación mediante

30 citometría de flujo como se ha descrito anteriormente, se encuentra dentro del intervalo de $0,7-1,4 \times 10^6$ células espermáticas/ml aproximadamente. Por consiguiente, es importante concentrar las células espermáticas separadas para reducir al mínimo el choque por la dilución del esperma y lograr la concentración adecuada del esperma con fines de crioconservación e inseminación artificial. Una práctica generalizada en la industria de cría, por ejemplo, es llevar a cabo la inseminación artificial con esperma con una concentración de aproximadamente 20×10^6 o

35 aproximadamente 40×10^6 células espermáticas/ml. Una manera de concentrar las células espermáticas es centrifugar el líquido recogido por el citómetro. Otra manera de concentrar el esperma es pasar el líquido recogido por el citómetro a través de un sistema de filtración. Estos métodos se tratan con mayor detalle a continuación.

40 **A. Centrifugación**

Para concentrar el esperma se puede usar cualquier centrífuga convencional. Sin embargo en una actividad comercial es preferible usar una centrífuga que tenga la capacidad de centrifugar un lote grande de células espermáticas de una vez. Durante la centrifugación la mayoría de las células espermáticas se comprimirán formando un sedimento en el fondo del tubo de centrífuga como consecuencia de la fuerza centrífuga que actúa

45 sobre ellos. La magnitud de la fuerza centrífuga se establece convencionalmente como la cantidad de veces que la fuerza centrífuga sobrepasa la fuerza gravitacional. Dado que la fuerza centrífuga es el parámetro crítico y debido a que la magnitud de la fuerza centrífuga a cualquier velocidad dada (velocidad angular) variará dependiendo de la longitud del radio de curvatura, la velocidad de centrifugación se especifica habitualmente estableciendo la magnitud de la fuerza centrífuga. Por ejemplo, una fuerza de 600 g significa que la velocidad angular de la centrífuga se selecciona para que la fuerza centrífuga resultante sea 600 veces la fuerza de gravedad. La mayoría de los líquidos y todas las células espermáticas que no se hayan centrifugado para formar el sedimento quedan en el sobrenadante. En general, se extrae el sobrenadante y las células espermáticas del sedimento se resuspenden para su procesamiento adicional según se describe más adelante. Es importante maximizar el porcentaje de esperma concentrado en el sedimento, reduciendo al mínimo al mismo tiempo el daño a las células espermáticas.

55 De acuerdo con un ejemplo, un tubo de centrífuga que contiene aproximadamente 10×10^6 células espermáticas separadas se coloca en una centrífuga. Para facilitar la concentración, los tubos de centrífuga se pueden usar como recipientes de recogida en el sistema de recogida del citómetro. Esto evita la necesidad de transferir las células espermáticas separadas a un tubo de centrífuga antes de la centrifugación. El tubo se centrifuga a una velocidad determinada y por un tiempo suficiente para permitir que se forme el sedimento de células espermáticas concentradas en el fondo del tubo. La velocidad y la duración de la centrifugación se seleccionan convenientemente teniendo en cuenta diversos factores, incluyendo: el hecho de que las células espermáticas son frágiles y la centrifugación a una velocidad excesiva las puede dañar; el tamaño del tubo de centrífuga influye en el tiempo necesario para que las células espermáticas se muevan hacia el fondo el tubo; y hay mayor probabilidad de que las

60 células espermáticas resulten dañadas al centrifugarse a una velocidad determinada cuanto más dure la centrifugación. Por lo tanto, en un ejemplo el tubo de centrífuga se centrifuga a 550-800 g durante un periodo de

aproximadamente 6-10 minutos. De acuerdo con otro ejemplo, el tubo de centrífuga se centrifuga a 650-750 g durante un periodo de aproximadamente 6-10 minutos. En otro ejemplo más, el tubo de la centrífuga se centrifuga a 700g durante un periodo de aproximadamente 6-10 minutos. En otro ejemplo más, el tubo de centrífuga se centrifuga a 700 g durante un periodo de aproximadamente 7 minutos.

Como se demuestra en los siguientes experimentos, la velocidad de la centrífuga y la duración de la centrifugación pueden afectar al porcentaje de células espermáticas recuperados y la motilidad de los mismos. Los experimentos se llevaron a cabo sin separar las células espermáticas efectivamente. En cambio, se añadieron a las muestras de semen diversos líquidos como soluciones tamponadas, diluyentes, líquidos de recubrimiento y un líquido de tinción para simular el proceso de separación. Las muestras después se centrifugaron para intentar concentrar las células espermáticas.

Ejemplo I de centrifugación

En el ejemplo I de centrifugación se recogió semen bovino y se evaluó como se ha descrito anteriormente. La muestra de semen se diluyó con una cantidad de ácido cítrico - Tris ("TCA") con un pH de 7,3 para obtener una concentración de 150×10^6 células espermáticas/ml. Las células espermáticas se tiñeron con Hoechst 33342 (100 μ M) a 41°C durante veinte minutos. Se habían preparado dos tubos de 15 ml con soluciones tamponadas para la simulación. El tubo 1 estaba parcialmente lleno con 750 μ l de solución salina amortiguada con fosfato ("PBS") con 10% de yema de huevo y 14,25 ml de PBS con 0,1% de albúmina sérica bovina ("BSA"). El tubo 2 estaba parcialmente lleno con 750 μ l de TCA con yema de huevo al 10% y 14,25 ml de PBS con BSA al 0,1%. Cada uno de los dos tubos recibió 100 μ l de la solución que contenía las células espermáticas teñidos, que luego se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación los dos tubos se dividieron en dos alícuotas de 7 ml cada una. Se centrifugó una alícuota de cada tubo a 2250 rpm (aproximadamente 540 g) durante 7 minutos en una centrífuga de rotor de ángulo fijo. La otra alícuota de cada uno de los dos tubos se centrifugó a 2500 rpm (aproximadamente 660 g) durante 7 minutos. Inmediatamente después de la centrifugación, se utilizaron pipetas de 10 ml para extraer y guardar el sobrenadante de cada alícuota. Los sedimentos se resuspendieron en 200 μ l de TCA con yema de huevos al 10% (pH 7,0). Se observó la motilidad de las células espermáticas previa y posteriormente a la centrifugación con un microscopio de contraste de fase. Se añadieron cincuenta μ l de un fijador (0,1% de glutaraldehído en citrato de sodio al 3,4%) a cada sedimento y sobrenadante para inmovilizar el esperma para determinar la concentración con un hemocitómetro. La cantidad total de células espermáticas se calculó sobre la base del volumen usado/recuperado multiplicado por la concentración correspondiente de esperma determinada por el hemocitómetro. La tasa de recuperación se calculó como la cantidad total de esperma en el sedimento dividido por la suma de la cantidad total de esperma en el sedimento y la cantidad total de esperma en el sobrenadante.

Los resultados, como se muestra en las Fig. 88 y 89 demuestran que la variación de la velocidad de la centrífuga causa pocas diferencias en la motilidad de las células espermáticas. Los resultados también indican que la motilidad fue algo mejor al usar TCA en comparación con PBS.

Ejemplo II de centrifugación

En el ejemplo II de centrifugación se recogieron y evaluaron muestras de semen de tres toros como se ha descrito anteriormente. Una de las muestras se descalificó por no cumplir con las normas de control de calidad iniciales. Las otras dos muestras de semen se diluyeron con una cantidad de TCA que tenía un pH de 7,3 para obtener un esperma con una concentración de 150×10^6 células espermáticas/ml. Las células espermáticas se tiñeron con Hoeschst 33342 10 μ M a 41°C durante veinte minutos. A cada uno de los tubos se agregó una solución tamponada simulada que contenía 1500 μ l de PBS con 10% de yema de huevo y 28,3 ml de PBS con 0,1% de BSA. A cada tubo se añadieron doscientos μ l de células espermáticas teñidos (30×10^6 células espermáticas) y se incubaron a temperatura ambiente durante veinte minutos. Se tomaron tres alícuotas de 9 ml de la mezcla de semen de cada uno de los dos tubos para la centrifugación. Una alícuota de cada una de las dos muestras se centrifugó durante siete minutos en un tubo de centrífuga de 15 ml a cada una de las velocidades siguientes: 550 g; 650 g; y 750 g. Durante la centrifugación la temperatura fue de 22°C. Inmediatamente después de la centrifugación se extrajo el sobrenadante con una pipeta de 10 ml, dejando aproximadamente 200-300 μ l del sobrenadante en el sedimento. Los sedimentos se resuspendieron con 200 μ l de TCA con 10% (v/v) de yema de huevo que tenía un pH de 7,0. Se observó la motilidad del esperma previa y posteriormente a la separación con un microscopio de contraste de fase. En las muestras de uno de los dos toros posteriormente a la centrifugación se observó un grado importante de aglutinación del esperma. Se añadieron cincuenta μ l de un fijador (0,1% de glutaraldehído en citrato de sodio al 3,4%) al sobrenadante y al sedimento para inmovilizar al esperma para determinar su concentración. La tasa de recuperación se determinó de acuerdo a la fórmula establecida en el experimento I de centrifugación.

Los resultados se muestran en la Fig. 90. Los resultados indican que hay una mejor tasa de recuperación de células espermáticas a 650 g que a 550 g. Sin embargo, hubo poca diferencia en la tasa de recuperación entre 650 g y 750 g. No hubo ninguna diferencia significativa en la motilidad de las células espermáticas causada por la variación de la velocidad de la centrífuga.

Ejemplo III de centrifugación

Para el ejemplo III de centrifugación, se repitió básicamente el procedimiento del ejemplo II de centrifugación con los mismos tres toros, otro día. Los resultados se muestran en la Fig. 91. Los resultados confirman que hay poca diferencia en la tasa de recuperación a 650 g comparada con 750 g.

Ejemplo IV de centrifugación

Se recogió semen de dos toros diferentes en dos días diferentes. El semen se transportó y se evaluó de la manera descrita anteriormente.

Sobre la base de la concentración de esperma del semen sin tratar, las células espermáticas se diluyeron con ácido cítrico-Tris (TCA, pH 7,3) más piruvato 10 mM, hasta una concentración de 150×10^6 células espermáticas/ml. Las células espermáticas se tiñeron con Hoechst 33342 $10 \mu\text{M}$ a 41°C durante 20 min. Después de la tinción, $267 \mu\text{l}$ de la solución que contenía las células espermáticas teñidos se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 células espermáticas/ml mediante la adición de las siguientes soluciones tamponadas simuladas: 2 ml de PBS con 10% (v/v) de yema de huevo; y 37,733 ml de PBS con 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA). Las células espermáticas teñidas y las soluciones tamponadas simuladas se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos. Se tomaron cuatro alícuotas de 9 ml de la mezcla de células espermáticas teñidos obtenidos de cada toro y las soluciones tamponadas simuladas. Las cuatro alícuotas del primer toro se centrifugaron a combinaciones variables de velocidad y tiempo de la centrifuga en la siguiente secuencia:

- (1) 700 g durante 7 minutos para la primera alícuota;
- (2) 700 g durante 10 minutos para la segunda alícuota;
- (3) 650 g durante 10 minutos para la tercer alícuota; y
- (4) 650 g durante 7 minutos para la cuarta alícuota.

Las cuatro alícuotas del segundo toro se centrifugaron a combinaciones variables de velocidad y tiempo de la centrifuga en la siguiente secuencia:

- (1) 700 g durante 10 minutos para la primera alícuota;
- (2) 700 g durante 7 minutos para la segunda alícuota;
- (3) 650 g durante 10 minutos para la tercer alícuota; y
- (4) 650 g durante 7 minutos para la cuarta alícuota.

Toda la centrifugación se llevó a cabo en tubos de centrífuga de 15 ml en una centrífuga de rotor basculante (Allegra 6R, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA) a 22°C . El intervalo de tiempo entre la recogida de semen en la granja y la centrifugación en el laboratorio fue de 4-5 horas. Inmediatamente después de la centrifugación, se extrajo el sobrenadante con pipetas de 10 ml, dejando $\sim 250 \mu\text{l}$ de sobrenadante con cada uno de los sedimentos. Los sedimentos se resuspendieron en $250 \mu\text{l}$ de PBS de Dulbecco (pH 7,0). La motilidad del esperma y la motilidad progresiva se observaron mediante un analizador de motilidad Hamilton Thom (Hamilton-Thorn Motility Analyzer) (dos portaobjetos por muestra; dos cámaras por portaobjetos) después de la tinción pero antes de la centrifugación y nuevamente después de la centrifugación. La concentración del esperma se determinó mediante la medición con un hemocitómetro de una alícuota de unos $100 \mu\text{l}$ de la mezcla sin centrifugar de células espermáticas teñidos y soluciones tamponadas simuladas, que se había colocado en el congelador y una alícuota de $10 \mu\text{l}$ del sedimento resuspendido mezclado con $90 \mu\text{l}$ de fijador (0,1% de glutaraldehído en citrato de sodio al 3,4%). La tasa de recuperación se determinó de la misma forma que en el ejemplo I de centrifugación. Los resultados se muestran en las Fig. 92 y 93.

Los datos indican que $>85\%$ de las células espermáticas pueden recuperarse después de la centrifugación a 650 g ó 700 g, durante 7 ó 10 minutos (Fig. 92). Sin embargo, la tasa de recuperación fue algo mejor (95%) a 700 g. La disminución en la motilidad después de la centrifugación (comparada con la motilidad antes de la centrifugación) en todos los tratamientos podría deberse a la presencia de células espermáticas muertas/anómalas/frágiles que podrían no resistir la agresión de la fuerza centrífuga. La motilidad del esperma descendió en un 10-14% (Fig. 93) en todos los tratamientos. La disminución mayor en la motilidad del esperma (14%) a 650 g durante 7 minutos podría deberse a la exposición más larga del esperma a la solución tamponada simulada cuando se llevó a cabo la centrifugación a 650 g después de 700 g. La centrifugación no mostró ningún efecto adverso sobre la motilidad progresiva de las células espermáticas, más bien hubo una mejoría de alrededor de 2-3%.

Ejemplo V de centrifugación

Se recogió el semen de un toro en dos días diferentes. El semen se evaluó, se diluyó y se tiñó con Hoechst 33342 y se diluyó posteriormente con soluciones tamponadas simuladas según se describe en el ejemplo IV de centrifugación. Para cada una de las muestras de semen se obtuvieron cuatro alícuotas de 9 ml de la mezcla de células espermáticas teñidos y soluciones tamponadas simuladas. Las alícuotas de la primera muestra se

centrifugaron a una de las siguientes combinaciones de velocidad y tiempo de la centrífuga en la siguiente secuencia:

- 5 (1) 750 g durante 10 minutos para la primera alícuota;
- (2) 750 g durante 7 minutos para la segunda alícuota;
- (3) 700 g durante 10 minutos para la tercer alícuota; y
- (4) 700 g durante 7 minutos para la cuarta alícuota.

10 Para las alícuotas obtenidas de la segunda muestra, las combinaciones de velocidad y tiempo de la centrífuga fueron las mismas, pero la secuencia se modificó del siguiente modo:

- 15 (1) 750 g durante 7 minutos para la primera alícuota;
- (2) 750 g durante 10 minutos para la segunda alícuota;
- (3) 700 g durante 7 minutos para la tercer alícuota; y
- 15 (4) 700 g durante 10 minutos para la cuarta alícuota.

La centrifugación se llevó a cabo en un tubo de centrífuga de 15 ml en una centrífuga de rotor basculante (Allegra 6R, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA) a 22°C. El intervalo entre la recogida de semen en la granja y la centrifugación en el laboratorio fue de 6,5 horas aproximadamente para la primera muestra y de 4 horas aproximadamente para la segunda muestra. El procedimiento posterior a la centrifugación, es decir, la extracción del sobrenadante, la resuspensión del sedimento, la determinación de la concentración del esperma y la estimación de la motilidad con el analizador de motilidad Hamilton-Thorn (Hamilton-Thorn Motility Analyzer), se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo IV. Los resultados se muestran en las Fig. 94 y 95.

25 Los resultados muestran que >85% de la población de esperma en una suspensión sumamente diluida puede recuperarse con 700 g ó 750 g en 7 minutos ó 10 minutos (Fig. 94). Un aumento de la fuerza g a 750 g no mejoró significativamente la tasa de recuperación. Como el caso en el ejemplo IV de centrifugación, en todos los tratamientos se observó disminución en la motilidad después de la centrifugación (en comparación con la motilidad antes de la centrifugación). En el experimento actual, la motilidad del esperma descendió aproximadamente 13-20% (Fig. 95), que es un porcentaje un poco mayor que el del ejemplo IV de centrifugación. La variación podría deberse a la variación en la muestra de semen y al mayor intervalo de tiempo desde la recogida del semen hasta la centrifugación (6 horas) en una muestra. Como se explicó en el ejemplo IV, la disminución en la motilidad del esperma (aproximadamente 20%) con la centrifugación a baja velocidad (700 xg, durante 7 ó 10 min.) podría deberse a la mayor exposición del esperma a la solución tamponada simulada cuando se centrifugó después de la centrifugación a 750 g. La disminución en la motilidad progresiva fue insignificante (1-5%).

B. Centrifugación secundaria

40 Para recuperar el esperma que de otro modo se podría perder en el sobrenadante, es posible centrifugar el sobrenadante después que éste se ha separado del sedimento. Sin adherirse a una teoría en particular, los solicitantes creen que la interfase sedimento/sobrenadante impide el movimiento de las células espermáticas dentro del sedimento. La extracción de la interfase mediante la separación del sedimento del sobrenadante permitirá que la centrifugación adicional del sobrenadante provoque la formación de un segundo sedimento con las células espermáticas que hubieran quedado en el sobrenadante. El segundo sedimento se puede resuspender y agregar al esperma resuspendido del primer sedimento.

C. Filtración

50 La filtración es un método de concentración alternativo que se puede usar para evitar la pérdida de células espermáticas en el sobrenadante. Como se muestra en la Fig. 96, de acuerdo con un ejemplo, un filtro 2415 se incorpora en un recipiente de recogida 2403. Es deseable que el tamaño de los poros en el filtro esté dentro del intervalo de aproximadamente 0,2 -1 micrómetro. También es deseable que el filtro no sea un filtro de profundidad (por ejemplo, un filtro que tenga pasajes tortuosos en los que puedan quedar atrapadas las colas de las células espermáticas). Más bien es deseable que el filtro sea lo más delgado posible. Por ejemplo, es deseable que el filtro tenga un grosor de 50 µm a 500 µm; es más deseable que el grosor sea de 75 µm a 250 µm; y aún es más deseable que el grosor del filtro sea de 100 µm a 150 µm. Se aplica vacío de nivel bajo 2417 para extraer los fluidos a través del filtro cuando se recogen las gotitas 33. Es importante usar vacío de nivel bajo (menos de 20 pulgadas de mercurio (0,6906 kg/cm²), por ejemplo, 15 pulgadas de mercurio (0,5179 kg/cm²) para evitar infligir daño a las células espermáticas. En un ejemplo el vacío es lo bastante bajo como para que la velocidad de extracción del líquido sea de aproximadamente 1,0 ml/15 segundos. De acuerdo con otro ejemplo, el vacío se aplica intermitentemente para permitir que las células espermáticas se recuperen. En otro ejemplo, el filtro 2415 está construido de un material que es compatible con las células espermáticas, si bien no tiene ninguna afinidad de unión a ellos. Al finalizar la separación, aproximadamente 80-90% de los líquidos se habrán extraído a través del filtro. Sin embargo, queda suficiente líquido (aproximadamente 10-20%) para que las células espermáticas se acumulen en una suspensión concentrada 2405, impidiendo de ese modo que las células espermáticas formen una torta de filtración. La suspensión concentrada se puede transferir a otro recipiente 2419, como se muestra en la Fig. 97 por

ejemplo. Se puede usar un mecanismo de jeringa 2409 con un filtro de la punta de la cánula 2411 para extraer una parte del líquido remanente de este recipiente 2419. Sin embargo, en el recipiente quedan líquidos suficientes para evitar que las células espermáticas formen una torta en el filtro 2411. Se aplican las mismas consideraciones al filtro de la punta de la cánula 2411 que al filtro 2415 del recipiente de recogida. Por lo tanto, es deseable que el tamaño de poro del filtro de la cánula 2411 varíe entre 0,2 y 1,0 micrómetros aproximadamente y que el filtro de la cánula sea relativamente fino para evitar que las colas de las células espermáticas queden atrapadas en los tortuosos pasajes del filtro. Por ejemplo, un filtro de punta de jeringa de fibra de polipropileno hueco DynaGard®, que se encuentra disponible comercialmente de los Laboratorios Spectrum, Inc. de Rancho Domínguez, CA, se puede usar para el filtro de la punta de la cánula. Como se muestra en la Fig. 98, se vierte un líquido de resuspensión 2413 a través del filtro de la punta de la cánula para lavar las células que pueden estar adheridas a la superficie del filtro y devolverlas a la suspensión. El líquido de resuspensión puede contener una cantidad del líquido filtrado y/o un diluyente apropiado. Después de efectuar un retrolavado a través del filtro con una cantidad de líquido de resuspensión suficiente para extraer las células espermáticas del filtro, se puede agregar líquido de resuspensión adicional si se desea. La cantidad total de líquido de resuspensión se selecciona para llevar la concentración a un valor deseado (por ejemplo, aproximadamente 20×10^6 células espermáticas/ml). Por lo tanto, el proceso de filtración de este ejemplo es un proceso en tres etapas que incluye el uso de un filtro en el recipiente de recogida, la filtración mediante un filtro de la cánula y la resuspensión para obtener la concentración deseada.

En un proceso alternativo de filtración en dos etapas, se combinan el primero y el segundo etapa del proceso en tres etapas descrito anteriormente para que la extracción de todo el líquido sea a través de un filtro de la cánula. En este proceso las células espermáticas separadas se dirigen a un recipiente de recogida que no tiene filtro. Los líquidos se extraen por medio de vacío de bajo nivel y/o vacío intermitente como se ha descrito anteriormente, que se aplica a través del filtro de la punta de la cánula 2411. Cuando las células espermáticas están formando parte de una suspensión concentrada, se hace un retrolavado con un líquido de resuspensión, como por ejemplo un diluyente, a través del filtro de la cánula para obtener la concentración deseada de células espermáticas.

Ejemplo I de filtración

El ejemplo I de filtración muestra la tasa de recuperación y la motilidad de las células espermáticas después de la concentración mediante un proceso de filtración en tres etapas. Se recogieron muestras de semen de tres toros y se evaluaron según lo estipulado anteriormente en la sección de preparación de muestras. Una de las tres muestras de semen se descalificó por no satisfacer los criterios de calidad iniciales mínimos. Las dos muestras restantes se diluyeron con una cantidad de TCA (pH 7,3) adecuada para obtener una concentración de 150×10^6 células espermáticas/ml. Se añadieron quinientos μ l de PBS con 10% de yema de huevo y 9,5 ml de PBS con 0,1% de BSA a cada uno de dos tubos de ensayo de 15 ml. A cada tubo de ensayo se añadieron sesenta y siete μ l de la muestra de semen (aproximadamente 10×10^6 células espermáticas) y se incubaron durante veinte minutos a temperatura ambiente. Con referencia a la Fig. 99, se usó una bomba de vacío 2427 para aplicar presión negativa para extraer una alícuota de cuatro ml del semen diluido 2423 a través de un filtro 2425. El filtrado 2429 se recogió en una jeringa 2421. Después de la filtración las células espermáticas que quedaron en el filtro se retrolavaron con 1 ml de solución tamponada TCA en un tubo de 15 ml. La motilidad del esperma se evaluó visualmente. Las muestras se mezclaron con un fijador (0,1% de glutaraldehído en citrato de sodio al 3,4%) antes y después de la filtración para inmovilizar las células espermáticas. La concentración del esperma se determinó usando un hemocitómetro. El número total de células espermáticas se calculó sobre la base del volumen multiplicado por la concentración de células espermáticas. La tasa de recuperación se calculó como el número total de células espermáticas en la porción a la que se efectuó el retrolavado dividida por el número total de células espermáticas en la alícuota antes de la filtración. El proceso se repitió con un filtro diferente. El experimento ensayó los dos filtros siguientes: (1) un filtro (jeringa) de disco de membrana de 1,0 μ m de PTFE (no FTPE) (que comercializa Pall Corporation, Life Science Group, Ann Arbor, MI, Cat. N° PN4226T o VWR, Batavia, IL, Cat. N° 28143-928); y (2) filtro (jeringa) de disco de membrana de 0,8 SFCA (acetato de celulosa sin surfactante) (Corning, Inc., Corning, NY, Cat. N° 431221; VWR Batavia, IL, Cat. N° 28200-028). Los resultados se muestran en la Fig. 101. Se recuperaron más células espermáticas con filtros de acetato de celulosa en comparación con el filtro de PTFE, es decir 67 frente a 33% debido a las proteínas de baja afinidad de unión del acetato de celulosa. La motilidad visual de las células espermáticas recuperados fue del 63% (PTFE) al 68% (acetato de celulosa).

Ejemplo II de filtración

El ejemplo II de filtración muestra la tasa de recuperación y la motilidad de las células espermáticas después de la concentración mediante un proceso de filtración en dos etapas. Se recogieron muestras de semen de tres toros y se evaluaron según lo estipulado anteriormente en la sección anterior de preparación de muestras. Las tres muestras se diluyeron con una cantidad de TCA (pH 7,3) adecuada para obtener una concentración de 150×10^6 células espermáticas/ml. A cada uno de los 50 tubos de ensayo se agregó un ml y medio de PBS con 10% de yema de huevo y 28,3 ml de PBS con 0,1% de BSA. Se añadieron doscientos μ l de la muestra de semen (aproximadamente 30×10^6 células espermáticas) a cada tubo de ensayo y se incubaron durante treinta minutos a temperatura ambiente. Con referencia a la Fig. 100, se utilizó una jeringa 2431 para aplicar presión negativa para extraer una alícuota de 6 ml del semen diluido 2433 de cada tubo de ensayo a través de un filtro 2435. El filtro se colocó en un

soporte del filtro 2437 (un soporte de filtro Swinnex de Millipore Corporation, Billerica, MA Cat N° SX0002500.). Después de la filtración, el soporte de filtración 2437 se desconectó de la jeringa y el tubo, conservando intacto el soporte del filtro.

Las células espermáticas en el filtro se recogieron invirtiendo la parte superior del ensamblaje del filtro y retorlavando con 1 ml de solución tamponada TCA empleando una jeringa de 3 ml que tenía un trozo pequeño de tubo en la punta de un tubo de ensayo de 15 ml. La motilidad del esperma se evaluó visualmente. Las muestras se mezclaron con un fijador (0,1% de glutaraldehído en citrato de sodio al 3,4%) antes y después de la filtración para inmovilizar las células espermáticas. La concentración de células espermáticas se determinó usando un hemocitómetro. El número total de células espermáticas y la tasa de recuperación se calcularon como se especifica en el ejemplo I de filtración. El proceso se repitió dos veces para ensayar filtros diferentes. El experimento ensayó los dos filtros siguientes: (1) un filtro de membrana de Teflón de 0,2 μm (disponible en el mercado en X-Partek, P.J Cobert Associates Inc. St. Louis Cat. N° 944106; y (2) un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0,8 (Millipore Corporation, Billerica, MA Cat. N° AAWP 02500). Los resultados se muestran en la Fig. 102. La tasa de recuperación de células espermáticas fue baja en ambos filtros (~25%). En el filtro de teflón fue baja como en el ejemplo I. Sin embargo, la baja tasa de recuperación y poca motilidad visual de las células espermáticas a los que se les efectuó el retorlavado en el filtro de acetato de celulosa podría deberse al material usado por diferentes proveedores y/o a la capacidad de las células espermáticas de unirse al soporte/ montaje del filtro.

D. Concentración de medio denso

Otro método alternativo para concentrar las células espermáticas recogidas depende de la flotación de las células espermáticas en un medio de alta densidad. Según este método, se añade un medio de alta densidad a las células espermáticas recogidas para elevar el peso específico de la suspensión por encima de aproximadamente 1,3. Por ejemplo, para aumentar el peso específico de la suspensión se puede usar una suspensión de sílice coloidal tal como está disponible comercialmente de las marcas registradas Percoll® e Isolate®. Las células espermáticas flotarán en la parte superior de la suspensión, donde pueden separarse o recogerse de otro modo, debido al mayor peso específico de la suspensión. A las células que se han recogido de la superficie se les agrega un líquido de resuspensión para llevar la concentración final a aproximadamente 20×10^6 células espermáticas/ml. Parte del líquido de suspensión puede extraerse por uno de los métodos de filtración descritos anteriormente antes del agregado del medio de alta densidad para reducir la cantidad de medio de alta densidad necesario para obtener el peso específico deseado.

Criodilución

A. Crioprotección

Una vez que el esperma se separó y recogió en los recipientes de recogida, se puede usar para inseminar hembras de mamíferos. Esto puede ocurrir casi de inmediato, requiriendo poco tratamiento adicional del esperma. Asimismo, el esperma también se puede enfriar o congelar para usar en una fecha posterior. En tales casos, puede ser beneficioso administrar un tratamiento adicional al esperma para reducir al mínimo la repercusión sobre la viabilidad o la motilidad posterior a la descongelación como resultado de la refrigeración y la congelación.

En general, un criodiluyente consiste en un tampón o solución amortiguada, una fuente proteica y un crioprotector. Antes se dieron ejemplos de tampones y soluciones amortiguadas que se pueden usar en el criodiluyente en lo que se refiere a la recogida y dilución de las muestras. Habitualmente estos tampones tendrán una concentración de aproximadamente 0,001 M a aproximadamente 1,0 M y su pH es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8,5; preferiblemente de aproximadamente 7,0.

Si está incluida, se puede agregar una fuente proteica para proporcionar sustento a las células y para amortiguar el contacto de las células con el recipiente de recogida. La fuente proteica puede ser cualquier fuente proteica que no interfiera con la viabilidad de las células espermáticas y sea compatible con el tampón o solución amortiguada particular que se utilice. Algunos ejemplos de fuentes proteicas son la leche (incluso la homogeneizada por calor y la descremada), el extracto lácteo, la yema de huevo, el extracto de yema de huevo, la proteína de soja y el extracto de proteína de soja. Tales proteínas se pueden encontrar en una concentración entre aproximadamente 10% (v/v) y aproximadamente 30% (v/v), preferiblemente entre aproximadamente 10 % (v/v) y aproximadamente 20 % (v/v) y mejor si es de aproximadamente 20 % (v/v). Aunque la leche se puede usar en combinación con un tampón o solución amortiguada, en general se usa a falta de éstos, ya que la leche misma es una solución que se puede utilizar para los mismos fines que un tampón o solución amortiguada. En tales casos, el criodiluyente contendría entre aproximadamente 80 % (v/v) y aproximadamente 90 % (v/v) de leche.

Preferiblemente se incluye un crioprotector en el criodiluyente para reducir o evitar el choque frío y para conservar la fecundidad del esperma. En el medio se conocen numerosos crioprotectores. La selección de un crioprotector apropiado para usar con un diluyente determinado puede variar y depende de la especie de la que se obtuvo el esperma congelado. Algunos ejemplos de crioprotectores apropiados son, por ejemplo, el glicerol, el dimetil sulfóxido, el etilenglicol, el propilenglicol, la trehalosa, Triladyl® y combinaciones de éstos. Si están incluidos, en general, estos crioprotectores están presentes en el criodiluyente en una cantidad de entre aproximadamente 1 %

(v/v) y aproximadamente 15 % (v/v), preferiblemente en una cantidad entre aproximadamente 5 % (v/v) y aproximadamente 10 % (v/v), mejor si es entre aproximadamente 7 % (v/v), y lo mejor es que esté presente en una cantidad de aproximadamente 6 % (v/v).

- 5 En un ejemplo particular, el criodiluyente comprende agua, Triladyl®, yema de huevo y ácido pirúvico. En otro ejemplo más, el criodiluyente comprende 25 g Triladyl®, 25 g de yema de huevo y ácido pirúvico 10 mM en 75 ml de agua.

10 Opcionalmente, el criodiluyente también puede contener una variedad de aditivos que son beneficiosos para la viabilidad o motilidad del esperma y que evitan o reducen los efectos colaterales perjudiciales de la crioconservación. Entre dichos aditivos se encuentran, por ejemplo, una fuente de energía, un antibiótico o una preparación que regula las reacciones de oxidación/reducción dentro de la célula o del medio celular, cada uno de los cuales se trata antes con relación a la recogida y dilución de muestras. Dichos aditivos se pueden agregar al criodiluyente de acuerdo con eso.

15 B. Crioconservación de células espermáticas separadas

En la mayoría de los casos, no es posible usar de inmediato las células espermáticas que se separaron como se ha descrito anteriormente para la inseminación artificial. En el caso específico de una aplicación de clasificación de
20 esperma para uso comercial, las células espermáticas separadas se deben almacenar y/o transportar antes de que se puedan usar en inseminación artificial. Esto generalmente requiere la crioconservación de las células espermáticas. El esperma separado se puede cargar en cilindros alargados (conocido como "pajitas" en la industria de cría) y se lo somete a la crioconservación para protegerlo durante el transporte y el almacenamiento. Las células espermáticas sometidas a la crioconservación se pueden almacenar durante períodos largos en nitrógeno líquido.
25 Para usar el esperma sometido a crioconservación, se puede sumergir la pajita en un baño de agua caliente para descongelarlo. Luego la pajita se carga en una pistola de inseminación artificial que se usa para inseminar a una hembra. Se deben tomar varias precauciones para proteger a las células espermáticas durante el proceso de crioconservación. De otro modo las células espermáticas resultarán tan dañados (como lo indica una tasa baja de motilidad posterior a la descongelación, del 5-10%) que no serán adecuados para usaren inseminación artificial.

30 Los métodos convencionales de crioconservación consisten en agregar secuencialmente una fuente proteica (por ejemplo, yema de huevo), enfriar el esperma a una temperatura de aproximadamente 4-5°C, agregar un crioprotector (por ejemplo, glicerol), mantener al esperma y al crioprotector a una temperatura constante en el intervalo de 4-5°C aproximadamente durante un período suficiente para permitir que las células espermáticas se equilibren con el crioprotector y después sobreenfriar el esperma, por ejemplo sumergiendo las células espermáticas
35 en nitrógeno líquido a -196°C para el almacenamiento. Los especialistas en la técnica saben que la finalidad de la fuente proteica es proteger al esperma del daño cuando se lo enfría desde aproximadamente 14°C hasta aproximadamente 8°C, que es la temperatura a la que las células espermáticas son más susceptibles al choque frío. En contraposición, el crioprotector protege a las células espermáticas del daño a temperaturas inferiores a 0°C. Aún cuando las temperaturas que se emplean en la crioconservación son muy inferiores a la congelación y el término "congelación" a veces se emplea para describir la crioconservación, los especialistas en la técnica también saben que el esperma crioconservado no está realmente congelado. Para ser precisos, el esperma crioconservado está en un estado sobreenfriado. El período convencional durante el cual las células espermáticas y el crioprotector se mantienen a una temperatura constante puede durar desde 60 minutos hasta muchas horas. El tiempo total que
45 lleva completar la crioconservación utilizando los métodos convencionales en general supera las cuatro horas. Además, se cree que hasta 50% de las células espermáticas mueren durante los procesos convencionales de crioconservación. Aunque el esperma se crioconserva utilizando métodos convencionales de acuerdo con algunos ejemplos, otros ejemplos pueden emplear métodos mejorados de crioconservación que permiten reducir el tiempo que requiere el proceso y/o mejorar la salud del esperma crioconservado.

50 La Fig. 103 muestra un diagrama de flujo de trabajo que describe las etapas de un ejemplo ejemplar de un método mejorado de crioconservación de esperma. En el etapa 2501, la concentración de una solución que contiene células espermáticas separados se ajusta para quedar dentro del intervalo de 1 millón - 40 millones de células espermáticas/ml aproximadamente, dependiendo de la norma que use el consumidor final (por ejemplo, asociación de cría). Por ejemplo, la concentración de esperma puede ajustarse para quedar en el intervalo de 20 millones a 24 millones de células espermáticas/ml aproximadamente. El ajuste de la concentración de esperma puede incluir la adición de líquido de resuspensión, soluciones tamponadas y/o diluyentes al esperma concentrado, como se ha descrito anteriormente. En el etapa 2503, se añade un crioprotector (por ejemplo, glicerol) antes de que el esperma se enfríe. Las células espermáticas comienzan a equilibrarse con el crioprotector en cuanto entran en contacto con éste. En el etapa 2505 también se añade una fuente proteica (por ejemplo, yema de huevo) a la solución que
60 contiene las células espermáticas como se ha descrito anteriormente.

La solución con las células espermáticas, la fuente proteica y el crioprotector se carga en pajitas convencionales de inseminación artificial de 0,5 ó 0,25 ml utilizando un equipo de carga convencional en el etapa 2507. Los
65 especialistas en la técnica conocen una cantidad de equipos y técnicas convencionales que se pueden usar para cargar semen en las palillas. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5.249.610, otorgada a Cassou, et al.

expedida el 5 de octubre de 1993 e incorporada en este documento por referencia, proporciona instrucciones sobre el relleno de las pajitas con semen bovino utilizando una boquilla inyectora desechable. Es más, Minitube de América, ubicada en Verana WI comercializa el equipo para llenar las pajitas. Para cargar las células espermáticas separadas en las pajitas se puede utilizar cualquiera de estos métodos de carga o equipos convencionales o similares.

Después de la carga, las células espermáticas se enfrían hasta una temperatura de mantenimiento en el etapa 2509. En general, la temperatura de mantenimiento se selecciona teniendo en cuenta lo siguiente: mantener a las células espermáticas a una temperatura demasiado alta (por ejemplo, 10°C) puede causar daño innecesario por choque frío; se cree que el equilibrado de las células espermáticas con un crioprotector (por ejemplo, glicerol) es más activa a temperaturas de 4-5°C; y se cree que mantener a las células espermáticas a temperaturas demasiado bajas (por ejemplo, < 0°) los daña. De este modo, de acuerdo con un ejemplo, la temperatura de mantenimiento debe estar en el intervalo de 0-8°C. Es mejor si la temperatura de mantenimiento está en el intervalo de 2-6°C. Es aún mejor si la temperatura de mantenimiento está en el intervalo de 4-5°C. En otro ejemplo, la velocidad de refrigeración que se usa para este etapa 2509 se selecciona para reducir al mínimo el daño a las células espermáticas. Por ejemplo, se puede controlar la velocidad de refrigeración (es decir, prácticamente constante) para proporcionar un refrigeración homogéneo y evitar que el esperma sufra el choque térmico. La velocidad de refrigeración también debe enfriar al esperma lo suficientemente rápido para reducir su metabolismo antes de que la membrana sufra daño, pero lo suficientemente lento como para que no sufra choque térmico. Se puede controlar la velocidad de refrigeración colocando las pajitas que contienen las células espermáticas en un congelador programable (por ejemplo, un congelador 1810CD IceCube que está disponible comercialmente de Minitube de América, ubicado en Verana, WI) para enfriarlos. Según un ejemplo, el congelador programable enfría al esperma que está a la temperatura ambiente aproximadamente (habitualmente entre 22 y 24°C) a una velocidad de refrigeración constante de 0,1 y 0,3°C/minuto. Es mejor si la velocidad de refrigeración es de aproximadamente 0,15 y 0,25°C/min. Es mejor aún si la velocidad de refrigeración es de aproximadamente 0,2°C/min. En otro ejemplo, se selecciona la velocidad de refrigeración para enfriar el esperma de su temperatura inicial hasta la temperatura de mantenimiento en 90 minutos aproximadamente. En otro ejemplo más, se selecciona la velocidad de refrigeración para enfriar el esperma desde su temperatura inicial hasta la temperatura de mantenimiento a una velocidad de refrigeración constante en aproximadamente 90 minutos. Las velocidades de refrigeración mencionadas anteriormente se refieren en realidad a la velocidad de refrigeración de la cámara del congelador programable, pero debido a las paredes finas y a la forma larga, delgada de la pajita (es decir, aproximadamente 5,25 pulgadas (13,33 cm) de largo, menos de 3 mm de diámetro y aproximadamente 0,15 mm de espesor de la pared) y a las propiedades conductoras de la pajita, la diferencia de temperatura entre las células espermáticas y la cámara de refrigeración no es significativa.

Después de que las células espermáticas se hayan refrigerado hasta alcanzar la temperatura de mantenimiento, en el etapa 2511 se mantienen a esa temperatura o a una temperatura próxima durante un período para permitir completar sustancialmente su equilibrado con el crioprotector. Por ejemplo, el congelador programable descrito anteriormente se puede programar para mantener a las células espermáticas a una temperatura constante durante el período. De acuerdo con otro ejemplo, las células espermáticas se mantienen a la temperatura de mantenimiento durante un período más corto en comparación con los métodos convencionales porque ya se equilibraron con el crioprotector durante el proceso de refrigeración. Por ejemplo, el período puede variar entre 10 y 60 minutos. Es mejor si el período varía entre 20 y 40 minutos. Es mejor aún si el período es de aproximadamente 30 minutos. En otro ejemplo el período es inferior a 60 minutos. En otro ejemplo más, el período es inferior a 40 minutos. El período de mantenimiento relativamente corto ofrece varias ventajas en un proceso comercial de separación de esperma. En primer lugar, reduce el tiempo requerido para procesar el esperma separado, que puede traducirse en el ahorro en los costos. Además, las células espermáticas todavía llevan a cabo procesos metabólicos a temperaturas en el intervalo de 0-8°C, de modo que reducir el tiempo en que las células espermáticas deban mantenerse a esta temperatura puede mejorar su salud, lo que aumenta su valor para los criadores de animales, que están interesados en los índices de acierto de la inseminación artificial.

Después de mantener las células espermáticas a la temperatura de mantenimiento durante un período como se describió antes, en la etapa 2513 se enfrían hasta una temperatura que se acerca a la zona de temperatura crítica de crioconservación. Los especialistas en la técnica saben que la zona de temperatura crítica es la zona en la que la formación de cristales de hielo y los cambios en la presión osmótica dañan a las células espermáticas. Esta temperatura puede variar dependiendo de la solución que se use en la crioconservación de las células espermáticas, pero la zona de temperatura crítica generalmente se encuentra en el intervalo comprendido entre -18 y -35°C. Algunas veces se informa que esta zona de temperatura crítica se encuentra en el intervalo comprendido entre -18 y -30°C aproximadamente. De este modo, de acuerdo con otro ejemplo más, la velocidad de refrigeración utilizada para enfriar las células espermáticas desde la temperatura de mantenimiento hasta una temperatura que se aproxime a -18°C (por ejemplo, -15°C) se selecciona para proteger la salud del esperma. Los factores pertinentes a considerar incluyen el hecho de que las células espermáticas aún se están equilibrando con el crioprotector durante este período, el hecho de que aún llevan a cabo algunas funciones metabólicas y el hecho de que todavía son un poco sensibles al cambio rápido de temperatura. Nuevamente, es deseable que la velocidad de refrigeración sea una velocidad controlada, como una velocidad que se puede programar en el congelador programable descrito anteriormente. Es mejor si la velocidad de refrigeración que se utiliza para enfriar el esperma desde la temperatura

de mantenimiento hasta una temperatura que se aproxima a -18°C aproximadamente es una velocidad de refrigeración constante. De este modo, de acuerdo con otro ejemplo, las células espermáticas se enfrían de la temperatura de mantenimiento hasta aproximadamente -15°C a una velocidad de refrigeración en el intervalo de $1,0 - 5,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ aproximadamente. La etapa 2515 implica refrigerar rápidamente las células espermáticas a través de la zona de temperatura crítica para limitar el tiempo que las células espermáticas permanecen allí. Por lo tanto, de acuerdo con un ejemplo, la velocidad de refrigeración a través de la zona de temperatura crítica (por ejemplo, -18°C hasta aproximadamente -30°C) se selecciona para que sea mucho más rápida que la velocidad de refrigeración utilizada para enfriar a las células espermáticas hasta la temperatura de mantenimiento y la velocidad de refrigeración utilizada para enfriar a las células espermáticas hasta la temperatura próxima a la zona de temperatura crítica. Por lo tanto, es deseable que la velocidad de refrigeración más marcada se encuentre en el intervalo de aproximadamente $8-40^{\circ}$ por minuto. Es mejor si la velocidad de refrigeración más marcada se encuentra en el intervalo de aproximadamente $8-12^{\circ}\text{C}$ por minuto. Es mejor aún si la velocidad de refrigeración más marcada es de aproximadamente 10°C por minuto. El intervalo de temperatura en el que se usa la velocidad de refrigeración más marcada puede ir más allá de la zona de temperatura crítica. De ese modo, en otro ejemplo más, las células espermáticas se enfrían a una de las velocidades de refrigeración más marcadas descritas antes, de aproximadamente -15°C a aproximadamente -40°C . En otro ejemplo, las células espermáticas se enfrían a una de las velocidades de refrigeración más marcadas descritas antes, de aproximadamente -15°C a aproximadamente -80°C . La etapa de refrigerar el esperma a través de la zona de temperatura crítica a una velocidad más marcada se puede conseguir en el congelador programable descrito anteriormente.

Después de que las células espermáticas se hayan refrigerado por debajo de la zona de temperatura crítica (por ejemplo, hasta -80°C), en la etapa 2517 las pajitas que contienen las células espermáticas separados se sumergen en nitrógeno líquido (-196°C) para proporcionar la máxima vida útil a las células espermáticas separados. El uso de nitrógeno líquido para almacenar células espermáticas crioconservados está generalizado en la industria de cría de animales en el contexto de células espermáticas sin separar. Por lo tanto, los especialistas en la técnica estarán familiarizados con tecnologías que incluyen el transporte y almacenamiento de esperma en nitrógeno líquido, por lo que no es necesario tratarlo minuciosamente en este documento. Es suficiente señalar que se dispone de recipientes convencionales para almacenar a largo plazo cantidades a granel de pajitas de inseminación artificial en nitrógeno líquido y que también se dispone de recipientes más pequeños y portátiles para almacenar las pajitas de inseminación artificial en nitrógeno líquido para el transporte a los clientes y/o el transporte a un establecimiento agropecuario que tenga una o más hembras para inseminar con esperma crioconservado.

Una ventaja de los métodos de crioconservación descritos en este documento es que la crioconservación se puede llevar a cabo en menos tiempo que el que se requiere según los métodos convencionales. Quizás relacionado con esto, la disminución de la motilidad debida a la crioconservación es sólo aproximadamente del 5-11%, como lo indica el ejemplo que se trata a continuación. Por lo tanto, la crioconservación conserva sanas las células espermáticas como lo indican los ensayos que demuestran que las células espermáticas crioconservados tienen una motilidad que supera el 50% (por ejemplo, aproximadamente 60%), después que se descongelan en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 50 segundos. Como se trató anteriormente, se puede analizar la motilidad de las células espermáticas por medio de un equipo automático (por ejemplo, el analizador de esperma IVOS de Hamilton Thorn Research) o mediante el examen visual.

Debe señalarse que los métodos de crioconservación descritos anteriormente se consideran para el uso en un proceso de clasificación de esperma a escala comercial. Por lo tanto, de acuerdo con un ejemplo, las etapas de los métodos originales descritos en este documento se realizan simultáneamente en un lote de células espermáticas separados para crioconservar rápidamente todo el lote de células espermáticas de una forma que los conserve sanos. Por ejemplo, utilizando el equipo de citometría de flujo multi-canal que se describe a continuación, es posible obtener aproximadamente 840×10^6 cromosomas separados que tengan el cromosoma X en el sistema de recogida del equipo en aproximadamente 20 minutos. Es una cantidad de células espermáticas suficiente para llenar varias docenas de pajitas. Es más, un lote puede incluir las células espermáticas combinados de dos o más citómetros de separación diferentes. Después de estar concentrados como se ha descrito anteriormente, las células espermáticas se puedan cargar en cualquier cantidad de pajitas y se pueden crioconservar como un lote. Por ejemplo, lleva aproximadamente 5 minutos agregar un diluyente (que incluye una fuente proteica y un crioprotector) a un lote de células espermáticas, y aproximadamente 15 minutos cargar las células espermáticas en las pajitas de inseminación artificial con un equipo de carga automático. Todas las pajitas del lote se enfrían simultáneamente en un congelador programable. Además, la capacidad de algunos congeladores programables permite la crioconservación simultánea de miles de pajitas de inseminación artificial. Por ejemplo, el congelador IceCube 1810CD mencionado anteriormente tiene la capacidad de crioconservar simultáneamente más de 2.500 pajitas de 0,5 ml o más de 3800 pajitas de 0,25 ml. Por lo tanto, para iniciar la etapa de refrigeración se podría esperar a obtener lotes múltiples. Alternativamente, se podrían obtener lotes múltiples prácticamente al mismo tiempo al operar en paralelo equipos múltiples de citometría de flujo multi-canal (véase a continuación) y enfriar simultáneamente lotes múltiples obtenidos de ahí juntos en un congelador programable. En un ejemplo, lleva un período de menos de 220 minutos enfriar las células espermáticas de la temperatura ambiente a un estado sobreenfriado y sumergirlos en nitrógeno líquido (-196°C). En otro ejemplo, el período de sobreenfriación es inferior a 190 minutos. En otro ejemplo, el período de sobreenfriación es inferior a 150 minutos.

Los especialistas en la técnica reconocerán que se pueden hacer modificaciones importantes a los métodos de ejemplo previos. Por ejemplo, las células espermáticas se pueden crioconservar en un recipiente diferente a una pajita de inseminación artificial. Asimismo, los etapas del método que incluyen el cambio o el mantenimiento de la temperatura se pueden llevar a cabo por cualquier medio apropiado, inclusive baños María, vapores de nitrógeno líquido y congeladores programables o no programables convencionales, por ejemplo. Además, se puede usar una amplia variedad de sustancias o combinaciones de sustancias como fuente proteica y/o crioprotector. Entre estas sustancias se encuentran las sustancias y las concentraciones de las sustancias indicadas anteriormente en la parte en que se tratan las soluciones tamponadas, los diluyentes, los crioprotectores, los fluidos envolventes y los fluidos de recogida. Es más, el orden de algunas etapas en el método se puede variar. Aunque la Fig. 95 indica que el crioprotector se añade después de ajustar la concentración del esperma separado, también contempla la posibilidad de agregar un crioprotector antes de ajustar la concentración. Por ejemplo, el crioprotector se puede suministrar en el fluido de recogida o en el fluido envolvente que se utiliza con un citómetro de flujo. Algunos de los beneficios también se pueden obtener enfriando parcialmente las células espermáticas y agregando después el crioprotector. Asimismo, el orden en el que se añade la fuente proteica puede variar en tanto ésta sea eficaz para proteger a las células espermáticas del choque frío cuando pasan por el intervalo de temperatura de aproximadamente 14 a 8°C.

Ejemplo I de crioconservación

El semen bovino se recogió, se transportó y se evaluó como se ha descrito anteriormente. Se colocaron dos tubos de ensayo que contenían 5 ml de solución tamponada TCA (pH 7,3) cada uno en uno de dos baños María durante al menos cinco minutos. Uno de los baños María estaba a una temperatura de 35°C y el otro a 41°C. A cada tubo se añadieron células espermáticas a 24°C de modo que la concentración final en cada tubo fue de 150×10^5 células espermáticas/ml. Los dos tubos se dividieron en dos alícuotas que se mantuvieron en los respectivos baños María. Después de que el esperma se equilibró con la solución tamponada TCA durante cinco minutos, se agregó solución Hoeschst 33342 80 µM a una de las alícuotas a 35°C y a una de las alícuotas a 41°C. Después de agregar solución Hoeschst 33342, las cuatro alícuotas se incubaron durante 20 minutos en sus respectivos baños María. Después de la incubación, los tubos de ensayo se sacaron de los baños María y se dejaron a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante cinco minutos. Luego los contenidos de cada tubo de ensayo se diluyeron con un diluyente TCA que contenía 20% de yema de huevo y 6% de glicerol (v/v) (pH 7,0) hasta obtener una concentración final de 20×10^5 células espermáticas/ml. Los contenidos de cada tubo de ensayo se usaron después para llenar una pajita de inseminación artificial de 0,5 ml. Se colocó cada una de las cuatro pajitas en un congelador programable (un congelador 1810CD IceCube de Minitube de América, WI). En el congelador programable se programó la siguiente secuencia de refrigeración: (1) 22°C a 4°C a -0,2°C/min; (2) se mantuvo a 4°C durante 30 min; (3) 4°C a -15°C a -3,0°C/min; y (4) -15°C a -80°C a -10,0°C/min. Después de alcanzar -80°C, las pajitas se sumergieron en nitrógeno líquido (-196°C) durante 45 minutos. Luego las pajitas se sumergieron en un baño de agua a 37°C durante 50 segundos para descongelarlas. La motilidad del esperma se examinó bajo un microscopio de contraste de fase tanto antes como después de la crioconservación. Los resultados se muestran en la Fig. 104. La motilidad posterior a la descongelación estuvo en general en el orden del 60%. Esto representa una disminución en la motilidad de solamente 5-11% aproximadamente, en comparación con la motilidad anterior a la crioconservación. El análisis de varianza no reveló ningún efecto significativo ni de la solución Hoeschst 33342 ni de la incubación a 41°C en la motilidad de esperma posterior a la descongelación.

Funcionamiento del sistema

El funcionamiento general 813 del sistema de citometría de flujo 9 se describirá ahora con referencia a la Fig. 82 y en el contexto específico de células espermáticas (por ejemplo, esperma bovino), pero se comprenderá que la descripción es solamente un ejemplo y que el sistema se puede usar para procesar otros tipos de partículas.

La primera serie de etapas que llevan al circuito cerrado de repetición de seis segundos implica la calibración del sistema. Después de inicializar 769, se lleva a cabo una verificación del sistema 771 para confirmar, entre otras cosas, que el procesador 131 o los procesadores están en funcionamiento. Si se detecta un error después de la falla de tres controles del sistema 775, se solicita la interacción del usuario 773. Si la verificación del sistema es positiva, el microprocesador dirige el sistema para enjuagar 777 el sistema de boquilla con un líquido apropiado y luego un material de control de calidad 779, como cuentas o núcleos bovinos, se hacen pasar a través del sistema para inicializar los parámetros de detección (ver 739 en la Fig. 72) y confirmar que el sistema está operando dentro de un control de calidad aceptable. Esto implica la evaluación del material de control para ensayar la sensibilidad y la precisión del sistema para confirmar que el sistema puede discriminar adecuadamente una muestra. Si el control de calidad no se confirma después de tres intentos 775, se solicita la intervención del usuario 773.

Si el material de control de calidad indica un nivel aceptable de control de calidad, una muestra 781 es aspirada y se verifica la calidad 783 de una porción o alícuota de la muestra que se debe separar. La calidad de la muestra se puede determinar mediante el cálculo de un factor de calidad (factor-Q) de la muestra. Por ejemplo, se puede detectar el tipo de células en una primera alícuota de la muestra. Durante esta detección, los parámetros de detección inicializados (741) se vuelven a controlar y se generan los parámetros de discriminación iniciales (745). Si el tipo de células detectadas en la alícuota indica que la muestra cumple o supera una norma preestablecida (por ejemplo, que la muestra se puede discriminar para producir determinada pureza o motilidad y, en particular, que hay

suficientes células espermáticas X vivos disponible para el procesamiento), entonces el sistema continúa con la operación. Si la calidad de la muestra fracasa tres veces 775, se solicita la interacción del usuario.

La continuación de la operación implica la separación 785 del resto de la muestra empleando un circuito cerrado de repetición de seis segundos. Al comienzo del circuito, el microprocesador confirma que la separación de la muestra no está completa 789. Si la separación de la muestra está completa 789, el microprocesador procede a aspirar la muestra siguiente 781 si está disponible o a detener la operación de separación 793 si no hay otra muestra disponible. Si no se completó la separación de la muestra 789, el microprocesador verifica inicialmente la discriminación X/Y 795 de la muestra para confirmar que está dentro de un intervalo óptimo. En otras palabras, se lleva a cabo el análisis de desplazamiento como se observó anteriormente (761 en la Fig. 72). Si se debe realizar algún cambio, tales cambios se implementan y se controla nuevamente la discriminación 795. Si la discriminación todavía es inaceptable a esta altura, la separación se desactiva 793 y se solicita la interacción del usuario.

De lo contrario, el sistema continúa para determinar si el sistema de suministro de fluidos está abasteciendo de líquido y células a una velocidad dentro un intervalo óptimo 801. Esta determinación depende del tipo de estrategia de control que se emplee. Para la estrategia de control de alta recuperación, la tasa óptima se determinaría evaluando la pureza o mediante el valor de $x/x+~X$ de la población recogida. Si la pureza determinada supera un nivel requerido de pureza, la velocidad de alimentación de células se incrementa al aumentar una señal de control de la velocidad provista por la bomba de jeringa 803. Esto tiende a aumentar las células coincidentes y a disminuir la pureza porque se recogerían más células coincidentes, incluso células $~X$ con las células X. Si la pureza determinada es inferior a la pureza requerida, la velocidad de alimentación de las células se reduce disminuyendo la señal de control de la velocidad provista por la bomba de jeringa para reducir la frecuencia de las células coincidentes 803. Así, la velocidad de alimentación de las células es una función de la pureza determinada de la población recogida en comparación con un nivel de pureza deseado, es decir, una función de las células espermáticas $~X$ identificadas recogidas.

Para la estrategia de control de elevada pureza, la velocidad óptima se determinaría mediante el cálculo de las células X perdidas X, es decir, células X desechadas/células X desechadas + células X recogidas. Si la cantidad o el porcentaje de las células X perdidas es inferior a un nivel aceptable, la velocidad de alimentación de las células se incrementa al aumentar la señal de control de velocidad provista a la bomba de jeringa 803. Esto tendería a aumentar las células coincidentes y a aumentar la cantidad de células X desechadas debido a que más células, incluso células X, serían desechadas con las células Y. Si la cantidad o el porcentaje de células X perdidas es superior al nivel aceptable, la velocidad de alimentación de las células se reduce al disminuir la señal de control de velocidad provista a la bomba de jeringa 803 para disminuir las células coincidentes. Por lo tanto, la velocidad de alimentación de células es una función de las células X perdidas determinadas de la población desechada en comparación con la cantidad de células X en la población recogida, es decir, una función de la cantidad de células espermáticas X no recogidas.

Si esta velocidad modificada es aceptable 805, el sistema efectúa otra verificación del sistema 807. Si la verificación del sistema es aceptable 807, la separación continúa en el circuito de seis segundos. Si no, el sistema se reinicia 809. Si después de reiniciado el sistema no es aceptable o si la velocidad de alimentación modificada no es aceptable 811, se desactiva la separación 793 y se solicita la intervención del usuario 773.

Las corrientes de gotitas separadas se recogen mediante el sistema de recogida 2201. Las gotitas separadas en la población de células X pasan por la ventana de salida 2245 en el primer dispositivo interceptor 2247 para interceptarse por el segundo dispositivo interceptor 2249. Desde allí, las gotitas que contienen células X circulan hacia un recipiente de recogida 2207. Otras gotitas se interceptan por el primer dispositivo interceptor 2247 y dirigidas hacia el canal de desechos 2805. Se entiende que las gotitas interceptadas por el primer dispositivo interceptor también se pueden recuperar, como se indicó anteriormente. Cuando una cantidad adecuada de células espermáticas que tienen el cromosoma X se recogió en el recipiente de recogida, se puede interrumpir la separación para permitir la concentración del esperma en el recipiente de recogida 2207. Se puede colocar un nuevo recipiente de recogida debajo del primer dispositivo interceptor 2247 o el líquido recogido se puede verter en otro recipiente y volver a colocar el recipiente de recogida. Luego se puede reanudar la separación. Las células espermáticas en el líquido recogido se concentran, se cargan en las pajitas y se congelan como se ha descrito anteriormente.

Control de la temperatura durante el funcionamiento

Se puede utilizar el control de la temperatura a lo largo del proceso para mejorar los resultados del mismo. Como ya se discutió antes, se puede controlar la temperatura del esperma durante varias etapas del proceso (p. ej., durante la tinción y la crioconservación).

Por ejemplo, la Fig. 105 es un diagrama de flujo de trabajo de un ejemplo de un método de control de la temperatura. La temperatura de las muestras de semen en el momento en que se recogen se determinará en función de la temperatura corporal del animal del que se toman. Por ejemplo, en el etapa 2601 se recogen muestras de semen bovino a aproximadamente 37°C. En el etapa 2603 se usa un recipiente aislante para transportar las muestras de semen al laboratorio desde el sitio de recogida. El recipiente aislante demora la refrigeración del

esperma.

Durante la evaluación de la muestra en el etapa 2605, la temperatura se mantiene por debajo de la temperatura de recogida, pero por encima de la temperatura de transición vítrea por debajo de la cual la membrana de las células espermáticas sufre daño. Por ejemplo, la temperatura se puede mantener entre aproximadamente 18 y 37°C. En otro ejemplo, la temperatura se puede mantener entre aproximadamente 24 y 37°C durante la evaluación de la muestra. En un ejemplo en particular, las células espermáticas se colocan en un ambiente que tiene una temperatura entre aproximadamente 22 y 25°C durante la evaluación de la muestra. Dependiendo de la temperatura del esperma en el momento en que llega al laboratorio, el efecto de colocarlo en un ambiente que tiene una temperatura en el intervalo entre 22 y 25°C puede ser: continuar enfriando lentamente el esperma, mantener la temperatura del esperma o aumentar ligeramente la temperatura del mismo. En un ejemplo, en el etapa 2607 la temperatura puede aumentarse (p. ej. a 40°C o más) para la tinción, como se discutió en la sección de tinción. En otro ejemplo, la temperatura de las células espermáticas durante la etapa de tinción puede estar en el intervalo entre 20 y 40°C, como se ha analizado anteriormente.

En el etapa 2609, la mezcla de semen teñida se mantiene en un baño de agua hasta el momento en que la mezcla se introduce en un citómetro de flujo. La temperatura del baño de agua puede ser semejante a la utilizada en la etapa de tinción. En un ejemplo la temperatura del baño de agua se encuentra en el intervalo entre 40 y 47°C. En otro ejemplo la temperatura del baño de agua se encuentra en el intervalo entre 20 y 37°C. Aún En otro ejemplo la temperatura del baño de agua se encuentra en el intervalo entre 20 y 25°C. Después de mantener las células espermáticas teñidos en el baño de agua entre un minuto y dos horas, se los separa por citometría de flujo como se ha analizado anteriormente en el etapa 2611. En el etapa 2613 se concentran las células espermáticas recogidos. La concentración se puede llevar a cabo en un ambiente que tenga una temperatura que no modificará mucho la temperatura de las células espermáticas. Por ejemplo, en un ejemplo, la concentración se puede llevar a cabo en un ambiente que tenga una temperatura en el intervalo entre aproximadamente 20 y 25°C. En el etapa 2615 al esperma concentrado se le agregan un diluyente, una fuente proteica y un crioprotector. Luego, en el etapa 2617 las células espermáticas se cargan en las pajitas de inseminación artificial. En un ejemplo, la etapa de carga se realiza en un ambiente que tiene una temperatura que no cambiará mucho la temperatura de las células espermáticas. Finalmente, en el etapa 2619 la temperatura del esperma se controla durante la crioconservación como se ha analizado anteriormente.

Las células espermáticas pueden teñirse a temperaturas aún menores. Por ejemplo, puede ser deseable separar las células espermáticas en un citómetro de flujo a una temperatura relativamente baja (p. ej. aproximadamente entre 0° C y 8° C). Esto puede requerir la modificación del control total de temperatura. Antes que nada, cuando se enfrían las células espermáticas antes de su introducción en un citómetro de flujo, en general no se deben usar yema de huevo ni otras fuentes proteicas que protegen a las células espermáticas del choque frío a temperaturas inferiores a la temperatura de transición vítrea, puesto que este tipo de sustancias proteicas tienden a estropear u obstruir la fluidica del citómetro de flujo. De este modo, es deseable enfriar las células espermáticas antes de llevar a cabo la etapa de tinción a fin de aprovechar los protectores naturales contra el choque frío del semen puro, como por ejemplo el líquido seminal. Cualquier intento de teñir las células espermáticas antes de enfriarlos requerirá el agregado de soluciones tamponadas para proteger al esperma, que diluirán al semen puro y reducirán la protección natural contra el choque frío.

Por consiguiente, para clasificar las células espermáticas a una temperatura entre aproximadamente 0°C y 8°C incluye la colocación de dichos células espermáticas en un ambiente con una temperatura inferior a 8°C para enfriarlos hasta una temperatura entre aproximadamente 0°C y 8°C antes de la tinción. Se puede utilizar cualquier método para enfriar a las células espermáticas, pero es deseable utilizar un método que los proteja contra sus rápidas fluctuaciones de temperatura durante el proceso de refrigeración. Por ejemplo, en un ejemplo, un recipiente que contiene las células espermáticas se coloca en un baño de agua a temperatura ambiente, el que a su vez se coloca en un ambiente con una temperatura por debajo de aproximadamente 8° C. En otro ejemplo, se controla la temperatura de las células espermáticas y se añade hielo al baño de agua para enfriar aún más dichas células. La etapa de tinción se puede llevar a cabo como se describió antes excepto en que la mezcla de tinción se somete a una temperatura entre aproximadamente 0°C y 8°C. Debido a la menor temperatura, el período de incubación requerido para teñir las células es considerablemente mayor. Una vez que las células espermáticas se han enfriado hasta 8° C o por debajo, es preferible evitar calentarlos. Por tanto, puede ser posible manejar el citómetro de flujo en un ambiente con una temperatura en el intervalo entre 0° C y 8° C. De manera similar, también puede ser posible recoger las células espermáticas separadas en un recipiente de recogida que está rodeado por un entorno con una temperatura entre aproximadamente 0°C y 8°C. Además, pueden añadirse diluyentes, crioprotectores, tampones, fuentes proteicas, antibióticos, antioxidantes u otros aditivos a una temperatura entre aproximadamente 0°C y 8°C. Con respecto al agregado del crioprotector, puede ser aconsejable agregar un poco más del que se añadiría después de separar a las células espermáticas, a una temperatura en el intervalo entre 0°C y 8°C. De este modo, en un ejemplo en particular, se añade un crioprotector que contiene 7 % de glicerol (v/v) a las células espermáticas después de que se han separado, a una temperatura entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 8°C.

Generalmente, se produce una sobrefr Refrigeración de las células espermáticas en el intervalo de temperatura entre 0° C y 8° C como se describe antes en la sección de crioconservación. Sin embargo, las células espermáticas

deberán mantenerse a una temperatura entre aproximadamente 0° C y 8° C por un período después del agregado del crioprotector antes del sobrefrigeración, para dar tiempo a que dichas células espermáticas se equilibren con el crioprotector. Así, de acuerdo con un ejemplo, se deja que las células espermáticas se equilibren con el crioprotector durante un período de aproximadamente 30 minutos a 3 horas. En otro ejemplo, se deja que las células espermáticas se equilibren con el crioprotector durante un período de 1 a 2 horas. En otro ejemplo en particular, las células espermáticas se dejan equilibrar con el crioprotector durante un período de aproximadamente 90 minutos.

Se pueden usar los métodos y equipos convencionales de control de temperatura (p. ej., baños de agua, estufas de incubación, refrigeradores y congeladores) para calentar o enfriar la muestra a fin de que alcance o mantenga las temperaturas especificadas en los ejemplos anteriores. Se entiende que colocar una muestra en un ambiente con una temperatura diferente a la de la muestra, hará que la temperatura de la muestra cambie con el tiempo. Puede incluso haber variaciones de temperatura dentro de la muestra. Como se ha mencionado, es deseable cambiar la temperatura de la muestra gradualmente para ayudar a mantener la salud del espermatozoide. El cambio gradual de temperatura también sirve para reducir la variación de la temperatura dentro de la muestra. Como bien saben los especialistas en la técnica, la velocidad de cambio de la temperatura de la muestra estará influida por muchos factores, incluidos el volumen de la muestra, el tamaño y la forma del recipiente que la contiene y la magnitud de la diferencia de temperatura entre la muestra y el ambiente. Sin embargo, los especialistas en la técnica podrán fácilmente elegir un método y un equipo adecuados para alcanzar el control de la temperatura deseado después de considerar todos los factores relevantes.

El tiempo durante el cual las células espermáticas permanecen a cualquier temperatura también puede afectar a la salud del espermatozoide. Por tanto, en el procesamiento la temperatura puede controlarse a lo largo de todo el proceso y se completa de forma deseable dentro de un cronograma analizado a continuación.

Cronograma para el funcionamiento

En general, puede ser deseable completar el proceso de clasificación del espermatozoide en el menor tiempo posible para reducir el daño al mismo. El método de tinción mejorado descrito puede reducir el tiempo necesario para la tinción a aproximadamente 10 minutos. Asimismo, el nuevo citómetro descrito anteriormente se puede usar para separar células espermáticas en menos tiempo que el requerido con un citómetro convencional. Por ejemplo, un citómetro de flujo que use la tecnología analizada anteriormente puede recoger entre 2.000 y 10.000 células espermáticas con las características de ADN deseadas por segundo. Además, el proceso de crioconservación se puede usar para reducir el tiempo necesario para completar la crioconservación de las células espermáticas procesadas en comparación con los métodos tradicionales de crioconservación. Por consiguiente, un ejemplo implica el procesamiento del espermatozoide de conformidad con un método general para aprovechar una o más innovaciones que ahorran tiempo, para reducir el tiempo requerido para completar todo el proceso. Por ejemplo, se recoge un lote de células espermáticas (p. ej. una eyaculación) de un mamífero macho (p. ej. un toro), se efectúa un control de calidad, se tiñe, se clasifica de acuerdo con las características específicas de ADN, se carga en uno o más recipientes (p. ej. pajitas) y se crioconserva en un período de aproximadamente 12 horas desde el momento de su recogida, que es inferior a aproximadamente 8 horas, inferior a aproximadamente 6 horas, inferior a aproximadamente 3 horas, inferior a aproximadamente 2 horas o inferior a aproximadamente 1 hora.

APARATO DE CLASIFICACIÓN MULTI-CANAL Y MÉTODO

Para separar más espermatozoides en menos tiempo, es posible usar más de una unidad de citometría en paralelo para separar la misma muestra de espermatozoides. Una manera de hacer esto es sencillamente dividir las células espermáticas teñidas en alícuotas múltiples y procesar cada alícuota en un citómetro diferente. Sin embargo, según se tratará a continuación, se pueden obtener ciertas ventajas al diseñar un equipo que consta de varias unidades de citometría en una única unidad de citometría multi-canal integrada.

Sistema multi-canal que comparte una plataforma integrada

Las Fig. 106-116 muestran un ejemplo que comprende un sistema de citometría multi-canal, designado en general 1001, en el que múltiples unidades de citometría de flujo monocanal, designadas 1003, están agrupadas formando un sistema integrado para dar el producto separado. En este ejemplo en particular se ilustran cuatro de tales unidades, pero el número puede variar. Las unidades pueden integrarse de diversas maneras, por ejemplo compartiendo una plataforma integrada que comprende uno o más de los siguientes elementos (1) un suministro común de partículas 1005; (2) una fuente común de radiación electromagnética 1007; (3) una carcasa común 1009; (4) una entrada común para la operación de control de las unidades 1011; (5) una salida común 1019 que permite la evaluación de la operación de una unidad en relación con otra unidad; (6) un sistema de suministro de fluidos común 1021; (7) un sistema común de control de temperatura 1023; (7) una fuente común de energía 1025; (8) un sistema común de recuperación de desechos 1027; (9) un sistema común de placa deflectora 1029; y (9) un sistema común de limpieza 1031. En un ejemplo, el sistema incluye todos estos elementos, pero se entenderá que un sistema multi-canal de esta invención puede incluir cualquier combinación de elementos. El uso de elementos comunes es beneficioso porque le permite al sistema hacerse funcionar de manera más eficaz y rentable, logra resultados más uniformes entre los canales al reducir el número de variables, facilita cualquier localización de problemas que pueda

ser necesaria y es económico. El enfoque multi-canal también hace al sistema de clasificación más susceptible de ampliar o reducir a escala.

Cada una de las unidades de citometría 1003 tiene componentes similares a ciertos componentes del equipo de citometría de flujo 9 del ejemplo previo y, por conveniencia, las correspondientes partes se designan con los mismos números de referencia con el agregado de un número primo (''). En general, cada unidad comprende un sistema de boquilla 101', un soporte para montar el sistema de boquilla 331', un transductor 105', y un instrumento óptico de epi-iluminación 417' para centrar el haz de luz 25' en la corriente de fluido 21' que sale por el orificio de la boquilla 103', todo como se describió previamente. Cada unidad consta además de un fotodetector 117' que se puede operar como en el primer ejemplo para detectar las emisiones de fluorescencia 31' de las partículas en la corriente 21' y convertir las emisiones 31' en señales eléctricas 701' que se procesan para clasificar las partículas por una característica específica de ADN. Cada unidad 1003 está también equipada para separar las gotitas 33' en diferentes grupos o poblaciones 123', 125' según la clasificación de las partículas contenidas en las gotitas 35'. Las poblaciones de gotitas separadas por las unidades se recogen por el sistema de recogida 2201.

A. Carcasa común y disposición en módulos

Las unidades de citometría de flujo están montadas en una disposición modular en una carcasa común 1009. En el ejemplo mostrado en las Fig. 106 y 109-113, la cubierta tiene una base 1069 y dos paredes laterales 1071 que se extienden hacia arriba desde la base. Las paredes laterales tienen un par de salientes 1073 para sostener un panel de la cubierta inferior 1075 del frontal de la carcasa 1077 y un par de salientes superiores 1081. Un panel de la cubierta inferior 1075 en el frontal de la carcasa 1077 está montado entre las salientes inferiores 1073. Las salientes superiores 1081 sostienen un panel de la cubierta superior 1083 en la parte posterior de la cubierta 1085. Las partes delantera y trasera de la cubierta 1077, 1085 están prácticamente abiertas para permitir el acceso al equipo que está en su interior. Se comprenderá que la carcasa 1009 puede tener otras configuraciones. Aún más, se entenderá que las diversas unidades pueden estar instaladas en carcasas separadas.

Las unidades de citometría de flujo 1003 están montadas una al lado de la otra como módulos en un marco apropiado 1087 en la carcasa 1009. Específicamente, los soportes de la boquilla 331' para colocar las boquillas 101' están unidos libremente a una barra en forma de cruz 1089 (Fig. 106) fijados a las paredes laterales 1071 de la cubierta y las bases 429' de los instrumentos de epi-iluminación 417' están sujetas libremente a una placa de montaje en ángulo 1093 que se extiende entre las paredes laterales 1071 de la cubierta hacia la parte trasera de ésta 1085 (Fig. 109), esta disposición es tal que una unidad particular puede instalarse o retirarse como un módulo. Esta disposición en módulos facilita la instalación, el retiro para mantenimiento y/o reemplazo, y permite agregar fácilmente cualquier cantidad de unidades de citometría de flujo 1003 según sea necesario para aumentar la capacidad de producción del sistema.

B. Sistemas comunes de suministro y reparto de fluidos

El sistema de suministro de fluidos 1021 de este ejemplo está equipado para proporcionar líquidos apropiados a cada una de las unidades de citometría 1003. Como se ilustra esquemáticamente en la Fig. 108, generalmente el sistema consta de una bomba 1105 para transferir el fluido portador 17' a presión desde un suministro común del fluido portador 1107, un sistema de gas a presión 1115 para transferir el líquido a presión desde un suministro común 1117 del fluido envolvente 19' y un sistema de distribución 1121 para recibir los líquidos desde los respectivos suministros y dispensar los líquidos a presión a las diversas unidades de citometría 1003, según sea necesario. En el ejemplo específico de la Fig. 116, el suministro del fluido portador comprende un recipiente 1123 que contiene un volumen adecuado de dicho líquido (por ejemplo, 5 ml). El recipiente se sostiene mediante un soporte 1125, que puede ser un bloque 1133 que tiene una cavidad 1135 clasificado por tamaño para recibir el recipiente 1123. El bloque también tiene una segunda cavidad 1137 para sostener un recipiente 1139 que contiene una solución tamponada adecuada para el acondicionamiento del sistema durante el uso, como se describirá más adelante.

Es deseable (pero no imprescindible) que la bomba 1105 para dispensar el fluido portador del recipiente sea una bomba de jeringa 1141 como la que se describió antes. El émbolo de la bomba se puede desplazar por el recorrido de admisión para aspirar el volumen elegido de fluido portador 17' del recipiente 1139 y por el recorrido de descarga para dispensar el fluido portador a través de una línea de suministro 1147 al colector 1177 y de allí a las diversas boquillas 101' del sistema. La bomba de jeringa también se puede operar para aspirar líquido del recipiente 1139 que contiene solución tamponada y bombear ésta a través del sistema de una manera que se describirá. Una válvula de tres vías 1149 controla el flujo de fluido portador y de solución tamponada desde y hacia la bomba 1141. La bomba es accionada por un motor de velocidad variable controlada por el procesador 131'. A modo de ejemplo, la bomba puede accionarse por un motor paso a paso que funciona a velocidades selectivamente variables para bombear el fluido portador al sistema distribuidor 1121 a las velocidades necesarias para obtener la producción deseada de las unidades 1003. Se pueden usar bombas de jeringa múltiples u otros tipos de dispositivos dispensadores de líquido en vez de una única bomba de jeringa.

El suministro 1117 del fluido envolvente comprende un recipiente 1155, es decir, un tanque conectado al colector

1177 por medio de una línea de suministro 1157. El sistema de gas a presión 1115 se puede operar para presurizar el tanque y comprende una fuente de gas presurizado 1161 (por ejemplo, aire o nitrógeno) que comunica con el tanque mediante una línea de gas 1163 que tiene incorporado un regulador 1165 para controlar la presión provista al tanque y una válvula de dos vías 1167 que, en una primera posición, establece comunicación entre el tanque y la fuente de gas, y en una segunda posición, se puede operar para ventilar el tanque. El regulador de la presión del gas 1165 es un regulador convencional ajustable para controlar la presión provista desde la fuente de aire. El sistema de gas a presión 1115 también incluye una línea de gas 1169 para presurizar un abastecimiento 1173 de la solución de limpieza (por ejemplo, agua desionizada de un tanque) que puede usarse para enjuagar el sistema de circuitos de líquido de una manera que se describirá más adelante. El flujo a través de la línea de gas es controlado por una válvula de dos vías 1167 que se puede operar de la misma manera que la válvula 1167.

El colector 1177 comprende un bloque laminado 1179 (Fig. 112) de un material en el que se forman conductos 1181 para delimitar un circuito de flujo de fluido 1185 como el que se muestra en forma de diagrama en la Fig. 116. (Los conductos se pueden formar labrando ranuras en las caras de las láminas antes de ensamblarlas para formar el bloque.) El circuito de líquido incluye entradas 1189, 1191 conectadas a la bomba de jeringa 1141 y al suministro 1117 del fluido envolvente y conjuntos de salidas 1193, para proporcionar dichos líquidos a las unidades de citometría de flujo 1003, cada uno de tales conjuntos incluye una salida de fluido portador y una salida de fluido envolvente. El flujo a través de los diversos conductos de flujo 1181 es controlado por válvulas V1-V6 que, en un ejemplo, son válvulas accionadas por solenoide en alojamientos unidos al bloque del distribuidor 1179. Es preferible que el bloque sea de material prácticamente transparente (por ejemplo, plástico acrílico) para facilitar el monitoreo del sistema 1121 y la localización de problemas. El colector 1177 está sujeto a una pieza del marco 1203 y se extiende entre las paredes laterales 1071 de la carcasa 1009 adyacente al fondo de la cubierta debajo de los sistemas de boquilla 101'. Las entradas y las salidas 1193, del colector 1177 pueden tener conexiones 1205 roscadas en el bloque, como la tuerca sin pestaña y accesorios de casquillos de Upchurch Scientific, una división de Scivex. Se entenderá que el diseño y la construcción del circuito de líquido 1185 en general y del colector 1177 en particular, pueden variar.

Haciendo referencia a la Fig. 116, el circuito de distribución de líquido 1185 para el fluido portador 17' incluye un depósito de muestra 1207 para mantener un suministro limitado del fluido portador (por ejemplo, 1,0 ml). Si el fluido portador contiene células espermáticas, por ejemplo, disponer de un depósito de este tipo cerca de las boquillas 101' es beneficioso para la viabilidad y la motilidad de las células espermáticas, ya que el almacenamiento de tales células, aun durante períodos cortos, en espacios pequeños puede perjudicar la motilidad. El flujo del fluido portador desde el depósito de muestra 1207 a las boquillas 101' es controlado por una serie de válvulas de dos vías V1A-V1D, una para cada boquilla. Cada una de las válvulas V1A-V1D tiene una primera posición que establece la comunicación de líquido entre la aguja 1217 del depósito de muestra y la aguja 157' de la boquilla respectiva para la dispensación del fluido portador 17' a la aguja sometida a la presión generada por la bomba de jeringa 1141 y una segunda posición que establece comunicación de líquido entre la aguja 1217 y un sistema de desechos, generalmente designado 1221, que es común a todas las unidades de citometría de flujo 1003. En el ejemplo mostrado, el sistema de desechos 1221 comprende un tanque de desechos 1223 para mantener material de desecho, un mecanismo 1225 como una bomba de vacío para generar un vacío en el tanque de desechos, y líneas de desecho 1227 que conectan las válvulas V1A-V1D y el tanque de desechos. Se proporciona una válvula V3 en la corriente arriba de la línea de desechos del tanque de desechos para la apertura y cierre de la línea de desechos, según sea necesario. Se proporciona un filtro hidrófobo apropiado 1233 en la línea que conecta el tanque de desechos 1223 y la bomba de vacío 1225.

El circuito distribuidor de líquido 1185 para el fluido envolvente 19' incluye una pluralidad de válvulas V2A-V2D. Cada válvula tiene una primera posición que establece comunicación de líquido con el suministro 1117 del fluido envolvente del tanque para dispensar el fluido envolvente 19' a un cuerpo de flujo respectivo 133' a través de una línea de suministro de fluido envolvente 1241, y una segunda posición que establece comunicación de líquido entre el cuerpo de flujo y el tanque de desechos mediante una línea de desechos 1247. La presión a la cual el fluido envolvente se dispensa a los cuerpos de flujo 133' dependerá de la presión del tanque de fluido envolvente (controlado por el regulador 1165) que puede variar de 1 a 100 psi (0,0703 a 7,03 kg/cm²), mejor si es de 10 a 50 psi (0,703 a 3,515 kg/cm²), mejor aún si es de 15 a 40 psi (1,0545 a 2,812 kg/cm²) y todavía mejor aún si es de aproximadamente 20 a 30 psi (1,406 a 2,109 kg/cm²).

Aunque el uso de un suministro común para todas las unidades tiene diversas ventajas, se considera que al menos algunas de las unidades de citometría de flujo podrían abastecerse con material de muestra de fuentes independientes.

C. Fuente de energía común y controles de entrada y salida

Las unidades de citometría de flujo 1003 también comparten una fuente común de energía 1025, sistemas comunes de suministro de energía, una entrada común (GUI) 715' para el control del funcionamiento de los canales por el microprocesador 131' y una salida común provista al microprocesador que permite evaluar el funcionamiento de un canal en relación con el de otro canal. Por ejemplo, la salida común incluye proporcionar las señales digitalizadas de cada sistema de epi-iluminación al microprocesador para indicar la intensidad de fluorescencia medida por cada

canal, para indicar la velocidad a la cual cada canal está separando las partículas, para indicar las variaciones de tinción (que puede indicarse por la diferencia de intensidad de los pulsos de fluorescencia de las células X e Y) y para indicar los límites de la decisión 763 usados por cada canal para discriminar entre partículas. Como otro ejemplo, la salida común incluye proporcionar las señales de salida de los detectores de rotura 389' al microprocesador para indicar el sitio de división de la gotita 107' de cada canal.

D. Control común de temperatura

Opcionalmente, se proporciona un sistema de control de temperatura, en general designado 1257, para regular la temperatura de los contenidos de los recipientes 1123 en el bloque de soporte 1133 y la temperatura del colector 1177. Dicho control de temperatura reduce la variabilidad del sistema, proporcionando así mediciones más uniformes entre los canales y, para ciertos tipos de células (por ejemplo, células espermáticas), ayudando a mantener su viabilidad.

El sistema de control de temperatura 1257 puede comprender un circuito de flujo de fluido 1259 que consta de conductos para líquido 1263 en el bloque de soporte 1133 y conductos para líquido 1269 en el bloque del distribuidor 1179 y una unidad de control 1265 para hacer circular un líquido térmico (por ejemplo, agua) por el circuito a una temperatura seleccionada. Es deseable que la temperatura sea tal que mantenga el líquido, especialmente el fluido portador, a una temperatura óptima para maximizar la viabilidad de las células y, si se trata de células espermáticas, la motilidad de los mismos. Se coloca una válvula de cierre V6 en el circuito para controlar el flujo por el circuito. La unidad de control de la temperatura se puede usar para mantener las células espermáticas a la temperatura deseada antes de separarlos como se trató anteriormente.

Todas las válvulas del sistema de suministro de fluidos 1021 se accionan por medios convencionales, como solenoides, bajo el control de un operador o de una programación adecuada. Es deseable que las diversas líneas de flujo de líquido que conectan los componentes del sistema fuera del bloque del distribuidor 1179 sean de tubería plástica prácticamente transparente para poder observar cualquier bloqueo. Por ejemplo, la tubería puede ser de 0,0625 pulg. (0,158cm) de diámetro externo de polímero de FEP (etilenpropileno fluorado). Es deseable que las líneas de flujo del sistema de control de temperatura 1257 sean algo más grandes (por ejemplo, 0,125 pulg. (0,317 cm) de diámetro externo) para proporcionar mayor capacidad de flujo.

E. Haz de luz y sistema divisor del haz comunes

Como se ha indicado previamente, el sistema multi-canal comparte una fuente común de radiación electromagnética o haz de luz 1007. A modo de ejemplo (y no de manera excluyente), la fuente puede ser un haz de luz láser de un láser con emisión multilínea en el ultravioleta principalmente a longitudes de onda de 351,1 nm y 363,8 nm. Alternativamente, puede ser deseable usar un láser de pulsos (por ejemplo, un láser de modo cerrado), en particular para sincronizar el muestreo digital con un láser de pulsos (como se trató en la sección láser de pulso) para aumentar la potencia efectiva suministrada a cada unidad de citometría, aumentando de ese modo el número de unidades de citometría que pueden operarse con un único láser.

La potencia necesaria para generar el haz de luz láser variará según los requisitos de cada unidad de citometría de flujo y del número de unidades. Por ejemplo, si hay N unidades y cada unidad necesita un haz de luz que tenga una potencia efectiva de W vatios, entonces será necesario generar un haz de luz que tenga una potencia de $(W \times N) + L$, donde L equivale a la pérdida de potencia del sistema entre los elementos ópticos de éste. El uso de un único láser para abastecer a todas las unidades de citometría de flujo es económico en comparación con un sistema que usa múltiples láser. También es eficaz y proporciona mediciones más uniformes de un canal al siguiente, porque no hay ninguna variabilidad debida a diferentes características del haz de luz (por ejemplo, intensidad del haz de luz, polaridad de la luz, divergencia del haz) o ruido eléctrico resultante del uso de múltiples láser.

De acuerdo con un ejemplo, se usa un sistema de división y orientación del haz para dividir un único haz de luz láser en tres o más haces independientes. Como se muestra en la Fig. 117, por ejemplo, un divisor del haz 50/50 1270 (es decir, un divisor del haz que se puede operar para dividir un único haz en dos haces independientes que tengan aproximadamente la misma intensidad) se puede usar para dividir un único haz 25' en dos haces 1270A, 1270B. Al usar un segundo divisor del haz 50/50 1271 para dividir uno de los dos haces 1270B en dos haces adicionales 1271A, 1271B, se puede generar un total de tres haces 1270A, 1271A, 1271B de un único haz 25'. Cada haz puede dirigirse al sistema óptico de un citómetro de flujo, por ejemplo un sistema óptico de epi-iluminación 415' como se muestra en la Fig. 117. También se podrían usar más divisores del haz 50/50 para dividir el único haz de luz láser en cualquier cantidad de haces separados independientes. Según se muestra esquemáticamente en la Fig. 118, se puede agregar, por ejemplo, un tercer divisor del haz 1272 al sistema de división del haz de 3 vías (Fig. 117) de modo que los tres divisores del haz 50/50 1270, 1271, 1272 se puedan usar para dividir un único haz 25' en cuatro haces independientes 1271 A, 1271B, 1272A, 1272B. De esto se puede apreciar fácilmente que el haz único puede dividirse en cualquier cantidad de haces independientes. Se pueden utilizar otras disposiciones divisoras del haz para dividir el haz entrante de la fuente en múltiples haces de luz para las diversas unidades.

Se muestra un sistema de división del haz en las Fig. 106 y 109. Se proporciona un sistema de orientación del haz

1273 para guiar al haz común 1007 a los instrumentos ópticos 417' de las diversas unidades de citometría de flujo 1003. En las Fig. 106 y 111, el sistema de orientación 1273 incluye un conjunto de espejo inferior 1279 montado en una pared lateral 1071 de la carcasa 1009, un conjunto de espejo superior 1281 montado en la pared lateral 1071 encima del conjunto del espejo inferior y una serie de filtros reflectores 1283, uno asociado a cada instrumento de óptica 417'. El conjunto del espejo inferior se puede operar para reflejar un haz 1007 de una fuente apropiada ascendentemente hacia el conjunto del espejo superior, y el conjunto del espejo superior se puede operar para reflejar el haz a través de una abertura en la pared lateral 1071 hacia los filtros reflectores 431' de los diversos instrumentos 417'.

El conjunto del espejo inferior incluye una base 1285 sujeta a la pared lateral 1071 de la carcasa 1009, una plataforma 1289 que se desplaza verticalmente sobre la base mediante un mecanismo adecuado 1291, como un micrómetro, una placa basculante 1293 en la plataforma (por ejemplo, una montura óptica cinemática modelo P100-P de Newport) y un espejo 1295 sobre la placa, la posición del espejo se puede regular moviendo la plataforma y la placa del espejo a las posiciones apropiadas. El conjunto del espejo superior es similar al conjunto del espejo inferior, comprende una base 1297, una plataforma que se puede desplazar verticalmente 1299, una placa basculante en la plataforma 1301, y un espejo 1303 sobre la placa. Un par de placas de puntería 1309 se fijan a la pared lateral de la carcasa 1009 entre los conjuntos del espejo superior e inferior. Las placas de puntería 1309 alinearon verticalmente los orificios 1311 allí para facilitar el ajuste de los espejos superior e inferior de modo que un haz entrante 1007 sea reflejado con exactitud hacia los filtros reflectores 431' de los instrumentos 417', cuyos filtros están todos alineados con el haz entrante.

Cada uno de los tres primeros filtros reflectores 1315, 1317, 1319 funciona como un divisor del haz, es decir, funciona para reflejar un porcentaje específico del haz y para pasar el porcentaje restante. Por ejemplo, en el caso de los cuatro instrumentos de epi-iluminación, cada uno de los filtros reflectores 431' de los tres primeros instrumentos refleja un porcentaje de la luz láser 1007, para que cada una de las tres primeras unidades de la serie reciba 25% de la radiación electromagnética del haz original 1007. Por ejemplo, los filtros reflectores de la primera, segunda y tercera unidades pueden reflejar un 25 %, un 33 % y un 50 % de la luz incidente, respectivamente. Es deseable que el último filtro reflector 1321 de la serie refleje toda la luz restante (aproximadamente 25% del haz original) al último instrumento de la serie. Como resultado, cada uno de los cuatro instrumentos debe recibir la misma intensidad de radiación (luz) para interrogar las células en las corrientes respectivas.

Dependiendo de los dispositivos de división del haz usados en el sistema anterior 1273, puede ser aconsejable que el haz láser tenga una determinada polarización. La relación transmitancia a reflectancia de los filtros dieléctricos puede variar dependiendo de la polarización de la luz. Aún más, cuando se trata con luz linealmente polarizada, los filtros dieléctricos (que se fabrican para usar a un ángulo específico de incidencia) pueden ser demasiado sensibles a las variaciones en el ángulo de incidencia. La luz polarizada circular o elípticamente soluciona este problema hasta cierto punto porque el vector de polarización de la luz está en una diversidad de orientaciones diferentes con respecto a los ejes ópticos de un filtro dieléctrico cuando la luz interactúa con el filtro. Por lo tanto, la luz polarizada elípticamente o circularmente simula la luz polarizada aleatoriamente, que es más tolerante a las variaciones en el ángulo de incidencia en un filtro dieléctrico. En consecuencia, si el láser descrito anteriormente genera un haz de luz que tiene una polarización vertical, por ejemplo, puede ser ventajoso convertir la luz en luz polarizada circularmente antes de dividirla. Como comprenderán los especialistas en la técnica, esto puede llevarse a cabo pasando el haz través de una placa de retardo de 1/4-onda (filtro) de material polarizante que tiene sus ejes ópticos rotados 45 grados en relación con el plano de polarización del láser. El haz transmitido por la lámina de onda tendrá polarización aproximadamente circular y puede dividirse más fácilmente para proporcionar haces múltiples a los sistemas ópticos de las unidades de citometría de flujo respectivas.

Es más, al hacer rotar la placa de retardo de ondas para alterar el ángulo entre la polarización del láser y los ejes ópticos del material usado para hacer la lámina de onda, se puede introducir excentricidad en la polarización aproximadamente circular del haz (es decir, la polarización se puede hacer más elíptica). Cambiando la excentricidad de la polarización elíptica del haz se puede cambiar la relación transmitancia a reflectancia de los filtros dieléctricos al hacer que el vector de polarización para un mayor porcentaje de luz tenga un ángulo particular con respecto al eje óptico del filtro dieléctrico. En consecuencia, si el equilibrio de luz entre las múltiples unidades de citometría está fuera del intervalo deseado, se puede hacer rotar la lámina de onda para aumentar o reducir la excentricidad de la luz elípticamente polarizada, alterando de ese modo las relaciones transmitancia a reflectancia de los diversos filtros hasta que se logre un mejor equilibrio. De igual manera, si la lámina de onda está transmitiendo luz polarizada elípticamente, se puede influir la relación transmitancia a reflectancia de uno de los filtros al rotar ese filtro.

Independientemente del método usado para dividir el único haz en múltiples haces independientes. Se puede lograr el equilibrio de la energía entregada a cada unidad de citometría bloqueando selectivamente un porcentaje de la luz para reducir a todas las unidades de citometría al mismo nivel de energía. Por ejemplo, se puede seleccionar el filtro de densidad neutral 447' de cada sistema de epi-iluminación 415' para bloquear más o menos luz de modo de equilibrar la energía de iluminación entregada por el divisor del haz y el sistema de orientación a cada unidad de citometría. Si un canal de una unidad multi-canal recibe significativamente más iluminación del sistema de división y orientación del haz, se puede usar un filtro de densidad neutral 467' que transmita menos luz en el sistema de epi-

iluminación 415' de ese canal para llevar la energía de iluminación de ese canal más en línea con los otros canales. Es deseable, aunque no esencial, que las variaciones en la energía de iluminación canal a canal sean inferiores al 10 % aproximadamente. Es aún más deseable que las variaciones canal a canal sean inferiores a aproximadamente el 5%.

También se apreciará que el barrido con láser de pulsos, como se ha descrito anteriormente, puede ser aconsejable para la citometría de flujo multi-canal. Por ejemplo, se puede reemplazar el láser con emisión multilínea en el UV por un láser de pulsos de modo cerrado que opere a aproximadamente 85 MHz para permitir a más canales de citometría de flujo accionarse por un único láser. Por ejemplo, la máxima energía proporcionada en cada pulso de un láser de modo cerrado que emite pulsos con un ancho (duración) de cerca de 12 pico segundos a una frecuencia de aproximadamente 85 MHz es aproximadamente 800 veces la energía promedio de salida del láser. Por lo tanto, un láser de modo cerrado (por ejemplo, un Vanguard 350 de Spectra-Physics) puede proporcionar suficiente energía de iluminación para operar unas pocas docenas de unidades de citometría (por ejemplo, 32 unidades de citometría) mientras opere sólo a aproximadamente 350 milivatios.

También se considera el uso de los sistemas de fibra óptica para suministrar luz a las unidades. Pueden usarse fibras para dirigir la luz desde el láser hasta las respectivas unidades, eliminando así la necesidad de contar con el sistema de orientación descrito anteriormente.

F. Placas deflectoras comunes

En las Fig. 106 y 108-116, el sistema de clasificación 119' de cada unidad de citometría de flujo 1003 es prácticamente idéntico al sistema de clasificación 119 excepto en que las unidades comparten preferiblemente dos placas deflectoras comunes 1331 que se extienden a través del ancho de la carcasa 1009 en el frente de la misma. Utilizar un conjunto común de placas deflectoras tiene sus ventajas, entre ellas una carga uniforme de un canal al siguiente, el uso de una fuente común de energía, un área de placa mayor que proporciona un campo eléctrico más estable y una deflexión de gotitas más uniforme y un ángulo de deflexión más constante para la recogida de las muestras separadas. Las placas deflectoras 1331 están montadas en un marco 1333 sujeto a la carcasa 1009. Alternativamente, se podrían proporcionar placas independientes a cada unidad.

G. Sistema común de recogida

En las Fig. 107 y 116, un sistema común de recogida 2801 incluye dos dispositivos interceptores para cada unidad de citometría como se ha descrito anteriormente conectados con el sistema de recogida 2201 para la unidad única. Sin embargo, se proporciona un marco común 2803 para sostener a los ocho dispositivos interceptores. Incluso, uno de los dos dispositivos interceptores para cada unidad de citometría dirige el líquido a un canal común de desechos 2805 en lugar de a un recipiente de recogida. El canal de desechos facilita el desecho de las gotitas separadas que contienen partículas de escaso valor (por ejemplo, células espermáticas que tienen el cromosoma Y para la cría de vacas lecheras). Si es deseable retener todas las gotitas separadas, se puede quitar el canal de desechos y colocar recipientes de recogida debajo de cada dispositivo interceptor. Los cuatro recipientes de recogida del ejemplo mostrado en la Fig. 107 y 116 descansan en las aperturas de la superficie de una bandeja de recogida 2807. Se puede proporcionar un baño de agua común (no se muestra) bajo la superficie de la bandeja de recogida para controlar la temperatura del contenido de los recipientes de recogida.

H. Control multi-canal

Las diversas unidades de citometría de flujo se controlan por el microprocesador 131', (u otro sistema adecuado de procesamiento) que es deseable que tenga una entrada y una salida comunes como se trató anteriormente.

De forma deseable, los parámetros operativos de cada unidad de citometría de flujo 1003 se pueden fijar independientemente de las otras unidades para que tales parámetros puedan variarse como entre unidades. Estos parámetros pueden incluir, por ejemplo, la frecuencia de formación de gotitas, las estrategias de control y separación utilizadas por una unidad particular, los criterios usados por cada unidad para clasificar y separar las partículas en el líquido suministrado a la unidad y otros parámetros. Por ejemplo, en ciertas situaciones puede ser deseable proporcionar a una o más unidades con fluido portador 17' a una primera caudal y a otras unidades a una segunda (diferente) caudal. De manera semejante, puede ser aconsejable usar una estrategia de clasificación de control (por ejemplo, una estrategia "de alta eficacia") para una o más unidades mientras que se usa una diferente estrategia (por ejemplo, una estrategia de "pérdida baja") para otras unidades. Mediante la variación controlada de estos parámetros entre las unidades, basada en los antecedentes y los datos recopilados en tiempo real, se puede administrar la producción de las unidades y los resultados del sistema optimizado. La capacidad de funcionar independientemente también permite operar a unidades seleccionadas, en el caso de que no se necesiten o no estén disponibles todas las unidades.

I. Funcionamiento del sistema multi-canal

El funcionamiento del sistema multi-canal puede ser similar al descrito anteriormente, excepto en que las múltiples

unidades de citometría de flujo se adaptan para realizar operaciones de citometría de flujo en paralelo (es decir, durante el mismo período o períodos superpuestos) para una mayor producción.

Antes del comienzo de un proceso, el sistema de suministro de fluidos 1021 se enjuaga, si fuera necesario, con solución de limpieza del tanque 1173 moviendo la válvula V5 a su posición de limpieza. El sistema se acondiciona a continuación con solución tamponada usando la bomba de jeringa 1141. Durante este procedimiento, las válvulas V1A-V1D y V2A-V2D se mueven para establecer comunicación con el receptáculo de desechos 1223 que está al vacío. Como resultado, la solución de limpieza y/o la solución tamponada fluyen a través del sistema hacia los desechos. Este proceso limpia el sistema 1021, ceba la bomba de jeringa 1141 y extrae las burbujas de aire del sistema.

Con la válvula de tres vías 1149 adecuadamente colocada, la bomba de jeringa 1141 se desplaza por un recorrido de admisión para aspirar una cantidad de fluido portador 17' que contiene partículas, por ejemplo, células espermáticas, después de lo cual la válvula 1149 se mueve para establecer comunicación con el colector 1177 y la bomba de jeringa se desplaza por un recorrido de descarga para bombear un volumen de fluido portador al depósito 1207 para llenarlo. La temperatura del fluido portador 17' es controlada por el sistema de control de temperatura 1257 para mantener las células del fluido portador a la temperatura deseada. Con las válvulas V1A-V1D en la posición que establece comunicación con el depósito de muestra 1207, un nuevo accionamiento de la bomba de jeringa 1141 fuerza al fluido portador, a través de las líneas, a las agujas de los respectivos conjuntos de boquillas para que fluya a través de las boquillas 101', como se ha descrito anteriormente. Al mismo tiempo, y con las válvulas V2A-V2D en la posición que establece comunicación con el tanque del fluido envolvente 1155, el fluido envolvente 19' es forzado a través de las líneas de suministro a los cuerpos de flujo respectivos y a través de las boquillas, también como se ha descrito anteriormente. Este proceso continúa durante un período adecuado y suficiente para bombear un volumen apropiado de líquido a través del sistema 1001. La duración de un proceso particular variará según la cantidad de fluido portador del recipiente de suministro, la velocidad a la cual el fluido portador se bombea a través del sistema, y el número de canales del sistema. Por ejemplo, un proceso puede continuar sólo durante un período limitado (por ejemplo, 15 minutos durante los cuales se dispensa un ml de fluido portador a cada boquilla) o puede continuar indefinidamente, con el suministro de fluido renovándose según sea necesario.

Cuando una aguja 157' se obstruye, la válvula apropiada V1 se mueve para establecer comunicación con el receptáculo de desechos 1223. El fluido envolvente 19' que se introduce en el cuerpo de flujo 133' fluirá luego forzado por el vacío 1225 nuevamente a través de la aguja 157' a los desechos, enjuagando y limpiando de este modo a la aguja. Si hay necesidad de cerrar el flujo a una boquilla en particular, sencillamente se cambian las válvulas V1 y V2 a sus posiciones de desecho.

Aunque el sistema descrito en este documento en lo que se refiere a las configuraciones tanto monocanal como multi-canal se ha descrito con respecto a la separación de partículas, como la separación de células X e Y, se contempla que dichas partículas incluyan cualquier partícula que tenga características diferentes que pueden arbitrariamente indicarse como característica A y característica B. Aún más, se comprenderá que En algunos ejemplos, la función de separación se puede eliminar por completo, para que el equipo de citometría de flujo (monocanal o multi-canal) opere sólo clasificando las partículas y no separándolas.

Si bien el sistema multi-canal se ha descrito anteriormente en el contexto de la operación de las unidades de citometría de flujo en paralelo, se comprenderá que las unidades también podrían operarse en serie. Por ejemplo, se contempla que las partículas de una corriente podrían separarse por una unidad en múltiples poblaciones, y que una o más de las poblaciones separadas podría luego pasar a través de una o más de las otras unidades en serie para llevar a cabo operaciones adicionales de separación con el fin de separar partículas diferentes, usando la misma estrategia de clasificación o una diferente.

J. Sistema multi-canal vertical

Las Fig. 119 y 120 muestran un sistema de citometría de flujo multi-canal. Este sistema que se designa en general 4001 consta de cuatro unidades de citometría de flujo 4009 agrupadas. El sistema de boquilla 101', el sistema óptico de epi-iluminación 450', las placas deflectoras 629', la estación de muestra 4051, el mecanismo de prevención de contaminación 4031 y otros componentes de cada unidad 4009 están montados en una tabla de montaje vertical compartida 4011. Con referencia a la Fig. 120, un único láser 4013 y un sistema de división y orientación del haz 4015, que es sustancialmente similar al sistema de división y orientación del haz 1273 descrito anteriormente, proporciona iluminación para cada sistema de epi-iluminación 450'. El láser 4013 pasa a través de un orificio 4019 (Fig. 119) en una cubierta común 4021 que contiene el sistema de división y orientación del haz 4115. El sistema de división y orientación del haz 4115 y el sistema de epi-iluminación 450' están en un lado de la tabla 4011. El conjunto de la lente de enfoque 491' de cada sistema de epi-iluminación 450' se extiende a través de la tabla 4011 hasta el otro lado (similantemente a la configuración mostrada en el sistema monocanal mostrado (Fig. 26 y 27), en el que están montados los restantes componentes de las unidades 4009.

Las unidades 4009 están todas orientadas de modo que sus sistemas de boquilla 101' dirijan las corrientes de líquido 21' corriente abajo. Cada unidad 4009 también tiene un sistema de recogida 4031, que incluye un recipiente

de recogida 4033 para recoger gotitas 33 que contienen una población deseada de partículas y un recipiente de desechos 4035 para recoger otras gotitas 33. Se puede usar un baño de agua (no se muestra) u otro control de temperatura para controlar la temperatura recipiente de recogida 4033.

Las múltiples unidades de citometría de flujo 4009 también pueden compartir una fuente de energía común (no mostrada), una entrada común para controlar el funcionamiento de las unidades (no mostrada), y una salida común (no mostrada) que permita la evaluación comparativa del funcionamiento de las unidades 4009 unas con relación de las otras. Como se demuestra por la comparación de dos ejemplos multi-canal ejemplares 1001, 4001, la naturaleza de la plataforma integrada y el compartir elementos entre múltiples unidades de citometría de flujo en un sistema multi-canal puede variarse extensivamente.

Repercusión del procesamiento multi-canal en el proceso general

El proceso general descrito anteriormente se puede llevar a cabo con separación multi-canal de esperma para disminuir el tiempo requerido para separar las células espermáticas. Con pocas excepciones, el método no cambia. Un cambio menor es que las células espermáticas separadas se recogerán en múltiples recipientes de recogida. Si se desea, el contenido de los múltiples recipientes de recogida se puede combinar para su concentración. Alternativamente, el contenido de cada recipiente de recogida se puede concentrar por separado. Se apreciará que el tiempo necesario para separar un lote de células espermáticas (por ejemplo, una eyaculación) desde la recogida hasta que se completa el etapa de crioconservación, se puede reducir significativamente usando múltiples unidades de citometría para procesar el lote. Por ejemplo, si cuatro unidades de citometría operan en paralelo para procesar el lote de células espermáticas, el tiempo necesario para completar la separación se reduce a aproximadamente un cuarto del tiempo necesario para separar el lote usando una única unidad de citometría. Por lo tanto, al sustituir la etapa de separación de las células espermáticas con una única unidad de citometría por la etapa de separación de las células espermáticas con cuatro unidades de citometría que operan en paralelo, se puede reducir el ejemplo de cronograma para la realización completa del método desde la recogida hasta la finalización de la etapa de congelación. El tiempo se puede reducir aún más, aumentando la cantidad de citómetros que funcionan en paralelo para separar las células espermáticas de la muestra, sujeto a las limitaciones prácticas que implica el funcionamiento de un sistema en paralelo que tiene más de cuatro de dichas unidades. De este modo, la etapa de clasificación en el proceso general descrito anteriormente se realiza separando las células espermáticas según una característica específica de ADN en un equipo de citometría de flujo multi-canal. Por ejemplo el método de procesamiento de células espermáticas puede comprender la etapa de separación de las células espermáticas según una característica específica de ADN en un equipo de citometría de flujo multi-canal en el que cada canal recoge aproximadamente de 2000 a 10000 células espermáticas con la característica deseada de ADN por segundo.

Ejemplo I de clasificación multi-canal

Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro usando una vagina artificial y la muestra se transportó a una instalación de tinción cercana en un envase de temperatura controlada a 37°C. Al llegar, se analizó la concentración del semen, la motilidad visual, la motilidad y la motilidad progresiva con el analizador Hamilton-Thorn Motility Analyzer (IVOS), según los procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. *Theriogenology*, 49(4): 871-9 (Mar 1998)).

Se prepararon seis tubos de 1 ml de suspensión de esperma de 150×10^6 células espermáticas/ml suspendiendo una alícuota de semen a 41°C en solución tamponada TCA N° 2 que contenía piruvato 10 mM llevando el pH general a 7,35. Luego se añadieron a las muestras de esperma distintas cantidades de solución acuosa de Hoechst 33342 10 mM para obtener las siguientes concentraciones finales de solución de colorante Hoechst 33342: 200, 300, 400, 500, 600 y 700 μM . Cada una de las seis muestras se incubó a 41°C durante 30 minutos aproximadamente. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo y el % de CV de la población de células X se estimó por un algoritmo de computadora iterativo para las muestras de Hoechst 33342, 200, 300 y 400 μM . Se determinó que los % de CV para las soluciones de Hoechst 33342 300 y 200 μM se encontraban en el intervalo aceptable próximo a 1,3 % de CV. En consecuencia, se determinó que se usaría una concentración de solución de Hoechst 33342 250 μM para teñir un lote de células espermáticas para el procesamiento posterior.

Se prepararon dos tubos que contenían 2 ml cada uno de suspensión de esperma de 150×10^6 células espermáticas/ml suspendiendo una alícuota de semen a 41°C en solución tamponada TCA N° 2 que contenía piruvato 10 mM (llevando nuevamente el pH general a 7,35). Luego se agregó solución acuosa de Hoechst 33342 10 mM a cada una de las dos suspensiones de esperma para obtener una concentración final de solución de colorante Hoechst 33342 250 μM . Las suspensiones de esperma se mantuvieron en un baño de agua a 41°C durante 30 min. Después de 30 minutos, las suspensiones de esperma se retiraron del baño de agua a 41°C y se añadieron 4 μl de solución de FD&C N° 40 de 25 mg/ml a una de las suspensiones. La otra muestra se almacenó a temperatura ambiente para proporcionar muestras de comparación para los ensayos de evaluación.

La suspensión de esperma teñida y enfriada se cargó sobre el puerto de muestra de un canal de un citómetro de

flujo de clasificación de gotitas de cuatro canales. Como fluido envolvente se usó PBS de Dulbecco. El citómetro se equipó con una boquilla orientadora como se ha descrito anteriormente y que tiene un orificio de 60 micrómetros. Se instaló una placa deflectora semicircular perpendicular al eje longitudinal de la boquilla como se ha descrito anteriormente. El transductor se operó a 54 kHz y el sitio de división de la gotita se controló manualmente. Un sistema óptico de epi-iluminación como se ha descrito anteriormente se usó para dirigir aproximadamente 25% del haz de una onda láser continua para que cruzara la corriente de fluido en un ángulo perpendicular. Las lentes de enfoque y recogida tenían una apertura numérica de 0,65. El haz se enfocó a una mancha luminosa que tenía un ancho inferior a 3 μm para el barrido de ranura de las células espermáticas. Se utilizó el procesamiento de señales digitales para extraer la diferencia en la pendiente crítica y el área del pulso para cada pulso de onda detectado. Los parámetros de clasificación para la clasificación de las células X, las células Y y las células indeterminadas en CSD bidimensional y el espacio característico del área del pulso se ingresaron manualmente en el sistema de procesamiento para clasificar a las células espermáticas según el contenido cromosómico.

El esperma se separó según el contenido de cromosomas X e Y usando una estrategia de clasificación de aceptación de coincidencia para la recogida de células X, asignando un 50/50 de probabilidad de que cada célula espermática sin clasificar fuera una célula X o una célula Y. Se ajustó manualmente la tasa de líquido de la muestra para mantener la pureza de la población de células X recogidas (según se indica por el GUI) en un 85 % o mejor y para mantener la tasa de recogida de células X por encima de una tasa mínima. Después de que se recogieron en un tubo aproximadamente quince millones de células espermáticas X que habían estado en remojo en el fluido envolvente durante al menos una hora y luego se habían recubierto con 0,5 ml de solución tamponada TCA N° 2 con 10 % de yema de huevo de pH 7,0, el tubo se retiró y se reemplazó con un tubo adicional que se había preparado de manera similar.

Inmediatamente después de quitar un tubo de recogida del citómetro de flujo, se preparó una muestra de comparación de suspensión de esperma teñido pero no separado. Las muestras separadas y de comparación se centrifugaron durante 7 min a 750 g en un tubo de 15 ml. Se extrajeron los sobrenadantes usando una pipeta de transferencia para obtener una concentración de aproximadamente 40 millones de células espermáticas/ml. Se agregó solución tamponada TCA N° 2 de pH 7,0 a las suspensiones de esperma para obtener una concentración final de aproximadamente 20 millones de células espermáticas/ml. Este proceso continuó hasta que el citómetro de flujo produjo cuatro tubos de recogida (A2-A5). Las muestras separadas y las muestras de comparación "no separadas" se evaluaron con el analizador IVOS. La muestra separada A3 y su muestra de comparación no separada se evaluaron con respecto al % de acrosomas intactos mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial. Todas las muestras separadas se contaron con hemocitómetro para determinar la tasa de producción de esperma separado por hora. El % de esperma que tenía cromosomas X se confirmó al volverlo a analizar con citómetro de flujo. Se proporcionan los resultados de la evaluación con el analizador IVOS de las muestras separadas y las muestras de comparación "no separadas" en las Fig. 121 (motilidad) y 122 (motilidad progresiva). El número total de esperma separado en cada tubo de recogida se muestra en la Fig. 123. La tasa de esperma separado por hora en cada período de recogida se muestra en la Fig. 124. El porcentaje de esperma que contiene cromosomas X para cada muestra separada se indica en la Fig. 125. Los resultados de la evaluación de la integridad de los acrosomas fueron 72% de acrosomas intactos para la muestra separada y 78% para la muestra de comparación no separada.

Los resultados demuestran la capacidad técnica para producir más de 5000 células X separadas por segundo con una pureza superior al 85 % por canal del sistema de citometría de flujo multi-canal durante períodos prolongados. Los resultados también muestran la capacidad técnica para producir más de 7000 células X por segundo con pureza superior al 85% durante períodos prolongados en condiciones ideales. Aún más, los resultados indican que las muestras de células espermáticas separadas obtenidas mediante dicha separación por citometría de flujo a gran velocidad sólo sufrirán leves disminuciones en la motilidad, lo que indica que el esperma separado tendrá buena fecundidad.

Ejemplo II de clasificación multi-canal

Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial. La eyaculación se dividió en dos alícuotas. La primera alícuota de 250 μl de semen se suspendió en 5 ml de Triladyl® a 37°C. La segunda alícuota, compuesta por el resto de la eyaculación, se suspendió en dos partes de tampón de carbonato (pH 6,1-6,2) a 37°C. Ambas alícuotas se transportaron a 37°C en un recipiente de temperatura controlada a una instalación de procesamiento. En la instalación de procesamiento, la primera alícuota se hizo flotar en -120 ml de agua a 37°C en un vaso de precipitados de 200 ml y se colocó en una habitación fría para enfriarla lentamente hasta 5° C. A la segunda alícuota se le analizó la concentración, la motilidad y la motilidad progresiva con el analizador Hamilton-Thorn Motility Analyzer (IVOS), según los procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. *Theriogenology*, 49(4): 871-9 (Marzo de 1998)).

Se prepararon tres tubos de 1 ml de una suspensión de esperma de 150×10^6 células espermáticas/ml transfiriendo subalícuotas que contenían 150 millones de células espermáticas de la segunda alícuota a tubos vacíos, centrifugando a 500 g durante 5 min, retirando los sobrenadantes y resuspendiendo los sedimentos de esperma en 1 ml de tampón TCA N° 2 que contenía piruvato 10 mM, de pH 7,35 a 28°C. Se agregó solución de Hoechst 33342

10 mM en agua a cada uno de los tres tubos en diferentes cantidades para obtener concentraciones finales de colorante de 100, 150 y 200 μM de Hoechst 33342. Cada uno de los tres tubos se mantuvo a 28°C durante aproximadamente 60 minutos. El espermatozoide de cada uno de los tres tubos se analizó mediante citometría de flujo y se determinó el CV de la intensidad de fluorescencia total de la población X para las condiciones de tinción con 100, 150 y 200 μM de Hoechst 33342 utilizando un algoritmo computacional interactivo. Los CV para 150 y 200 μM de Hoechst 33342 estuvieron ambos dentro del intervalo aceptable próximo al 1,3 %. De este modo, se determinó usar las condiciones de tinción que incluían la concentración 150 μM de Hoechst 33342 para la clasificación.

Se preparó un tubo que contenía 5 ml de una suspensión de espermatozoide de 150×10^6 células espermáticas/ml transfiriendo subalícuotas que contenían 750 millones de células espermáticas de la segunda alícuota, centrifugando a 500 g durante 5 min, retirando los sobrenadantes y resuspendiendo los sedimentos de espermatozoide en tampón TCA N° 2 que contenía piruvato 10 mM, de pH 7,35 a 28°C. Se agregó solución de 33342 diez mM en agua al tubo en una cantidad que dio una concentración final de colorante de 150 μM de Hoechst 33342. El tubo se mantuvo en baño de agua a 28°C durante 60 min. Después de 60 minutos, el tubo se retiró del baño de agua a 28°C y se añadieron 10 μl de FD&C N° 40 de 25 mg/ml.

La suspensión de espermatozoide ahora teñida y enfriado se cargó en el puerto de muestra de un canal de un citómetro de flujo multi-canal de clasificación de gotitas. La suspensión de espermatozoide se mantuvo a 28°C. Utilizando prácticamente las mismas regulaciones del instrumento que se establecieron en el *Ejemplo I de Separación multi-canal*, se separaron las células espermáticas con cromosomas X e Y mediante un sistema de citómetro de flujo utilizando una estrategia de interrupción de coincidentes durante un período necesario para colocar una población enriquecida en células X de aproximadamente dieciocho millones de células espermáticas en un tubo de recogida que se había preparado sumergiéndolo en fluido envolvente durante al menos una hora y luego agregando 0,5 ml de medio de crioconservación Triladyl® que contenía piruvato 10 mM de pH 6,6. Las células espermáticas se introdujeron en el sistema de citometría de flujo a una velocidad entre aproximadamente 25000 y 30000 células/segundo. Se recogió una población enriquecida de células X a una velocidad que varió entre 4500 células por segundo y 6000 células por segundo. Una vez que se separaron aproximadamente dieciocho millones de células espermáticas en un tubo de recogida, el tubo se retiró y se reemplazó por otro tubo que se había preparado de manera similar. Inmediatamente después de retirar el tubo de recogida del citómetro de flujo, la suspensión de espermatozoide separado se centrifugó a 700 g durante 7 minutos. Se extrajo el sobrenadante usando una pipeta de transferencia para obtener una concentración de aproximadamente 100 millones de células espermáticas/ml. Se agregó solución de crioconservación Triladyl® que contenía piruvato 10 mM (pH 6,6) a las suspensiones de espermatozoide para obtener una concentración final de aproximadamente 50 millones de células espermáticas/ml. Este proceso continuó hasta que el citómetro de flujo produjo tres tubos de recogida (D1-D3). Aproximadamente 52 millones de células espermáticas fueron separados en 259 min obteniéndose una velocidad de recogida general de aproximadamente 12 millones de células espermáticas X por hora de separación. Los tubos de muestra separada y resuspendida se hicieron flotar en ~120 ml de agua a 28°C en un vaso de precipitados de 200 ml y se colocaron en una habitación fría a 5°C para enfriarlos lentamente.

Después que las muestras separadas alcanzaron los 5°C, los tres tubos de espermatozoide separado se combinaron en un tubo. La mezcla de muestras se analizó con el analizador IVOS para determinar el % de motilidad, el % de motilidad progresiva y la concentración. Se agregó más medio de crioconservación Triladyl® que contenía piruvato 10 mM pH 6,6 a la muestra para obtener una concentración final de aproximadamente 50 millones de células espermáticas/ml. El % de células espermáticas que contenían cromosomas X en la mezcla de muestras fue del 87 % como se determinó mediante repetición del análisis con citómetro de flujo. Un resumen de la evaluación del analizador IVOS en comparación con la muestra no separada de la misma eyaculación se ilustra en la Fig. 126.

La muestra clasificada combinada y la primera alícuota se cargaron en una pajita estándar de 0,25 cc en una habitación fría a 5°C. Las pajitas cargadas se transfirieron a un congelador programable y se congelaron según el programa siguiente: 5 min a 5°C, enfriar desde 5°C hasta -12°C a 4°C/min, enfriar desde -12°C hasta -100°C a 40°C/min, enfriar desde -100°C hasta -140°C a 20°C/min, mantener a -140°C. Después que las pajitas alcanzaron los -140°C, se retiraron rápidamente del congelador y se sumergieron en nitrógeno líquido.

Las pajitas descongeladas se analizaron con el analizador IVOS para el % de motilidad y el % de motilidad progresiva después de la incubación a 37°C durante 30 y 120 minutos. Los resultados de un conjunto de dos pajitas separadas y no separadas se resumen en la Fig. 127 y la Fig. 128.

Ejemplo III de clasificación multi-canal

Se recogió semen de un toro maduro sexualmente utilizando una vagina artificial y la eyaculación se dividió en dos alícuotas. Una primera alícuota de 250 μl de semen se suspendió en 5 ml de Triladyl® a 37°C. Una segunda alícuota, compuesta por el resto de la eyaculación, se suspendió en dos partes de tampón de carbonato (dos partes 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua) (pH 6,1-6,2) a 37°C. Ambas alícuotas se transportaron a 37°C en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de procesamiento. En la instalación de procesamiento, la primera alícuota se hizo flotar en ~120 ml de agua a 37°C en un vaso de precipitados de 200 ml y se colocó en una habitación fría para enfriarla lentamente hasta 5°C. A la

segunda alícuota se le analizó la concentración, la motilidad y la motilidad progresiva con el analizador Hamilton-Thorn Motility Analyzer (IVOS), según los procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. *Theriogenology*, 49(4); 871-9 (Mar 1998)).

Se prepararon dos tubos con la suspensión de esperma que contenía 150×10^6 células espermáticas/ml transfiriendo a cada uno de los dos tubos vacíos una fracción que contenía 900 millones de células espermáticas de la segunda alícuota, centrifugando cada tubo a $500 \times g$ durante 5 minutos, retirando el sobrenadante de cada tubo y resuspendiendo cada uno de los sedimentos de esperma en 6 ml de tampón TCA N° 2 que contenía piruvato 10 mM de (pH 7,35) a 28°C . A cada uno de los tubos se agregó solución Hoechst 33342 10 mM para obtener concentraciones finales del colorante de $200 \mu\text{M}$ de Hoechst 33342 en un tubo y $400 \mu\text{M}$ de Hoechst 33342 en el otro tubo. Cada uno de los tubos se mantuvo a 28°C durante aproximadamente 120 minutos. El esperma de cada uno de los tubos se analizó mediante citometría de flujo y se determinó el CV de la intensidad de fluorescencia total de la población X para las condiciones de tinción con $200 \mu\text{M}$ y $400 \mu\text{M}$ de Hoechst 33342 utilizando un algoritmo computacional interactivo. Los CV para Hoeschst 33342 para $200 \mu\text{M}$ y $400 \mu\text{M}$ estuvieron ambos dentro del intervalo aceptable próximo al 1,3 %. La suspensión de esperma teñido con una concentración de 200 ptM de Hoechst 33342 se eligió para la separación. Se añadieron $10 \mu\text{l}$ de FD&C N° 40 de 25 mg/ml a este tubo de suspensión de esperma teñido inmediatamente antes de la separación.

La suspensión de esperma teñido se cargó en el puerto de muestra de un canal de un citómetro de flujo multi-canal de clasificación de gotitas. La suspensión de esperma se mantuvo a 28°C . Utilizando prácticamente las mismas regulaciones del instrumento que se establecieron en el *Ejemplo I de Separación multi-canal*, utilizando una estrategia de interrupción de coincidentes durante se separaron las células espermáticas con cromosomas X e Y mediante el sistema de citometría de flujo durante un período necesario para colocar una población de células enriquecida en cromosomas X de aproximadamente dieciocho millones de células espermáticas en un tubo de recogida que se había preparado sumergiéndolo en tampón envolvente durante al menos una hora y luego agregando 0,5 ml de medio de crioconservación Triladyl® de pH 6,6. Las células espermáticas se introdujeron en el sistema de citometría de flujo a una velocidad entre aproximadamente 25000 y 30000 células/segundo. Se recogió una población enriquecida de células con el cromosoma X a una velocidad que varió entre 4500 células por segundo y 6000 células por segundo. Una vez que se separaron aproximadamente dieciocho millones de células espermáticas en un tubo de recogida, el tubo se retiró y se reemplazó por otro tubo que se había preparado de manera similar. Inmediatamente después de retirar un tubo de recogida del citómetro de flujo, la suspensión de esperma separado se centrifugó durante 7 min a $700 \times g$. El sobrenadante se extrajo con una pipeta de transferencia para obtener una concentración de aproximadamente 100 millones de células espermáticas/ml. Se agregó medio de crioconservación Triladyl® (pH 6,6) a las suspensiones de esperma para obtener una concentración final de aproximadamente 50 millones de células espermáticas/ml. Este proceso continuó hasta que el citómetro de flujo produjo dos tubos de recogida (C1-C3). Aproximadamente 35 millones de células espermáticas fueron separados en 193 minutos obteniéndose una velocidad de recogida general de 11 millones de células espermáticas con el cromosoma X por hora de separación. Los tubos de muestra separada y resuspendida se hicieron flotar en ~ 120 ml de agua a 28°C en un vaso de precipitados de 200 ml y se colocaron en una habitación fría a 5°C para enfriarlos lentamente.

Después que las muestras separadas alcanzaron los 5°C , los tres tubos de esperma separado se combinaron en un tubo. La mezcla de muestras se analizó con el analizador IVOS para determinar el % de motilidad, el % de motilidad progresiva y la concentración. Se agregó más medio de crioconservación Triladyl® (pH 6,6) a la muestra para obtener una concentración final de aproximadamente 50 millones de células espermáticas/ml. El % de células espermáticas que contenían cromosomas X en la mezcla de muestras fue del 88% como se determinó mediante repetición del análisis con citómetro de flujo. Un resumen de la evaluación del analizador IVOS en comparación con la muestra no separada de la misma eyaculación se ilustra en la Fig. 129.

La muestra combinada clasificada y no clasificada (es decir, la primera alícuota antes mencionada) se cargaron en pajitas estándar de 0,25 cc en una habitación fría a 5°C . Las pajitas cargadas se transfirieron a un congelador programable y se congelaron según el programa siguiente: 5 min a 5°C , enfriar desde 5°C hasta -12°C a $4^\circ\text{C}/\text{min}$, enfriar desde -12°C hasta -100°C a $40^\circ\text{C}/\text{min}$, enfriar desde -100°C hasta -140°C a $20^\circ\text{C}/\text{min}$, mantener a -140°C . Después que las pajitas alcanzaron los -140°C , se retiraron rápidamente del congelador y se sumergieron en nitrógeno líquido.

Las pajitas descongeladas se analizaron con el analizador IVOS para el % de motilidad y el % de motilidad progresiva después de la incubación a 37°C durante 30 y 120 minutos. Los resultados de un conjunto de pajitas separadas y no separadas se resumen en las Fig. 130 y 131.

Ejemplo IV de clasificación multi-canal

Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y la eyaculación se dividió en dos alícuotas. La primera alícuota de $250 \mu\text{l}$ de semen se suspendió en 5 ml de Triladyl® a 37°C . La segunda alícuota, compuesta por el resto de la eyaculación, se suspendió en dos partes de tampón de carbonato a 37°C (dos

partes 0,097 moles/l de NaHCO_3 ; 0,173 moles/l de KHCO_3 ; 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$ en agua) (pH 6,1-6,2) y se mantuvo bajo CO_2 . Ambas alícuotas se transportaron a 37°C en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de procesamiento. En la instalación de procesamiento, la primera alícuota se hizo flotar en ~120 ml de agua a 37°C en un vaso de precipitados de 200 ml y se colocó en la habitación fría para enfriarla lentamente hasta 5°C. A la segunda alícuota se le analizó la concentración, la motilidad y la motilidad progresiva con el analizador Hamilton-Thorn Motility Analyzer (IVOS), según los procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. *Theriogenology*, 49(4): 871-9 (Marzo de 1998)).

Se preparó un tubo de 5 ml de suspensión de esperma de 150×10^6 células espermáticas/ml transfiriendo una fracción que contenía 750 millones de células espermáticas de la segunda alícuota (pH 6,1-6,2) a un tubo vacío y agregando tampón de carbonato a 28°C (pH 7,35) hasta un volumen final de 5 ml. A esta suspensión de esperma, se le agregó solución de Hoechst 33342 10 mM en agua para obtener una concentración final 150 µM de colorante Hoechst 33342. La suspensión se mantuvo a 41°C bajo CO_2 durante aproximadamente 40 minutos y luego se colocó a 28°C para su separación. Se añadieron diez µl de FD&C N° 40 de 25 mg/ml al tubo de la suspensión de esperma teñido justo antes de la separación.

La suspensión de esperma teñido se cargó en el puerto de muestra de un canal de un citómetro de flujo multi-canal de clasificación de gotitas. La suspensión de esperma se mantuvo a 28°C. Se separaron las células espermáticas con cromosomas X e Y mediante un sistema de citómetro de flujo utilizando una estrategia de interrupción de coincidentes durante un período necesario para colocar una población de células enriquecida en cromosomas X de aproximadamente dieciocho millones de células espermáticas en un tubo de recogida que se había preparado sumergiéndolo en tampón envoltorio durante al menos una hora y después agregándole 0,5 ml de medio de criopreservación Triladyl® (pH 6,6). Las células espermáticas se introdujeron en el sistema de citometría de flujo a una velocidad entre aproximadamente 25000 y 30000 células/segundo. Se recogió una población enriquecida de células con cromosomas X a una velocidad que varió entre 4500 células por segundo y 6000 células por segundo. Una vez que se separaron aproximadamente 18 millones de células espermáticas en un tubo de recogida, el tubo se retiró y se reemplazó por otro tubo que se había preparado de manera similar. Inmediatamente después de retirar el tubo de recogida del citómetro de flujo, la suspensión de esperma separado se centrifugó a 700 X g durante 7 minutos. Se extrajo el sobrenadante usando una pipeta de transferencia para obtener una concentración de aproximadamente 100 millones de células espermáticas/ml. Se agregó medio de criopreservación Triladyl® y piruvato (pH 6,6) a las suspensiones de esperma para obtener una concentración final de aproximadamente 50 millones de células espermáticas/ml. Este proceso continuó hasta que el citómetro de flujo produjo dos tubos de recogida (C2-C3). Los tubos de muestra separada y resuspendida se hicieron flotar en ~120 ml de agua a 28°C en un vaso de precipitados de 200 ml y se colocaron en una habitación fría a 5°C para enfriarlos lentamente.

Después que las muestras separadas alcanzaron los 5°C, los dos tubos de esperma separado se combinaron en un tubo. La mezcla de muestras se analizó con el analizador IVOS para determinar el % de motilidad, el % de motilidad progresiva y la concentración. Se agregó más medio de criopreservación Triladyl® y piruvato (pH 6,6) a la muestra para obtener una concentración final de aproximadamente 50 millones de células espermáticas por ml. Un resumen de la evaluación del analizador IVOS en comparación con la muestra no separada de la misma eyaculación se ilustra en la Fig. 132.

La muestra combinada clasificada y la muestra sin clasificar (es decir, la primera alícuota antes mencionada) se cargaron en pajitas estándar de 0,25 cc en la habitación fría a 5°C. Las pajitas cargadas se transfirieron a un congelador programable y se congelaron según el programa siguiente: 5 min a 5°C, enfriar desde 5°C hasta -12°C a 4°C/min, enfriar desde -12°C hasta -100°C a 40°C/min, enfriar desde -100°C hasta -140°C a 20°C/min, mantener a -140°C. Después que las pajitas alcanzaron los -140°C, se retiraron rápidamente del congelador y se sumergieron en nitrógeno líquido.

Las pajitas descongeladas se analizaron con el analizador IVOS para el % de motilidad y el % de motilidad progresiva inmediatamente después de descongelarlas y después de la incubación a 37°C durante 30 minutos. Los resultados de un conjunto de dos pajitas separadas y no separadas se resumen en las Fig. 133 y 134.

SISTEMA DE BOQUILLA DE TUBO CAPILAR

La Fig. 135 ilustra un sistema alternativo de boquilla, generalmente designado 1335, similar al que se describió anteriormente excepto en que un tubo capilar 1337 (de cuarzo o sílice fundido, por ejemplo) está conectado a la boquilla 137 para que el líquido que está saliendo del orificio de la boquilla 103 se dirija hacia el interior y a través del tubo. El sistema óptico 109 del citómetro de flujo está acoplado ópticamente al lado del tubo de manera apropiada, como mediante una cámara 1341 llena con un medio que transmite luz como aceite o gel que tienen un índice de refracción conocido. El uso de un tubo capilar, en comparación con la salida en chorro de la corriente de fluido a través del espacio abierto, tiene el beneficio de reducir la estratificación lenticular de la corriente 21 debido a la energía acústica provista por el transductor 105 y permitir que la lente de enfoque 1343 se coloque de inmediato adyacente a la corriente de fluido para aumentar la resolución de las señales de emisión.

Una vez que se haya interrogado y clasificado a las partículas, se las puede separar usando cualquier técnica

convencional conocida por los especialistas en la técnica, como por ejemplo mediante el uso de un dispositivo de desviación del líquido que se muestra en la Fig. 137 u otros dispositivos apropiados como los sistemas de foto deterioro o los sistemas de clasificación de gotitas.

5 **TÉCNICAS DE CLASIFICACIÓN DIFERENTES DE LA TÉCNICA DE CLASIFICACIÓN DE GOTITAS**

Clasificación por foto deterioro

10 Las mejoras en la citometría de flujo son aplicables no sólo a la clasificación de células en gotitas como se ha descrito anteriormente, sino también a otras técnicas de clasificación, como la clasificación por foto deterioro (ablación con láser). La clasificación por foto deterioro se trata en la patente de los Estados Unidos N° 4.395.397. La Fig. 136 ilustra esquemáticamente un ejemplo de un sistema de foto deterioro de citometría de flujo monocal, generalmente designado con su número de referencia.

15 Como se muestra en la Fig. 136, el sistema de clasificación por foto deterioro 1351 es similar al sistema de clasificación de gotitas de la Fig. 2 y las partes correspondientes se designan con los números de referencia correspondientes con el agregado de número primo doble (""). En general, el sistema comprende los mismos componentes que el sistema de la Fig. 2, excepto en que se eliminan los componentes de clasificación de gotitas (por ejemplo, el transductor 105, el dispositivo de carga 627, las placas deflectoras 629 y las fuentes de energía asociadas 635). En cambio estos componentes se remplazan por un láser 1353 o un dispositivo similar que responde a las instrucciones recibidas del microprocesador 131" para extirpar las partículas no deseadas de la corriente de fluido 21". Como resultado, la corriente recogida en un receptáculo de recogida 1355 contiene una población deseada de partículas. Por ejemplo, si las partículas a analizar son células espermáticas y el resultado buscado es recoger células espermáticas con una característica A (por ejemplo, un contenido del cromosoma deseado), entonces el microprocesador recibe señales del sistema de epi-iluminación 415" que identifica las células que no tienen la característico A y activa selectivamente el láser para extirpar dichas células o de otro modo las vuelve ineficaces.

30 Se pueden emplear diferentes estrategias de clasificación de control en un sistema de foto deterioro, incluso las estrategias de clasificación de "alta recuperación" y de "pureza elevada" analizadas anteriormente en el contexto de un clasificador de gotitas. En un sistema de foto deterioro, las partículas contenidas en la corriente de fluido están espaciadas a diversos intervalos a lo largo de la corriente y en general están una después de la otra en fila india. Las partículas tienen diferentes características, algunas tienen una característica A, por ejemplo y otras tienen una característica B. La secuencia de las partículas es aleatoria, así que vista como una procesión continua, las partículas se pueden dividir en diferentes series de partículas, una atrás de la otra, incluida una primera serie de partículas que consta sólo de una o más partículas que tienen la característica A, una segunda serie de partículas que consta sólo de una o más partículas que tienen la característica B y una tercera serie de partículas que consta de dos o más partículas muy juntas al menos una de las cuales tiene la característica A y al menos una de las cuales tiene la característica B. El último (tercer) grupo corresponde en general a las partículas muy juntas en una gotita "coincidente" tratada anteriormente, al menos a los efectos de la estrategia de clasificación. Por lo tanto, dos o más partículas del tercer grupo pueden estar muy juntas en el sentido de que la separación entre las partículas es insuficiente para permitir una discriminación o clasificación exacta de las partículas, o porque tal separación es insuficiente para permitir a una partícula de la serie extirparse por el láser sin dañar a la(s) otra(s) partícula(s) de la misma serie. De todas maneras, las partículas muy juntas en cada (o al menos en alguna) tercera serie de partículas se pueden extirpar o no extirpar, según la estrategia de clasificación empleada. Debe señalarse que múltiples partículas en una primera serie o múltiples partículas en una segunda serie podrían estar "muy juntas", pero puesto que las partículas en cualquiera de dichas series tienen la misma característica (A o B), se las trata como a una serie de partícula única, al menos a efectos de la estrategia de clasificación.

50 El sistema de foto deterioro puede ser un sistema monocal o un sistema multi-canal, como se ha descrito anteriormente.

Clasificación por conmutación de fluidos

55 Se considera que los principios de esta invención pueden también aplicarse a los sistemas de citometría de flujo que usan técnicas de conmutación de fluidos, como se describe, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos N° 6.432.246 (Adair), 4.756.427 (Gohde et al.), y 3.791.517 (Friedman). La Fig. 137 es una vista parcial de un sistema de ese tipo, generalmente designado 1357. Es prácticamente idéntico al sistema que se muestra en la Fig. 2 excepto en que el sistema de boquilla 101" incluye un tubo capilar 1369 (por ejemplo, véase la Fig. 135) y el sistema de clasificación comprende un dispositivo de conmutación de fluidos 1359 acoplado al tubo capilar 1369 más allá de la localización de examen 115'. La construcción y el funcionamiento del dispositivo de conmutación de fluidos pueden incorporar cualquier tecnología de conmutación de fluidos convencional como se describe en las patentes referenciadas anteriormente. En general, el dispositivo funciona separando las partículas deseadas de las partículas no deseadas en respuesta a las instrucciones recibidas del procesador, al desviar intermitentemente las porciones de la corriente de fluido que contienen las partículas deseadas o no deseadas a lo largo de pasos de flujo independientes 1361 y 1365 para la recogida en recipientes o similares. La conmutación se logra habitualmente

accionando selectivamente un transductor 1367 en uno de los pasos de flujo.

Las diversas estrategias de clasificación descritas anteriormente respecto a la clasificación de gotitas y la clasificación por foto deterioro también se pueden emplear en un sistema de conmutación de fluidos. En el sistema de conmutación de fluidos, las partículas contenidas en la corriente de fluido también están espaciadas a diversos intervalos a lo largo de la corriente y en general una detrás de la otra en fila india. Las partículas tienen diferentes características, algunas tienen una característica A, por ejemplo y otras tienen una característica B y la secuencia de partículas es aleatoria. Por consiguiente, como se ha analizado anteriormente con respecto al sistema de foto deterioro, la procesión de partículas se puede dividir en diferentes series de partículas, una detrás de la otra, incluida una primera serie de partículas que consta de una o más partículas que tienen la característica A, una segunda serie de partículas que consta de una o más partículas que tienen la característica B y una tercera serie de partículas que consta de dos o más partículas muy juntas al menos una de las cuales tiene la característica A y al menos una de las cuales tiene la característica B. El último (tercer) grupo corresponde en general a las partículas muy juntas en una gotita "coincidente" tratada anteriormente, al menos a los efectos de la estrategia de clasificación. Por lo tanto, dos o más partículas del tercer grupo pueden estar muy juntas en el sentido de que la separación entre las partículas es insuficiente para permitir una discriminación o clasificación exacta de las partículas, o porque tal separación es insuficiente para permitir a una partícula de la serie desviarse por el dispositivo de conmutación de fluidos separada de otra partícula de la misma serie. De todas maneras, las partículas muy juntas en cada (o al menos en alguna) tercera serie de partículas se pueden desviar a un sitio de recogida o a otro, según la estrategia de clasificación empleada. Según se explicó antes con respecto a la clasificación por foto deterioro, múltiples partículas de una primera serie o múltiples partículas de una segunda serie podrían estar "muy juntas", pero puesto que las partículas de cualquiera de dichas series tienen la misma característica (A o B), se tratan como una serie de partícula única a los efectos de la estrategia de clasificación.

El sistema de conmutación de fluidos puede ser un sistema monocal o multi-canal, como se ha descrito anteriormente.

Separación por interferencia de gotitas

Puede usarse un sistema de clasificación por interferencia de gotitas de alta velocidad 1371, que se muestra esquemáticamente en la Fig. 138, para clasificar las partículas al desviar los segmentos seleccionados de la corriente coaxial de fluido portador y fluido envolvente.

En contraposición a algunas otras técnicas de clasificación, la técnica de separación por interferencia de gotitas no necesita que la corriente coaxial de fluido portador y de fluido envolvente forme gotitas. Por lo tanto, no hay ninguna necesidad de acoplar al sistema de boquilla 101" usado para dispensar el fluido portador y el fluido envolvente con un sistema generador de gotitas. Únicamente a modo de ejemplo, pasar los fluidos portador y envolvente a través de un sistema de boquilla a 60 psi (413,57 kPa) para crear una corriente de 50 micrómetros de diámetro es una disposición adecuada para la formación de una corriente coaxial laminar de fluido para la suministrar partículas al sistema de clasificación por interferencia de gotitas. Las partículas de la corriente coaxial de fluido se analizan y clasifican mediante el sistema óptico 109" y el procesador 131" a medida que se mueven a través de la localización de examen 115", según se ha descrito anteriormente para los otros sistemas de clasificación. La clasificación se produce más allá de la localización de examen, en un lugar donde la corriente coaxial de fluido cruza una corriente de interferencia de gotitas de alta velocidad 1373.

La corriente de interferencia de gotitas 1373 se genera por un sistema de generación de gotitas 1375 similar al sistema de generación de gotitas usado para la clasificación de gotitas. Una corriente de fluido de alta velocidad 1379 pasa a través de un sistema de boquilla de gran velocidad 1377 que está acoplado a un transductor piezoeléctrico 1381 u otra fuente de energía acústica para hacer que la corriente de fluido de alta velocidad se rompa en gotitas 1383 más allá de la boquilla de alta velocidad. Por ejemplo, un líquido sin partículas a 1500 psi (10,34 MPa) puede pasar a través de una boquilla de alta velocidad para formar un chorro de fluido de 70 micrómetros de diámetro de alta velocidad. La boquilla de alta velocidad puede hacerse oscilar a 400 kHz para formar gotitas de alta velocidad. Las gotitas de alta velocidad 1383 pasan por un campo eléctrico generado por una o más placas deflectoras eléctricas 1387 de modo que el recorrido de las gotitas de alta velocidad pueda controlarse al aplicar selectivamente una carga eléctrica a las gotitas, como se hizo para controlar el recorrido de las gotitas en el sistema de clasificación de gotitas. La corriente de interferencia de gotitas de alta velocidad se dirige de modo que algunas gotitas de alta velocidad crucen la corriente coaxial de líquido en un sitio 1399 más allá de la localización de examen. Por ejemplo, las gotitas sin cargar 1389 se pueden dirigir para que choquen con la corriente de fluido en tanto que las gotitas cargadas 1391 se desvían lejos de la corriente coaxial de fluido. Cuando una gotita de alta velocidad choca con la corriente coaxial de fluido, un segmento 1397 de la corriente de fluido y todas las partículas contenidas en ella se desvían del camino que de otro modo habrían tomado. La aplicación de una carga o de ninguna carga a una gotita de alta velocidad se sincroniza para que la llegada de esa gotita a la intersección 1399 con la corriente coaxial de líquido coincida con la llegada de un segmento particular de la corriente coaxial de fluido. Por lo tanto, al cargar selectivamente las gotitas de alta velocidad dependiendo de la clasificación de las partículas contenidas en los segmentos de la corriente coaxial, se pueden separar las partículas al desviar todos los segmentos de la corriente coaxial de fluido que contienen una o más partículas seleccionadas y no desviando otros

segmentos de la corriente coaxial o viceversa. Se pueden usar capilares de recogida 1403 que tienen un vacío leve para recoger tanto el segmento desviado 1397 como el no desviado de la corriente coaxial. Se puede fijar el sistema de clasificación por interferencia de gotitas para que las gotitas de alta velocidad se fusionen con segmentos desviados de la corriente coaxial o para que las gotitas de alta velocidad permanezcan separadas de los segmentos desviados de la corriente después de la colisión con los segmentos de la corriente coaxial.

Dado que no hay partículas ni células en la corriente de interferencia de gotitas de alta velocidad 1373, es posible usar presiones muy altas y frecuencias de gotitas muy altas sin dañar a las partículas ni a las células que se van a clasificar. Esto permite la clasificación de segmentos de la corriente cada uno de los cuales tiene menos volumen (por ejemplo, cuatro veces menos volumen) que el volumen de una gotita en el sistema de clasificación de gotitas. Esto aumenta en gran medida la máxima producción del sistema a la vez que reduce el factor de dilución de las partículas separadas. Es más, debido a que se usa un líquido finamente filtrado sin células ni partículas para formar la corriente de interferencia de gotitas, es posible la formación más uniforme de gotitas porque la boquilla de formación de gotitas tiene menor probabilidad de obstruirse o sufrir acumulación proteica que el sistema de boquilla usado en el sistema de clasificación de gotitas. Otra ventaja es que la distancia entre el análisis de partículas en el localización de examen y el sitio de separación 1399 se puede reducir (por ejemplo, a la cuarta parte), permitiendo predecir de manera más exacta el tiempo de llegada de una partícula particular al punto de clasificación. Además, el sistema de interferencia de gotitas permite una mayor flexibilidad en el ajuste del tamaño o la presión de la boquilla para la corriente coaxial de fluido. Si se desea, el sistema de clasificación por interferencia de gotitas se puede combinar con el sistema de boquilla de tubo capilar. Un sistema multi-canal de separación por interferencia de gotitas puede usar una bomba fluidica de alta presión para suministrar líquido de una fuente común de suministro a múltiples boquillas generadoras de una corriente de interferencia de gotitas.

Cuando se introducen elementos del ejemplo o ejemplos de la misma, los artículos "un", "una", "el", "la" y "dicho" o "dicha" pretenden indicar que hay uno o más de los elementos. Las expresiones "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pretenden ser inclusivos y quieren decir que puede haber elementos adicionales diferentes a los elementos enumerados. El término "o" pretende incluir "y/o" y quiere decir "uno u otro o ambos". Por lo tanto, una indicación de "ABC o DEF" significa (1) ABC, o (2) DEF, o (3) tanto ABC como DEF. El término "y/o" pretende indicar lo mismo que "o" como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, el término "y/o" pretende incluir "o" y quiere decir "uno u otro o ambos". Por ejemplo, una indicación de "ABC y/o DEF" significa (1) ABC, o (2) DEF, o (3) tanto ABC como DEF.

En vista de lo anterior, se observará que se consiguen los varios objetivos de la invención y se obtienen otros resultados beneficiosos.

Como podrían hacerse diversos cambios en las construcciones, productos y métodos anteriores sin alejarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y mostrada en los dibujos adjuntos se interprete como ilustrativa y no en un sentido limitante.

La presente invención se refiere a la siguiente materia específica.

A. Combinaciones sinérgicas de acuerdo con la presente invención

a. FCM multicanal (con estrategia de clasificación)

A1. Un método para procesar células espermáticas animales que comprende los pasos de:

clasificar las células espermáticas en diferentes poblaciones de células espermáticas en función de una o más características del ADN especificadas utilizando un proceso de citometría de flujo que comprende suministrar un fluido de muestra que contiene las células espermáticas a una pluralidad de unidades de citometría de flujo, donde cada una de las cuales se puede operar para clasificar las células espermáticas en función de dicha una o más características del ADN y operar dichas unidades a la vez que se comparte una plataforma integrada que comprende al menos uno de los siguientes elementos: (1) un suministro común de células espermáticas; (2) una fuente común de radiación electromagnética; (3) una carcasa común; (4) una entrada común para controlar la operación de las unidades; (5) un procesador común para recibir y procesar la información procedente de las unidades para permitir la evaluación de la operación de una unidad respecto a otra unidad; y (6) un sistema de suministro de fluidos común para suministrar fluido que contiene células espermáticas a dichas unidades de citometría de flujo; y

variar la velocidad con la cual se suministra el fluido de muestra a una o más de las unidades de citometría de flujo como una función de al menos una de las siguientes: (1) la pureza de una primera población clasificada de células espermáticas que tienen una característica del ADN deseada; y (2) la cantidad de células espermáticas que tienen dicha característica del ADN deseada en una segunda población clasificada.

A2. El método de la reivindicación Aa1' que además comprende operar dichas unidades de citometría de flujo en paralelo.

A3. El método de la reivindicación Aa1', donde dicha una o más características del ADN especificadas comprenden si una célula espermática contiene un cromosoma sexual X o Y.

REIVINDICACIONES

1. Un método para procesar células espermáticas animales que comprende los pasos de:

5 clasificar las células espermáticas en diferentes poblaciones de células espermáticas en función de una o más características del ADN especificadas utilizando un proceso de citometría de flujo que comprende suministrar un fluido de muestra que contiene las células espermáticas a una pluralidad de unidades de citometría de flujo, donde cada una de las cuales se puede operar para clasificar las células espermáticas en función de dicha una o más características del ADN y

10 operar dichas unidades a la vez que se comparte una plataforma integrada que comprende un sistema de suministro de fluidos común para suministrar el fluido que contiene dichas células espermáticas a dichas unidades de citometría de flujo y al menos uno de los siguientes elementos: (1) un suministro común de células espermáticas; (2) una fuente común de radiación electromagnética; (3) una carcasa común; (4) una entrada común para controlar la operación de las unidades; y (5) un procesador común para recibir y procesar la información procedente de las unidades para permitir la evaluación de la operación de una unidad respecto a otra unidad; y

variar la velocidad con la cual se suministra el fluido de muestra a una o más de las unidades de citometría de flujo como una función de al menos una de las siguientes:

20 (1) la pureza de una primera población clasificada de células espermáticas que tienen una característica del ADN deseada; y

25 (2) la cantidad de células espermáticas que tienen dicha característica del ADN deseada en una segunda población clasificada.

2. El método de la reivindicación 1, donde dicha una o más características del ADN especificadas comprenden si una célula espermática tiene un cromosoma sexual X o Y.

30 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sistema de suministro de fluidos común comprende una bomba para transferir el fluido portador desde un suministro común del fluido portador a presión.

35 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sistema de suministro de fluidos común comprende un sistema a presión de gas para transferir el fluido desde un suministro común de fluido envolvente a presión.

40 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sistema de suministro de fluidos común comprende un sistema colector para recibir los fluidos desde los suministros respectivos y suministrar a presión los fluidos a las unidades de citometría de flujo.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde la bomba comprende una bomba de jeringa.

45 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde el émbolo de la bomba se puede desplazar por el recorrido de admisión para aspirar un volumen elegido de fluido portador del recipiente y por el recorrido de descarga para dispensar el fluido portador a través de una línea de suministro al colector y del colector a las boquillas del sistema.

50 8. El método de la reivindicación 7, donde el colector comprende un bloque laminado de material en el que se han formado conductos para definir un circuito de flujo del fluido.

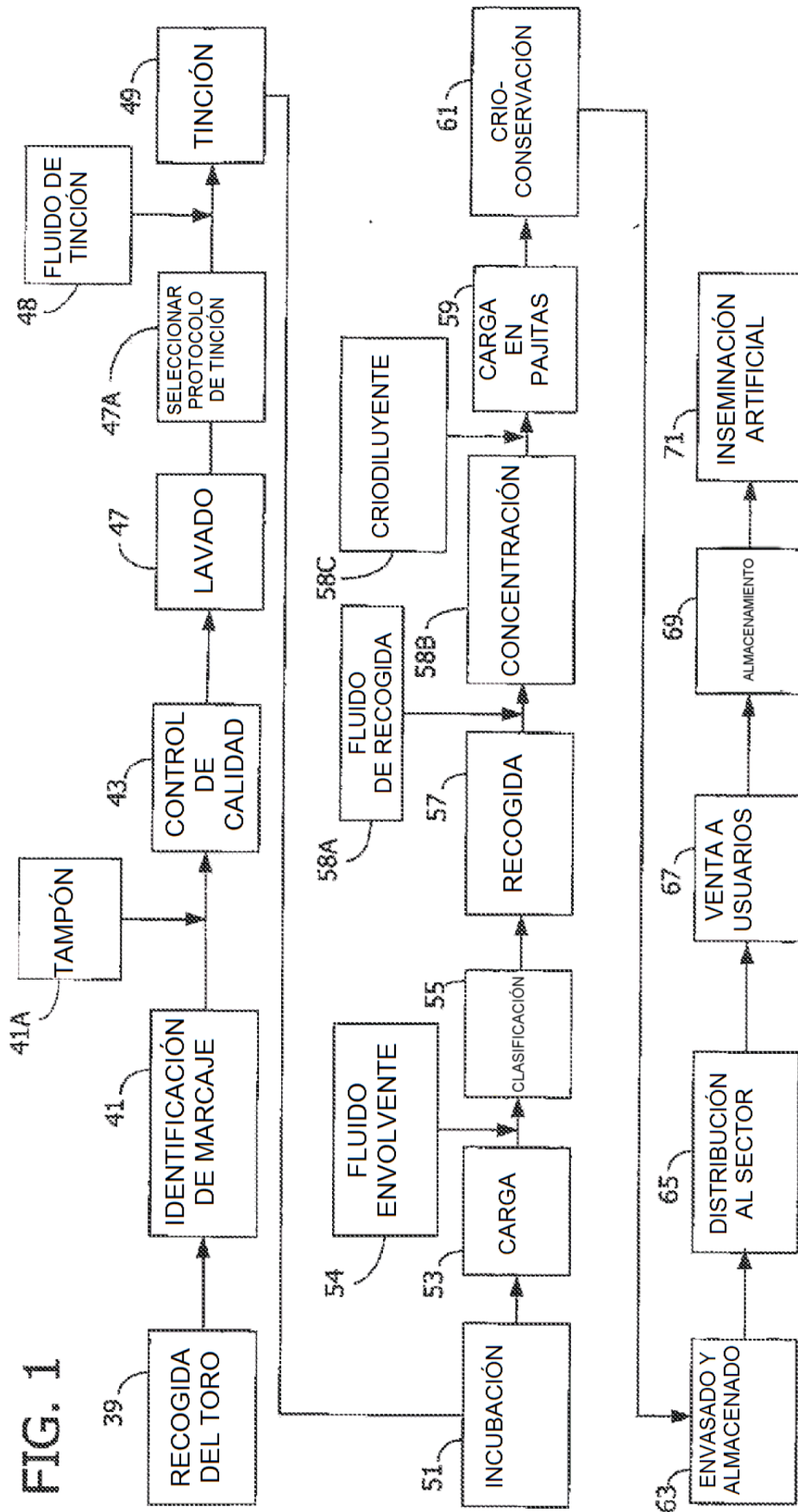


FIG. 2

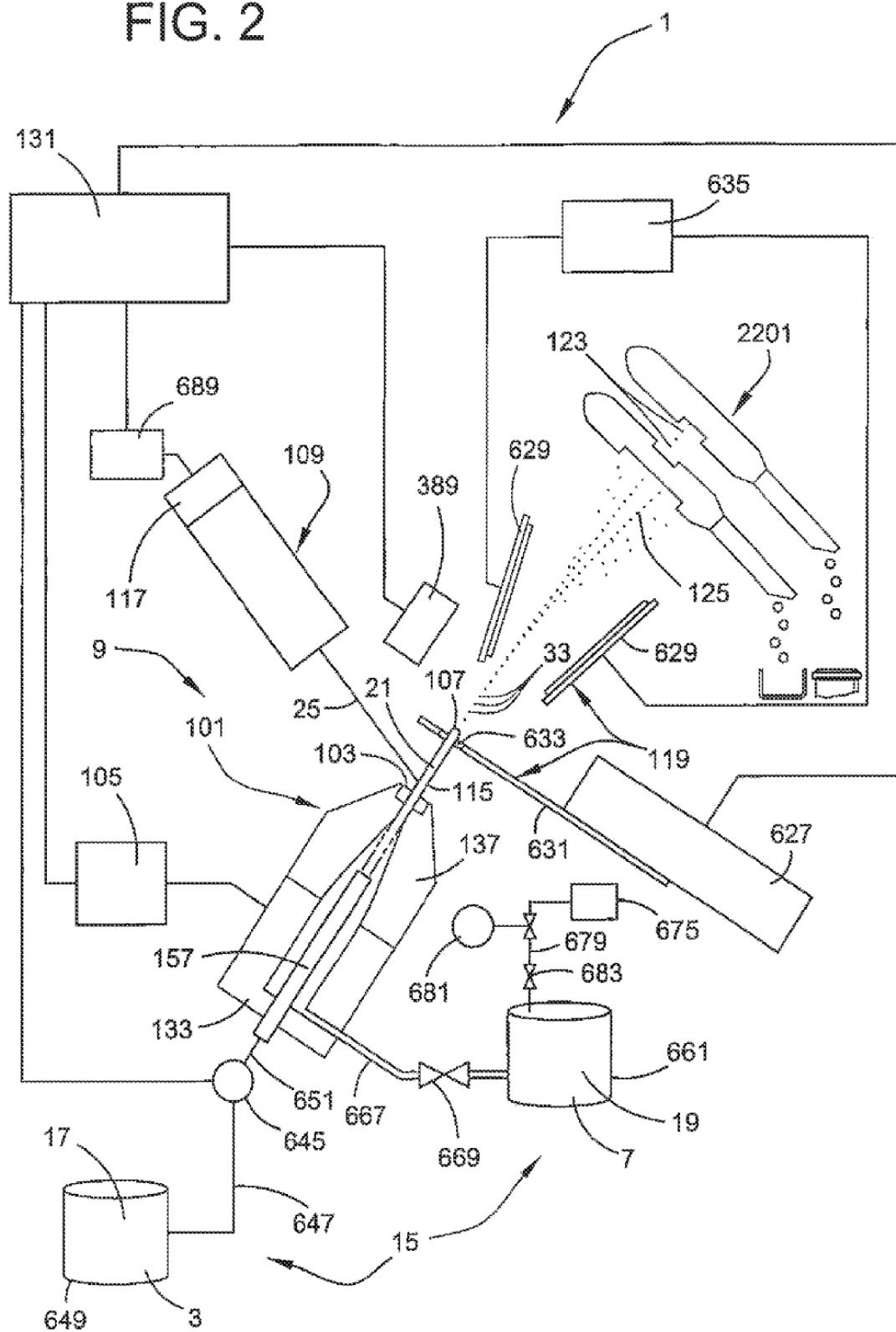
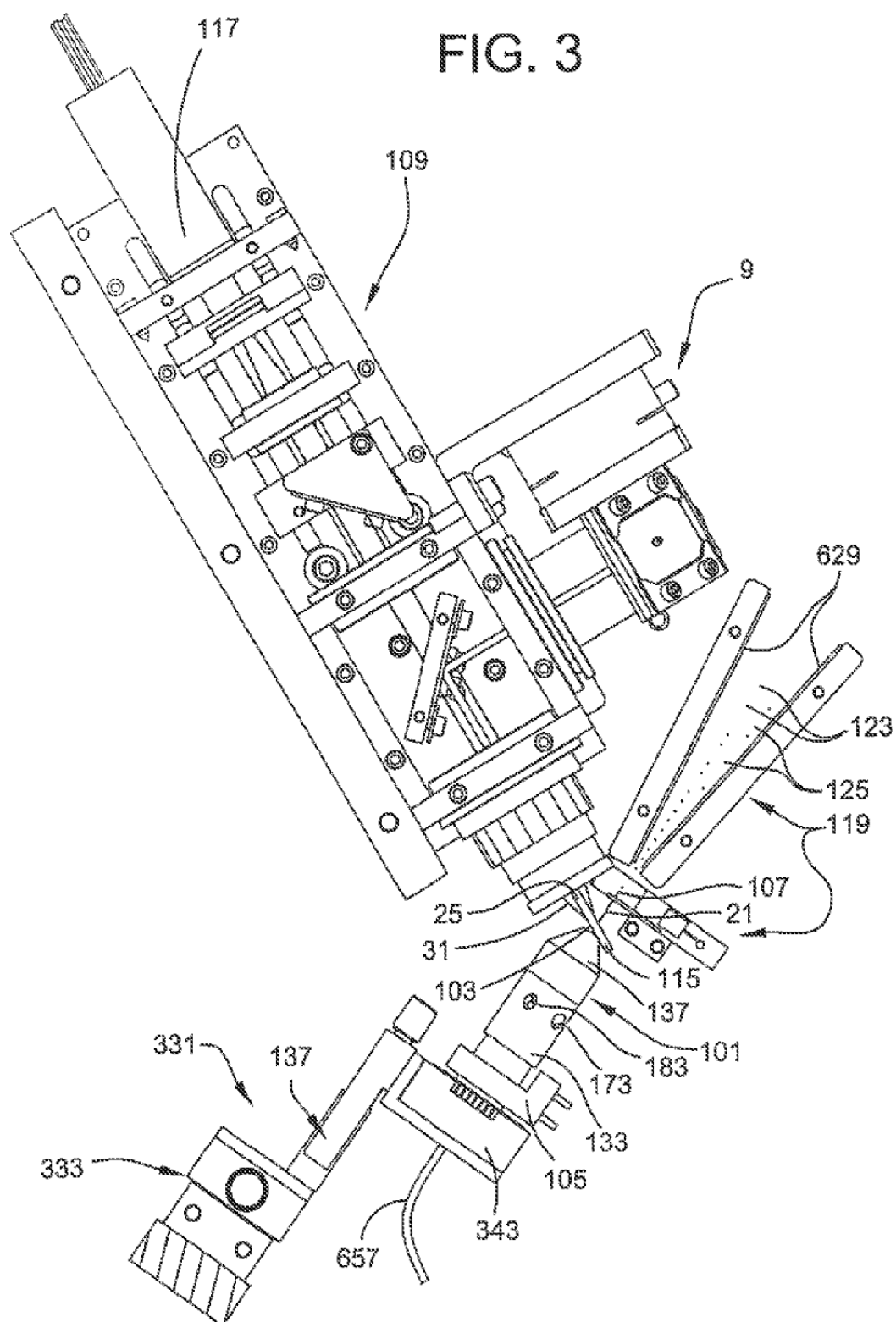


FIG. 3



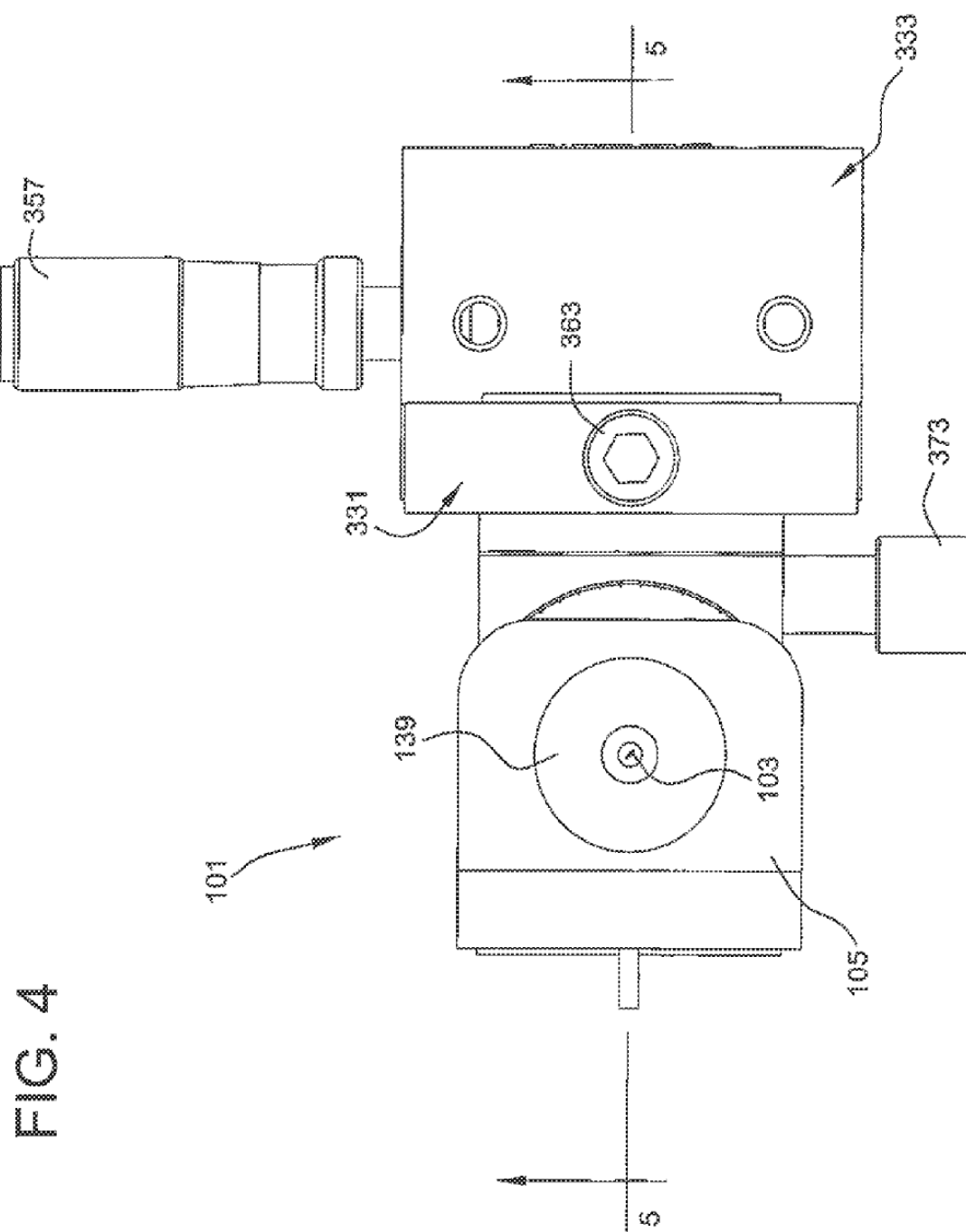
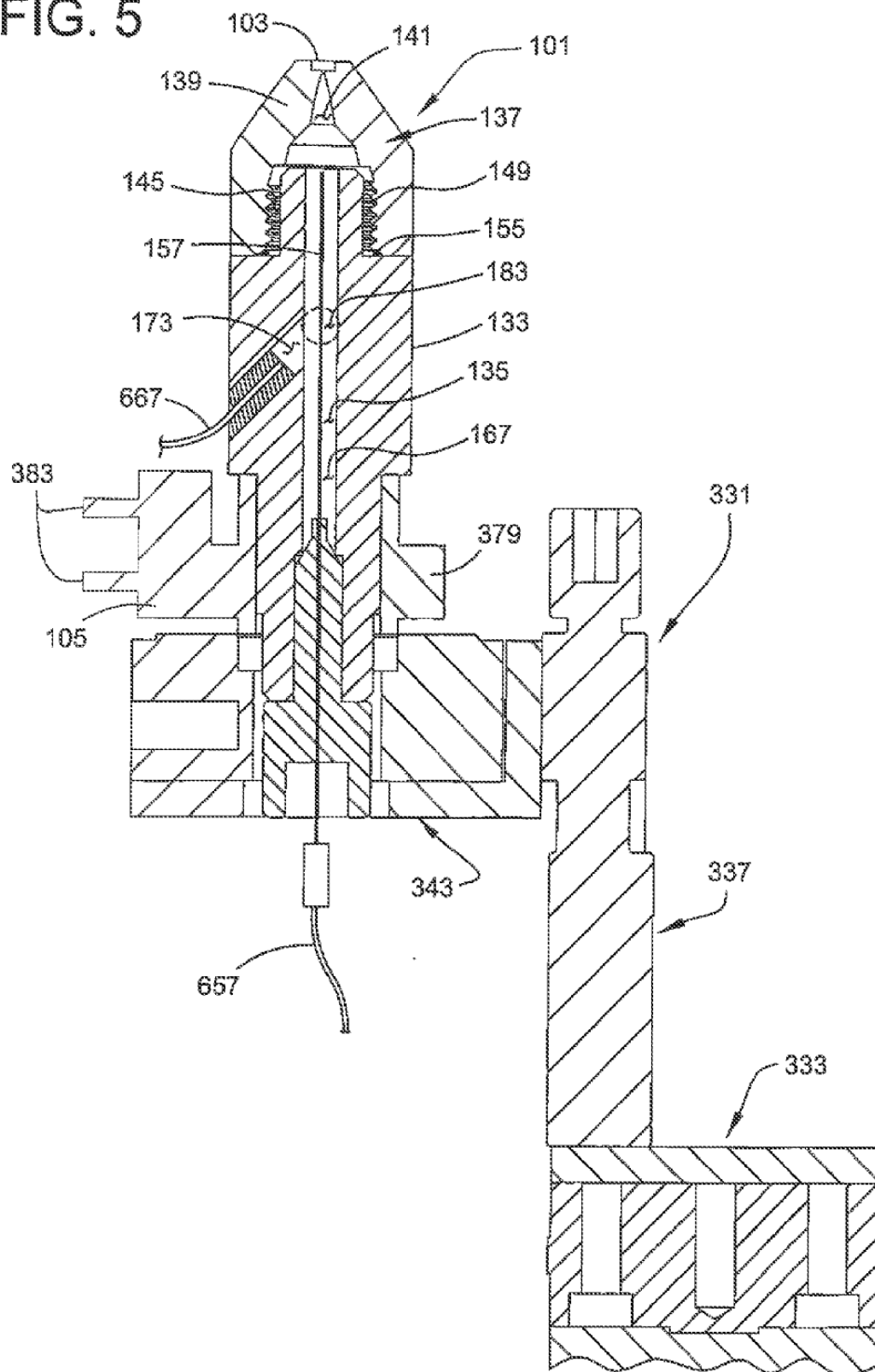
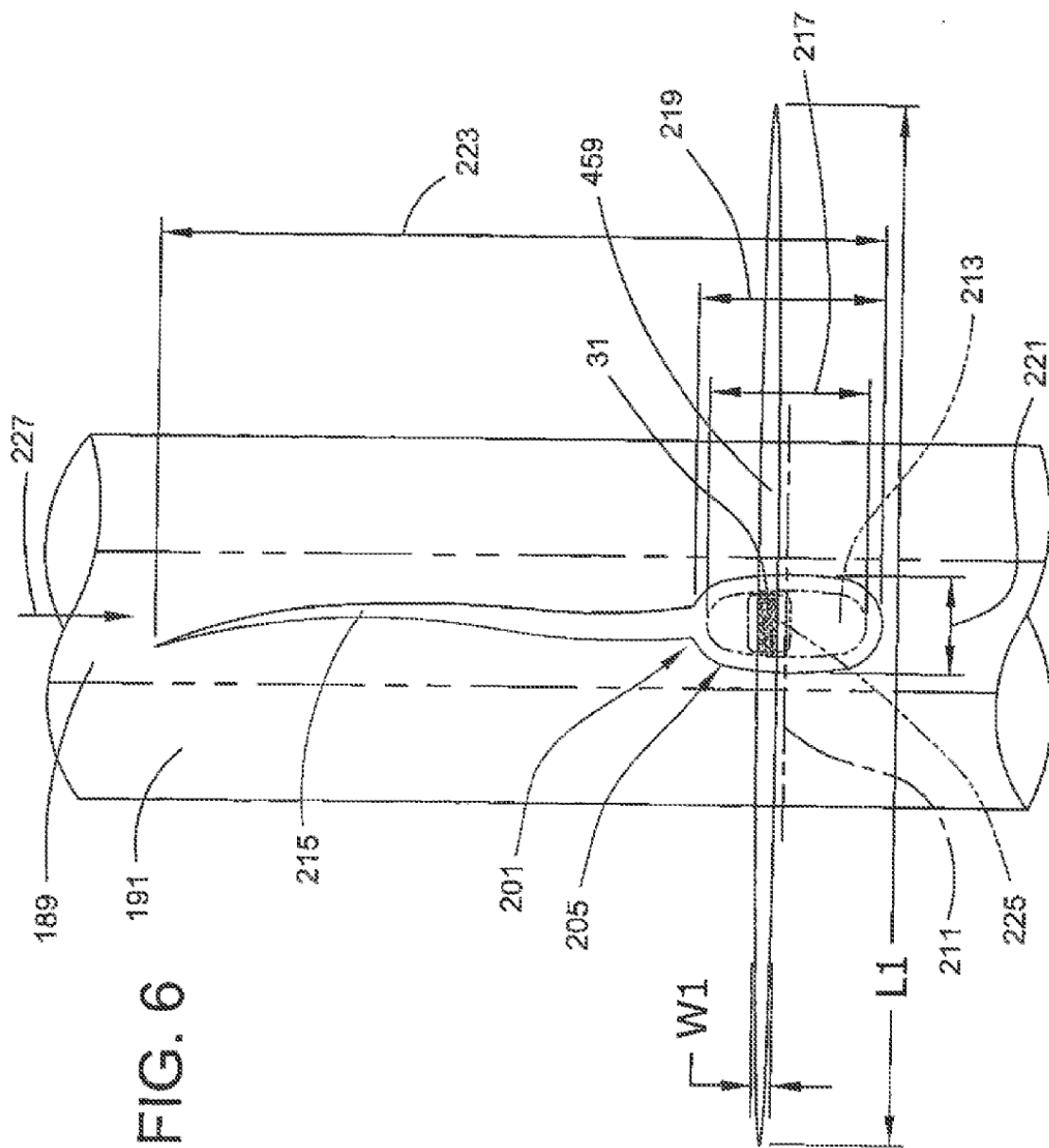
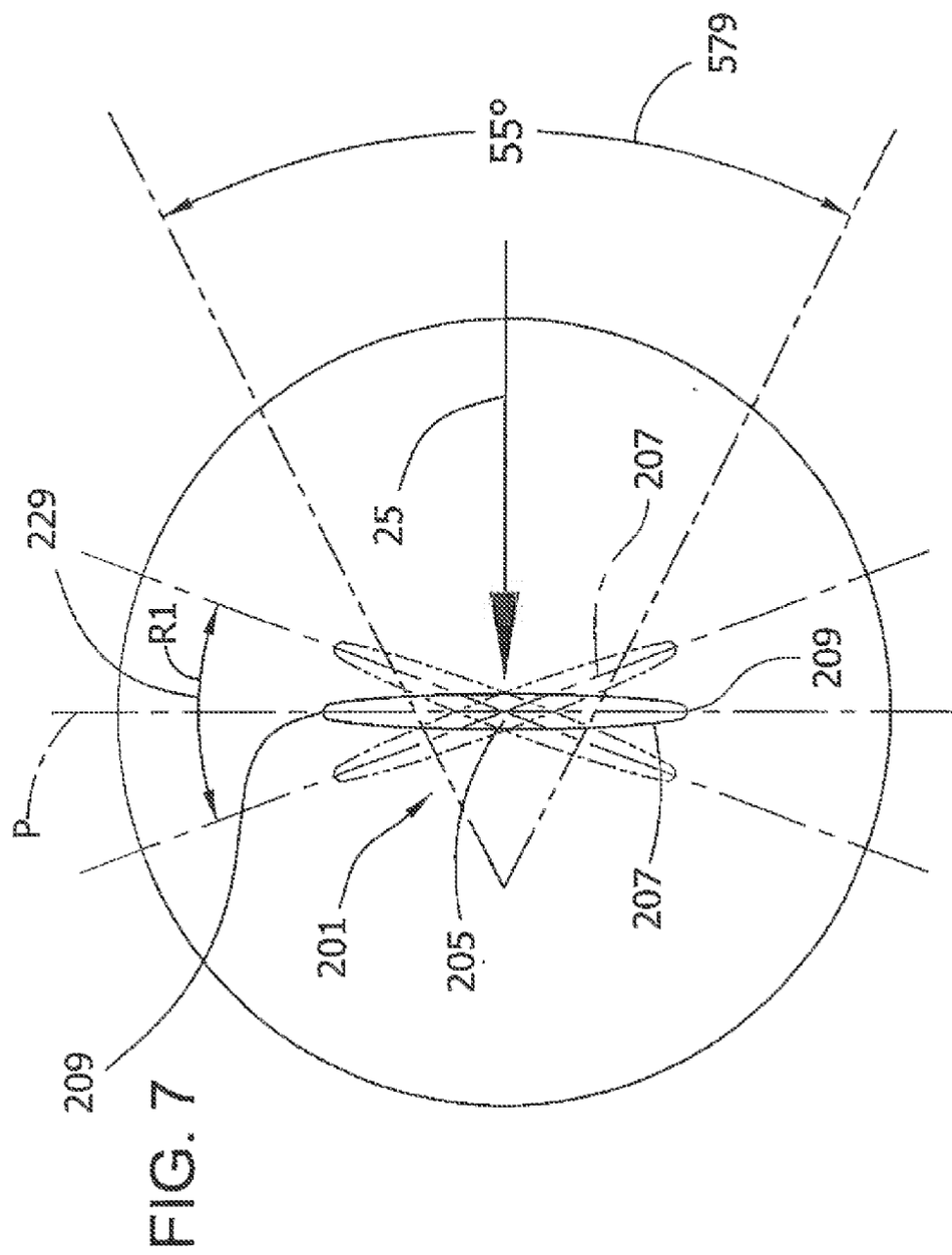
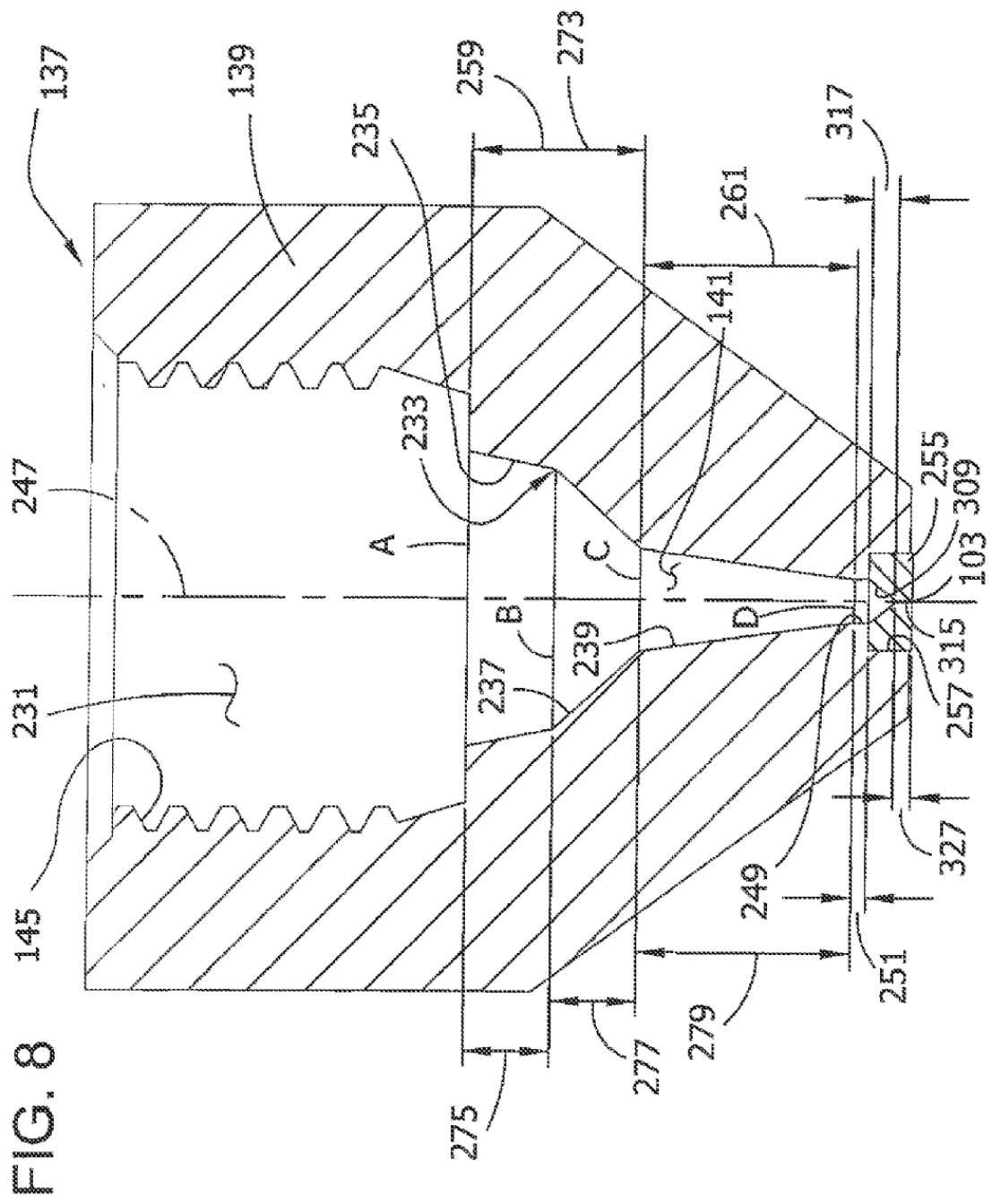


FIG. 5









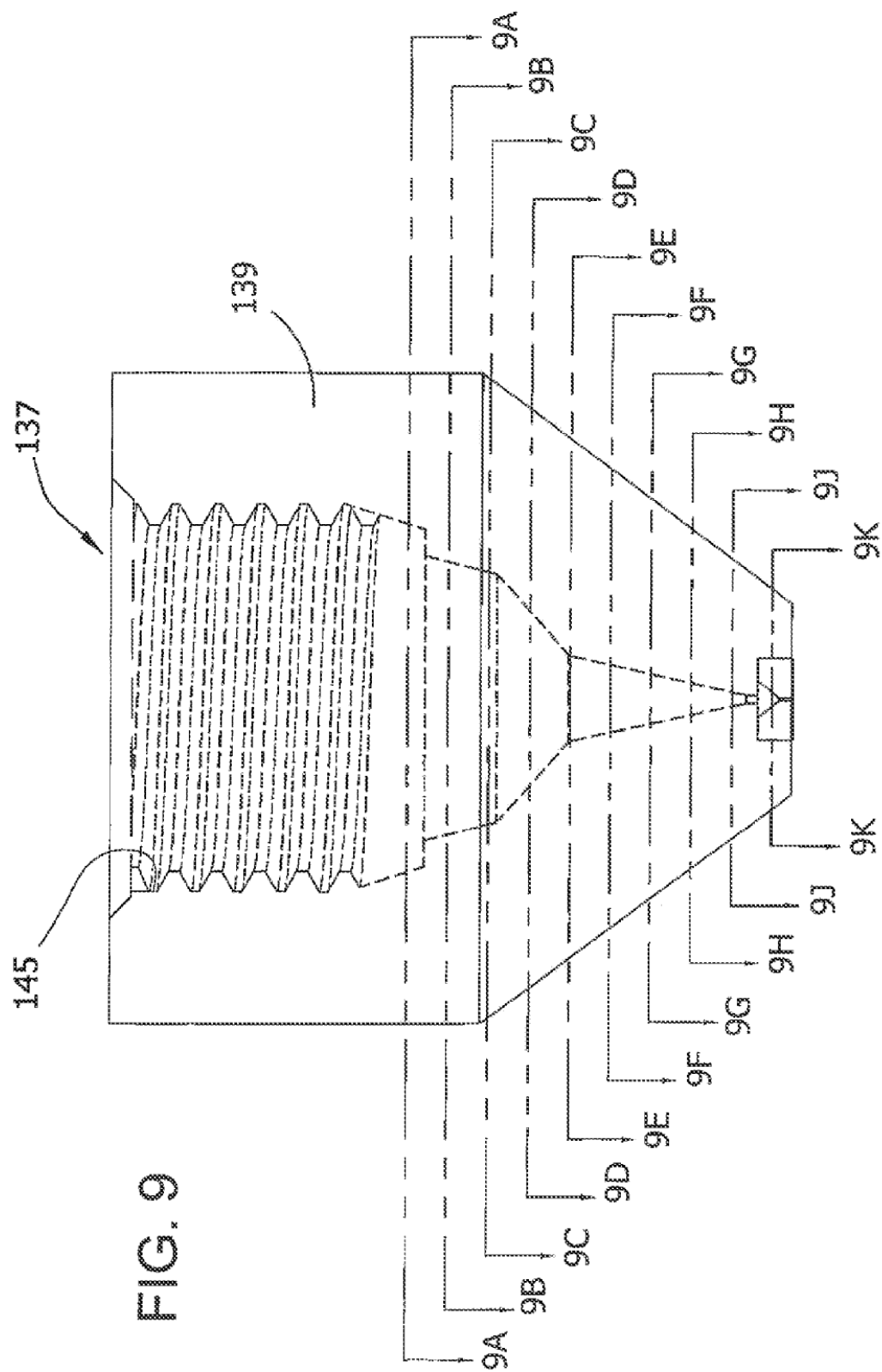


FIG. 9B

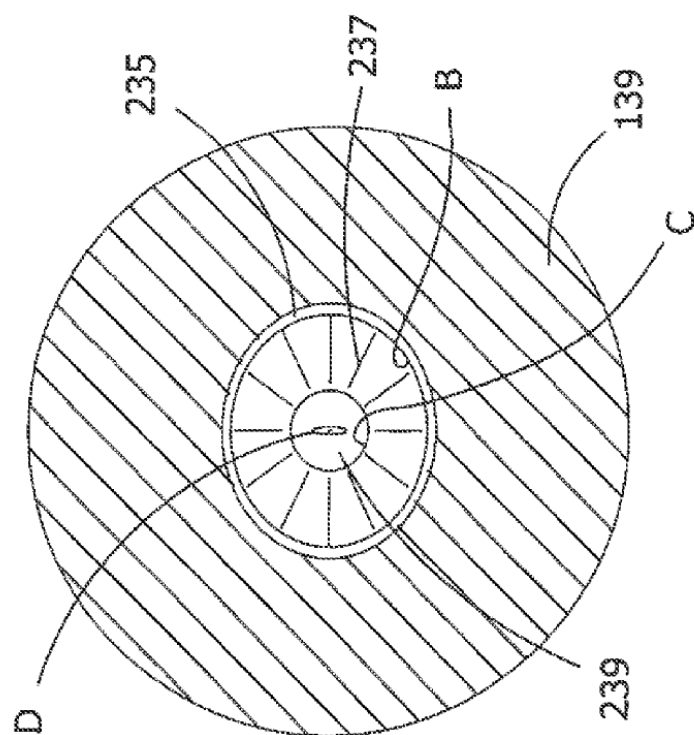


FIG. 9A

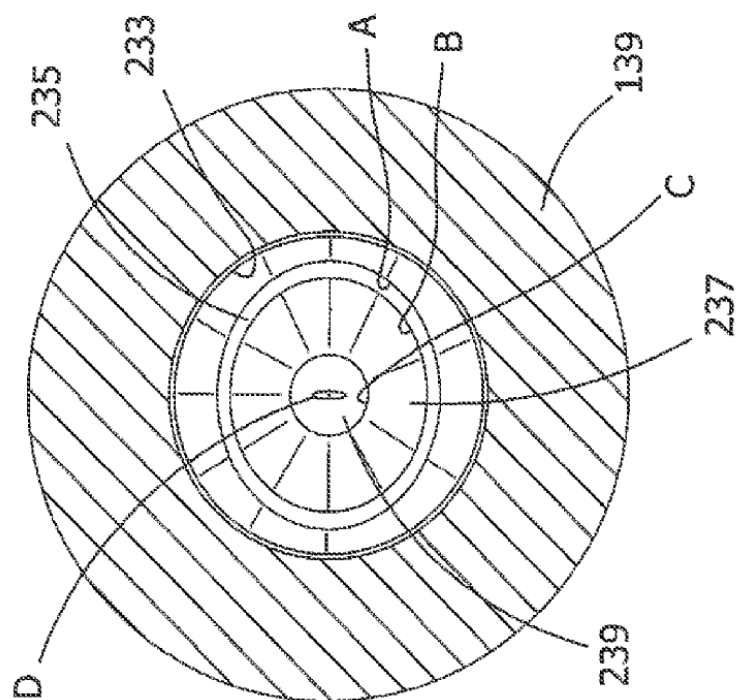


FIG. 9D

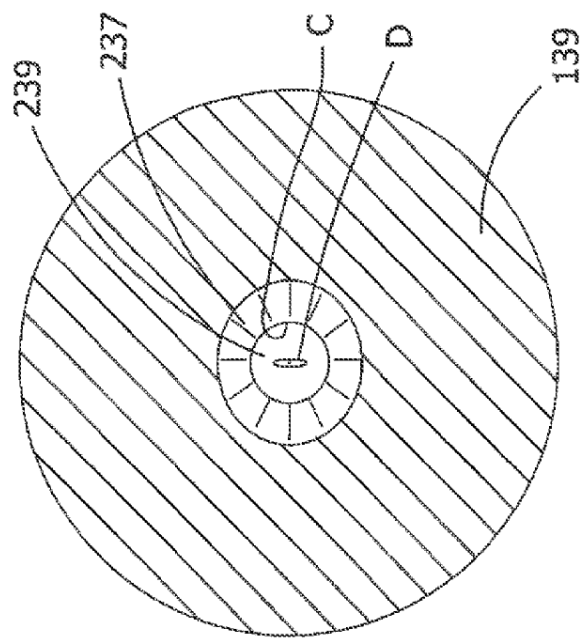


FIG. 9C

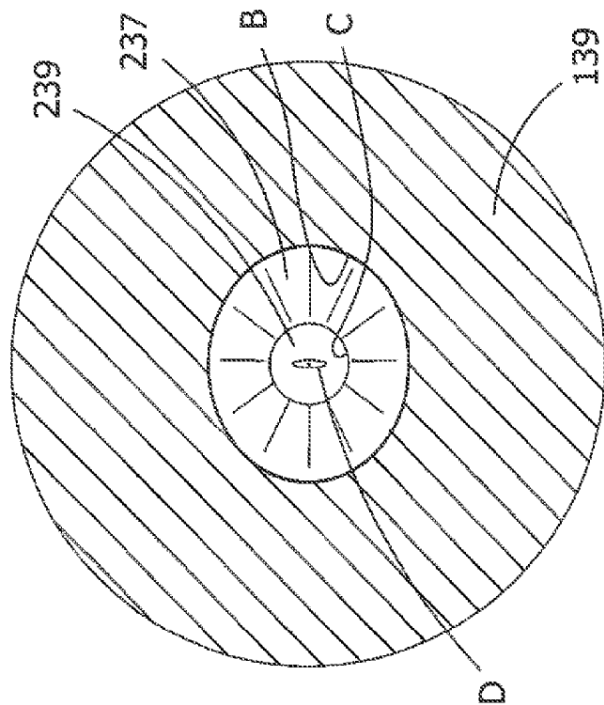


FIG. 9F

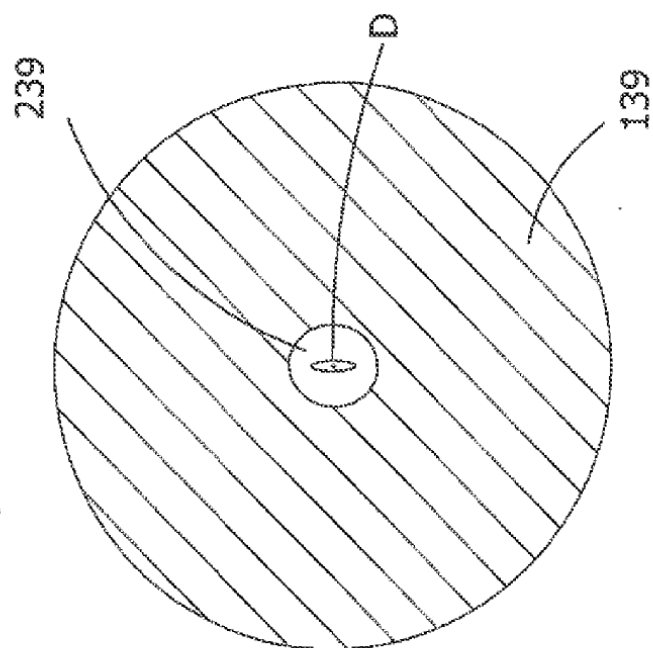
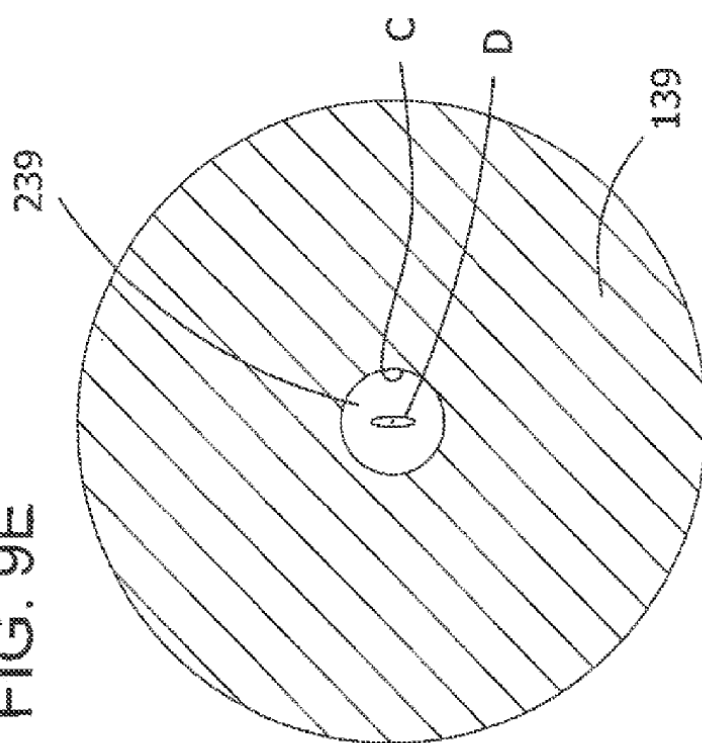


FIG. 9E



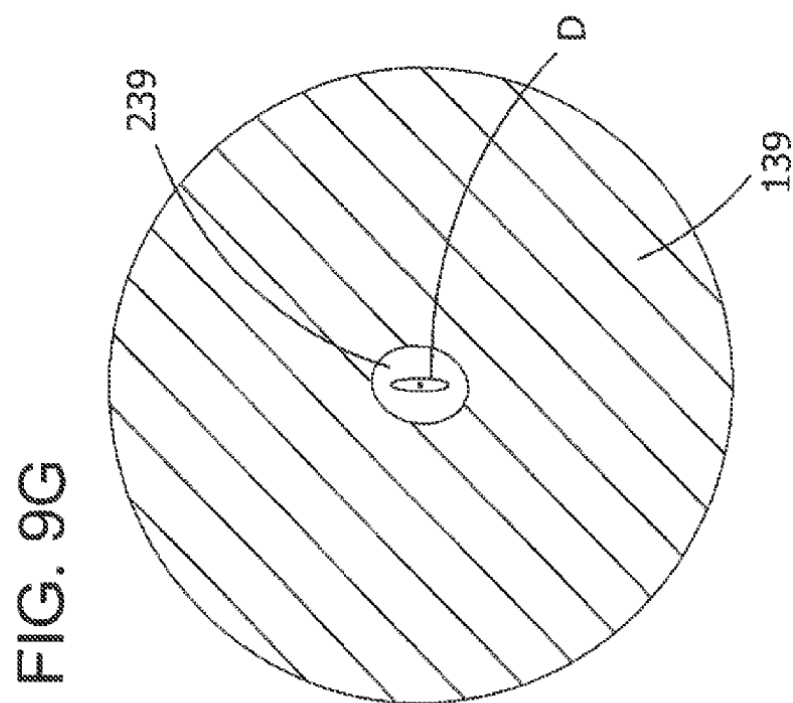
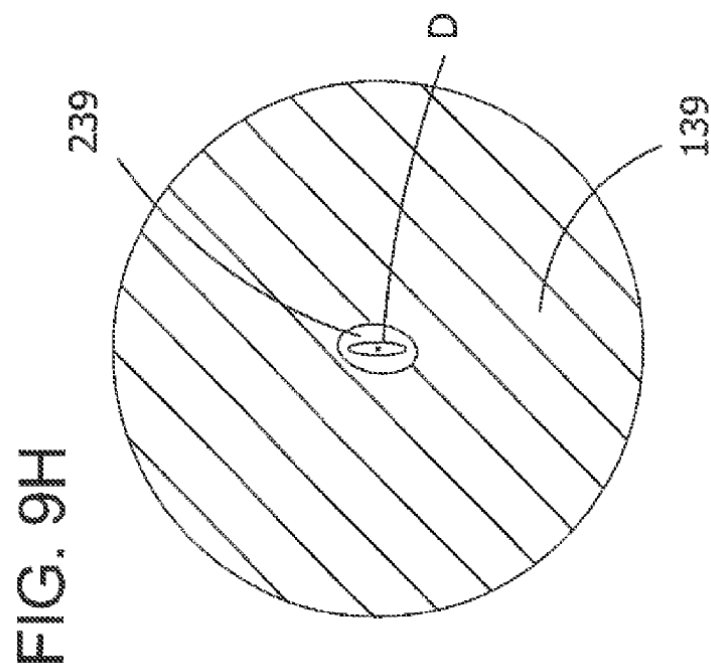


FIG. 9J

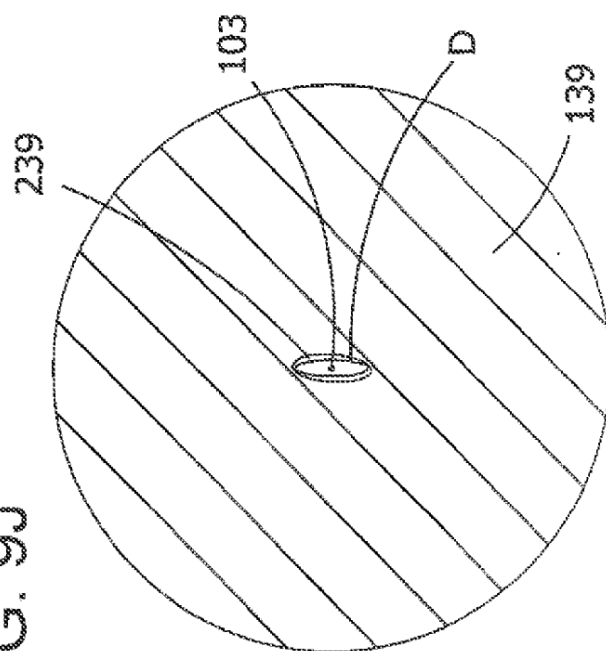


FIG. 9K

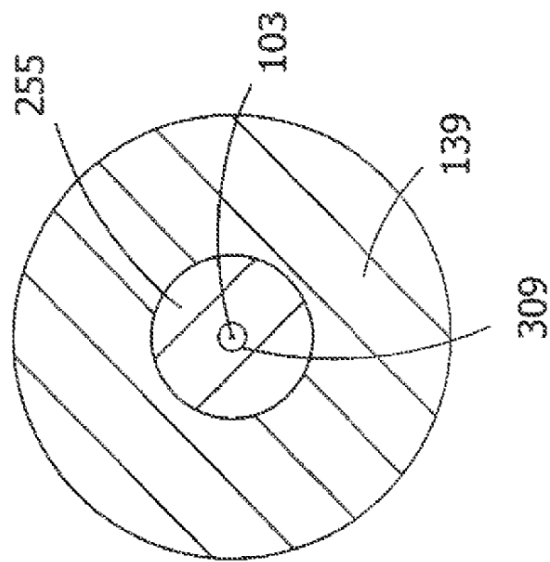


FIG. 10

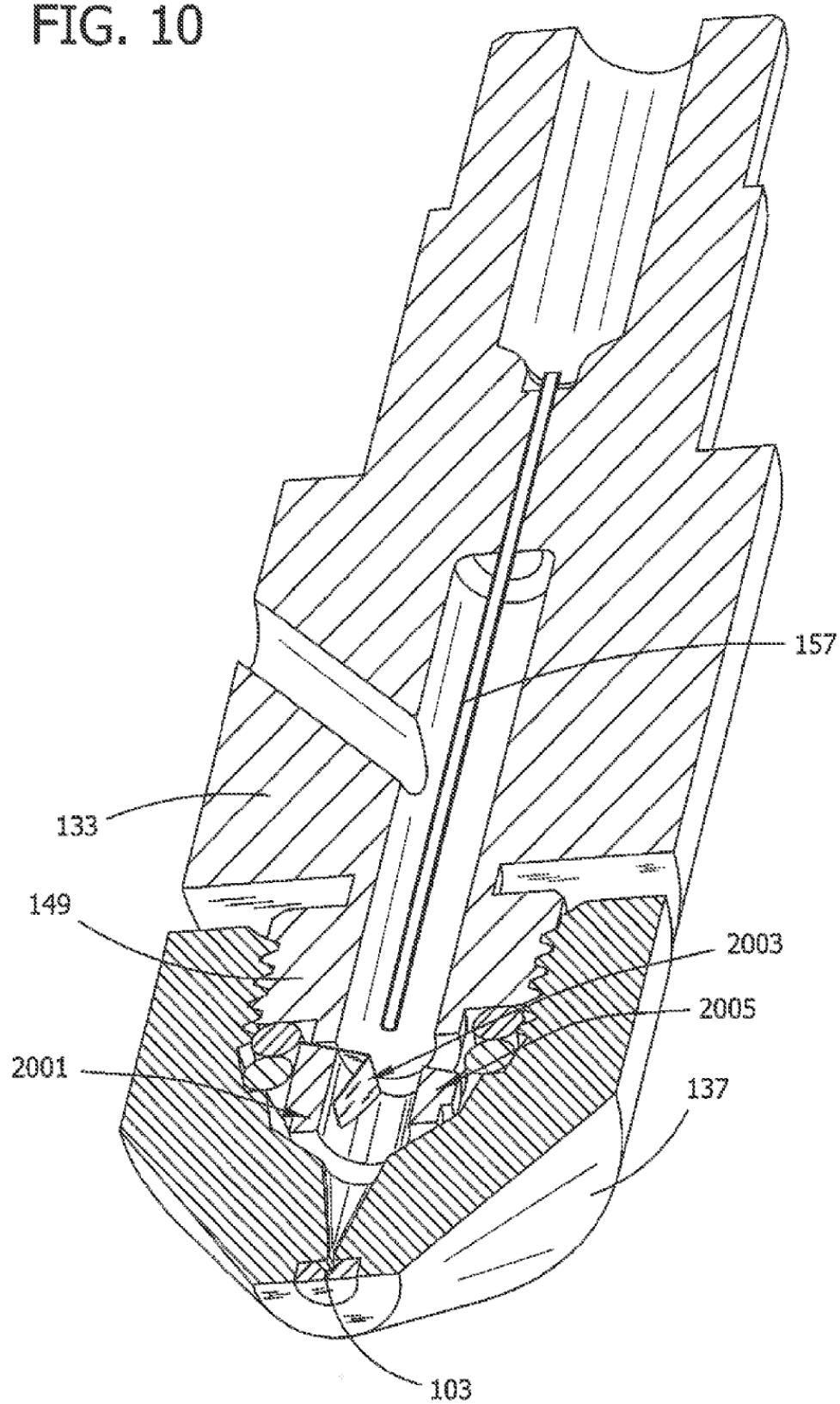


FIG. 11

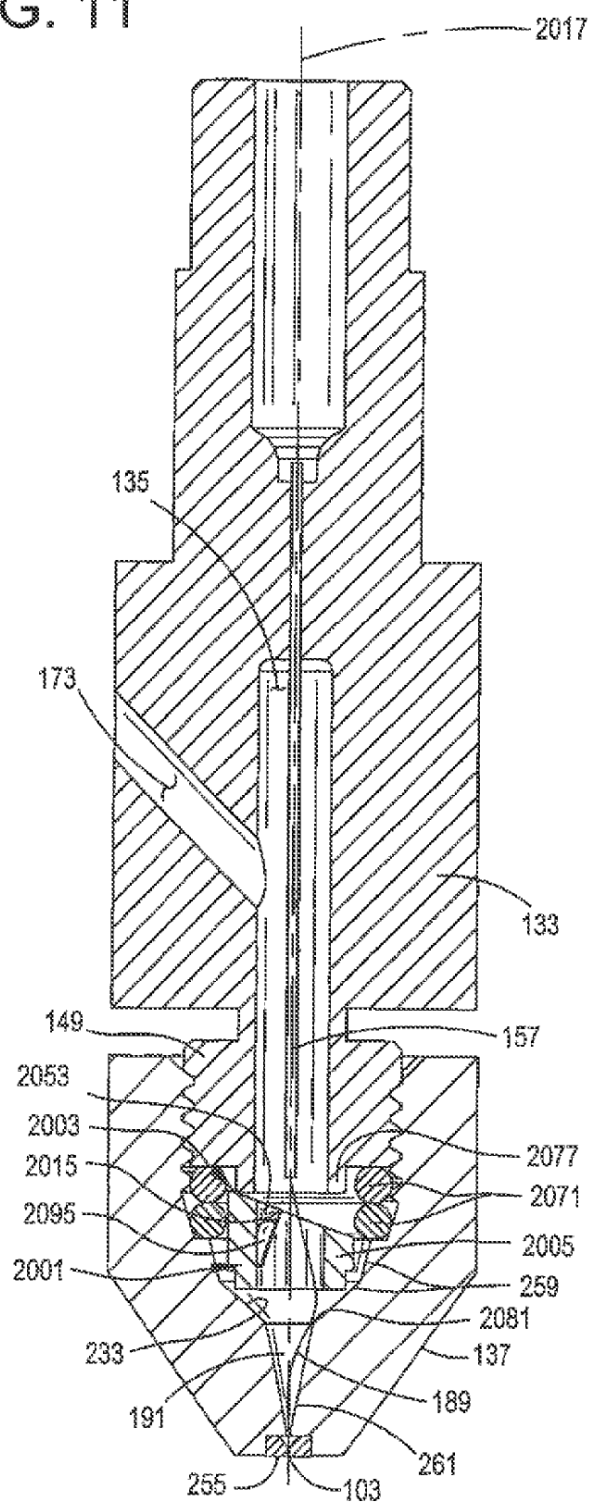


FIG. 12

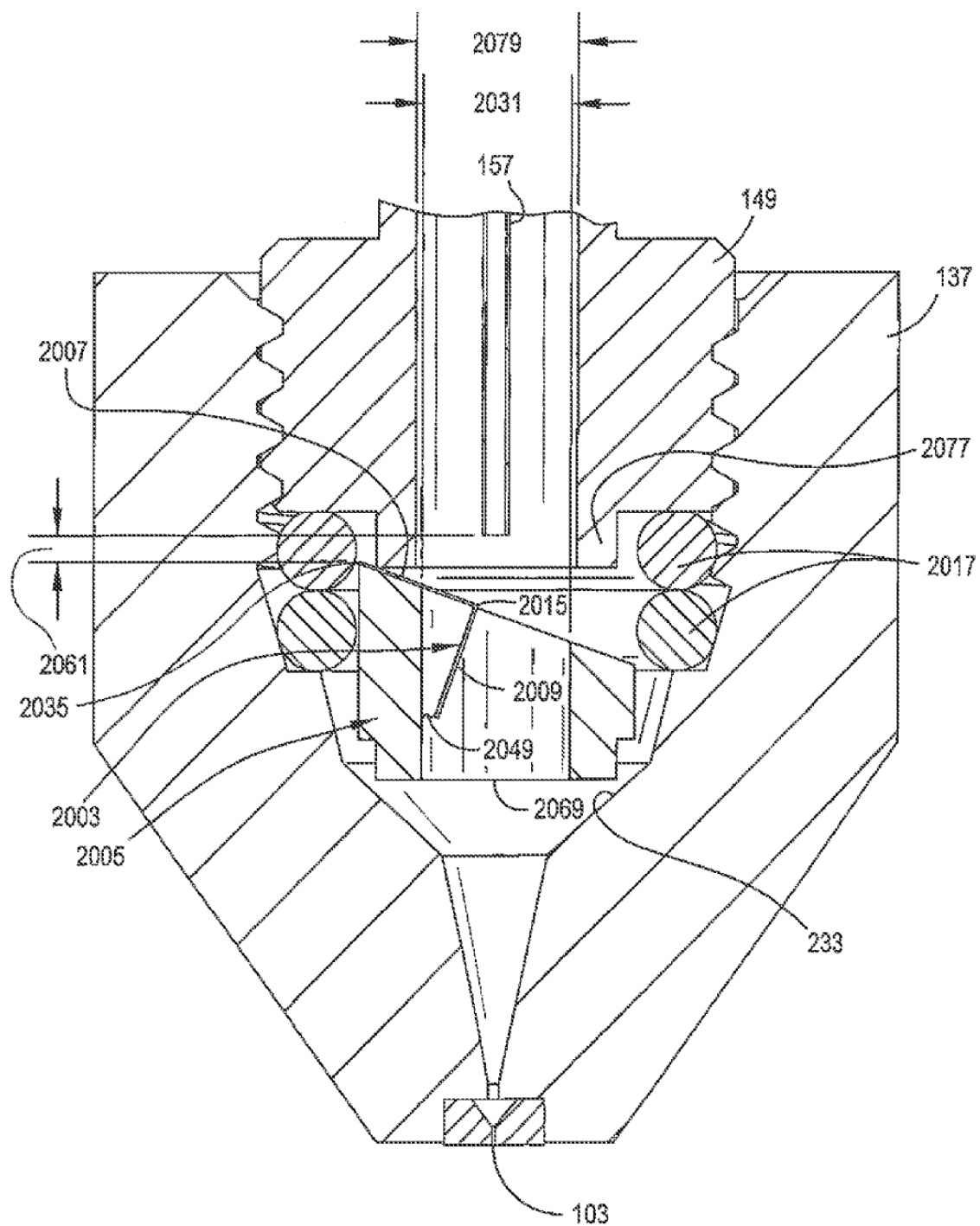
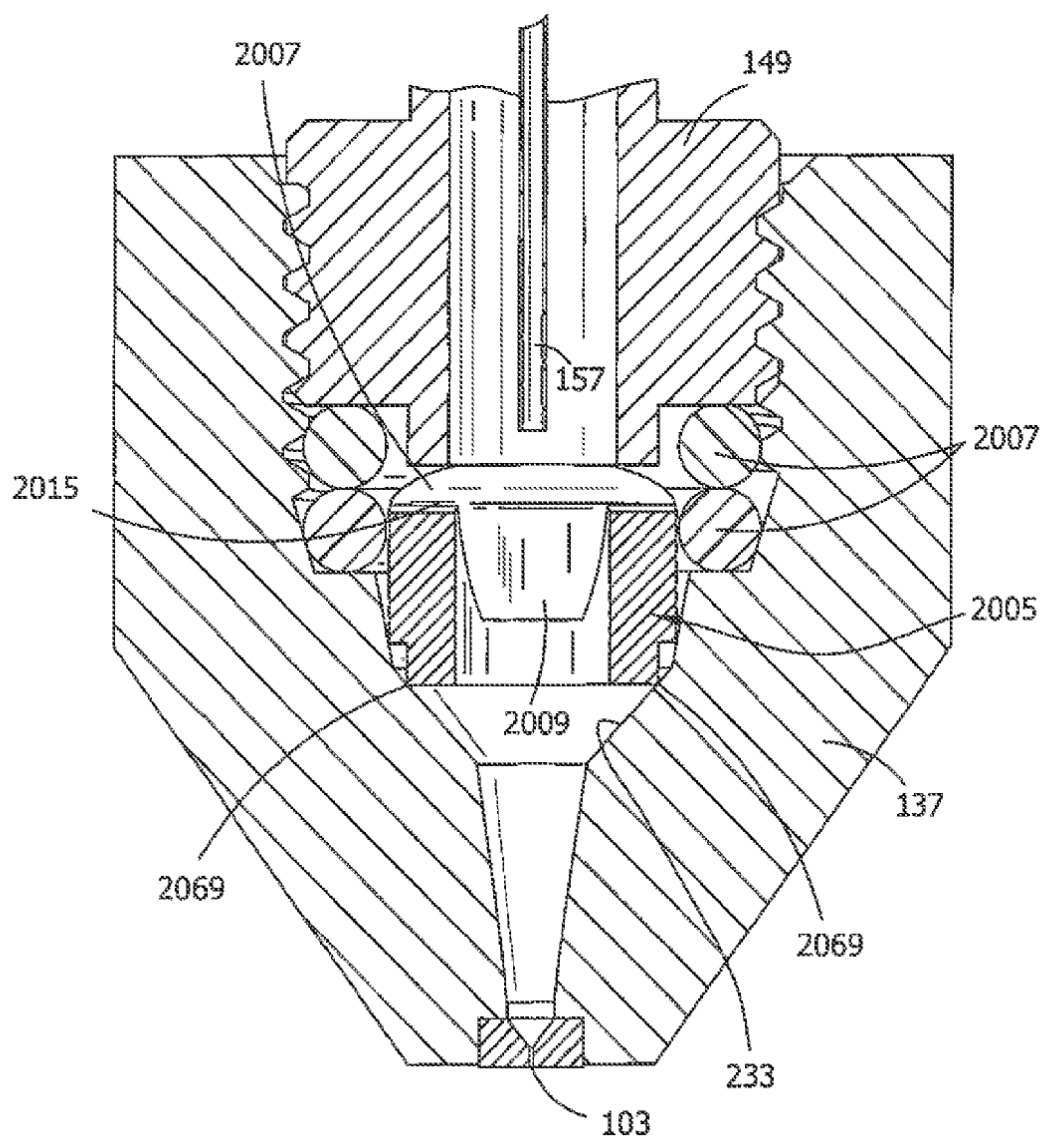


FIG. 13



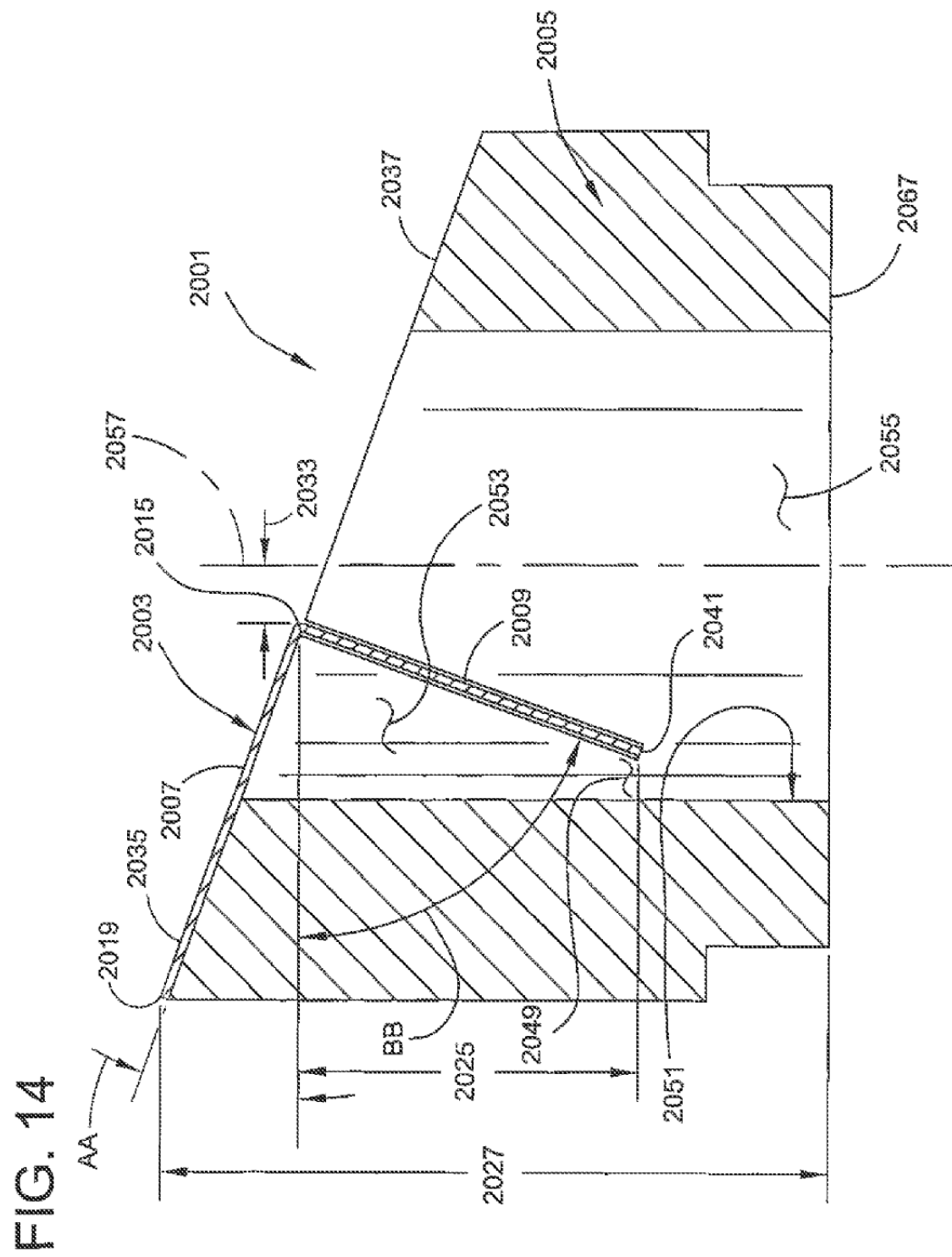


FIG. 15

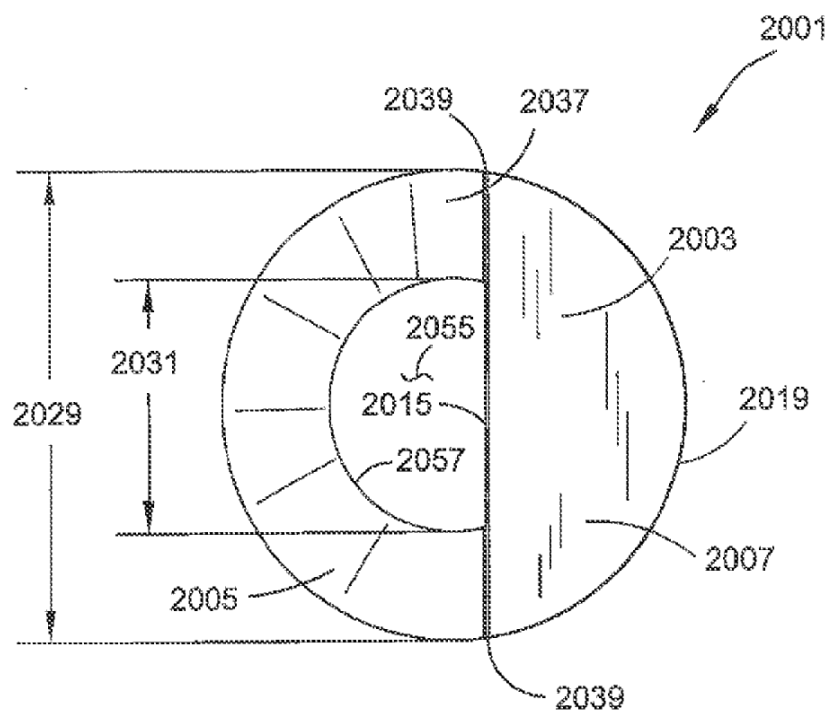


FIG. 16

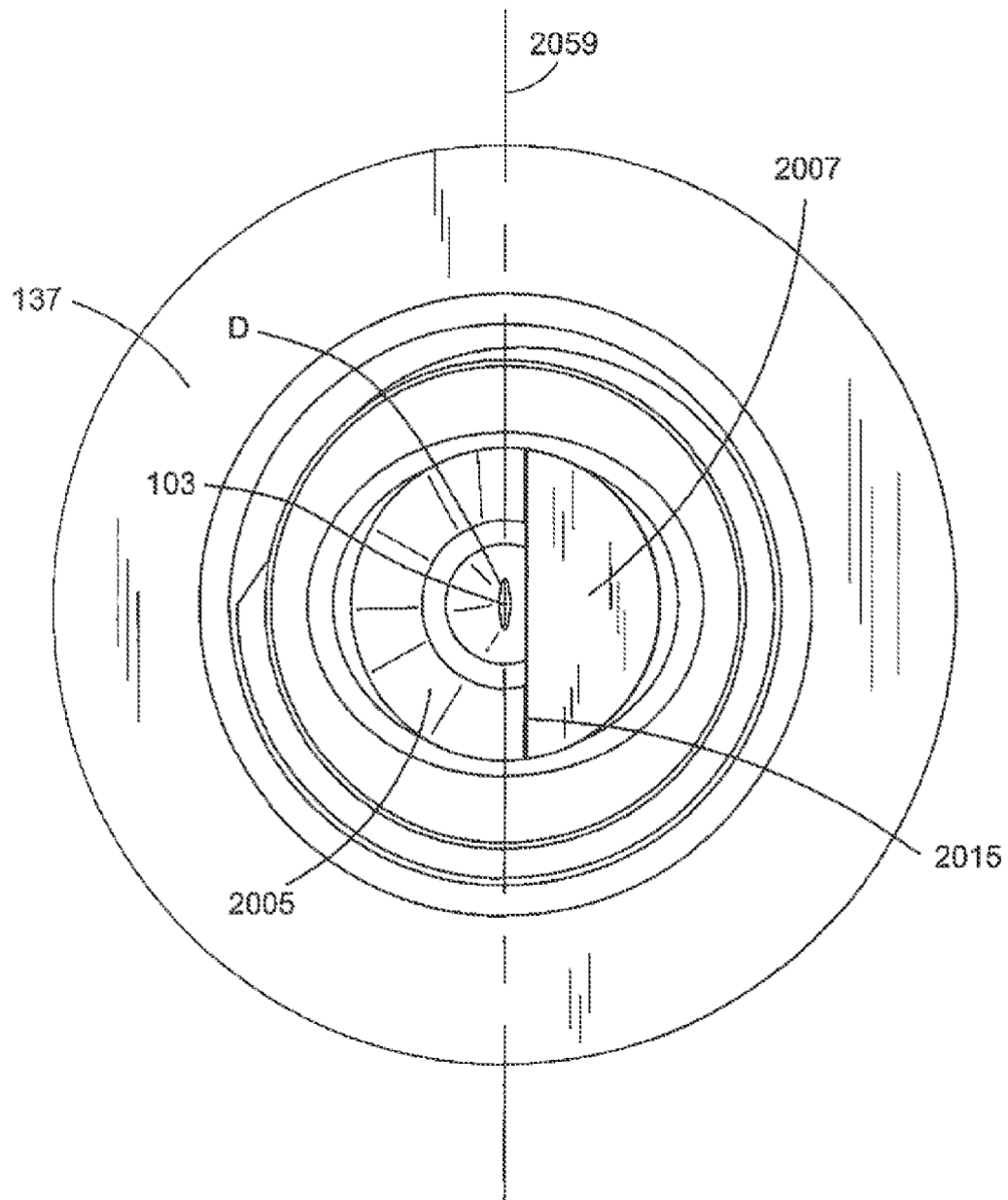
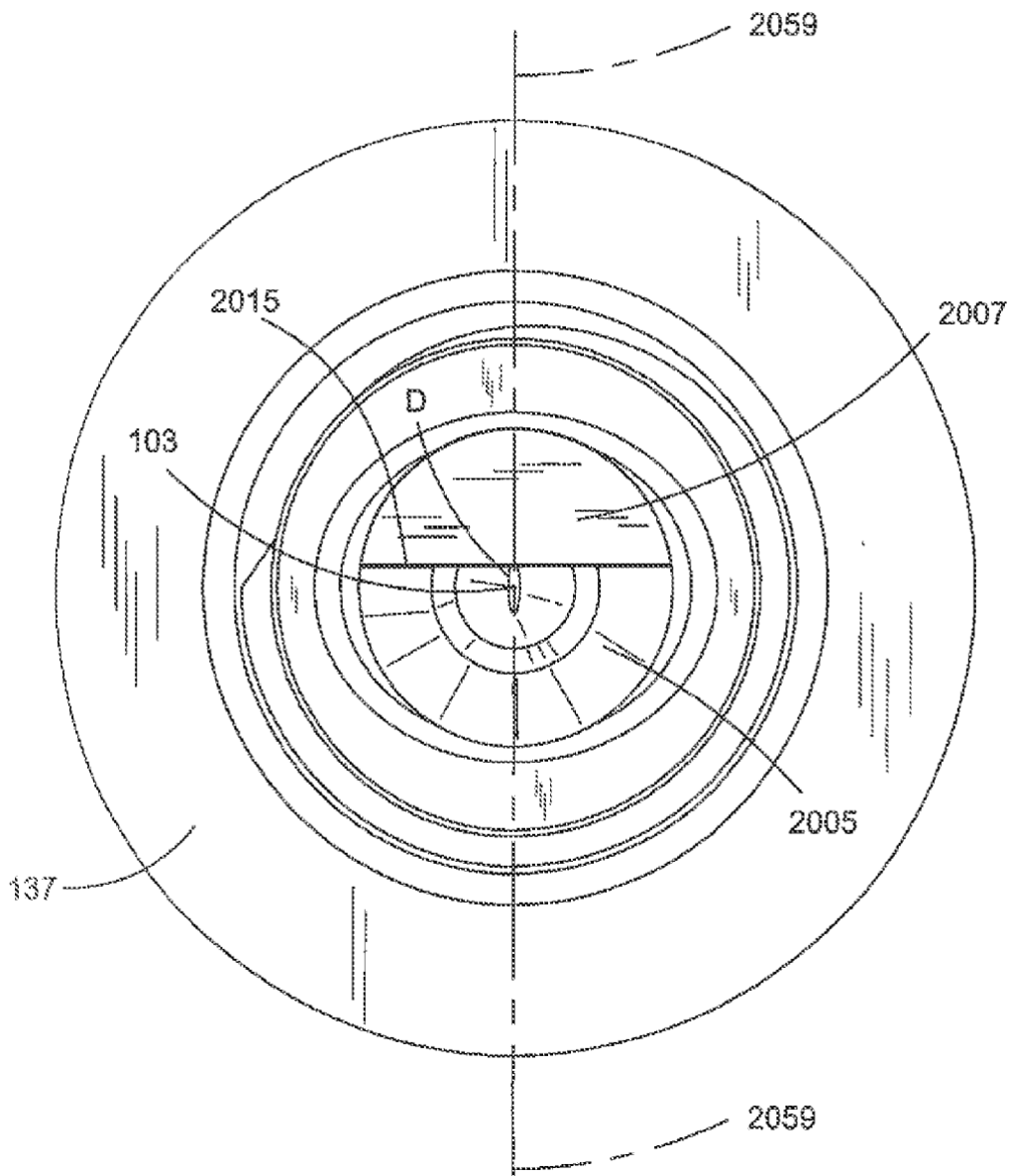
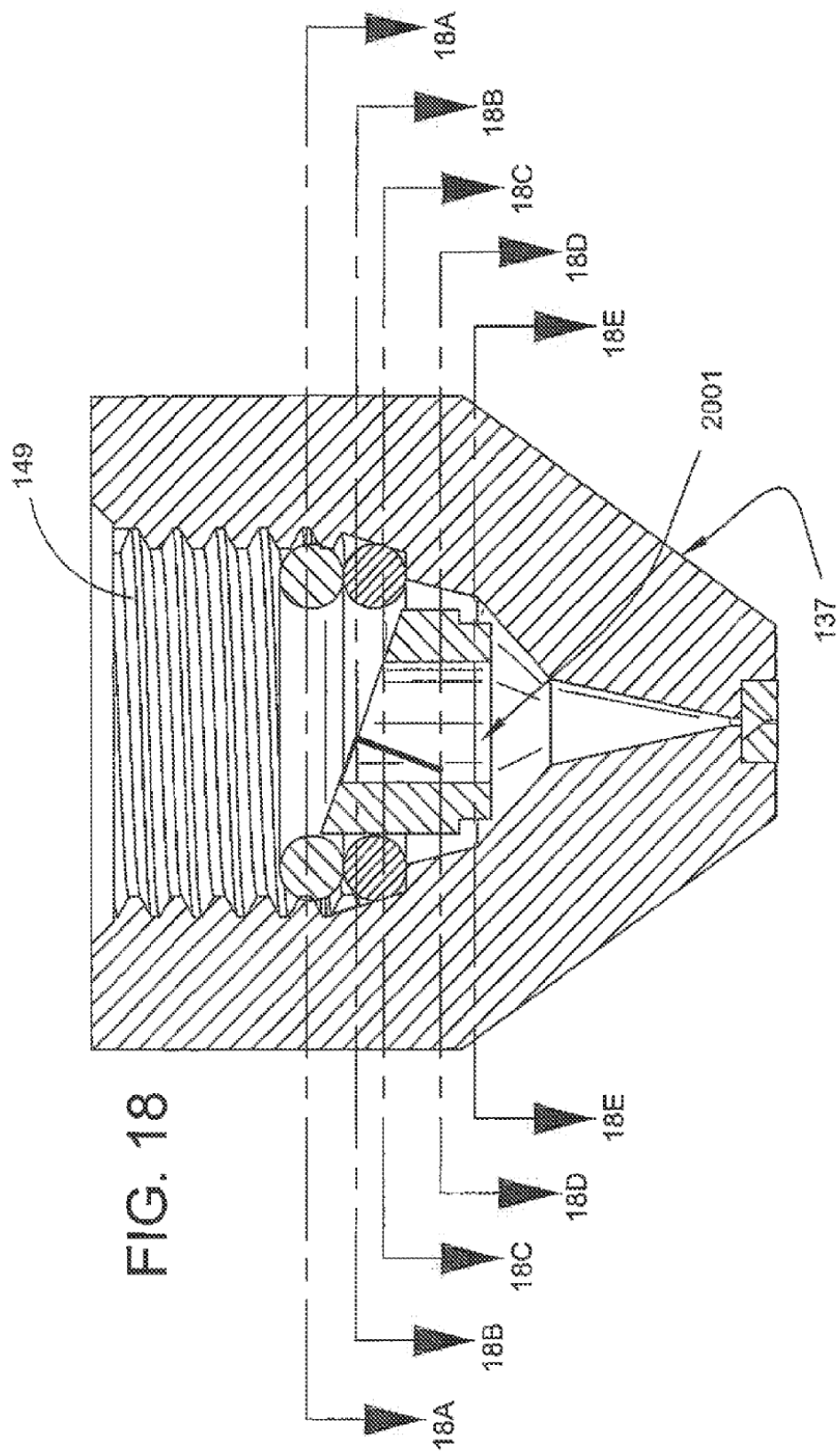


FIG. 17





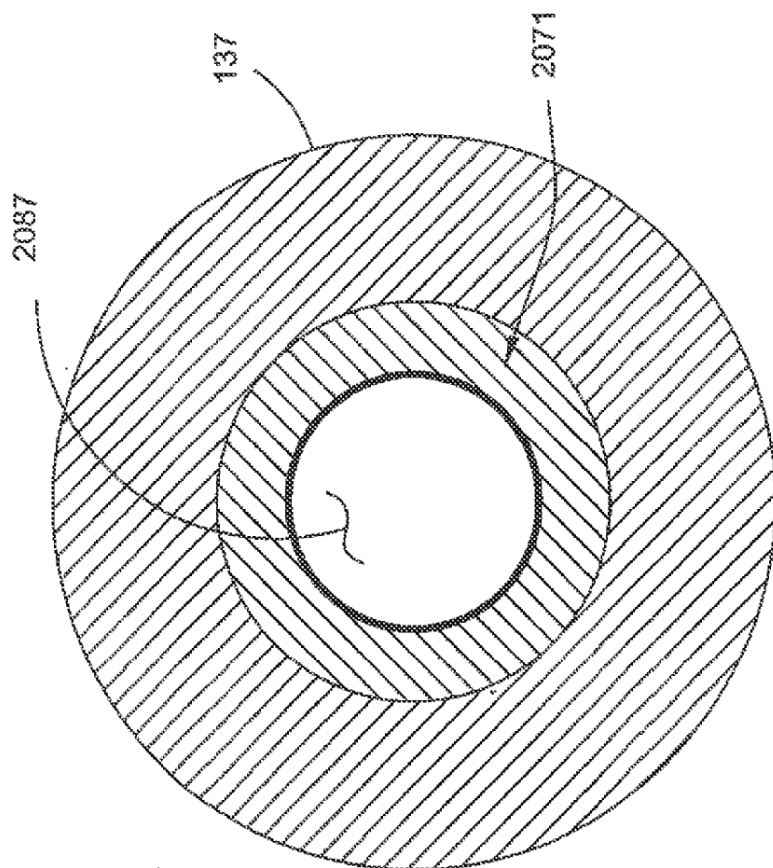
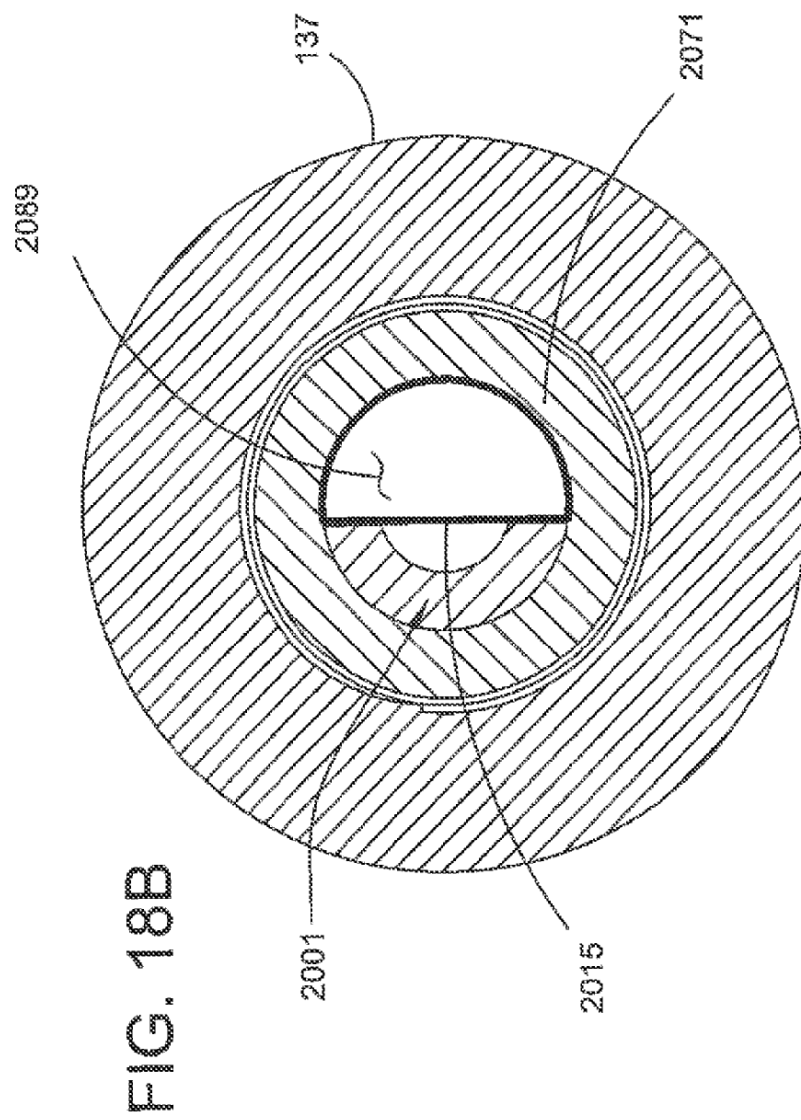
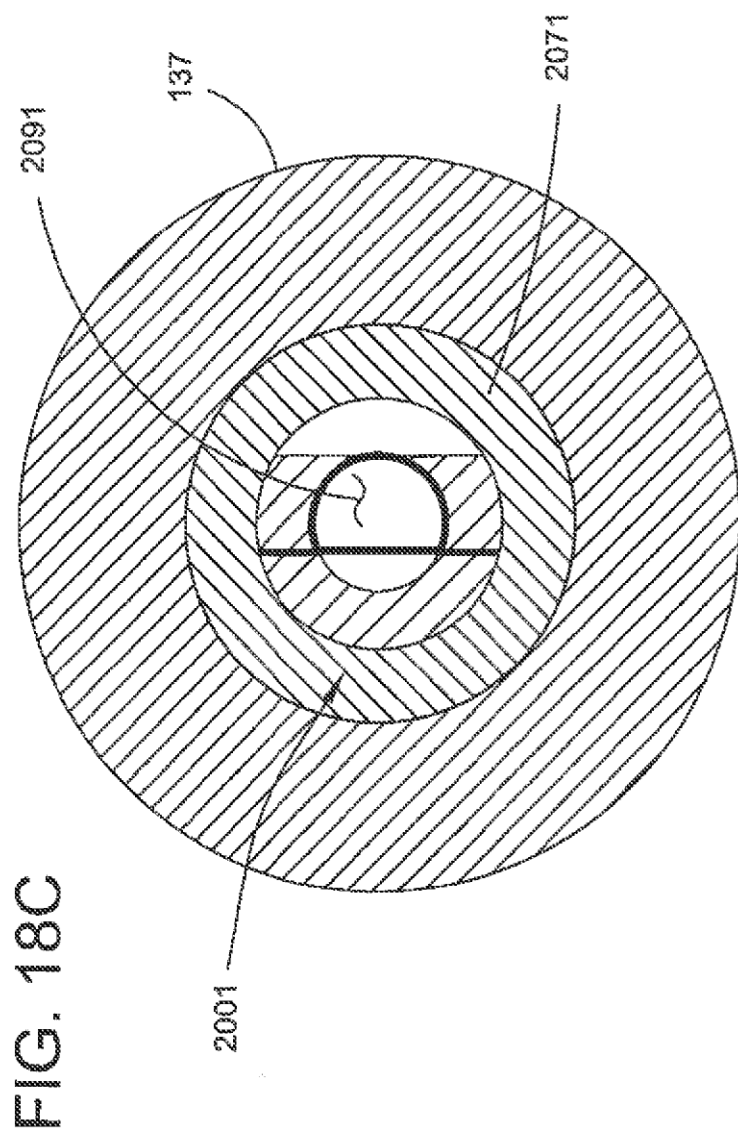
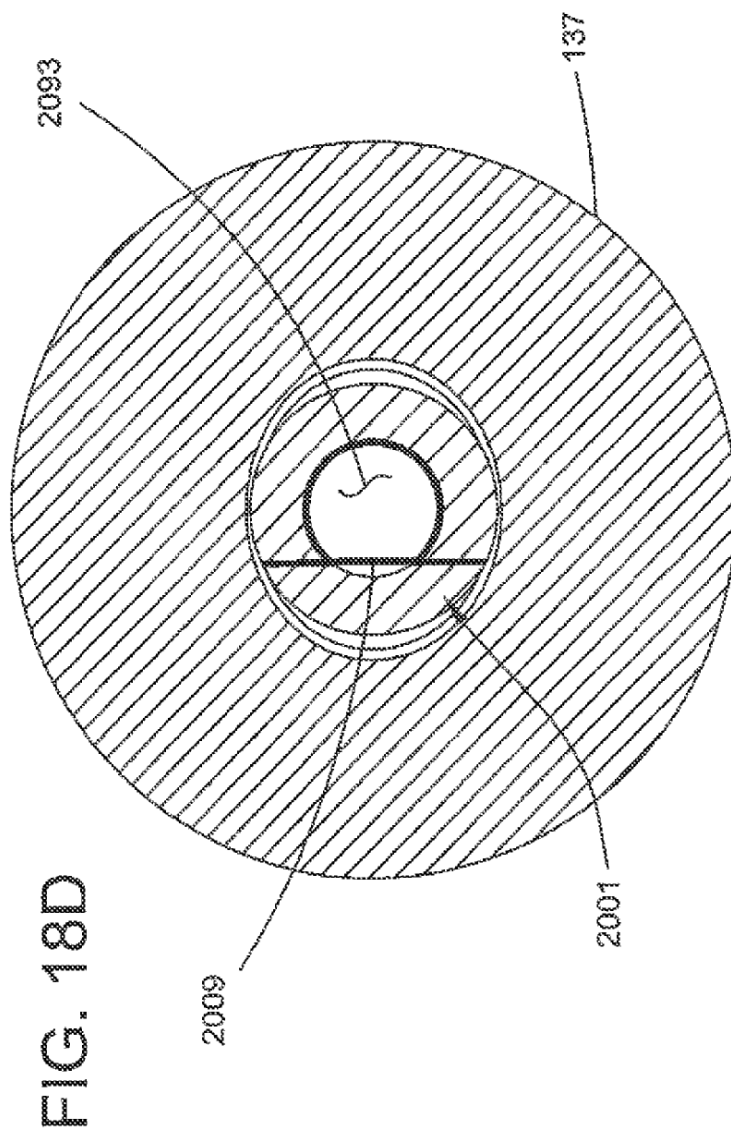
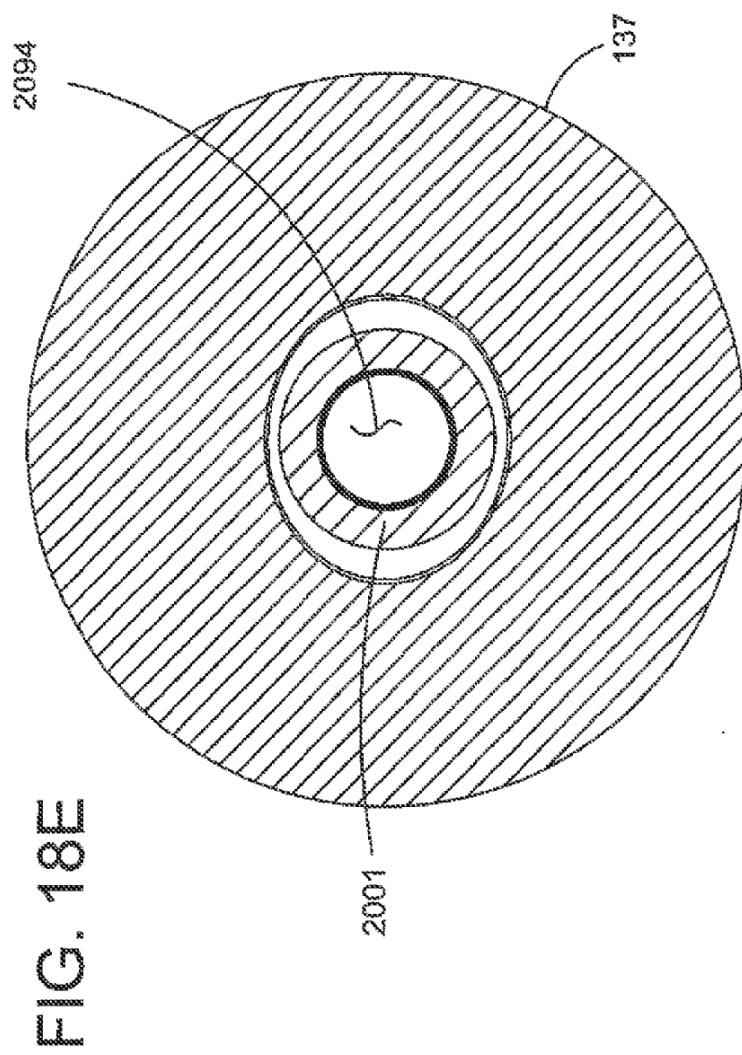


FIG. 18A









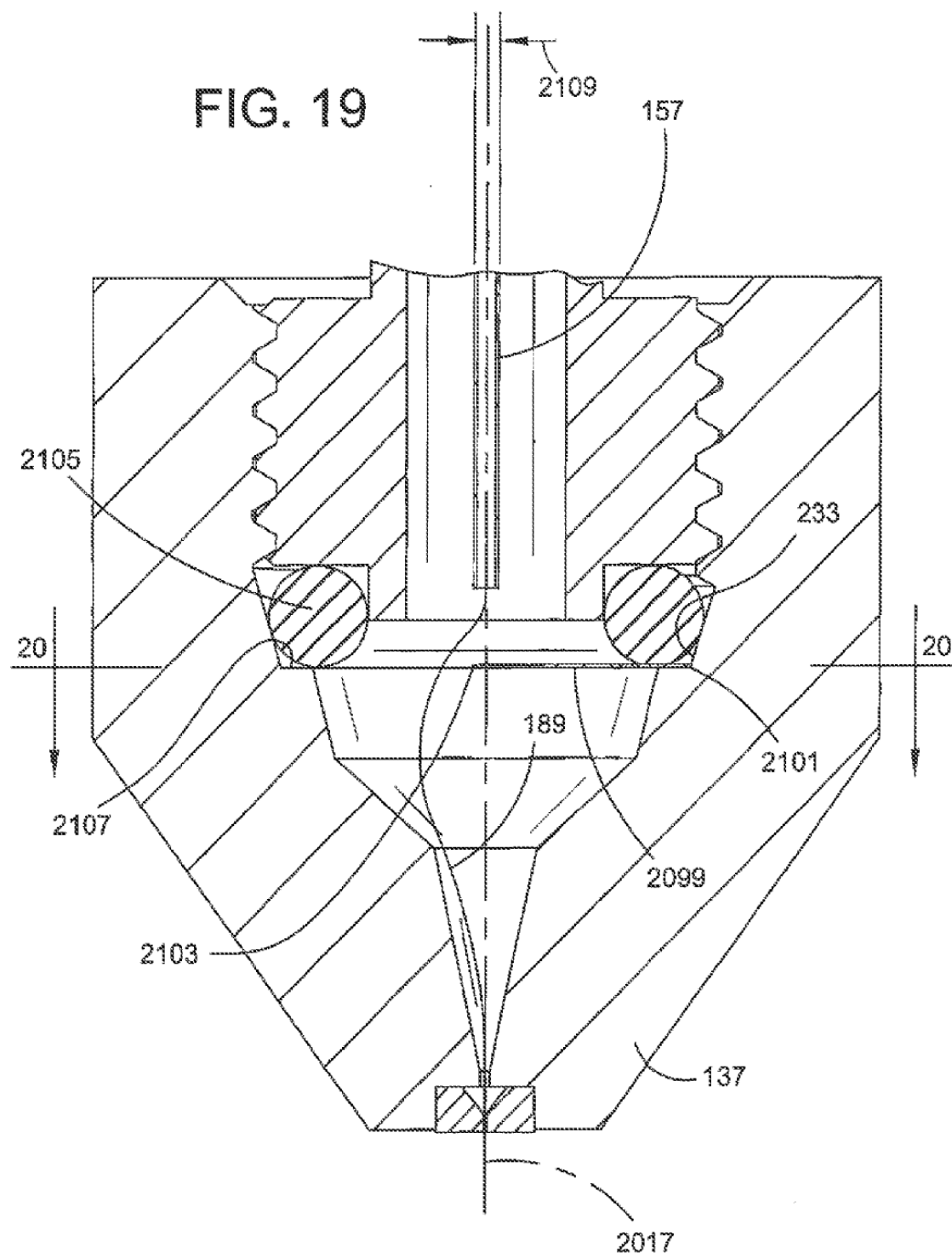


FIG. 20

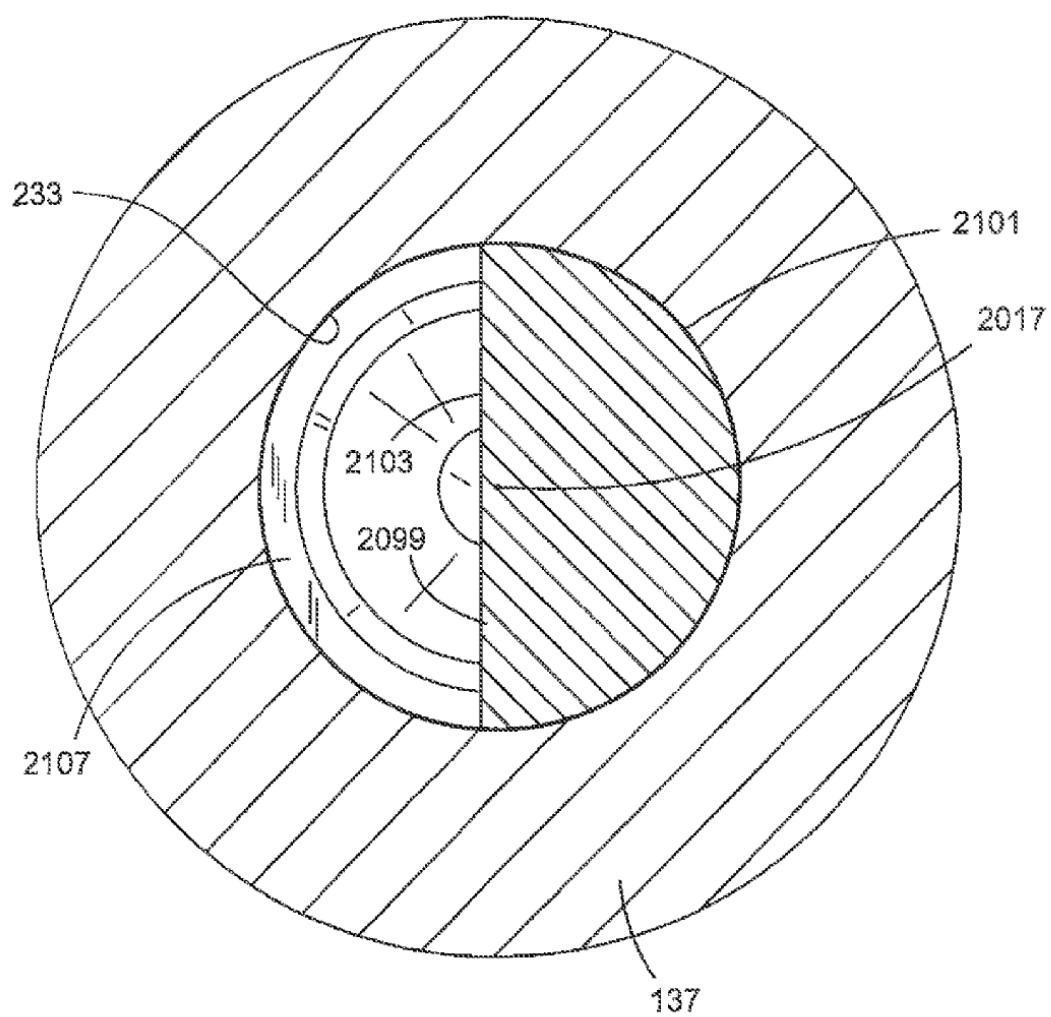
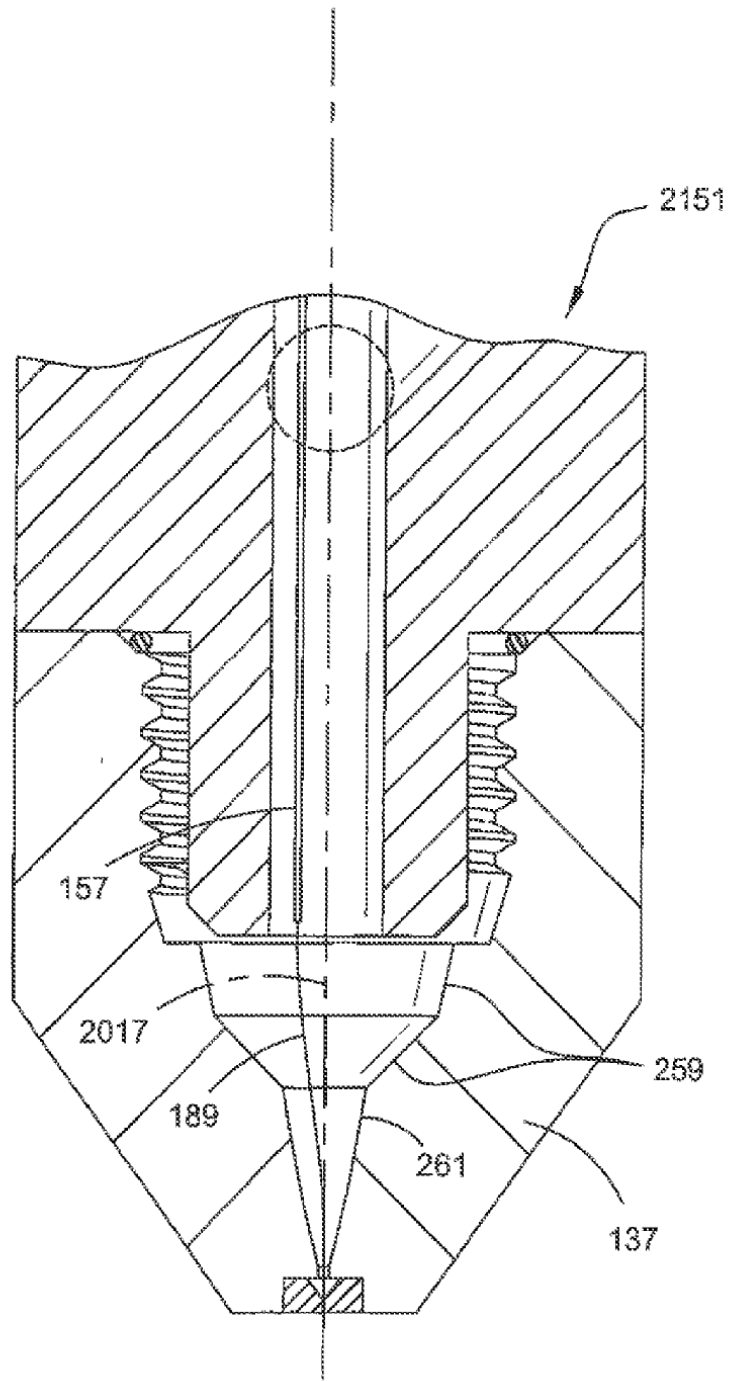


FIG. 21



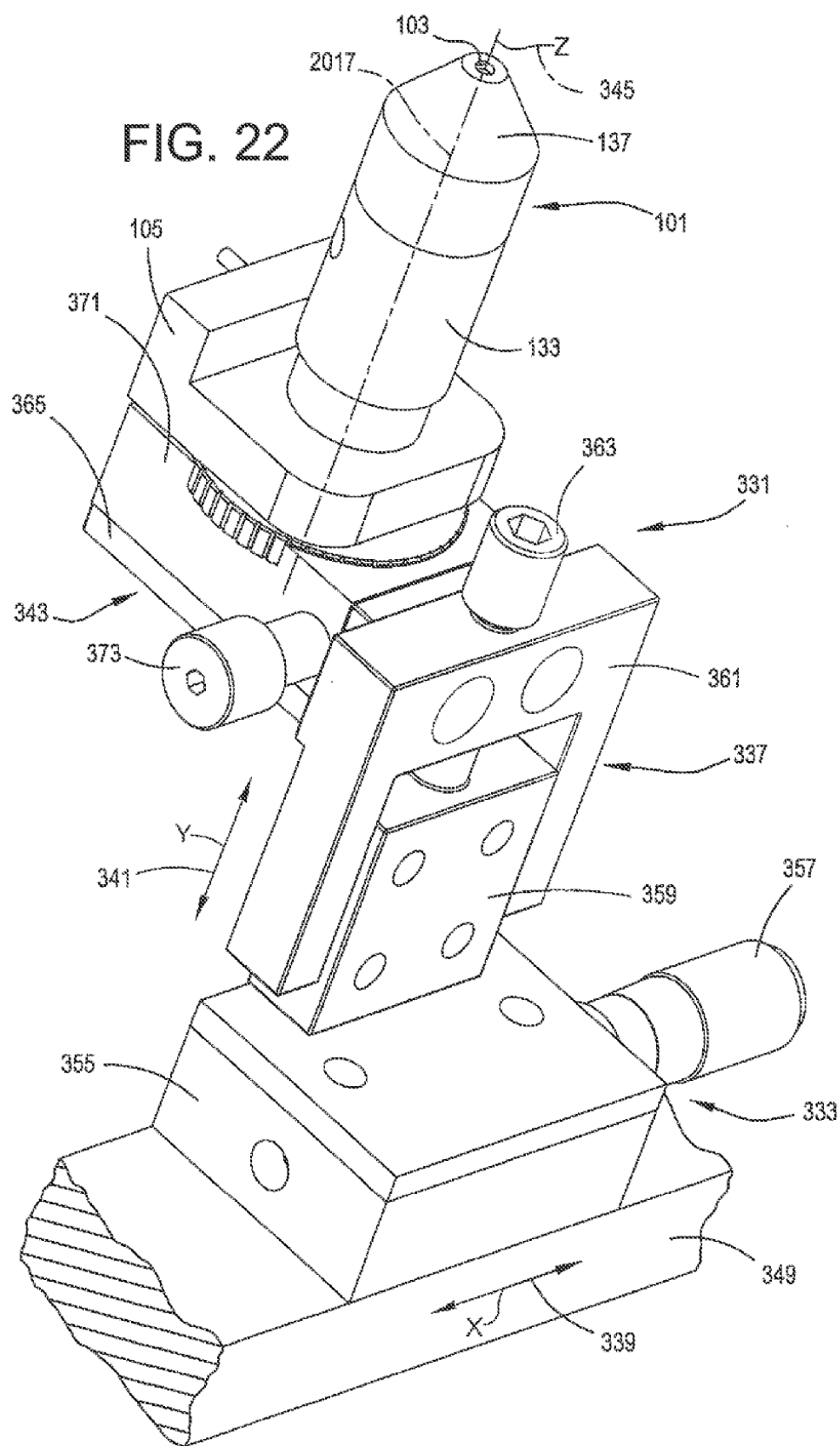
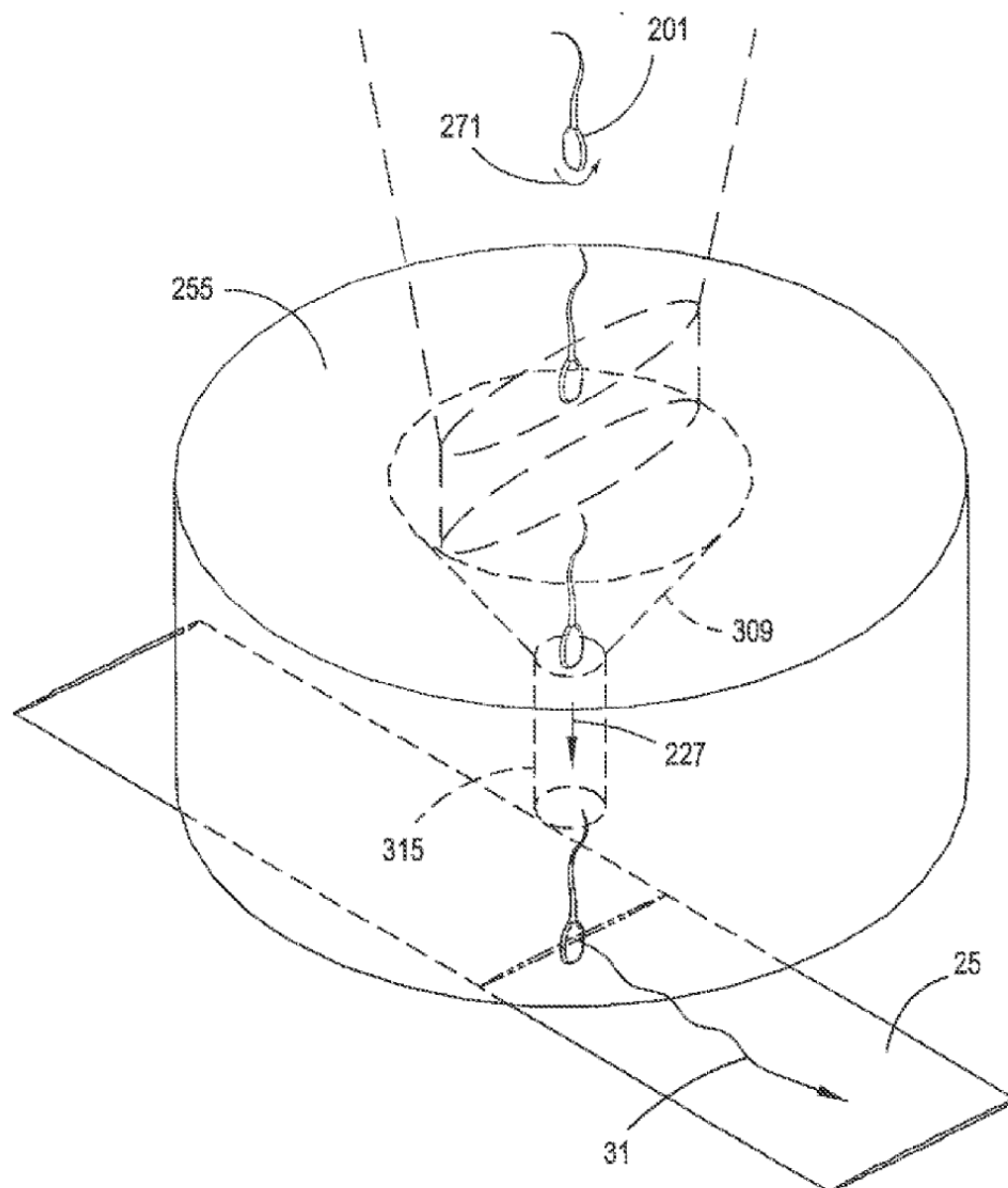
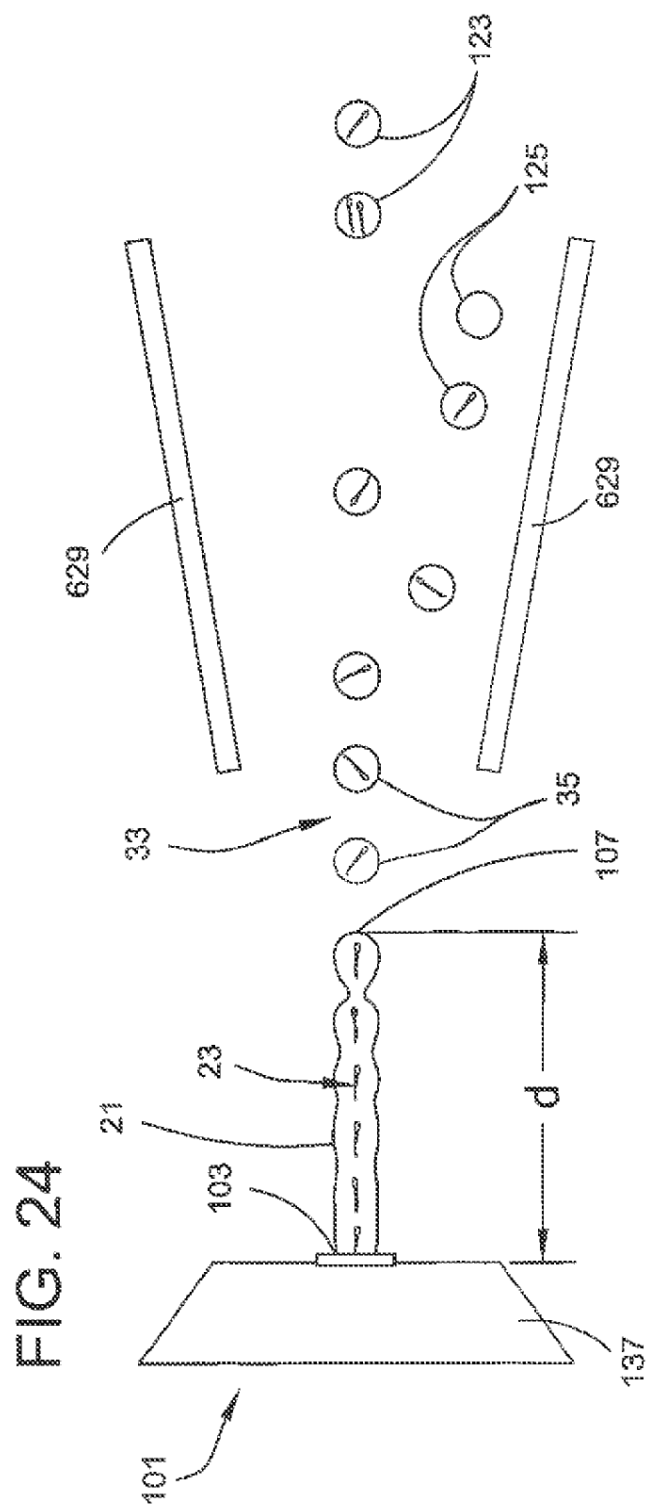


FIG. 23





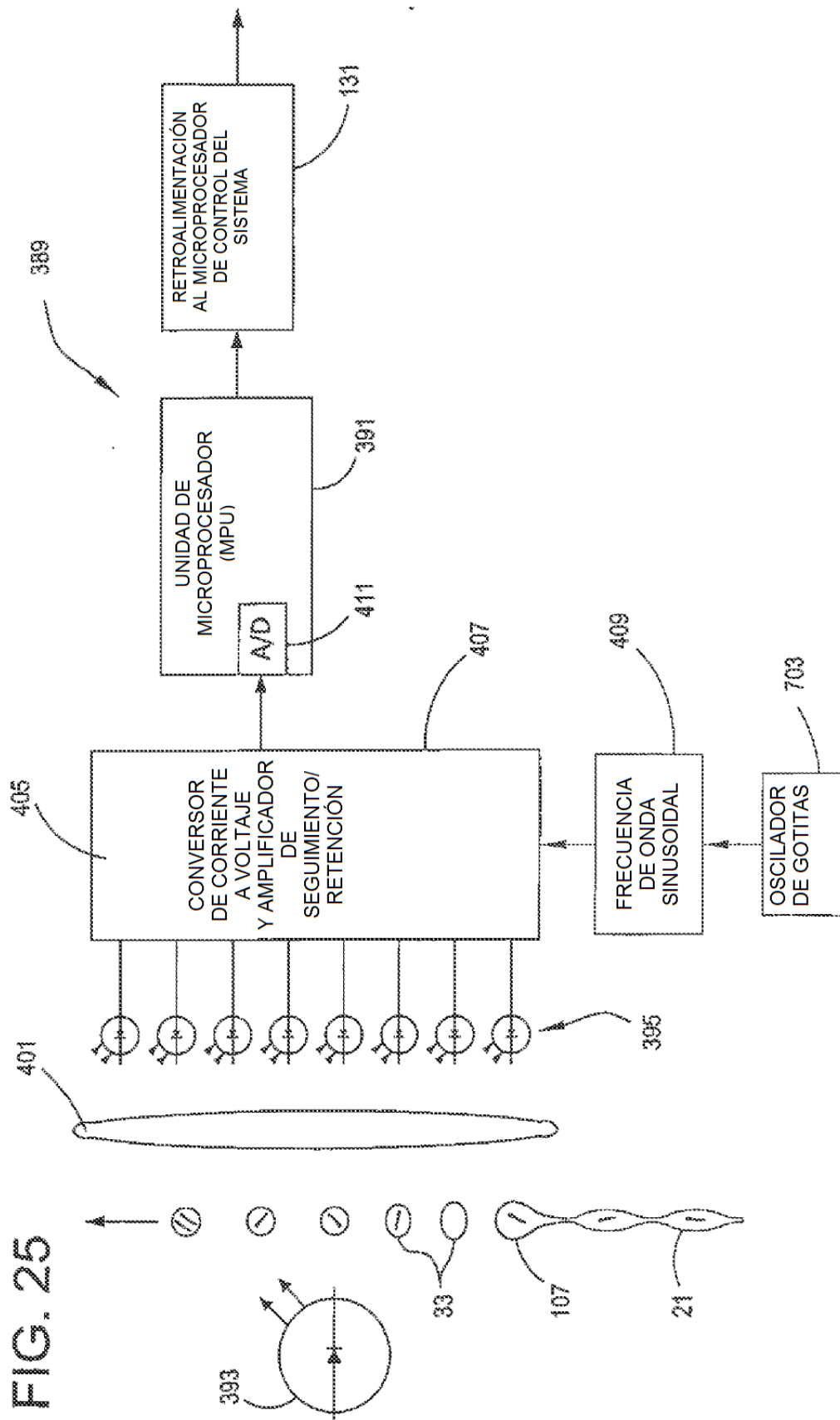
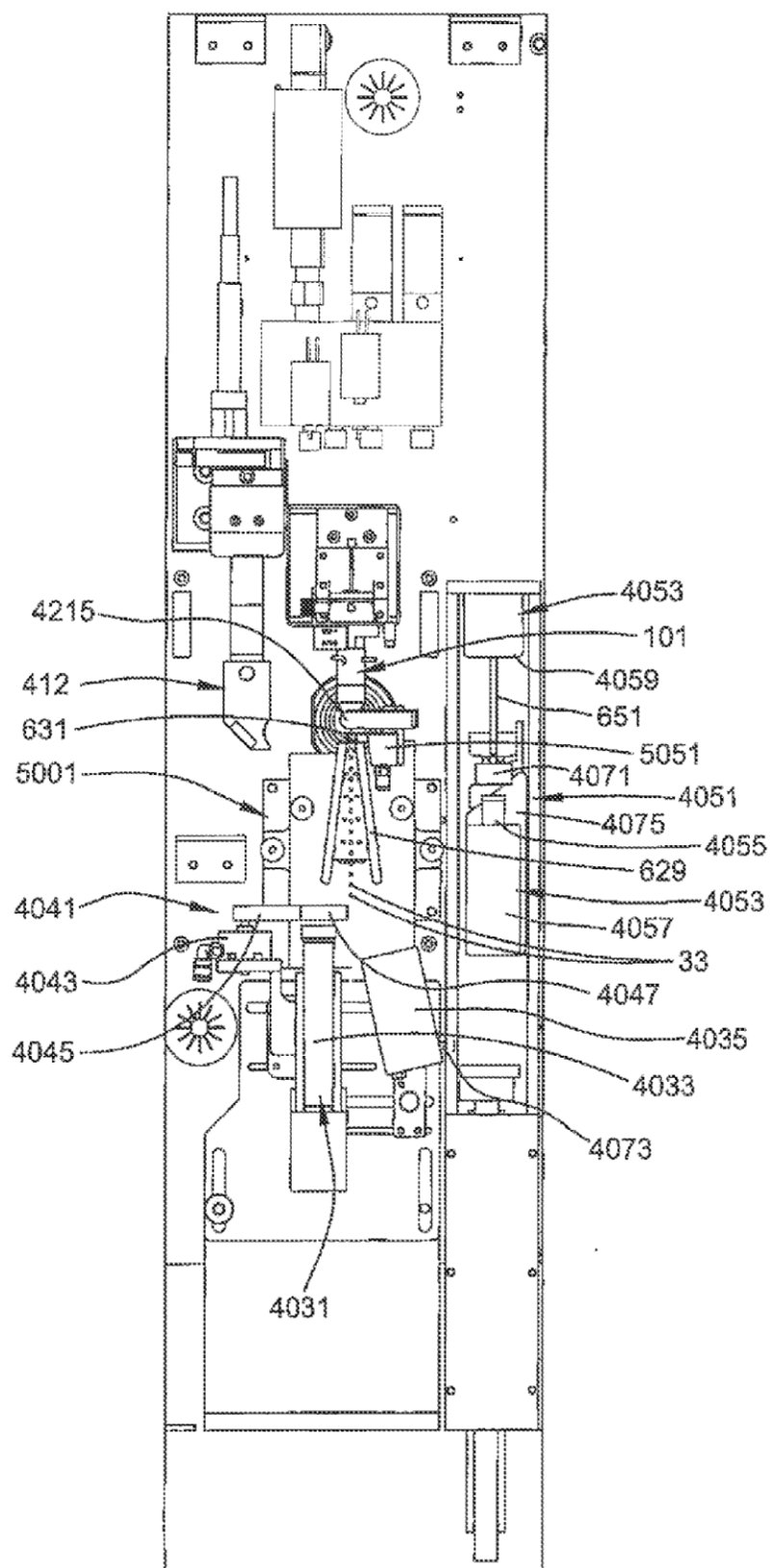


FIG. 26



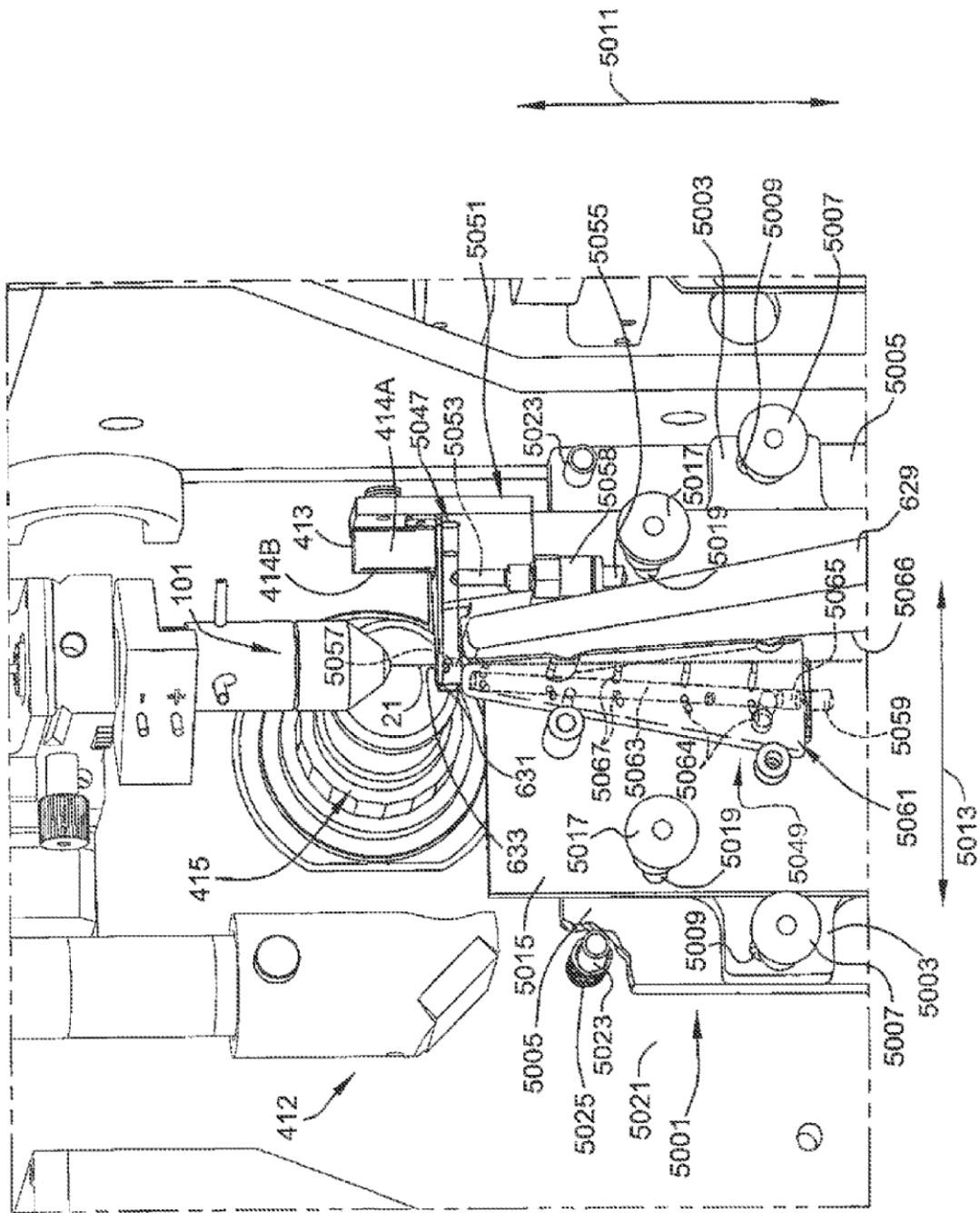


FIG. 27

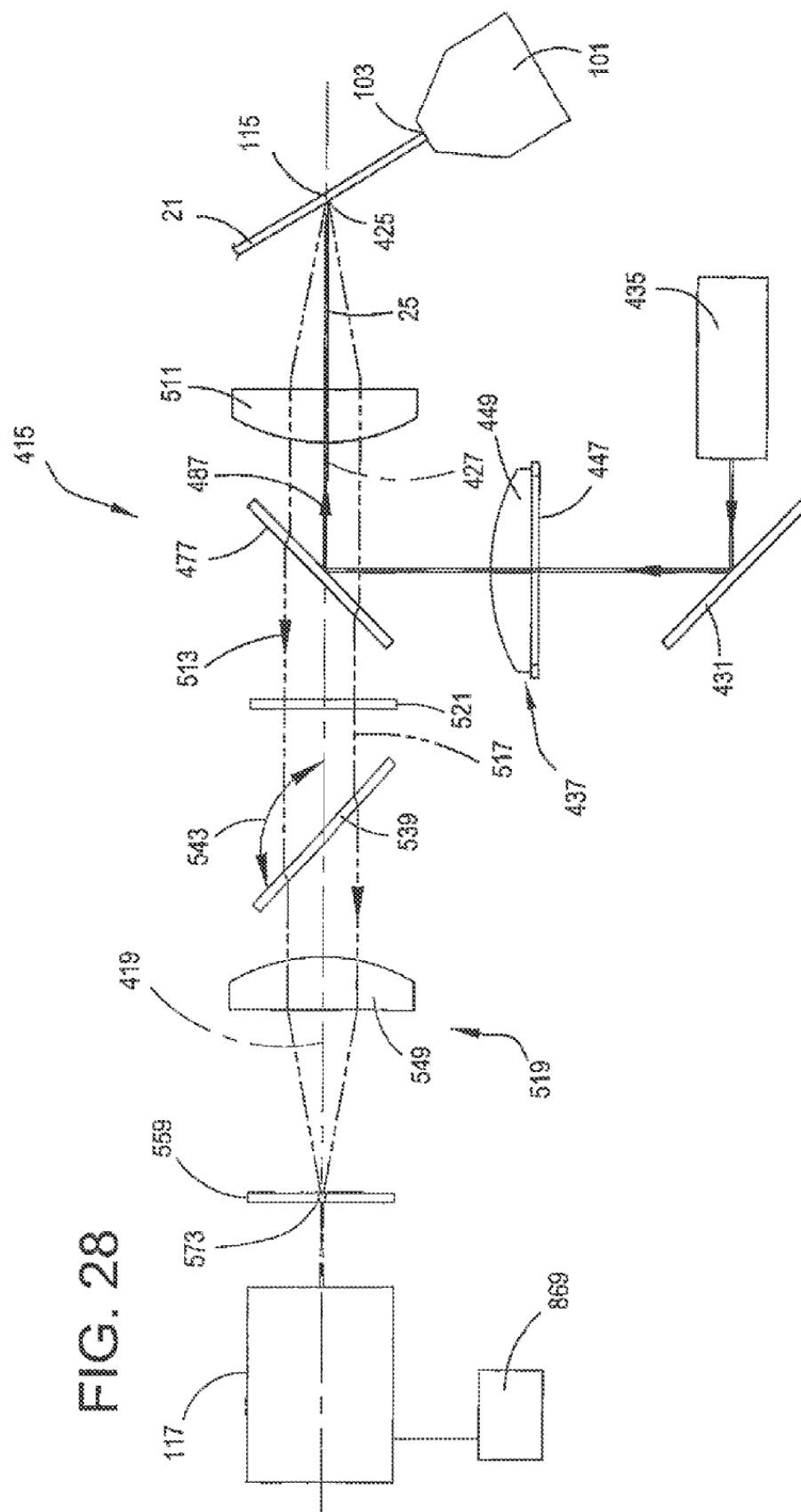


FIG. 29

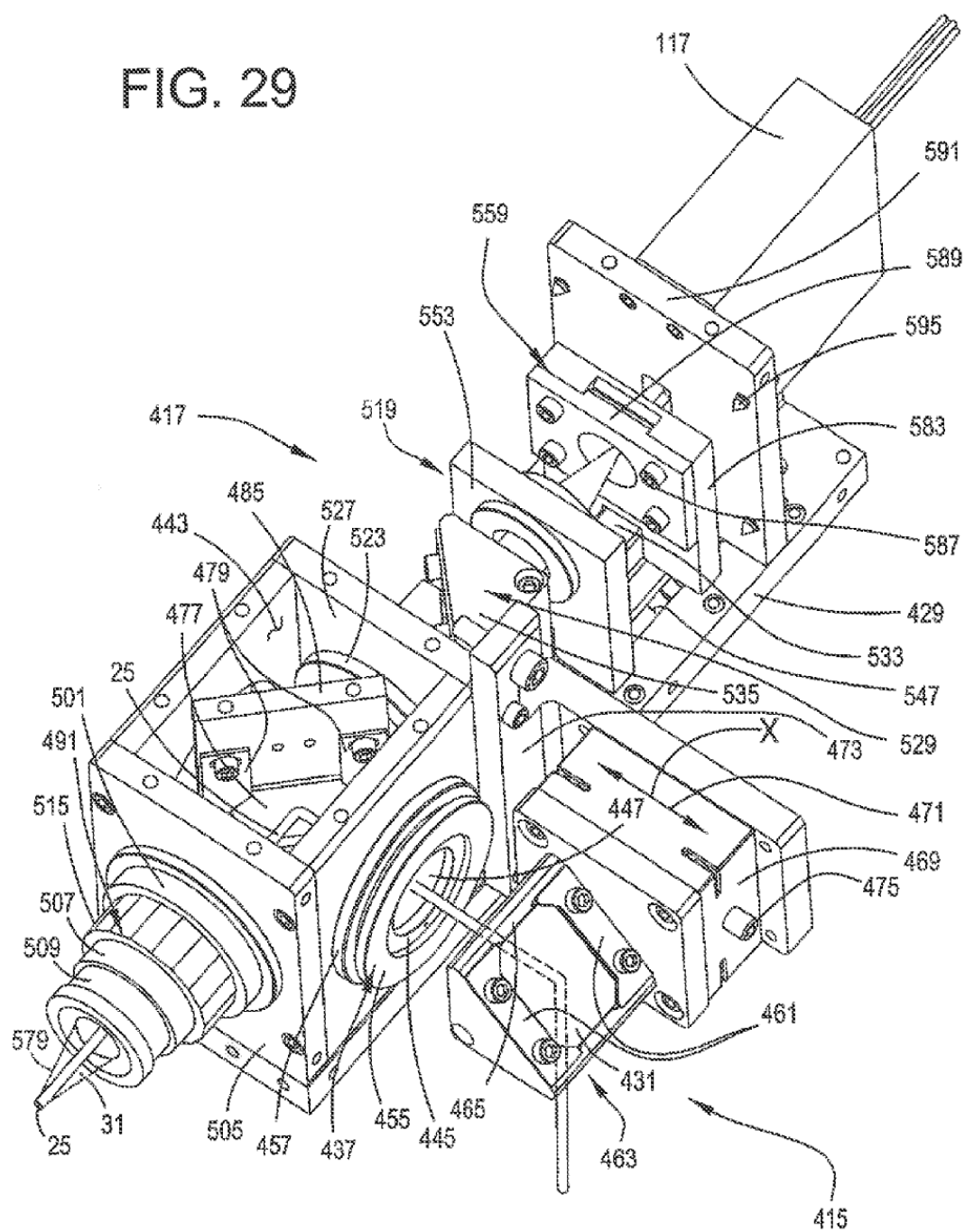
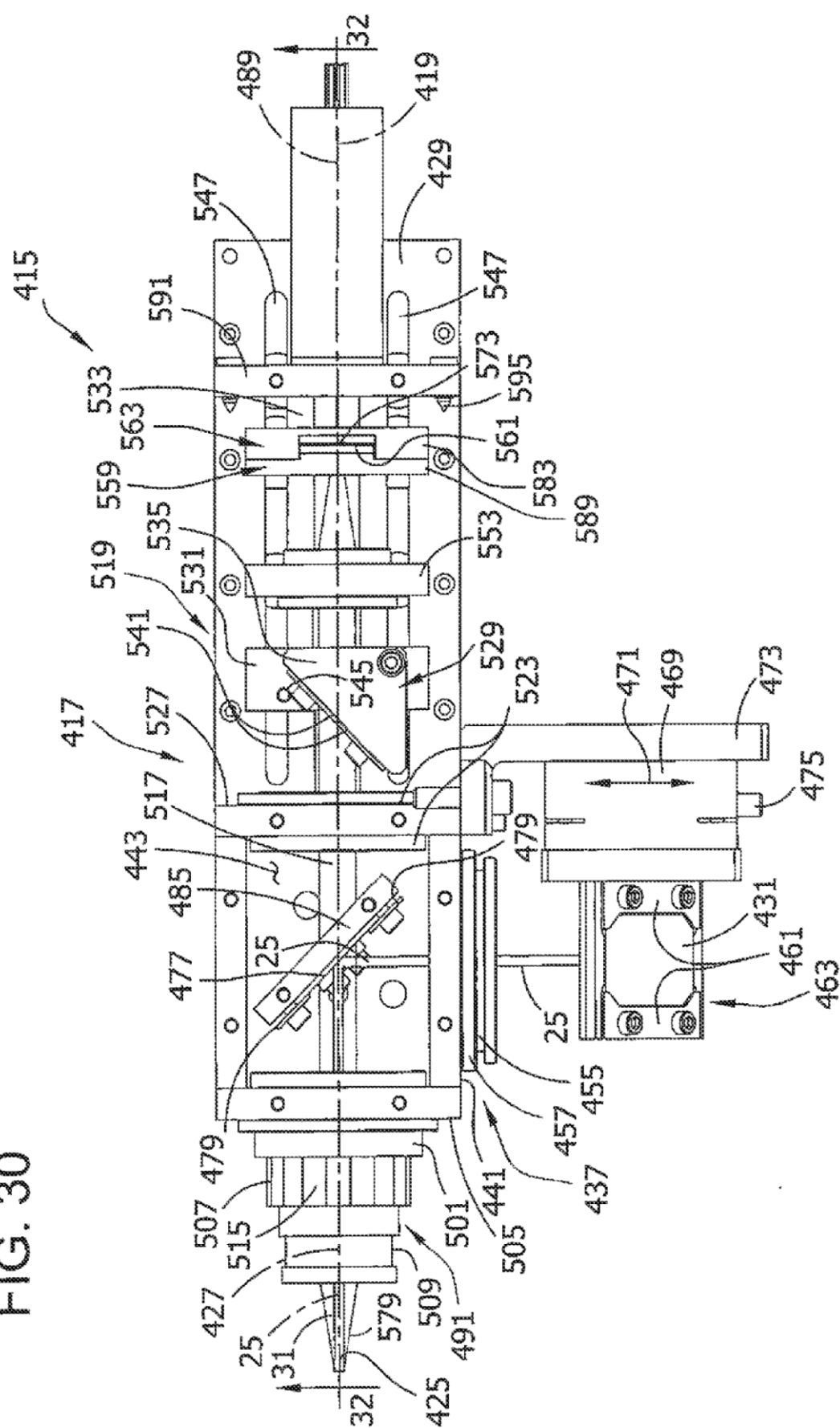
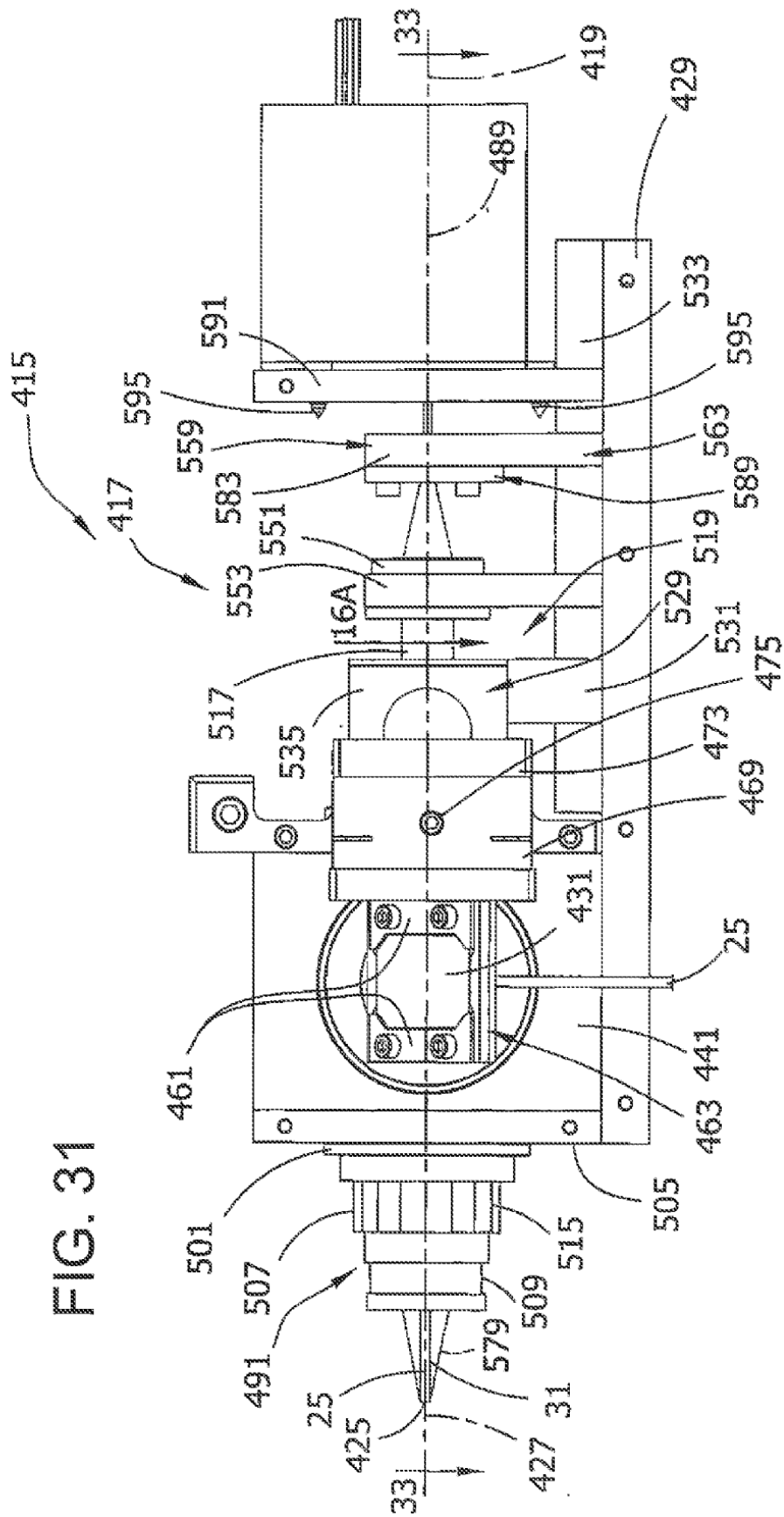
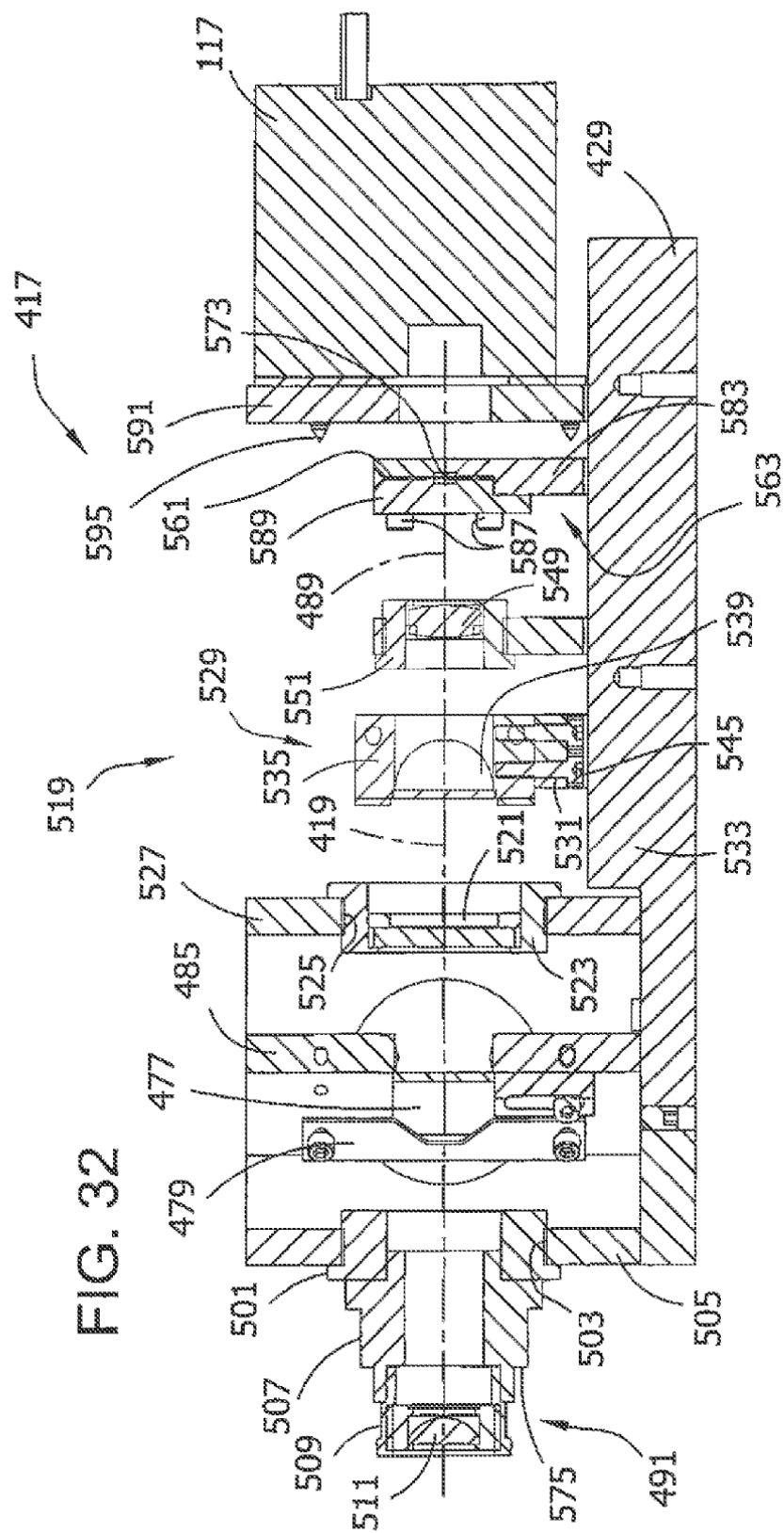
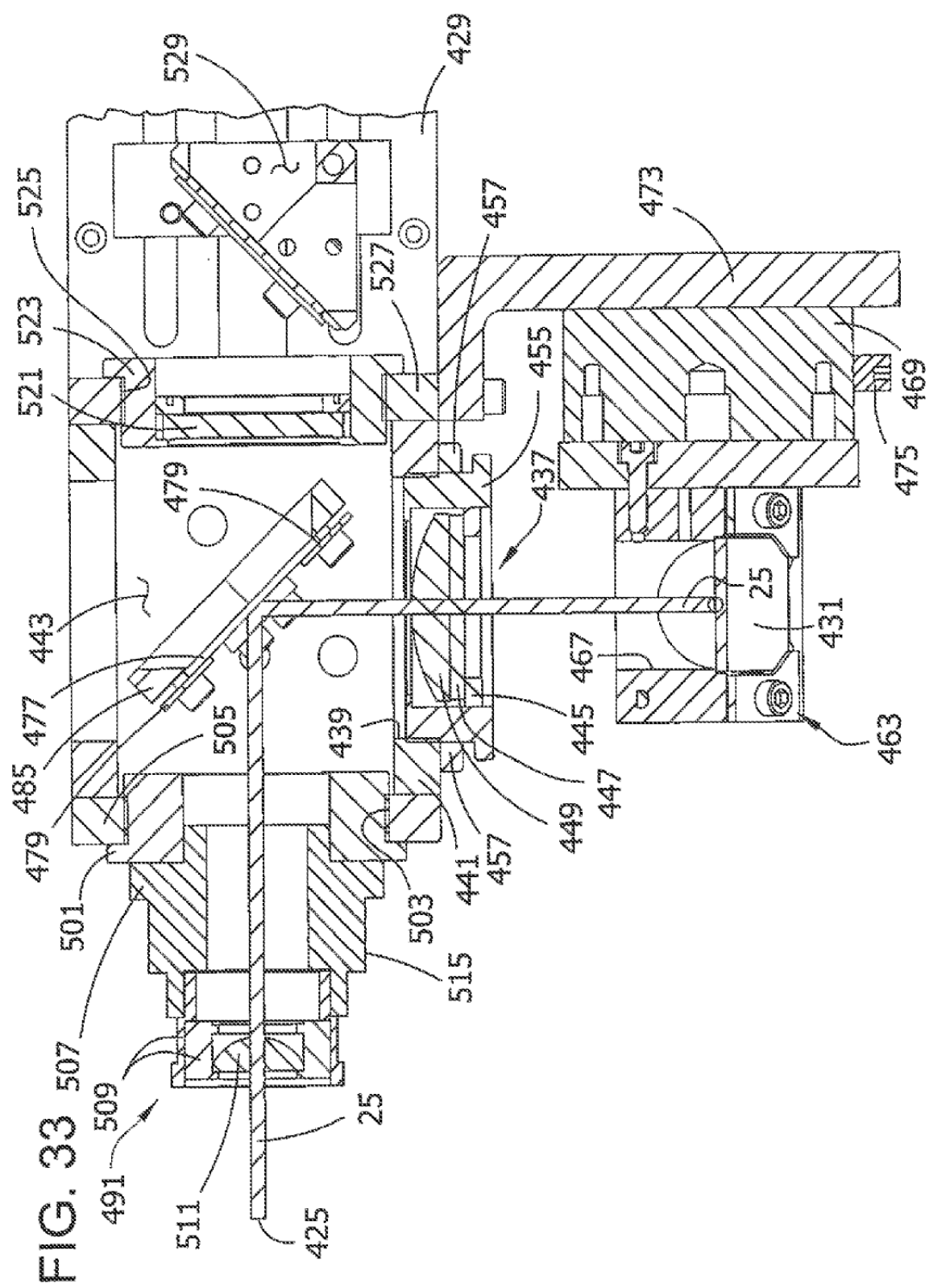


FIG. 30









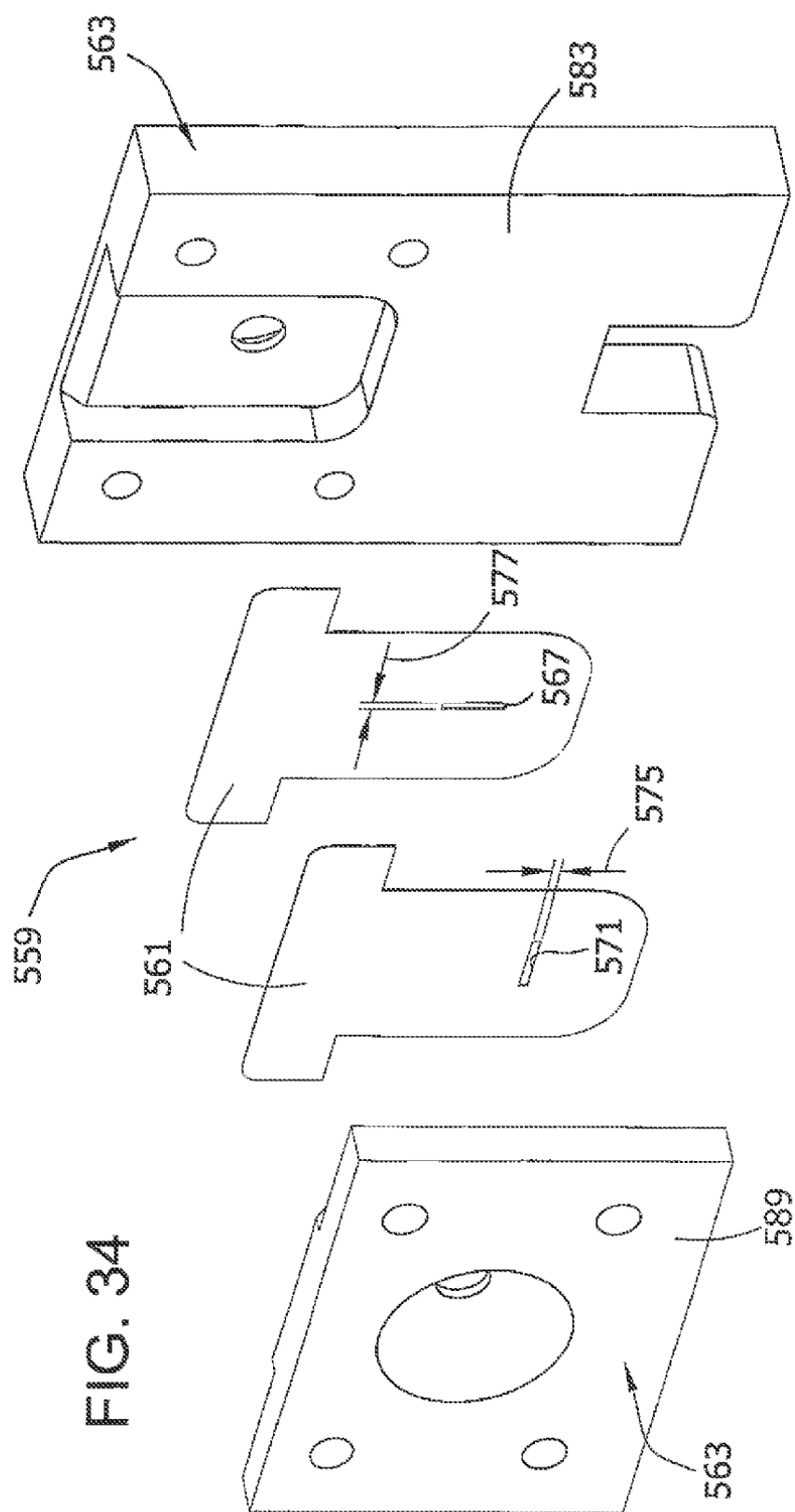


FIG. 35

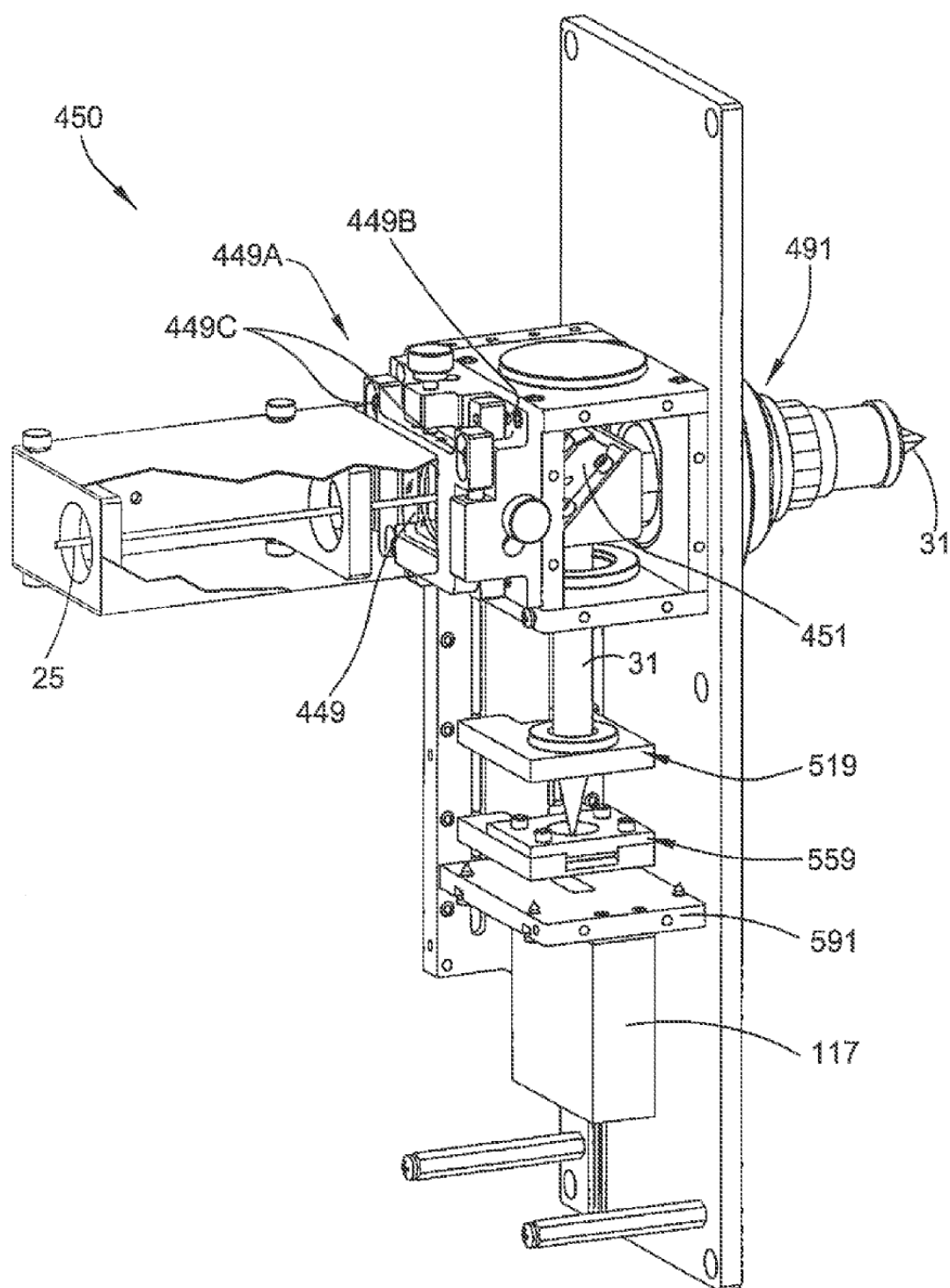


FIG. 36

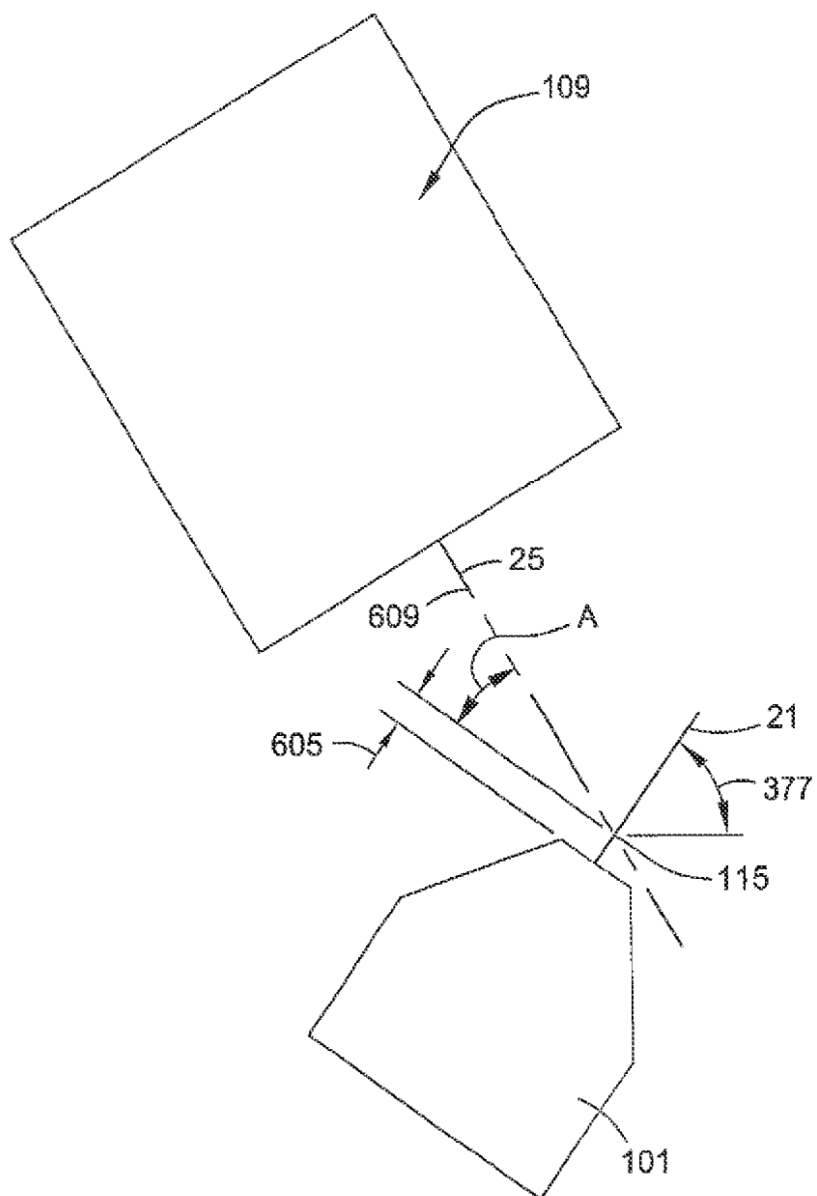


FIG. 37

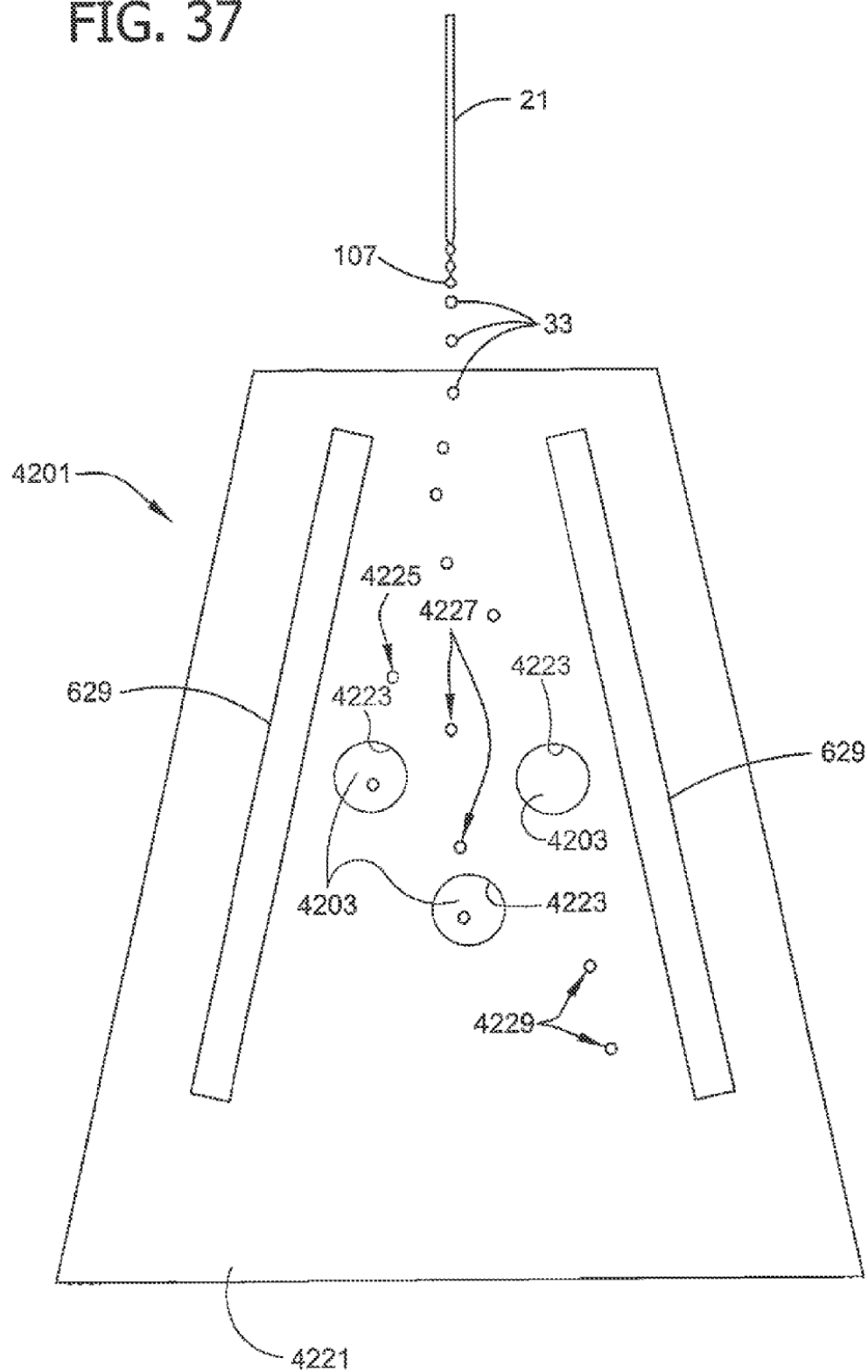


FIG. 38

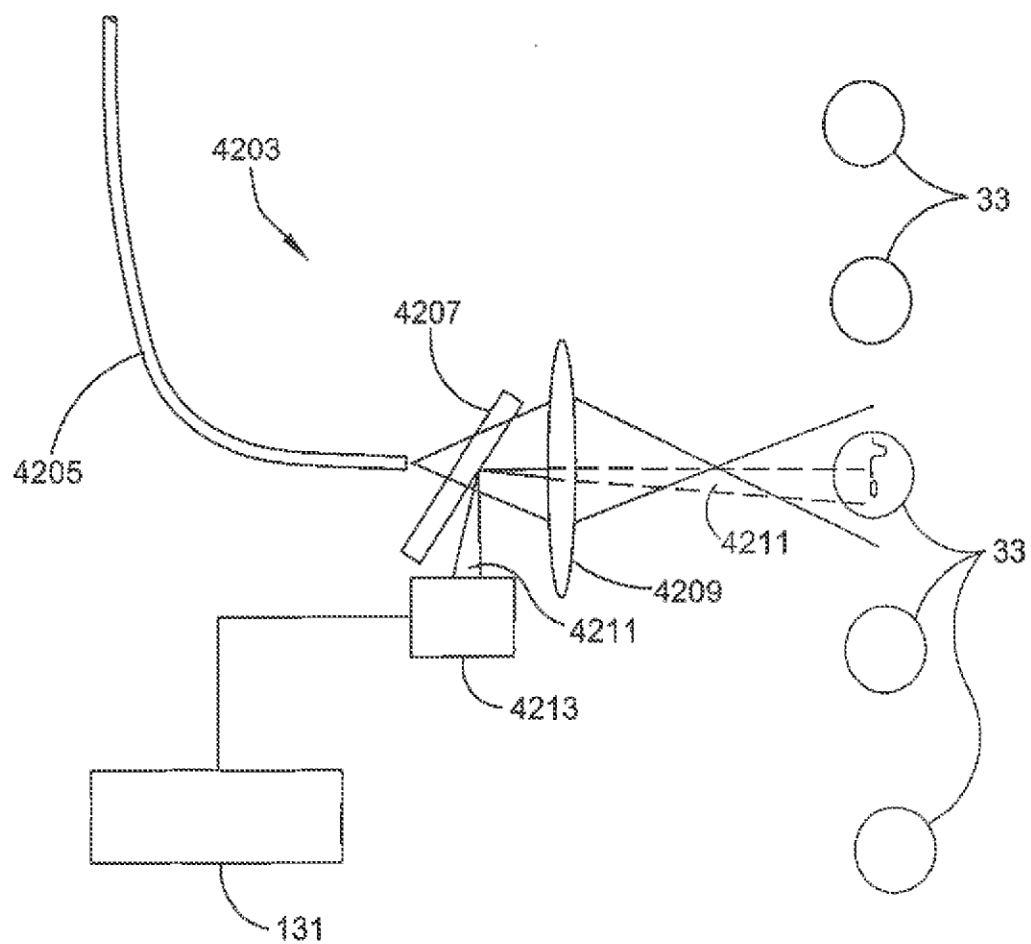
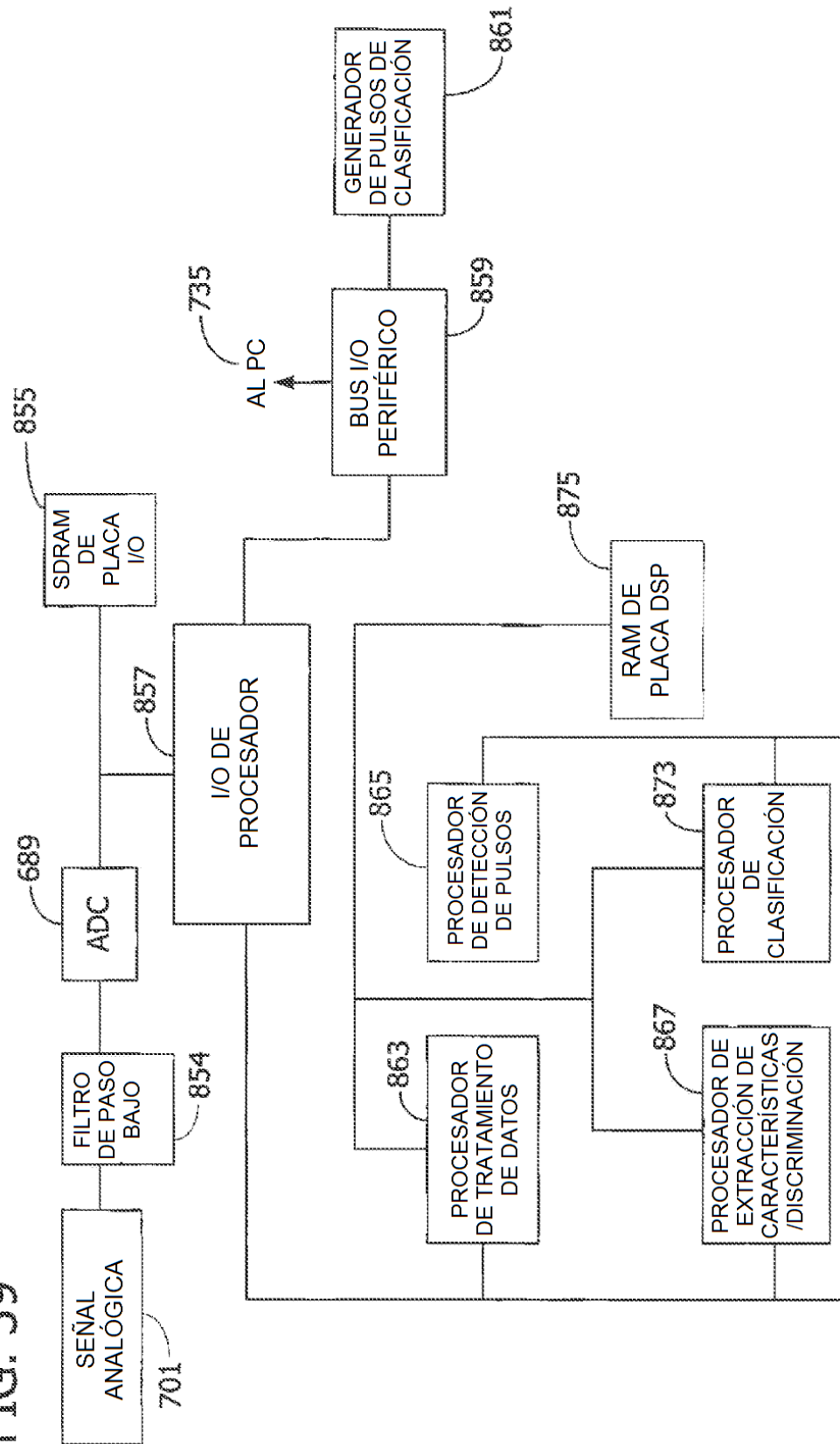
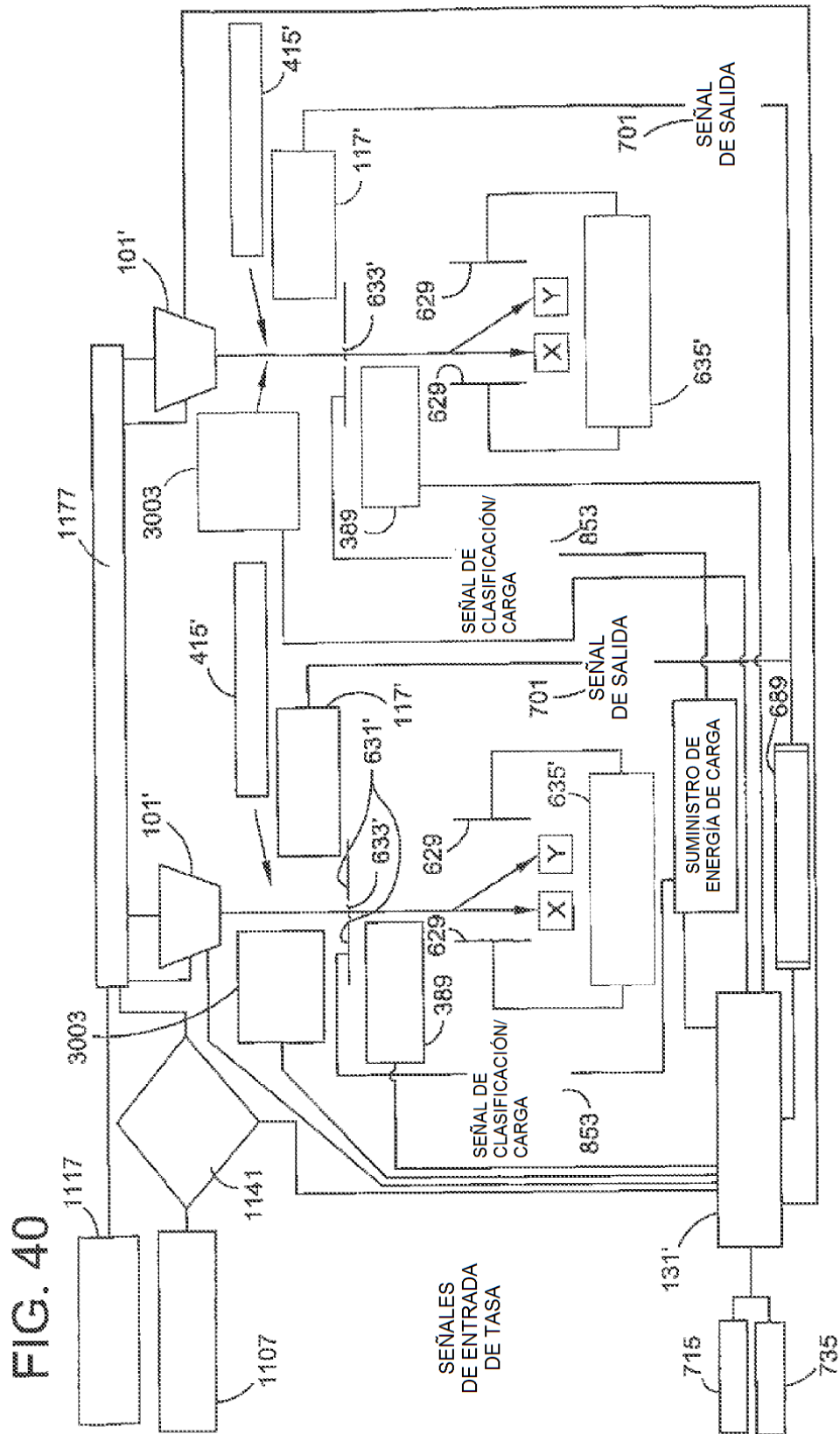


FIG. 39





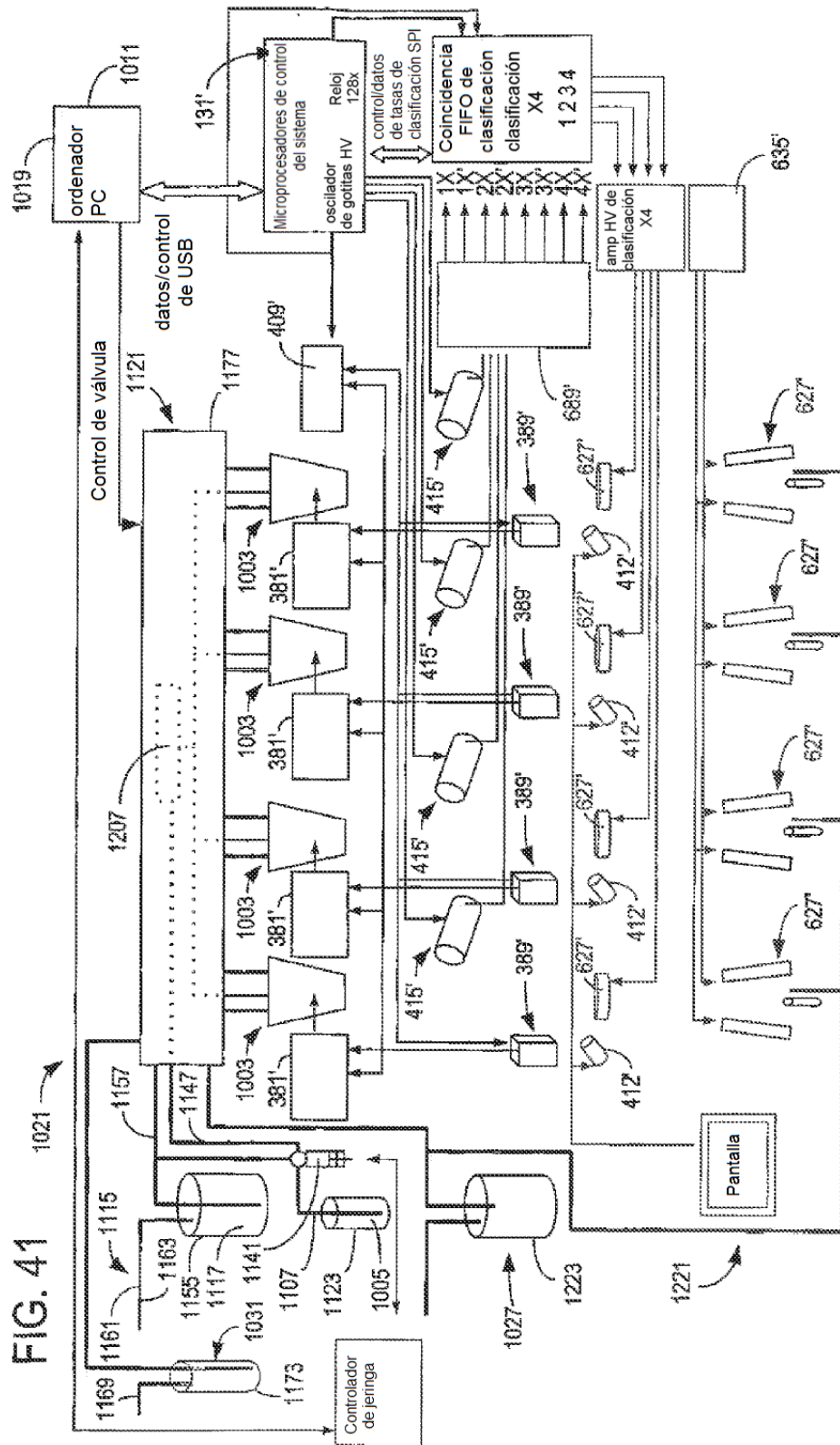


FIG. 42

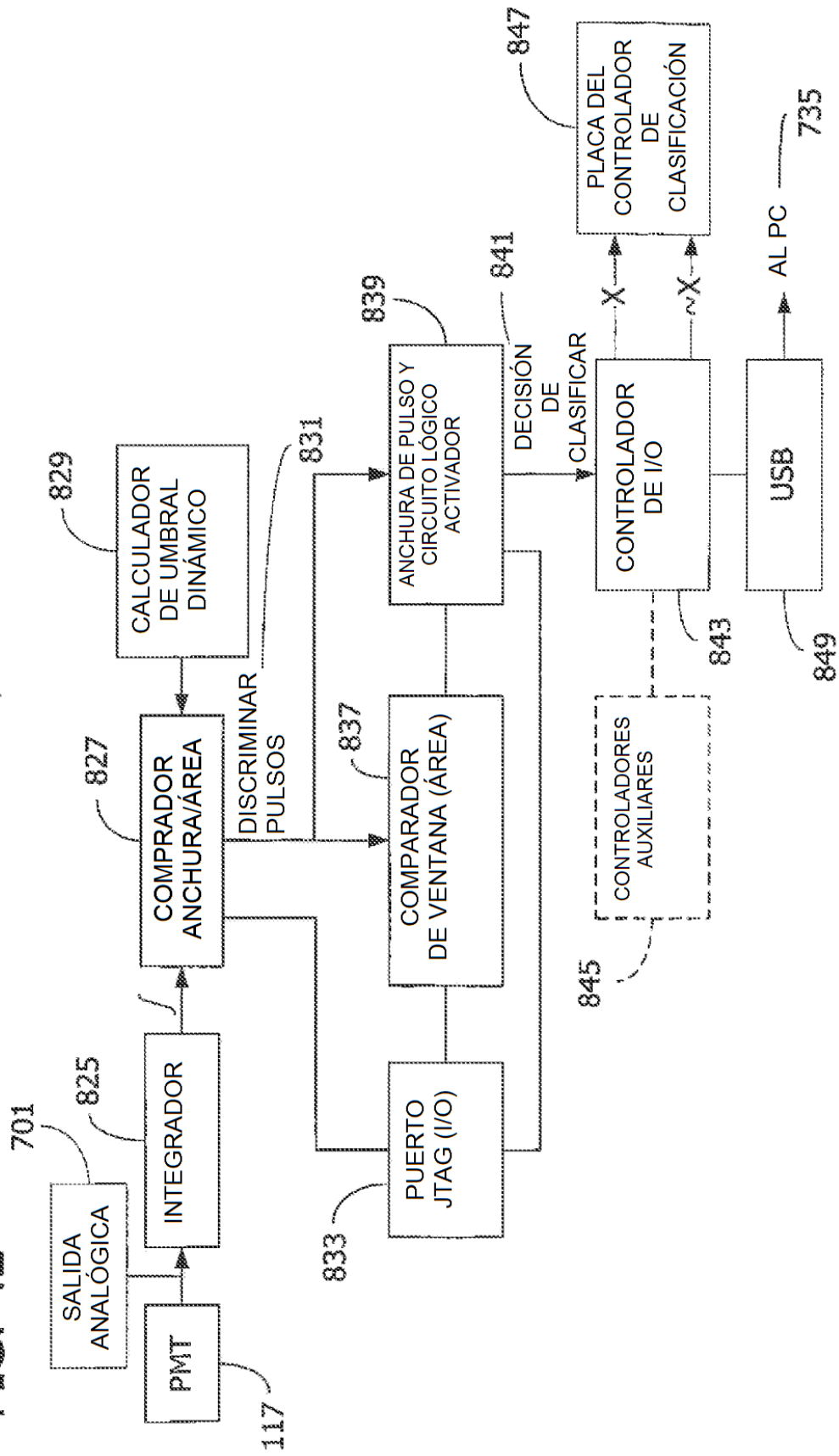


FIG. 43

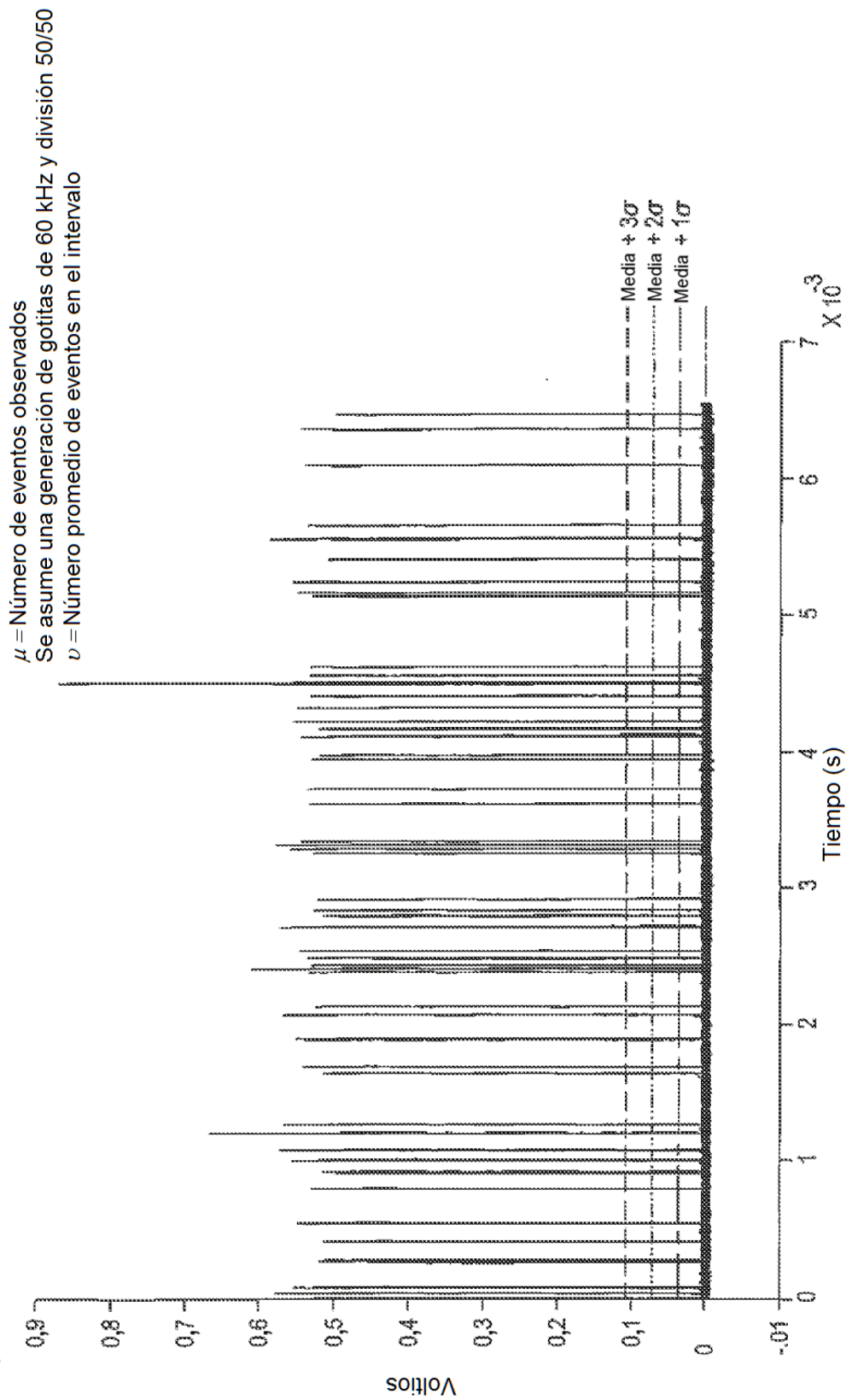
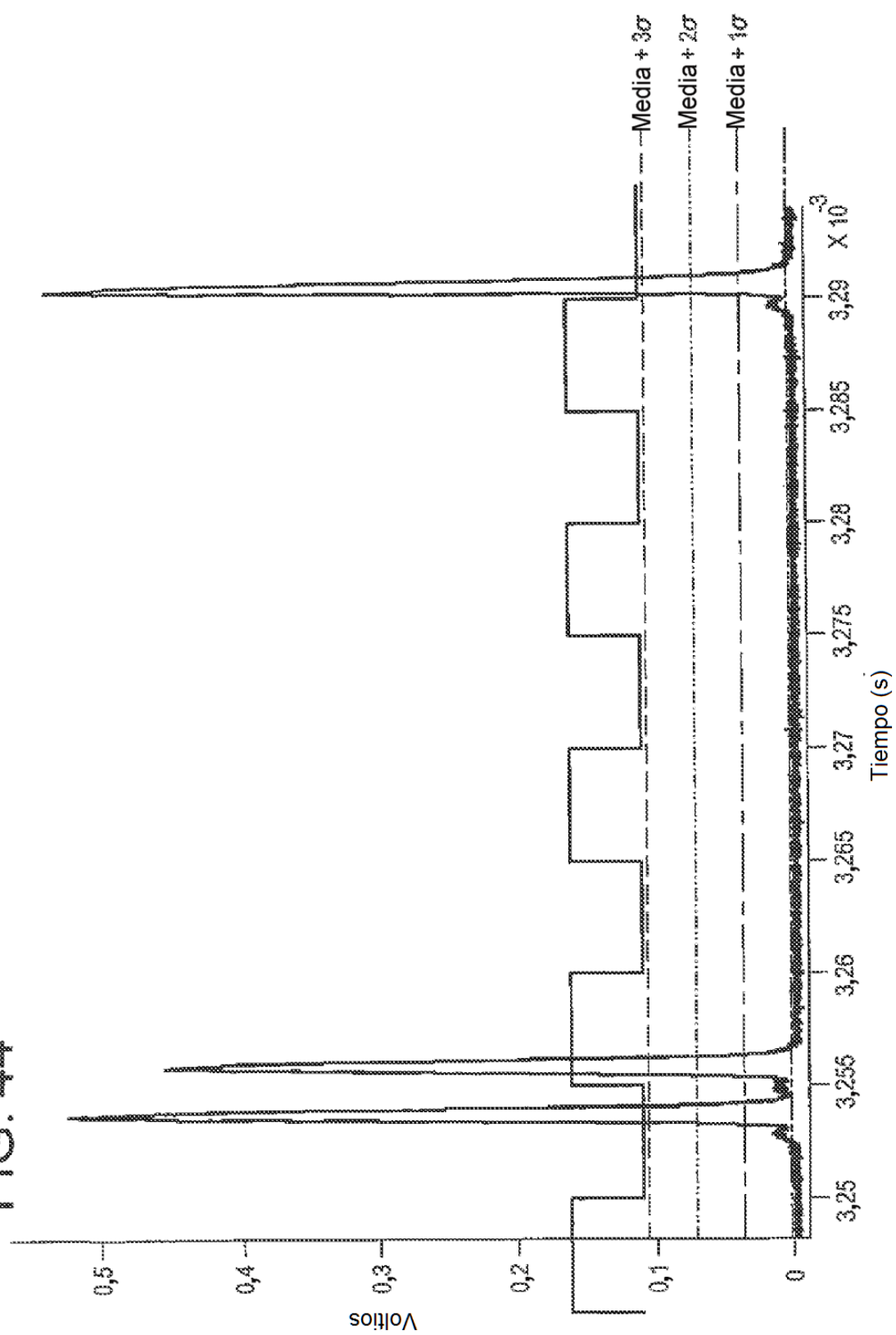
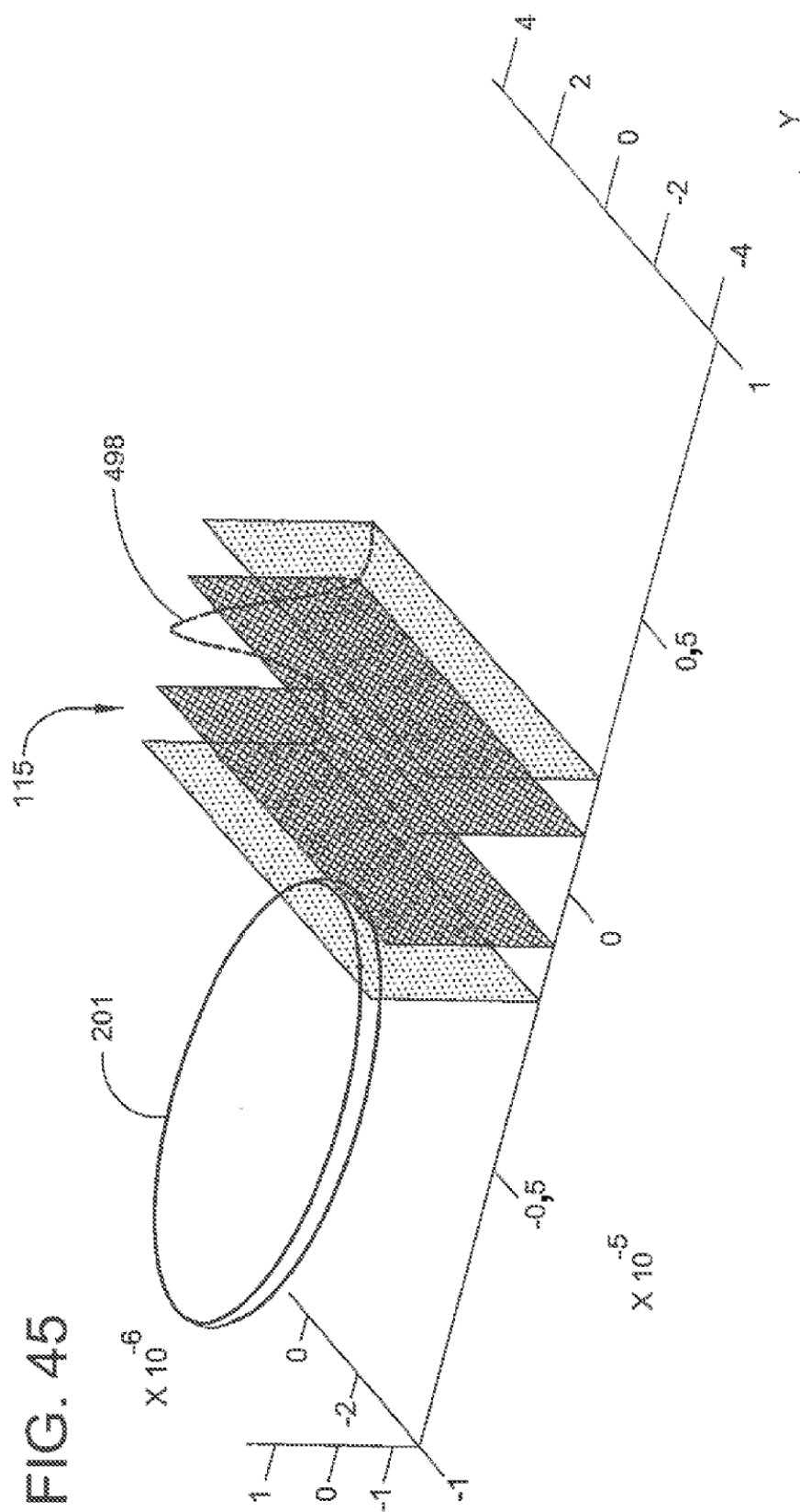


FIG. 44





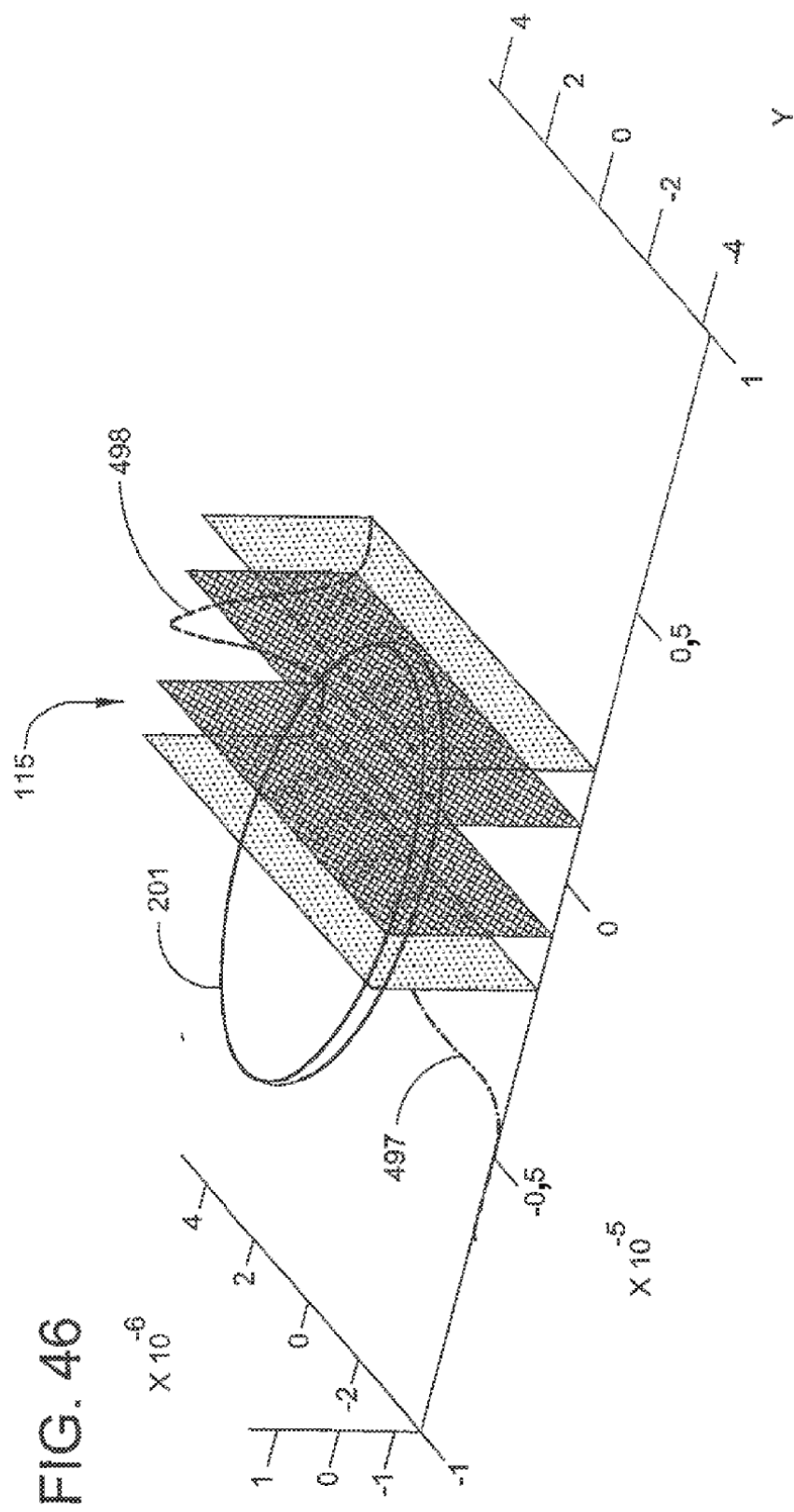


FIG. 47

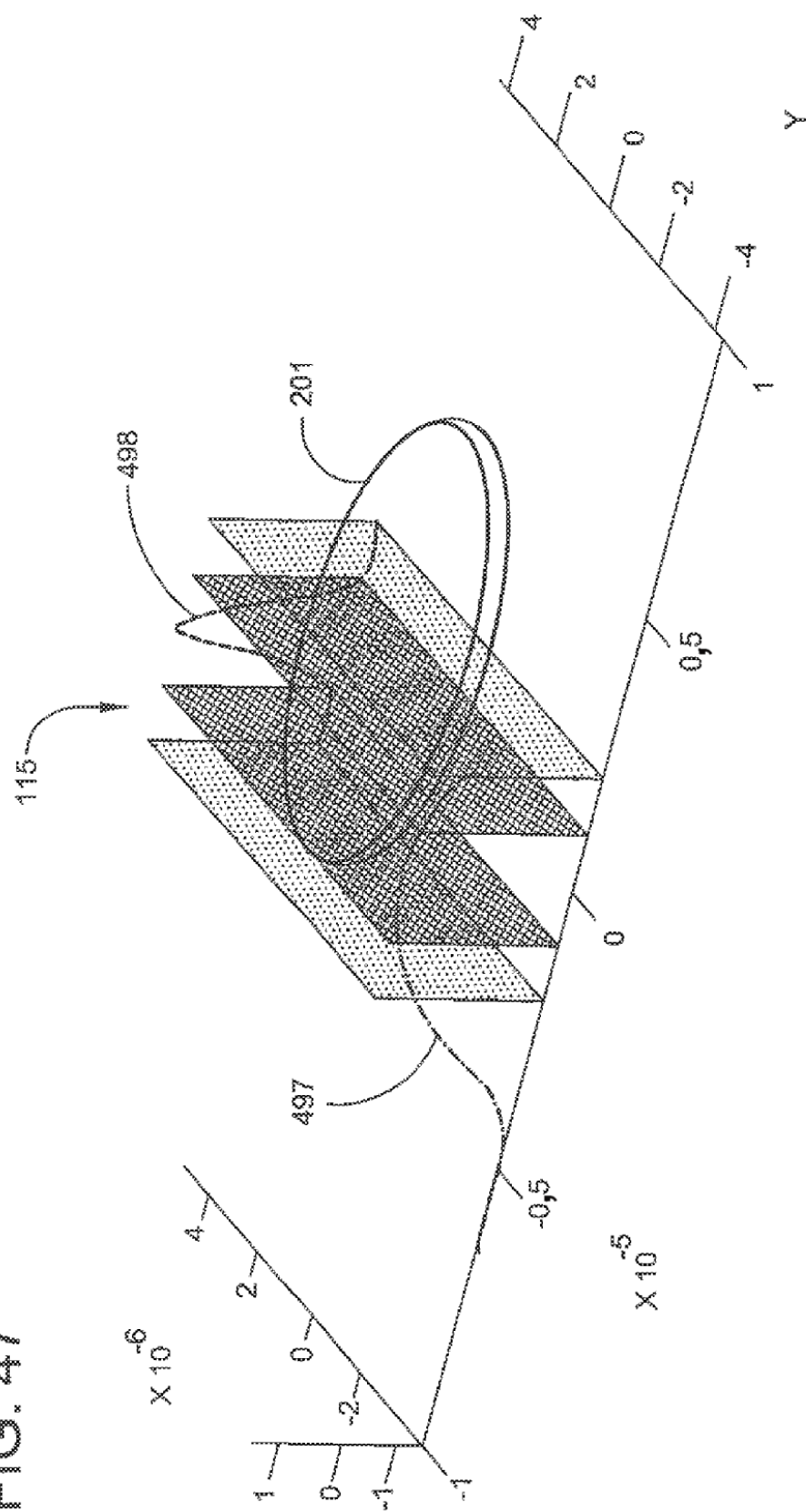


FIG. 48

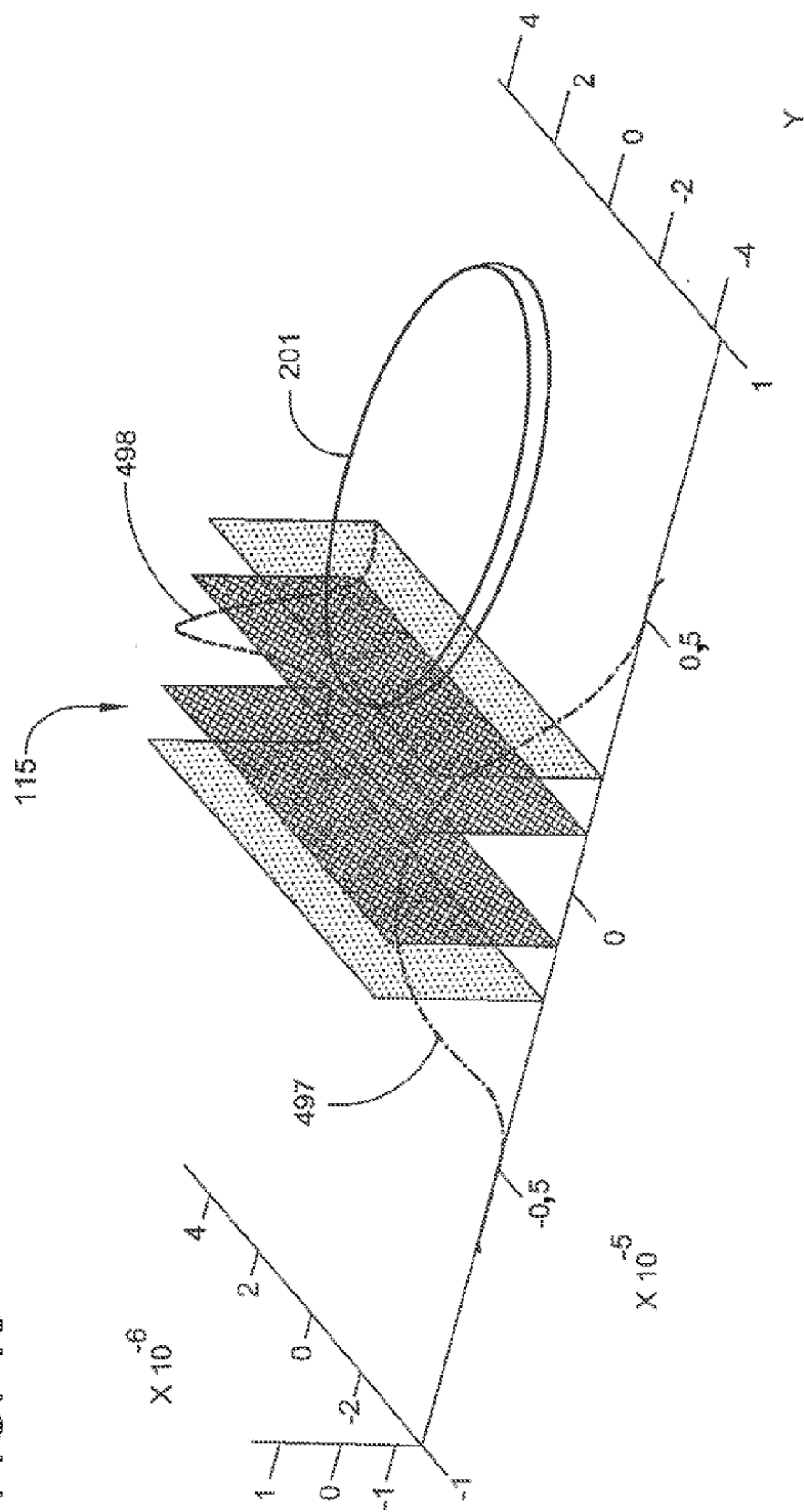
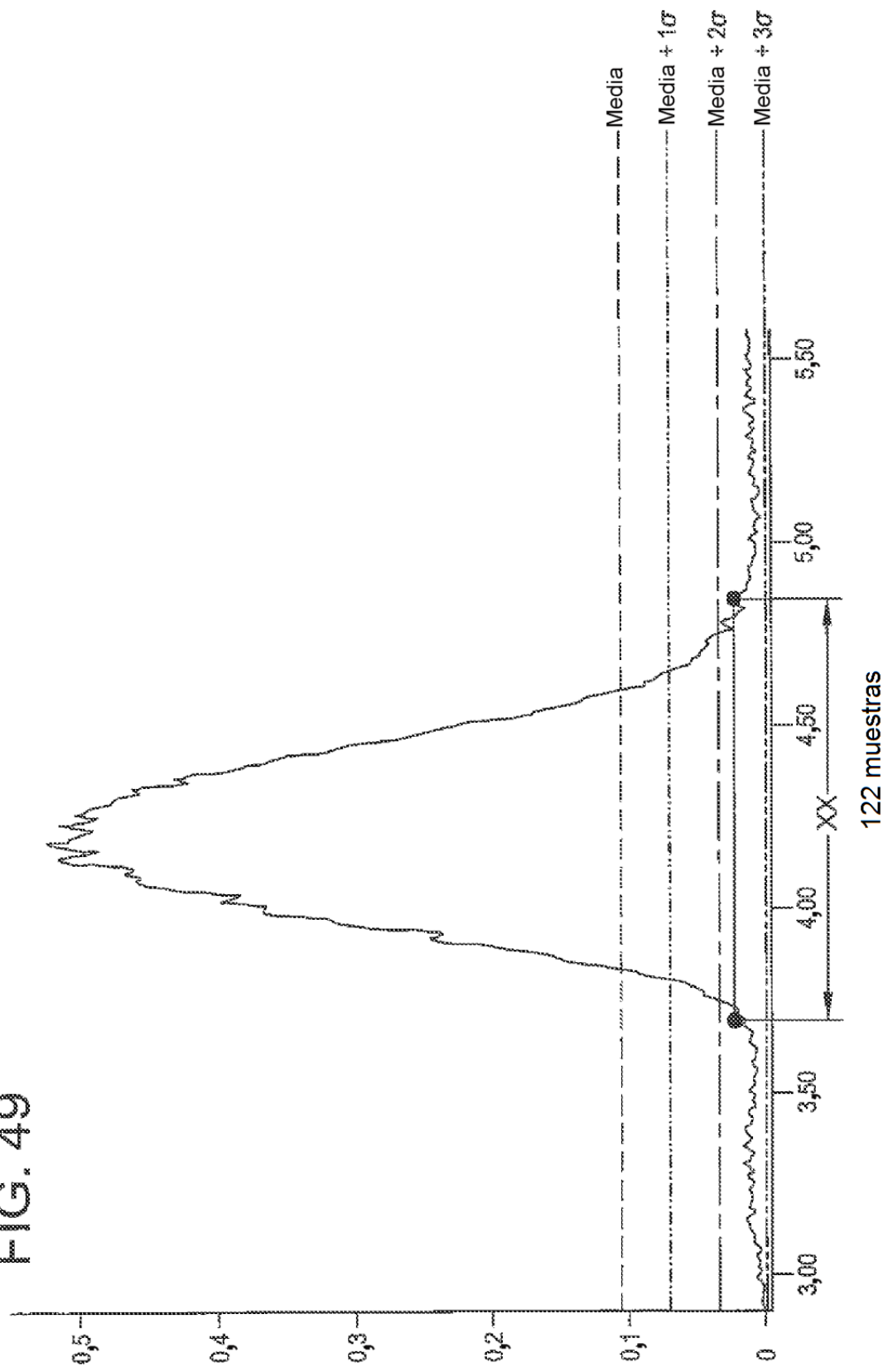


FIG. 49



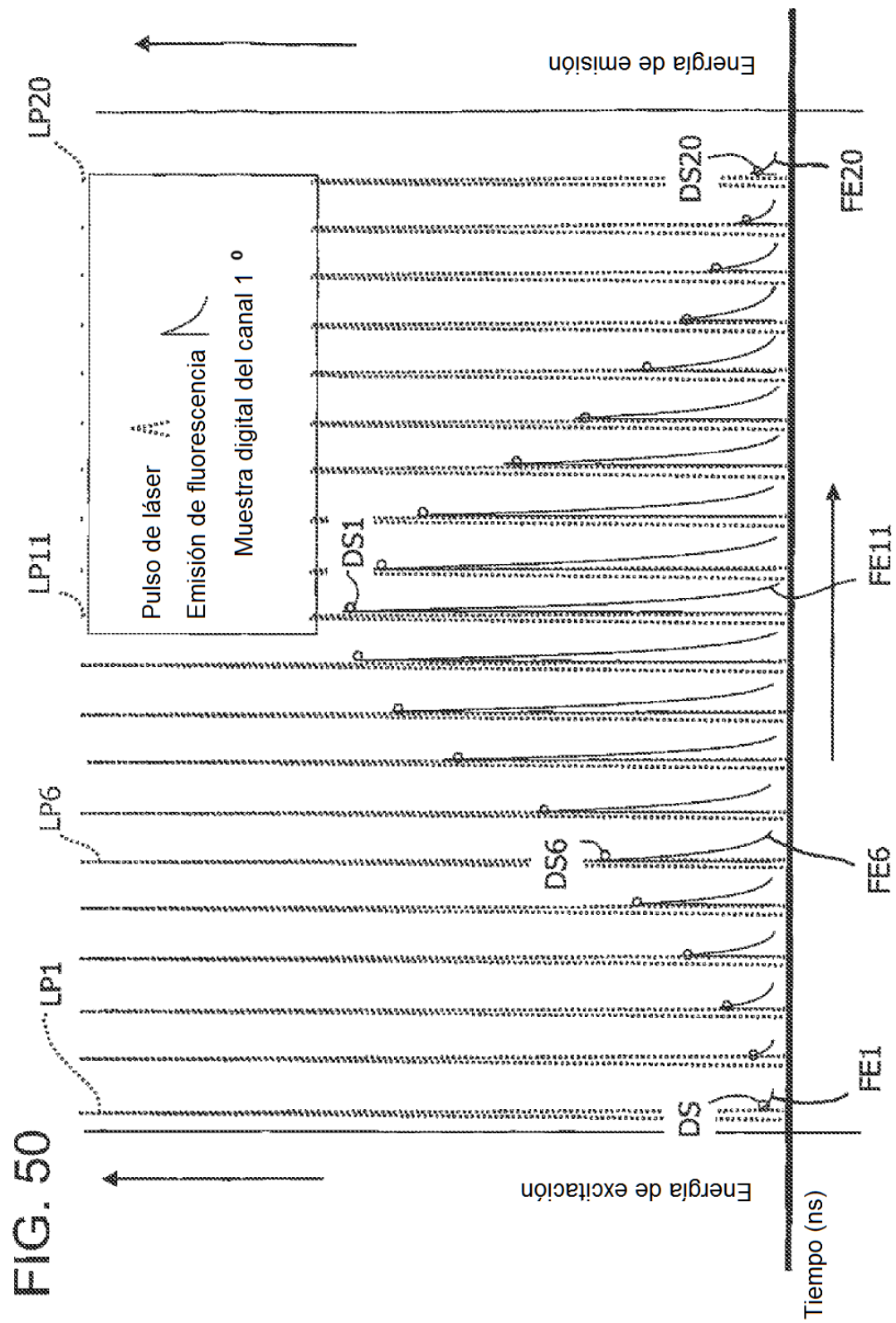


FIG. 51

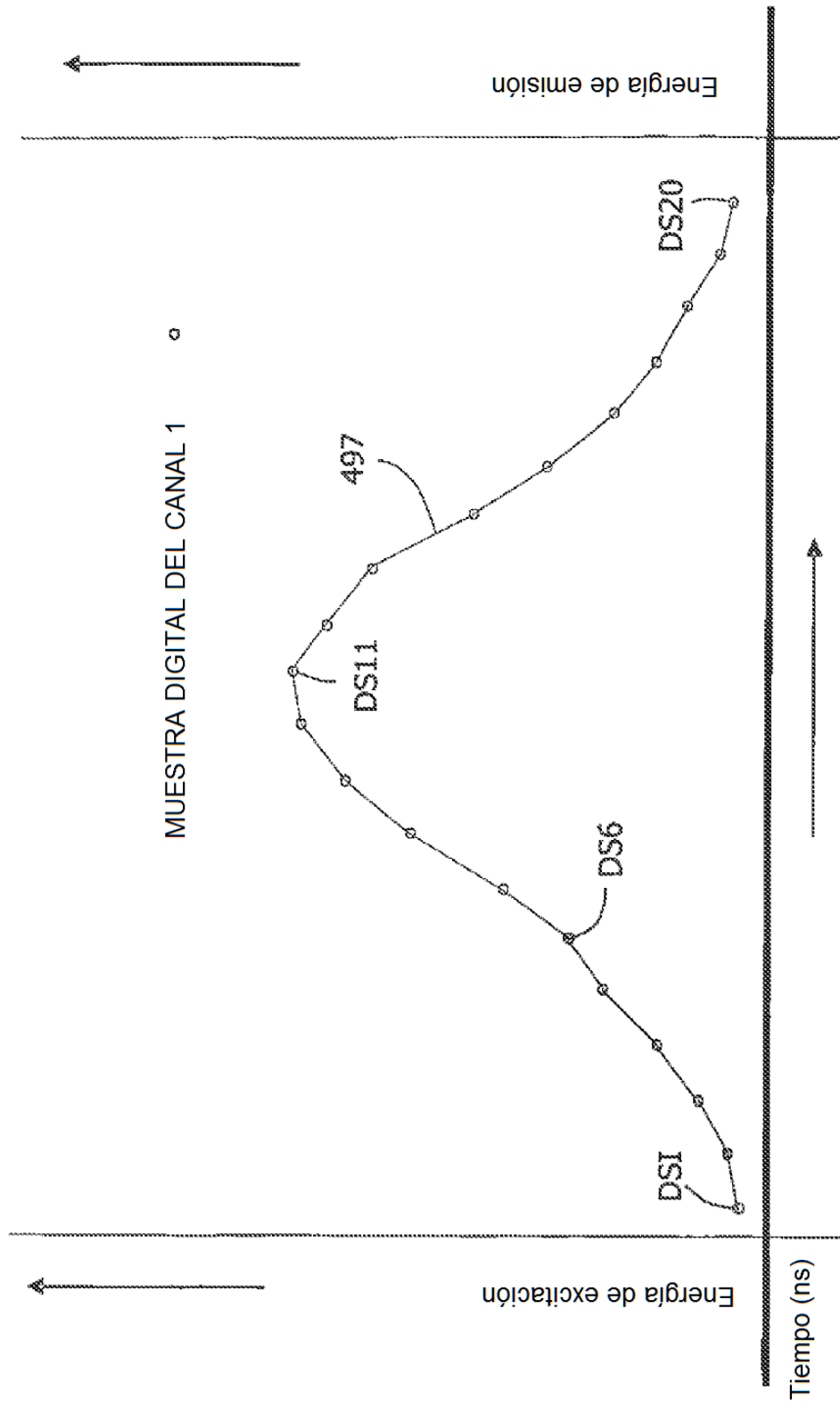


FIG. 52

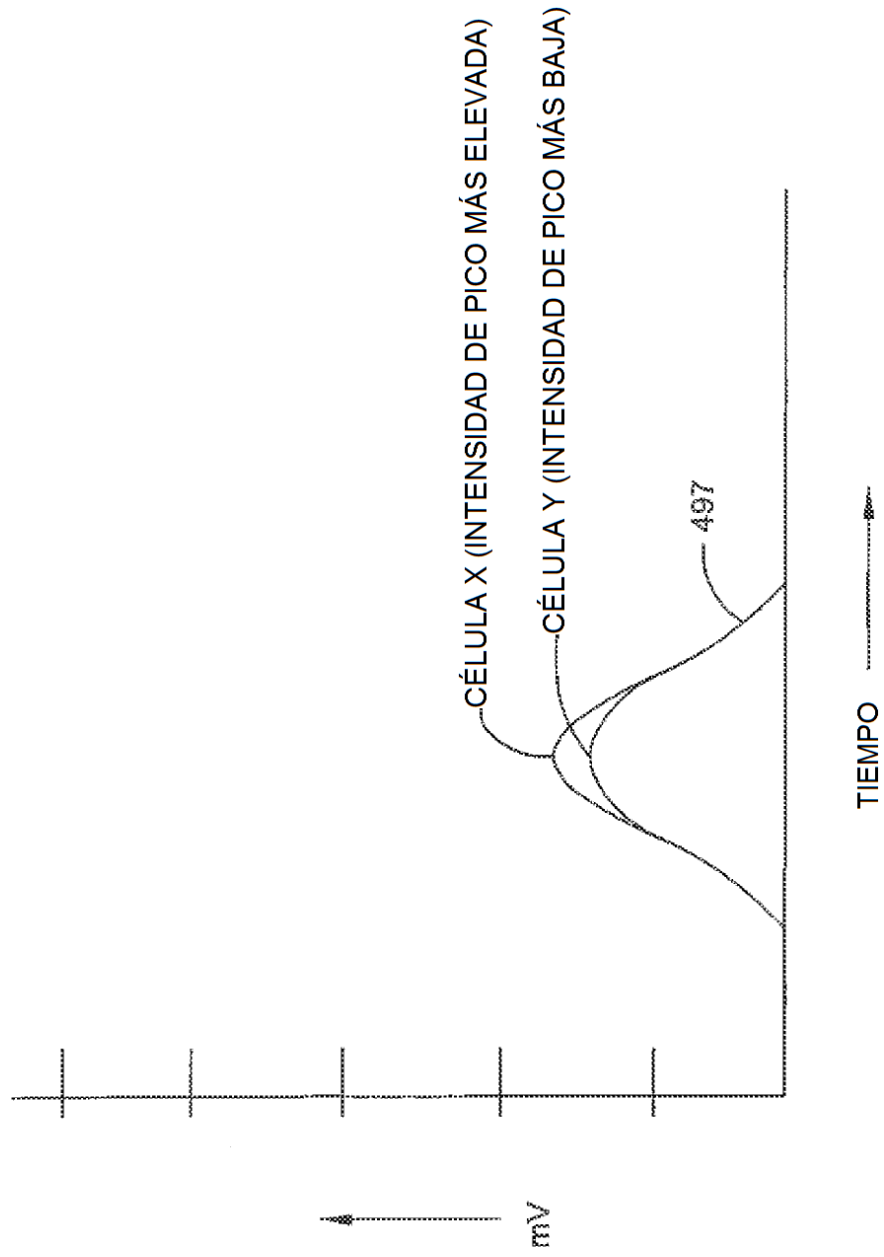
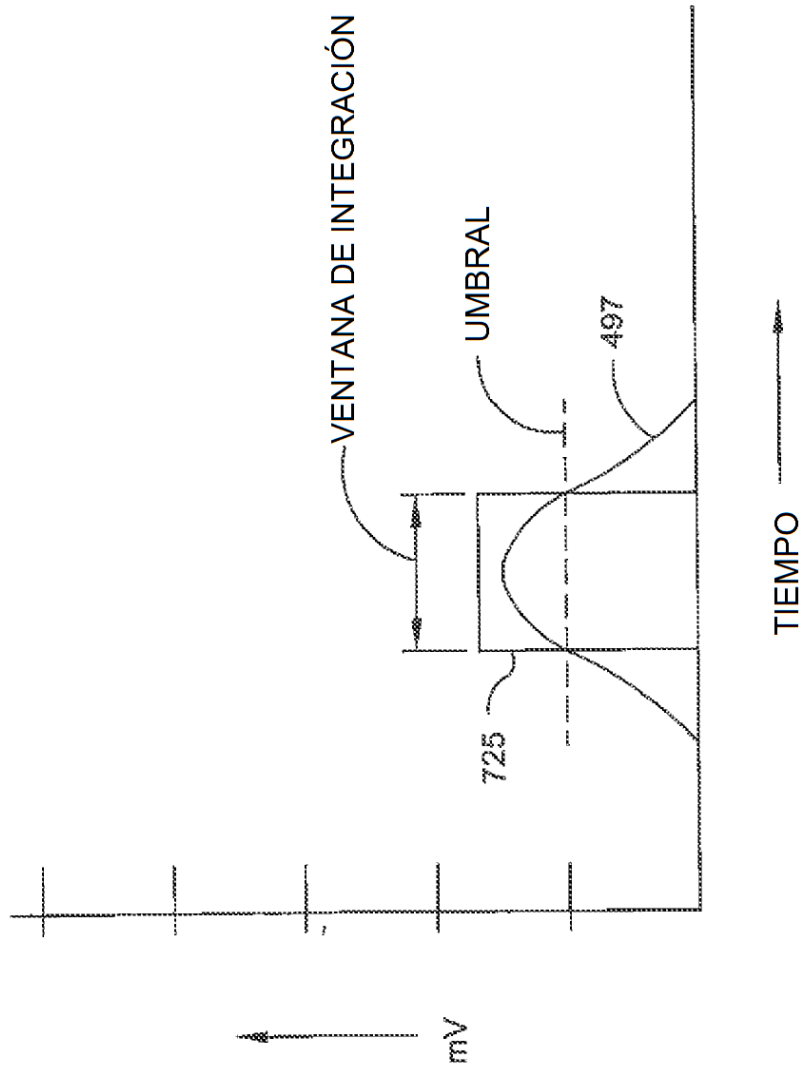
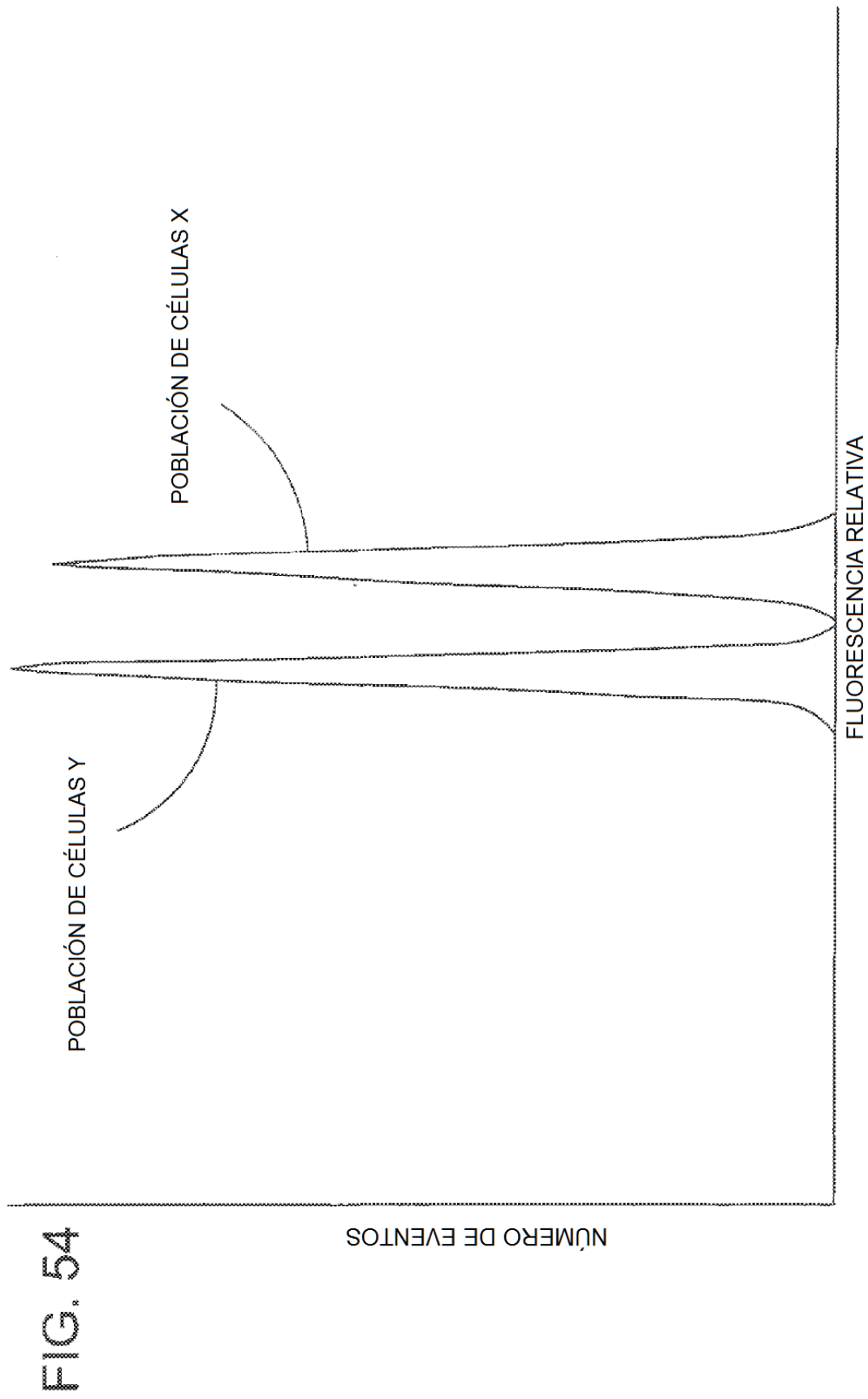


FIG. 53





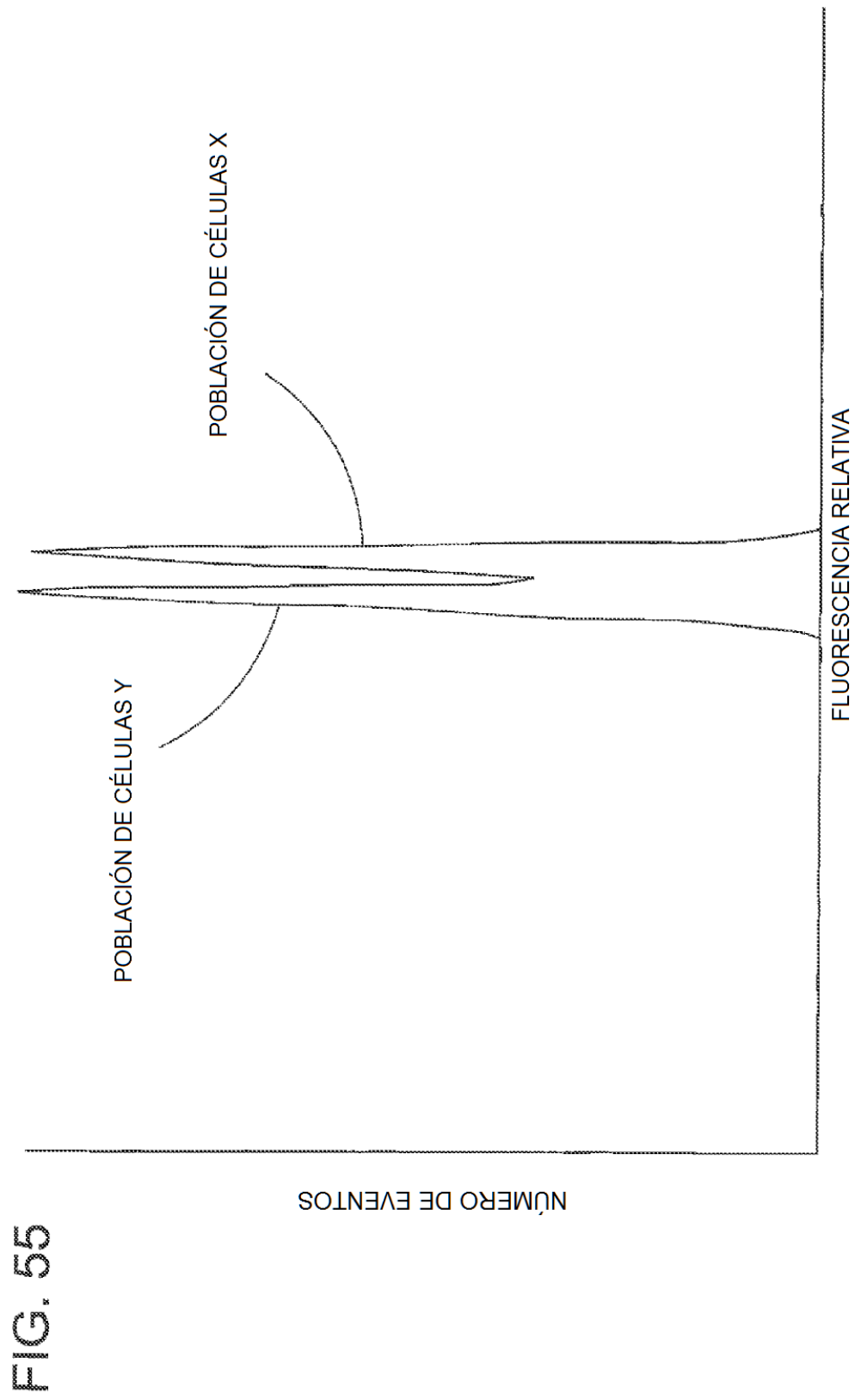


FIG. 56

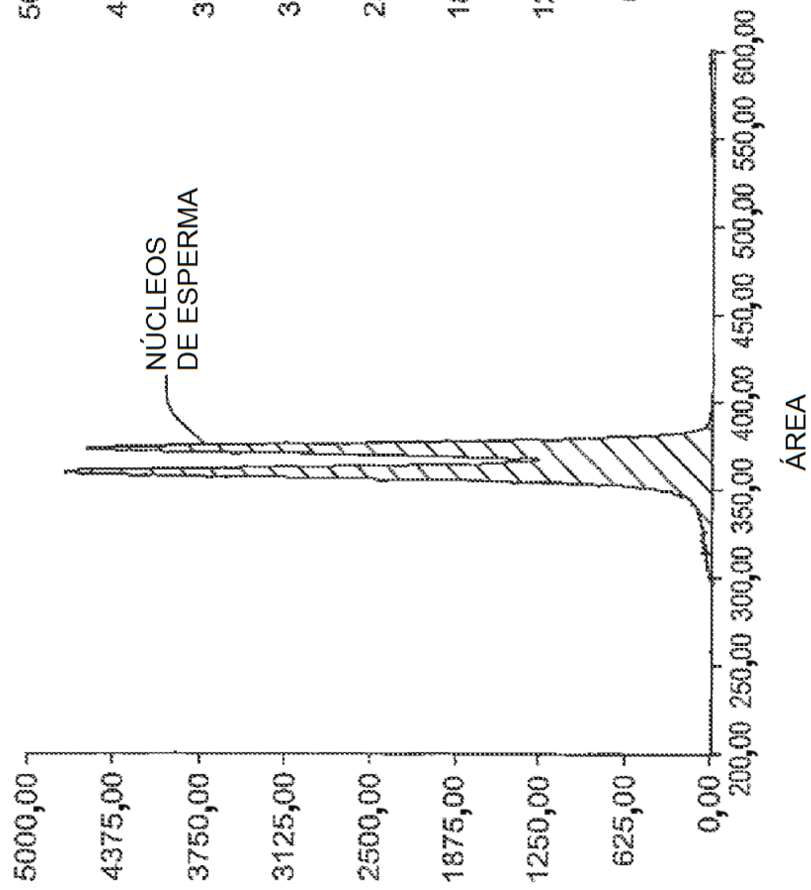


FIG. 57

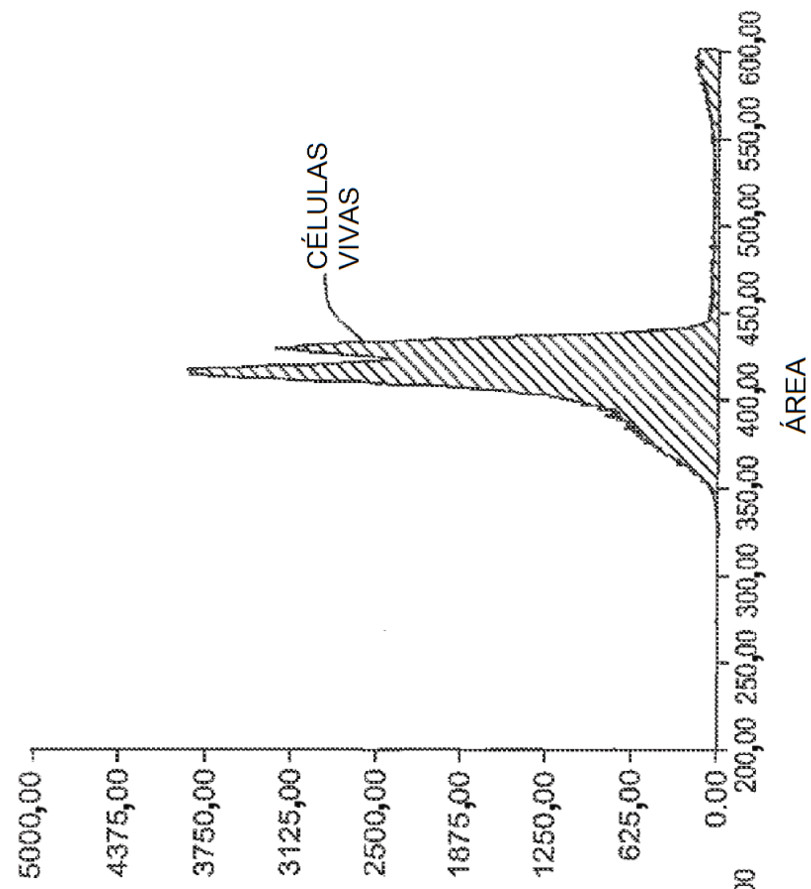


FIG. 58

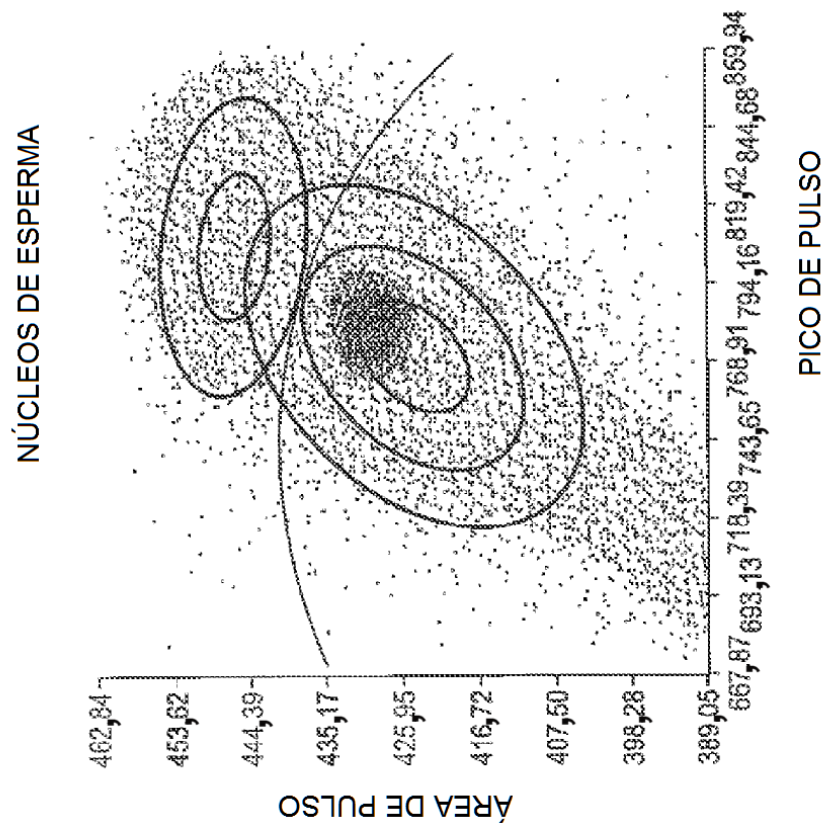


FIG. 59

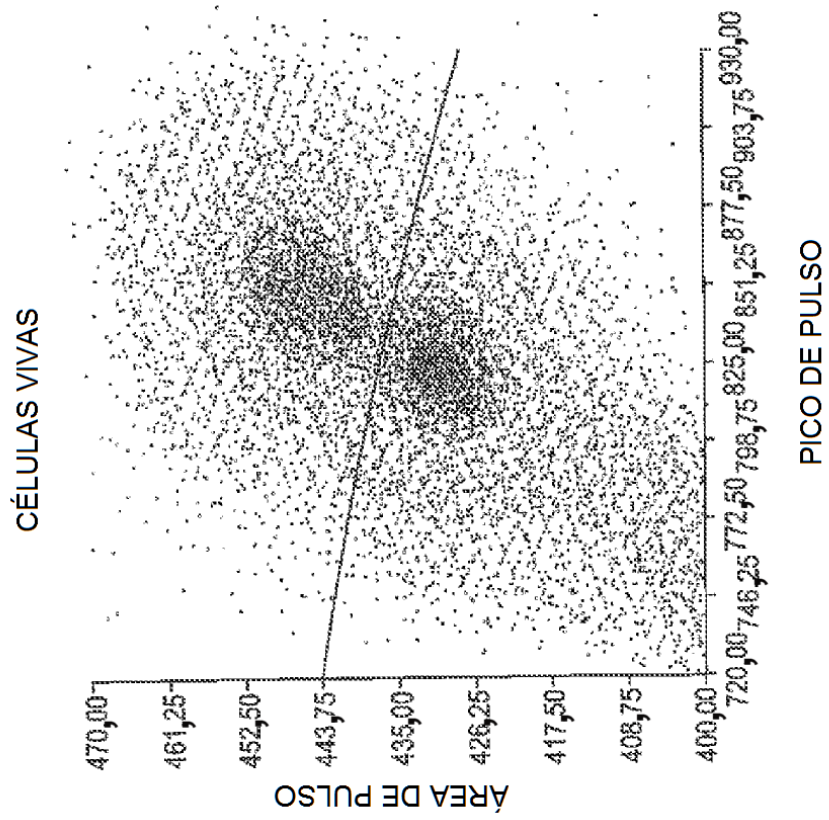


FIG. 60

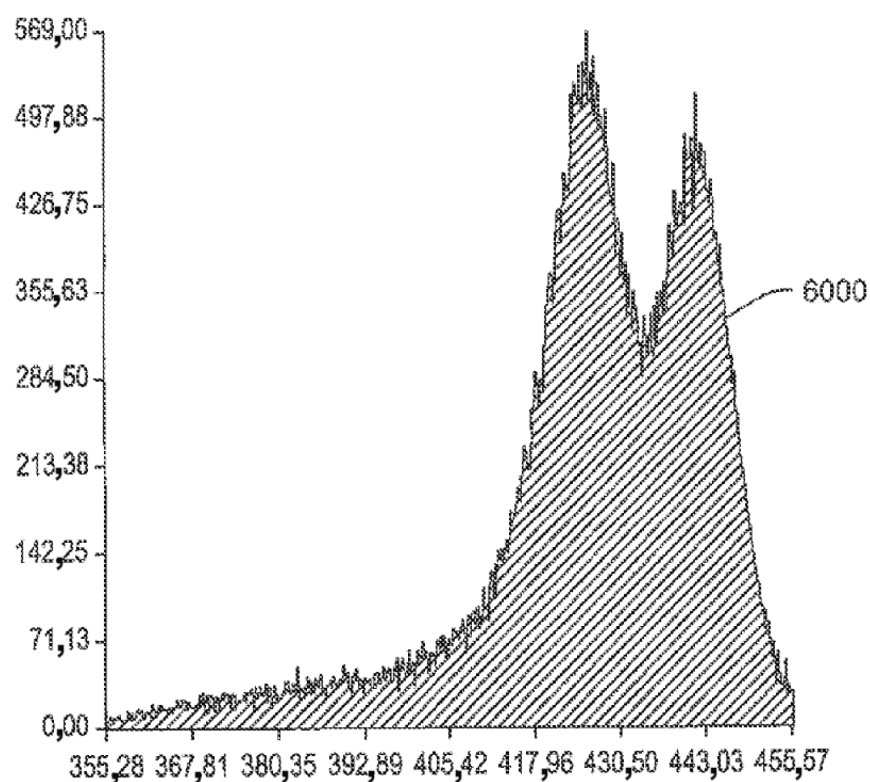


FIG. 61

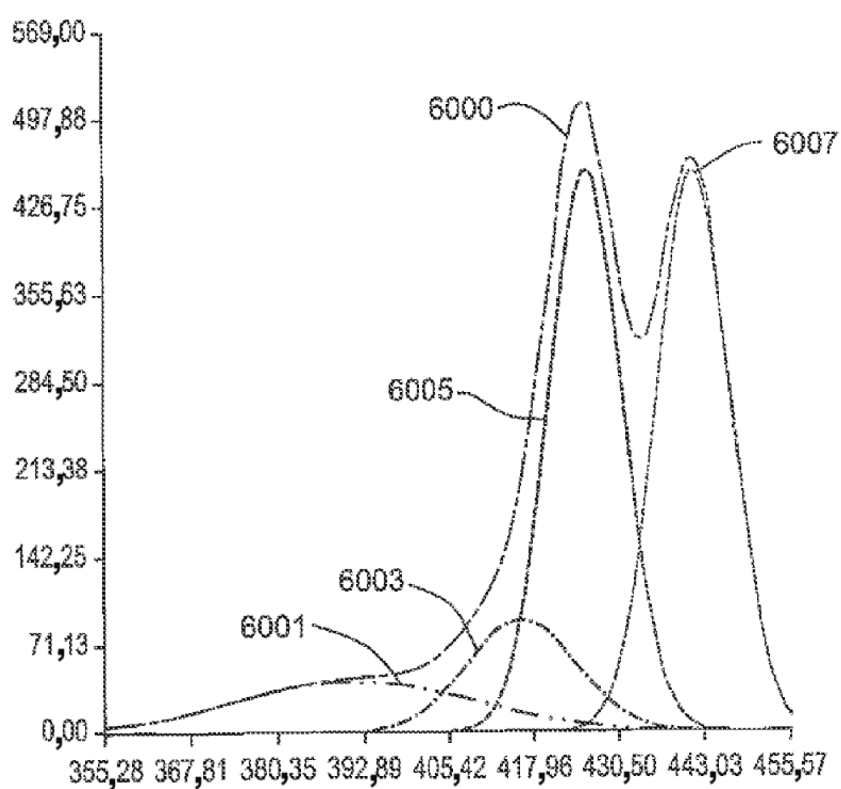


FIG. 62

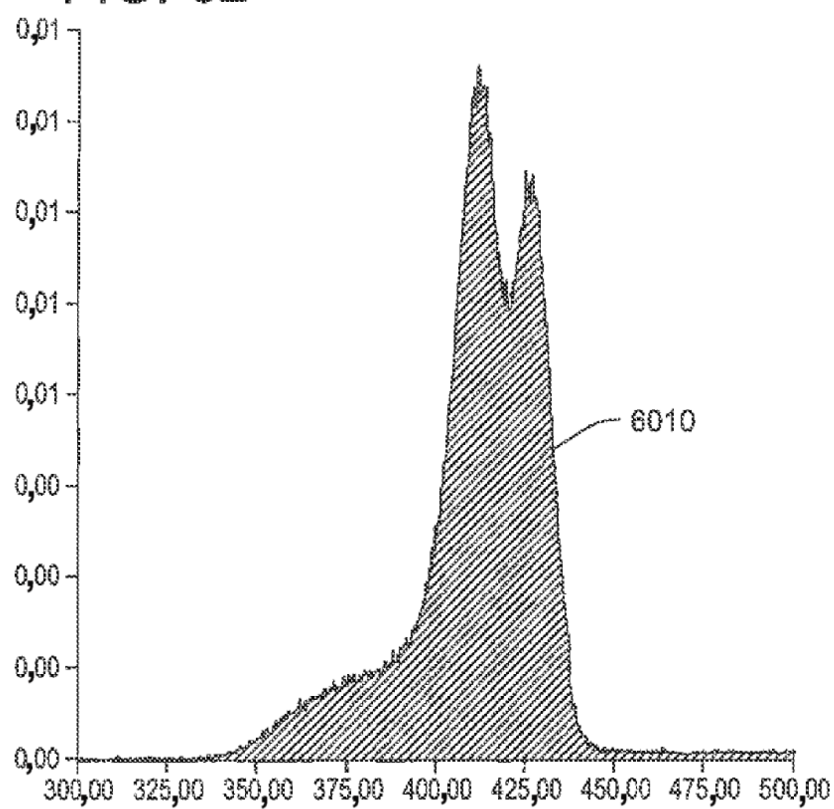


FIG. 63

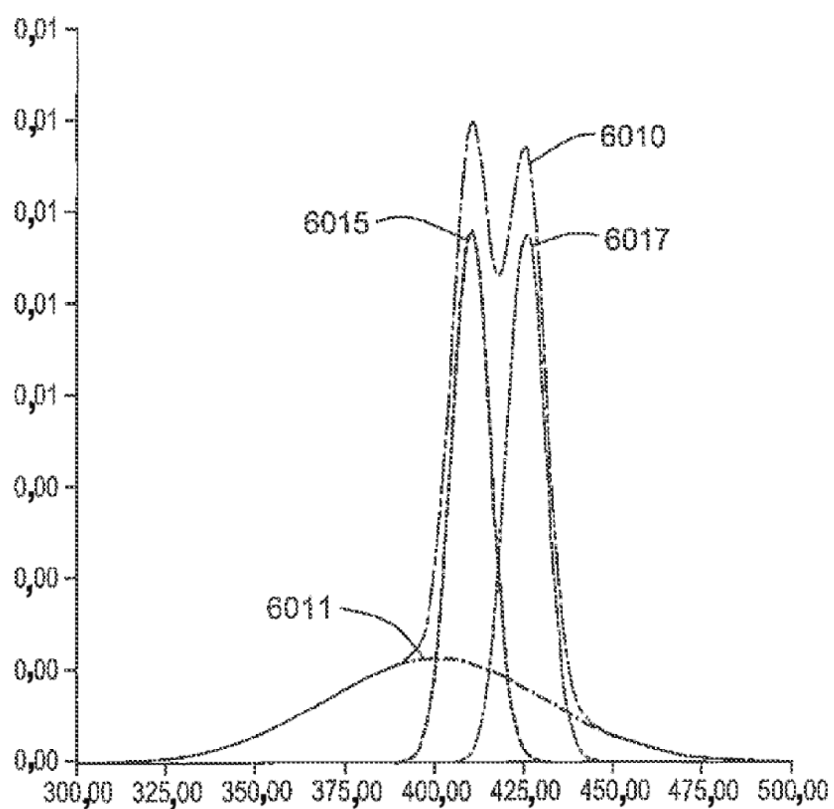


FIG. 64

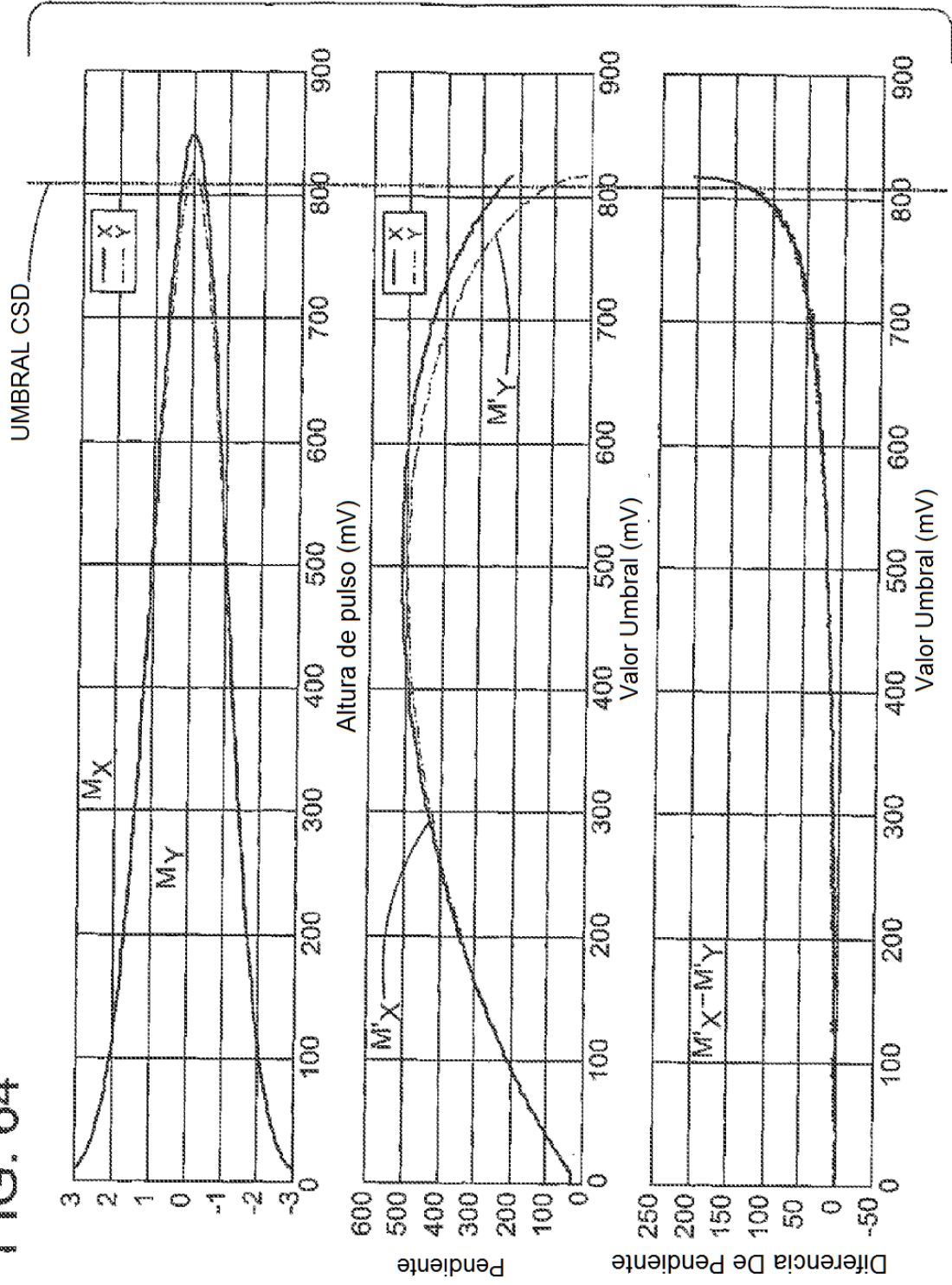


FIG. 65

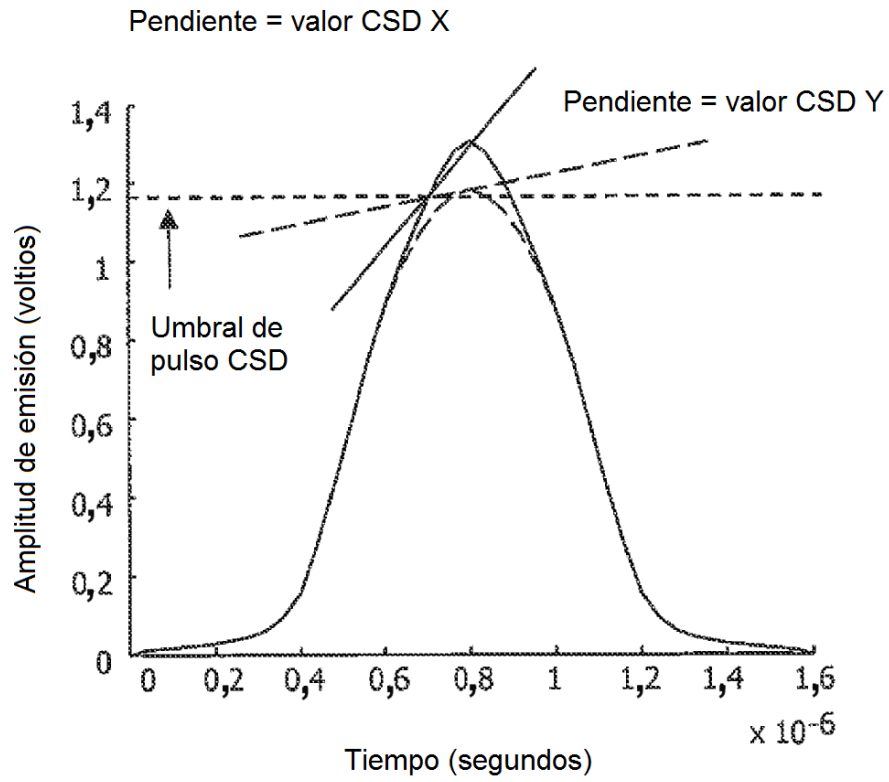


FIG. 67

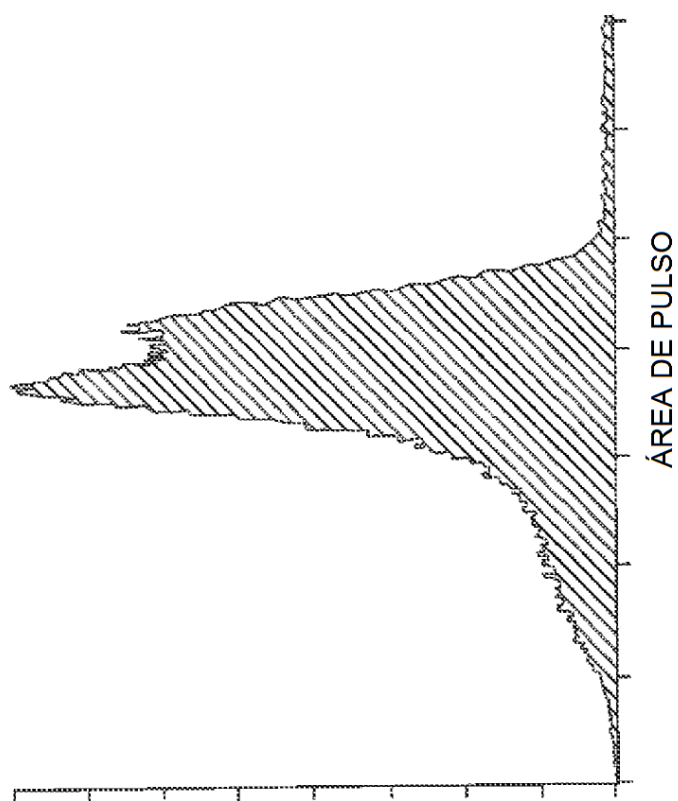


FIG. 66

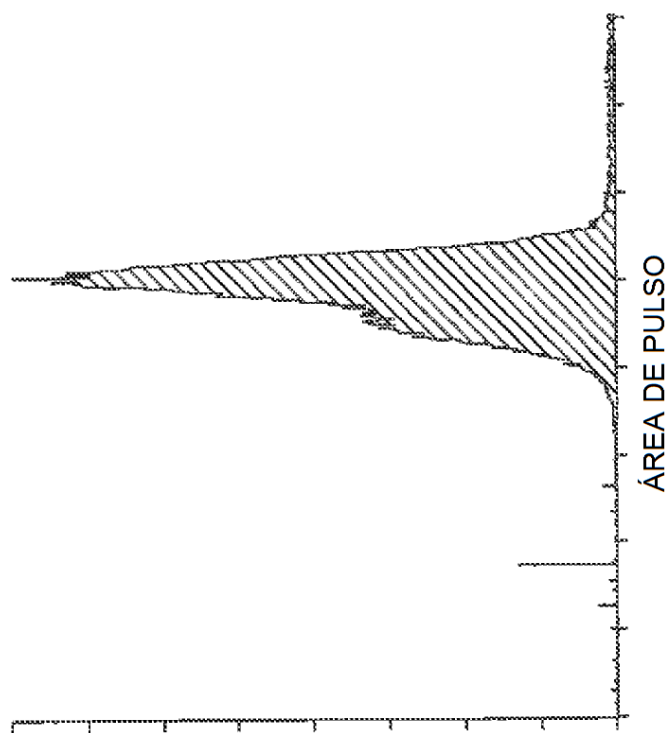


FIG. 68

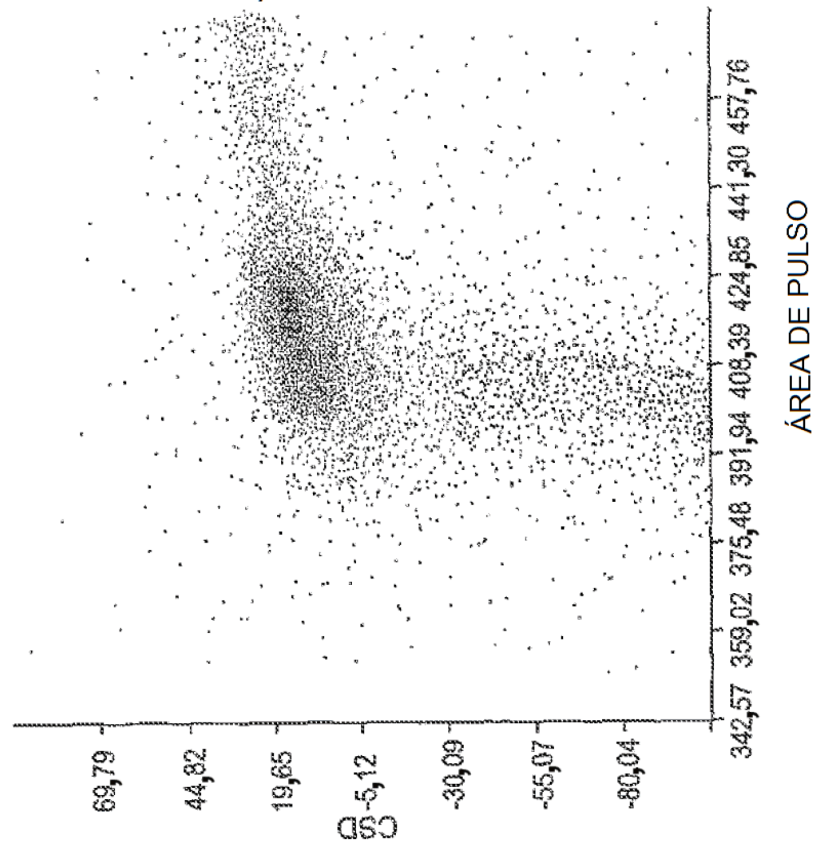


FIG. 69

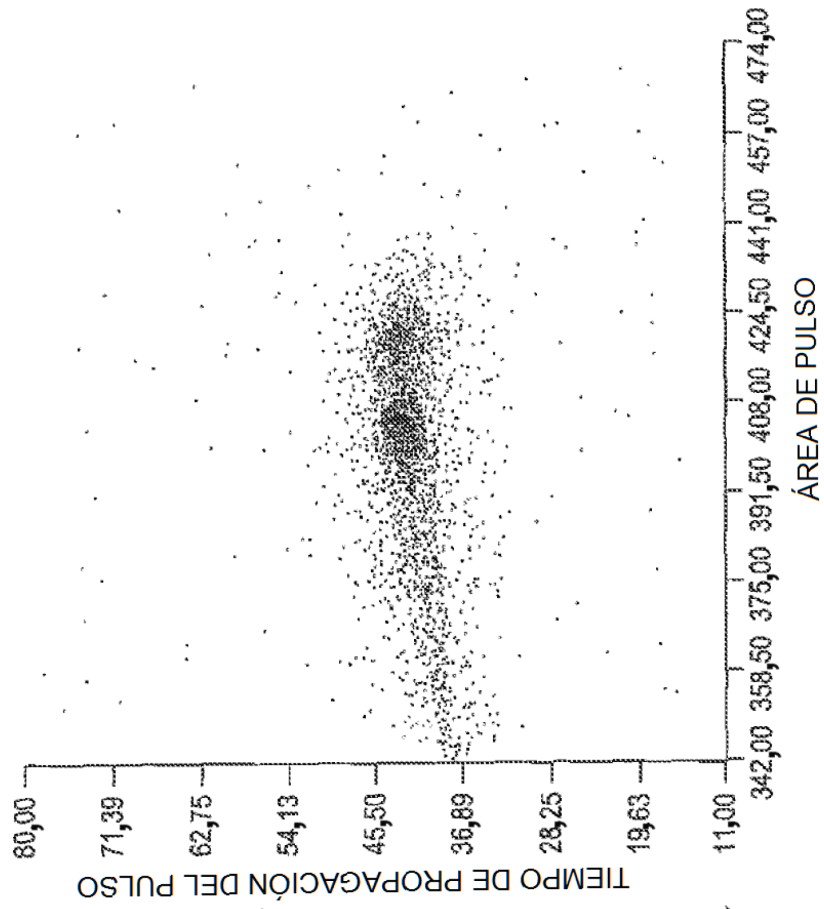
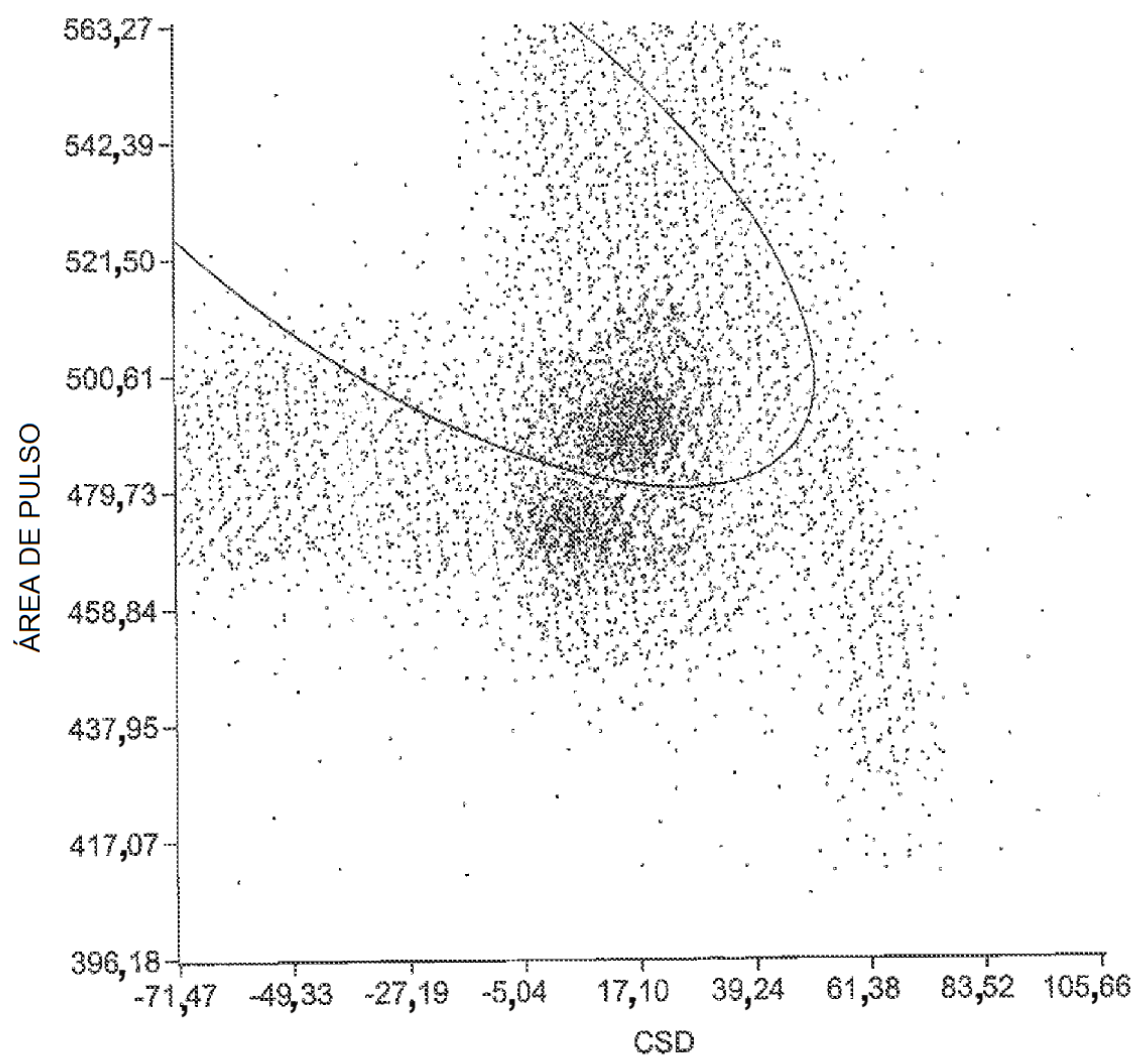


FIG. 70



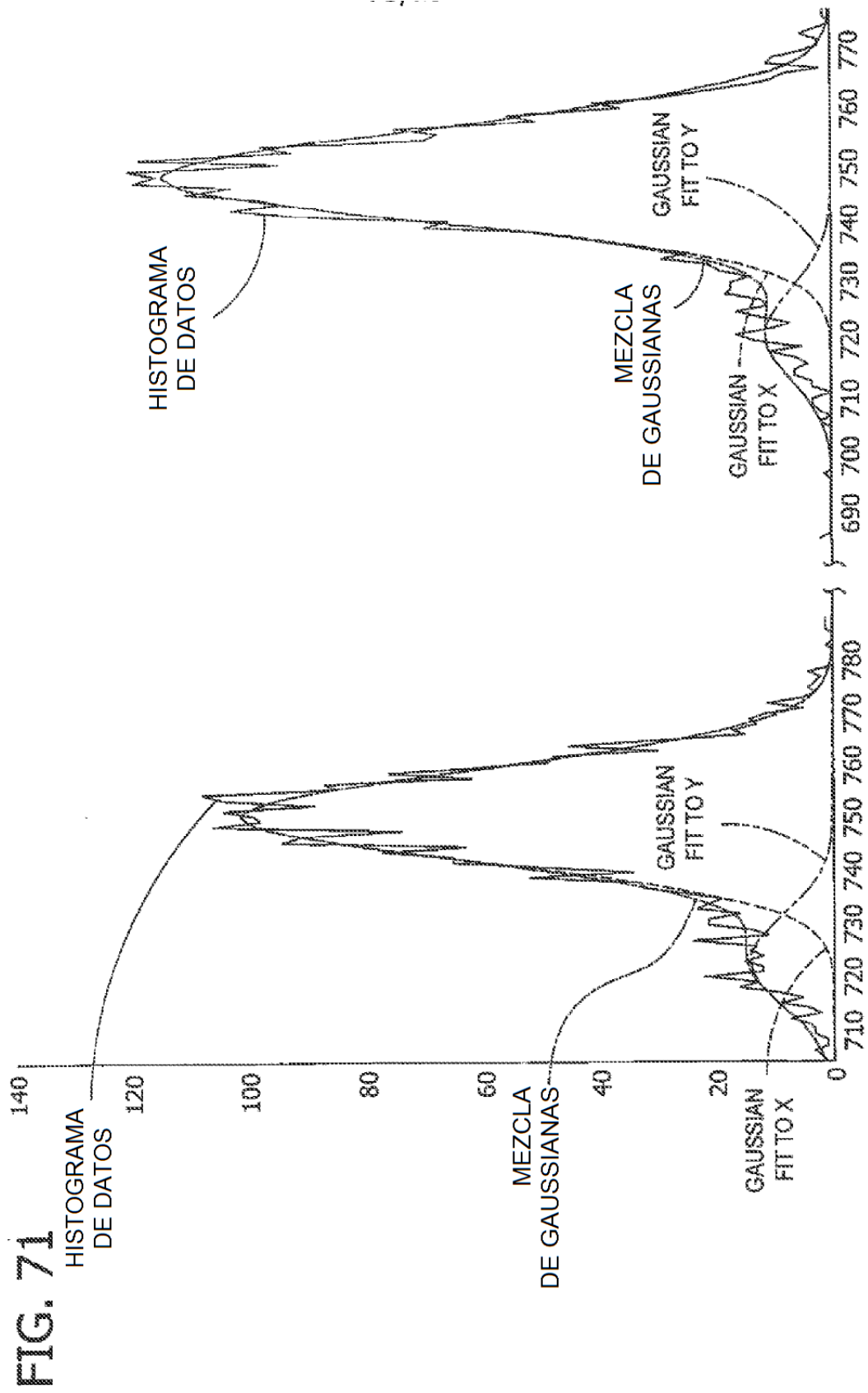


FIG. 72

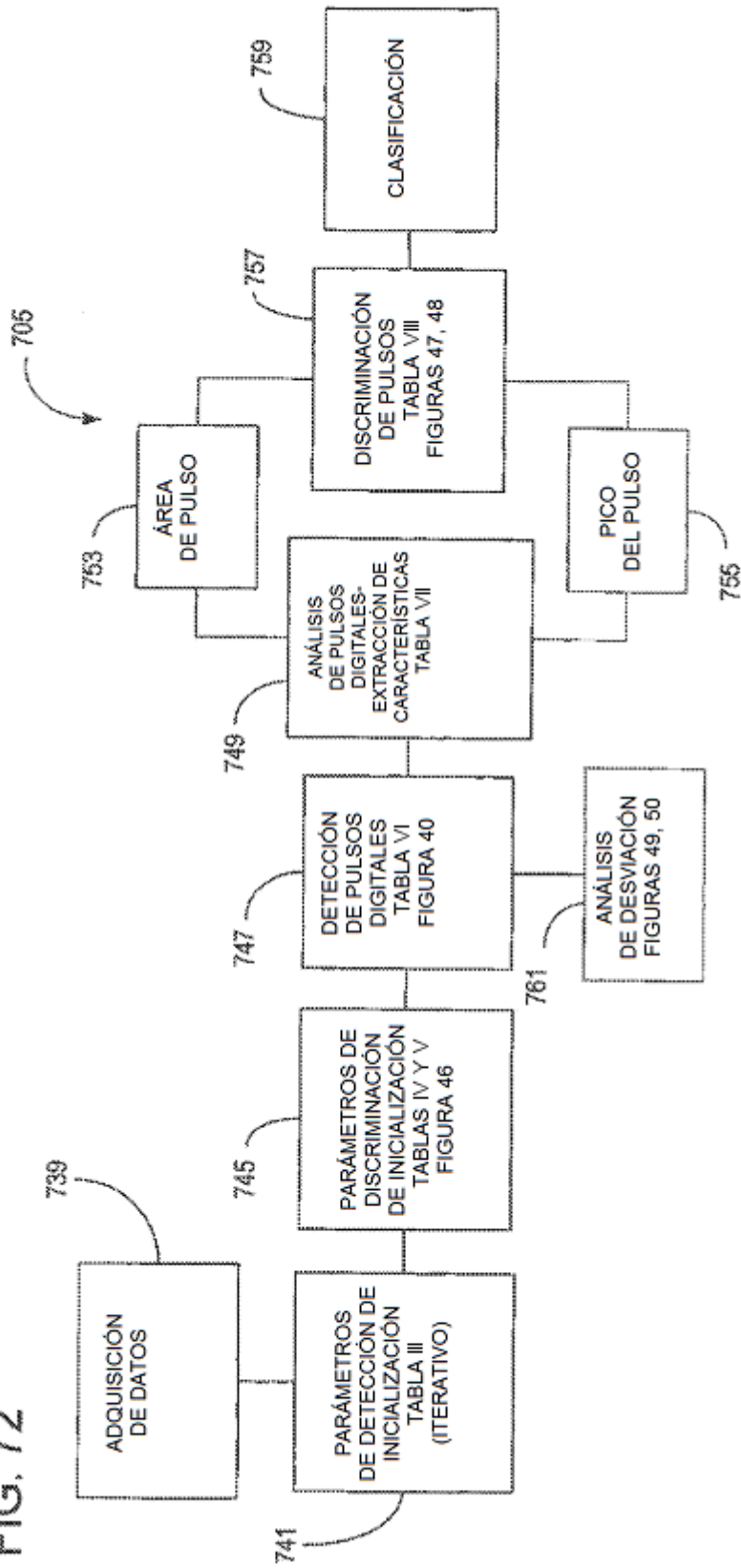


FIG. 73

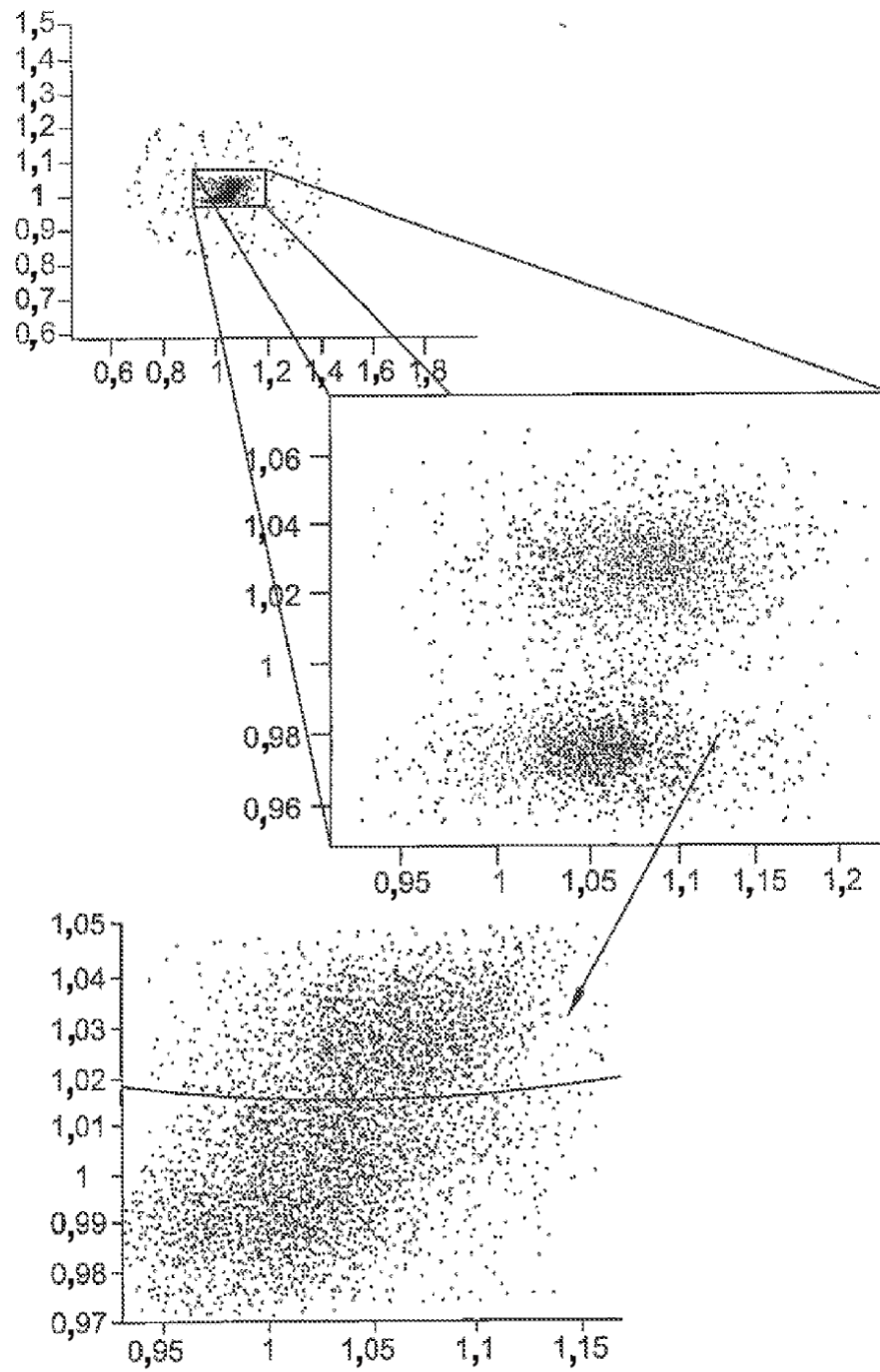
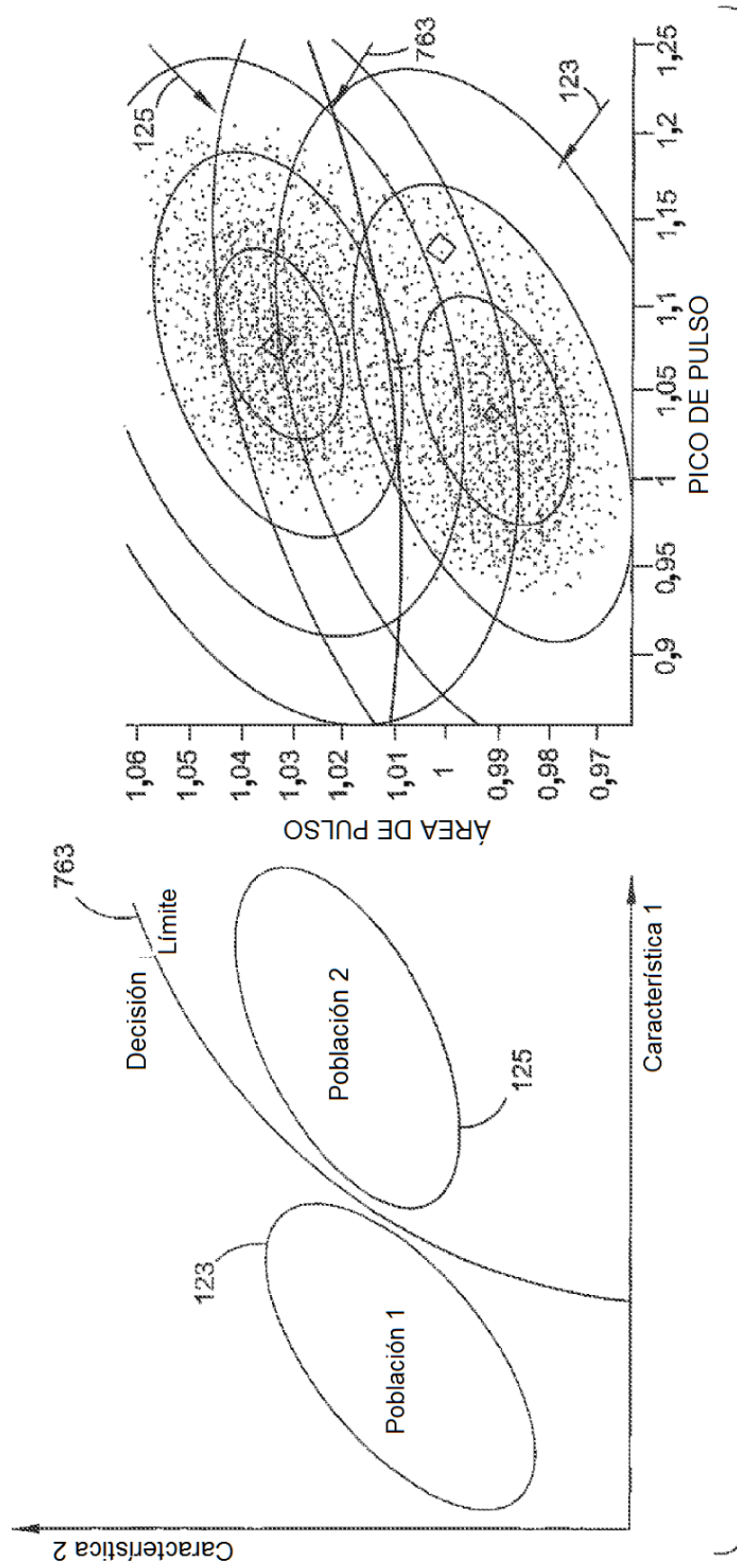


FIG. 74



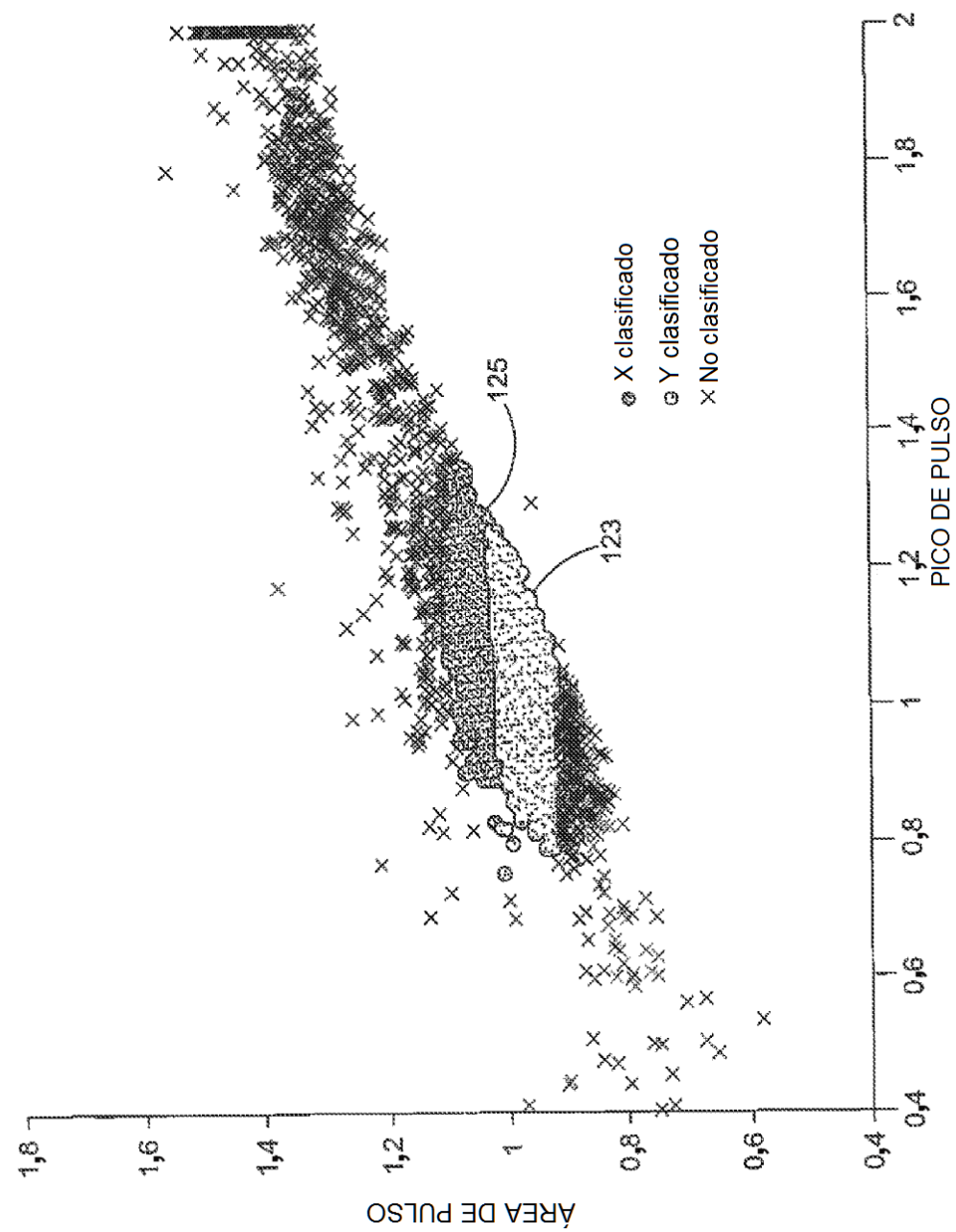
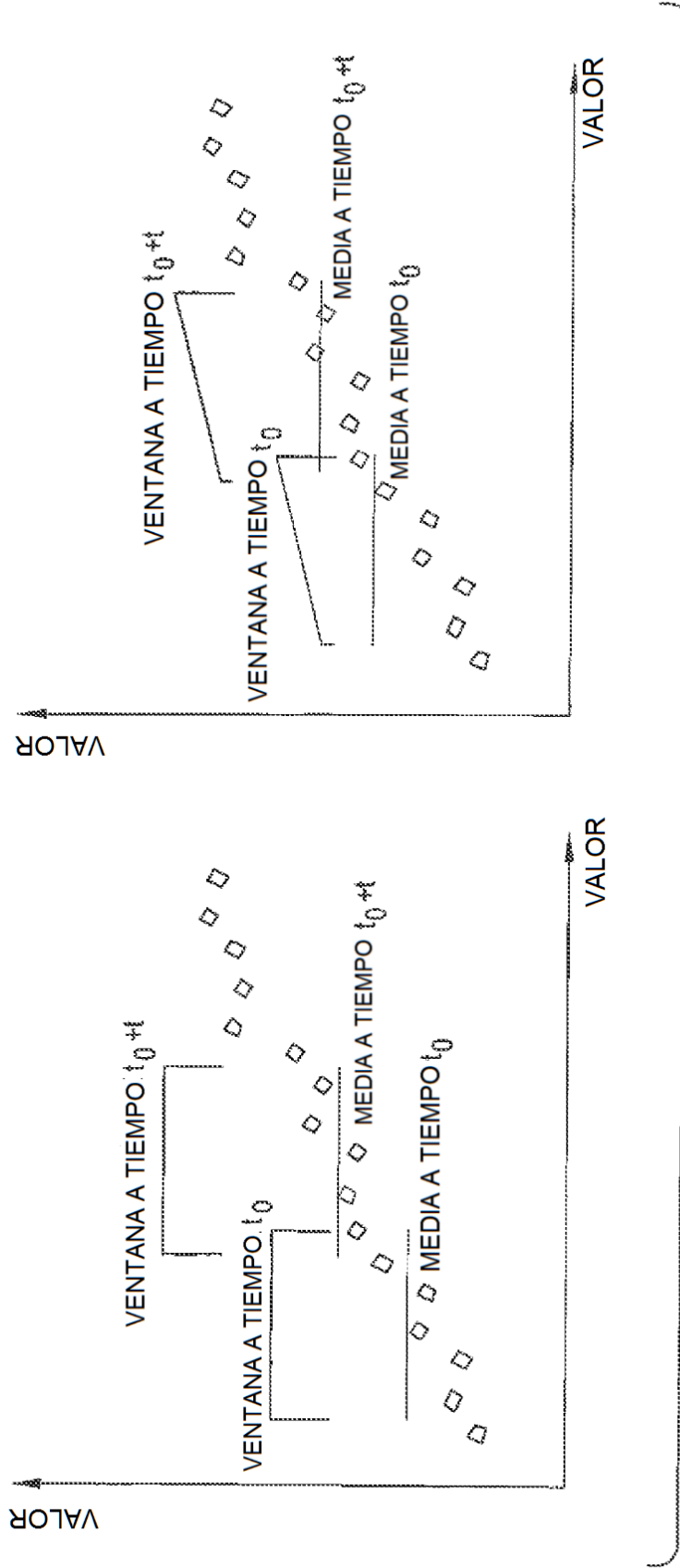


FIG. 75

FIG. 76



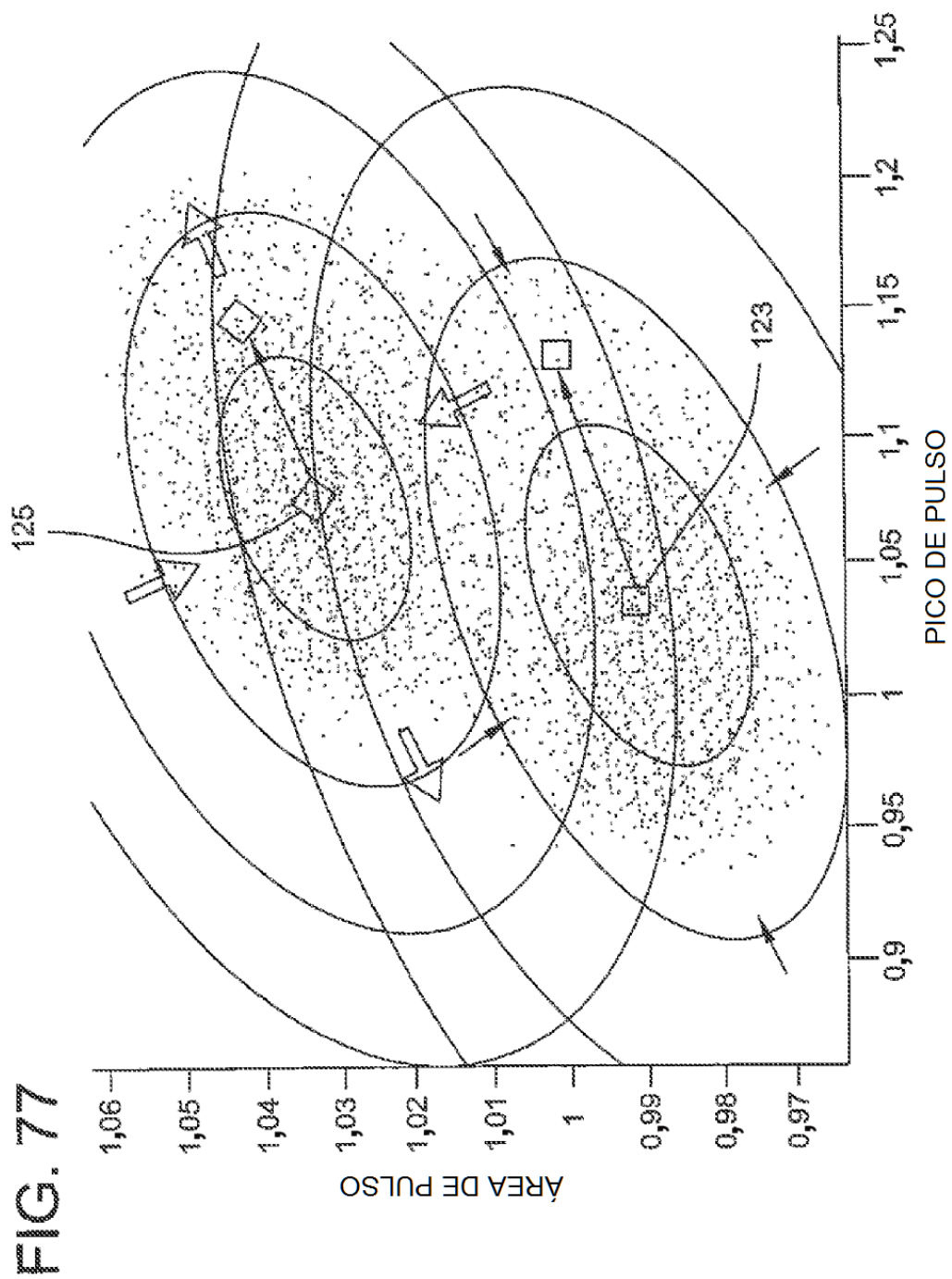


FIG. 78

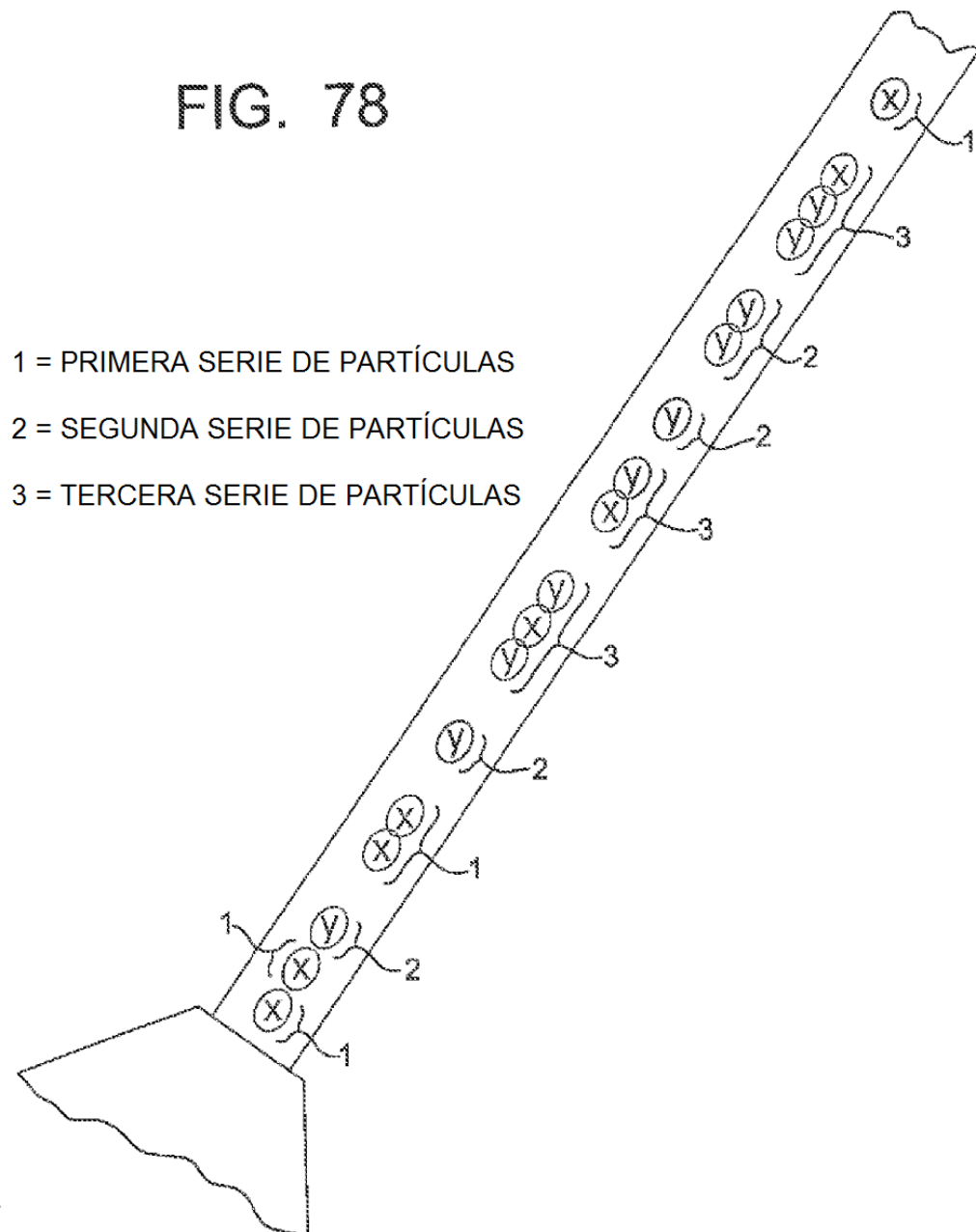


FIG. 79

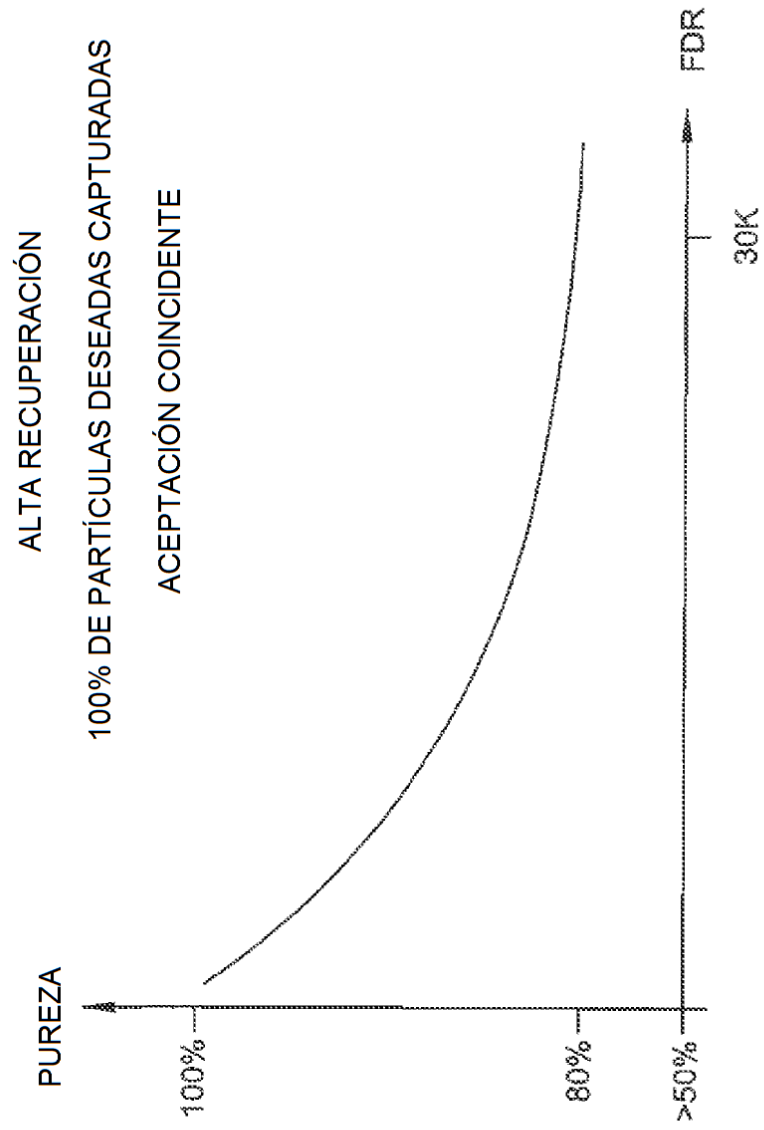


FIG. 80

% DE PARTÍCULAS DESEADAS
EN POBLACIÓN UTILIZABLE

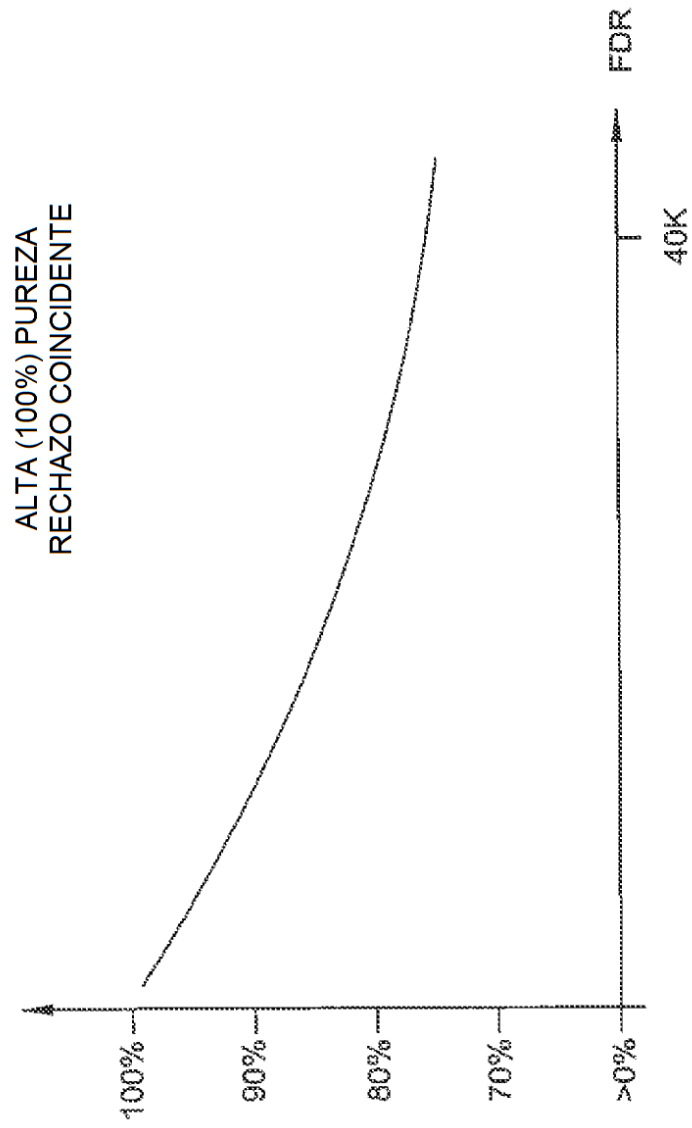


FIG. 81

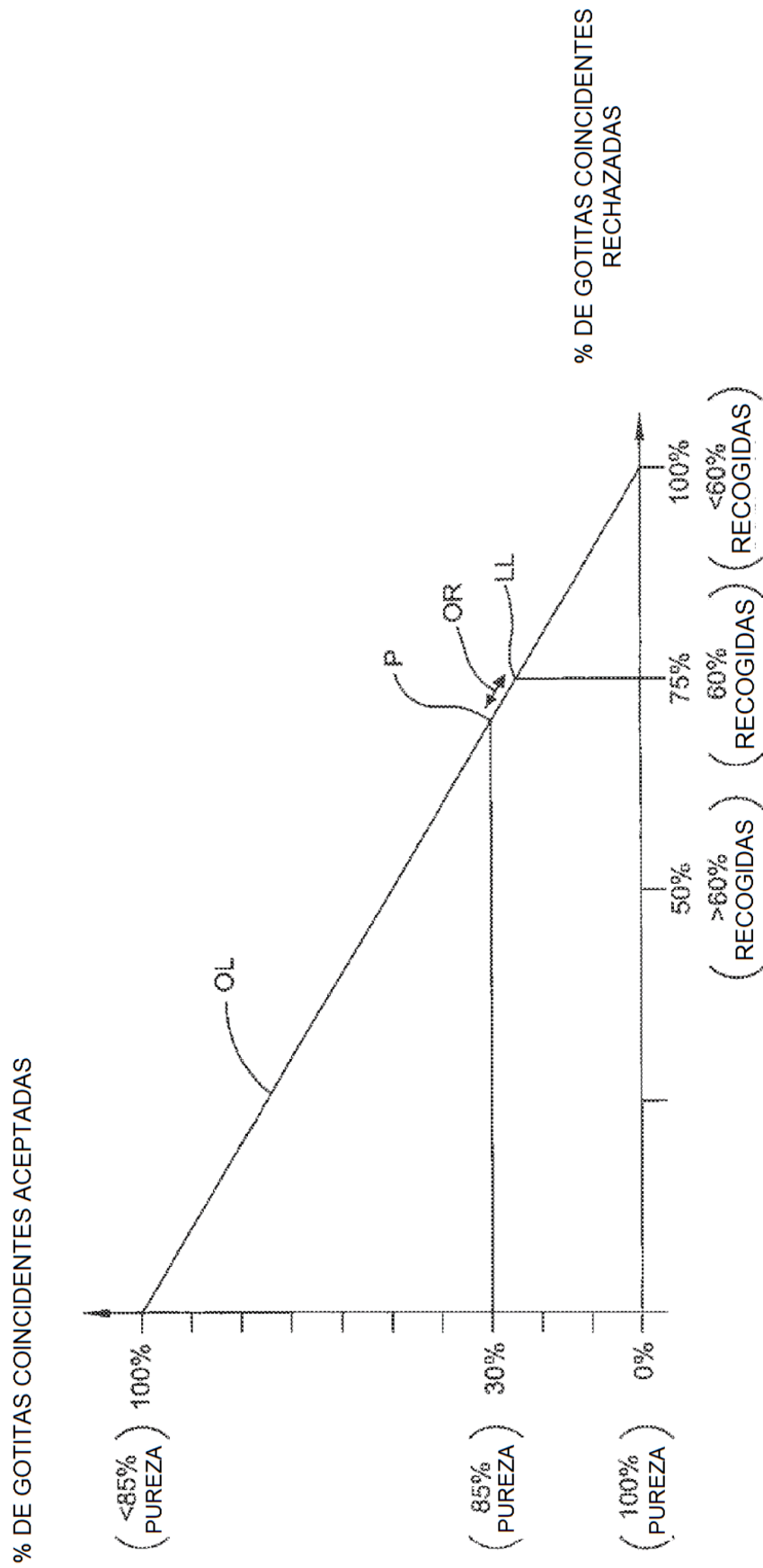


FIG. 82

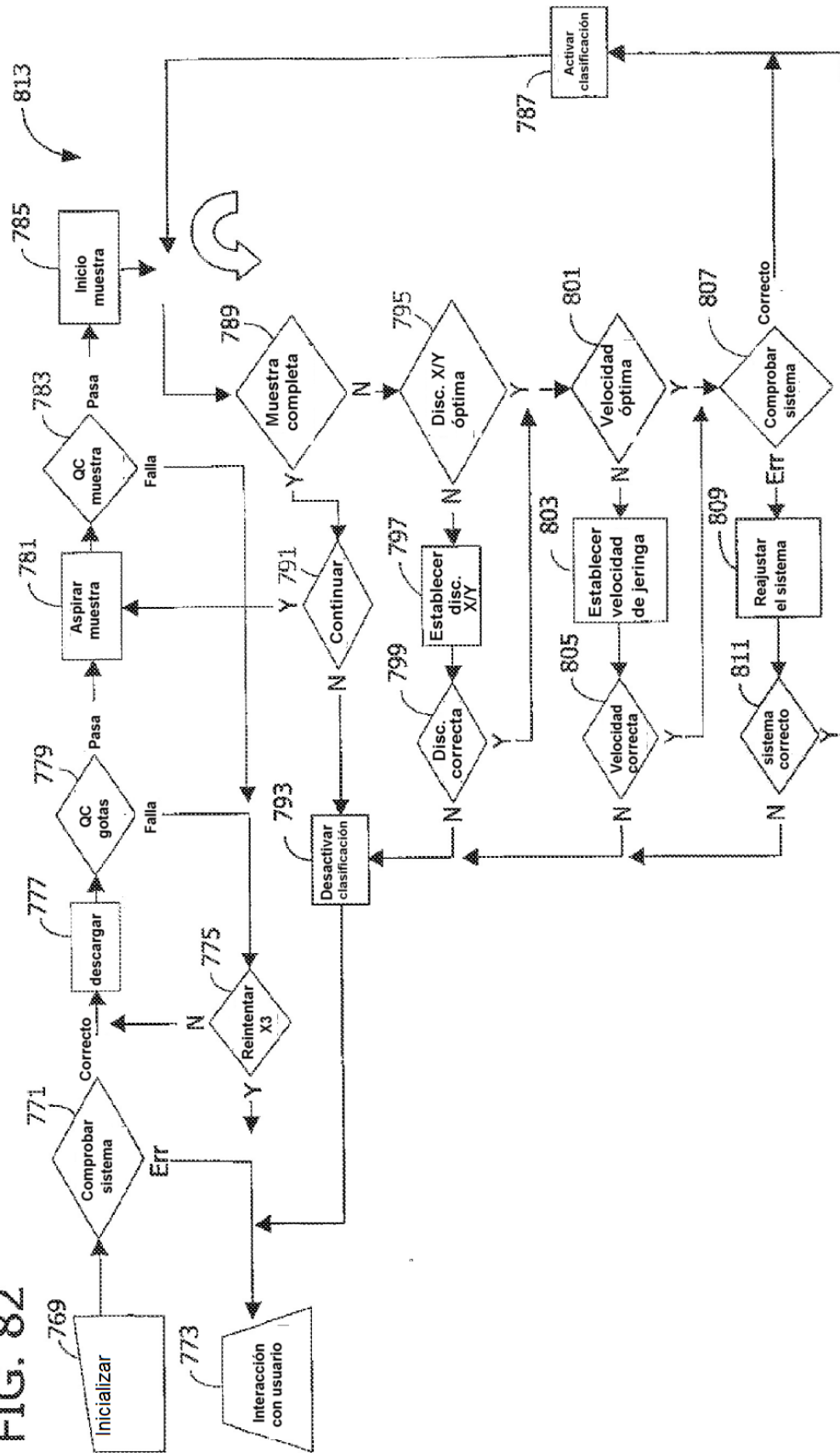
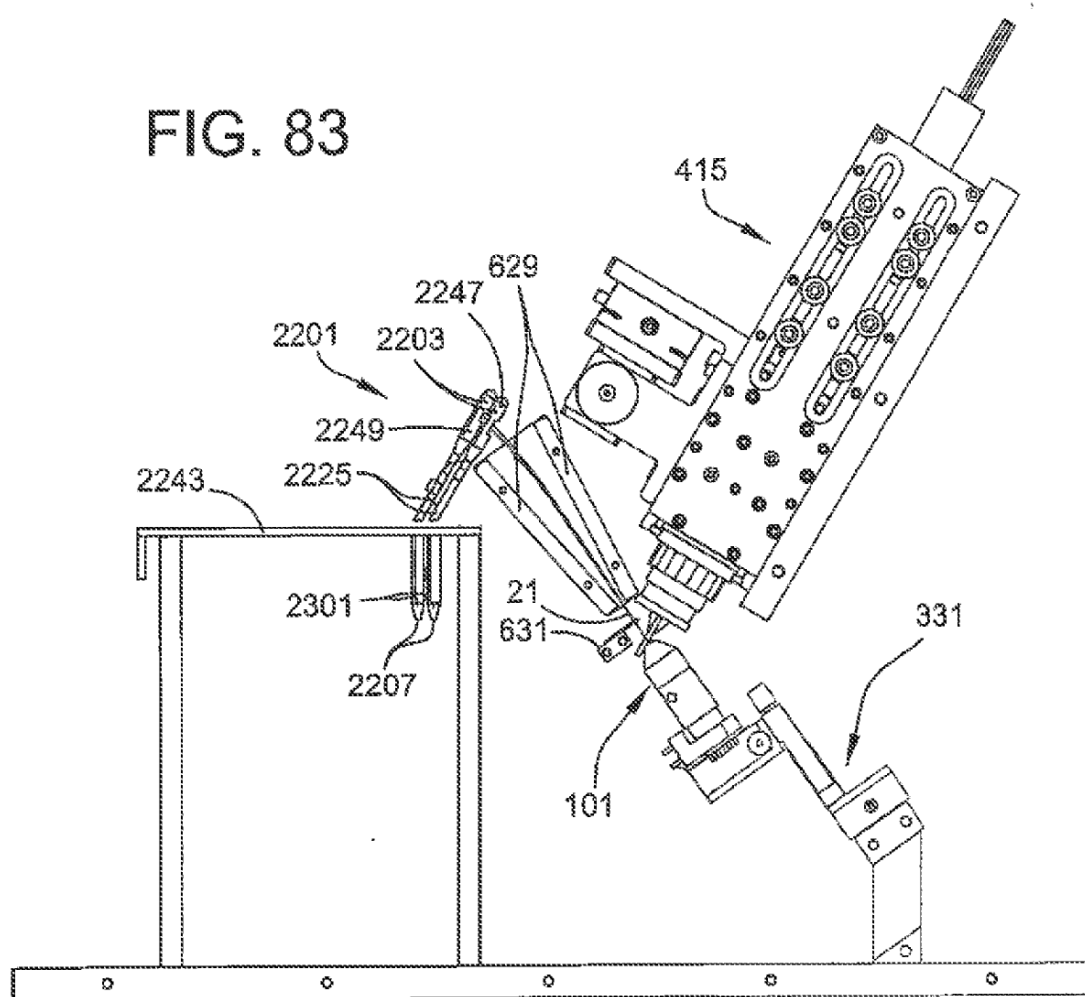
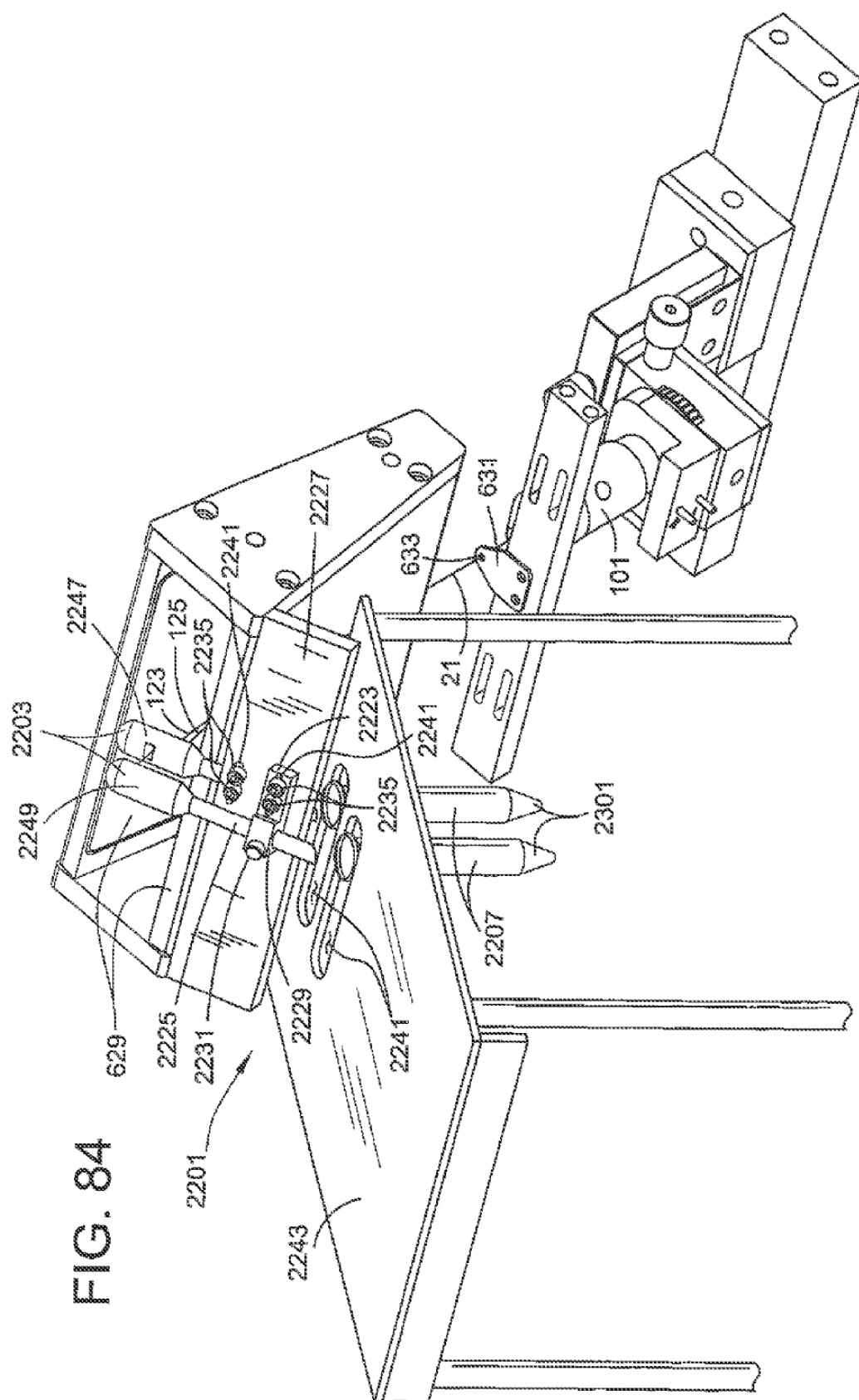


FIG. 83





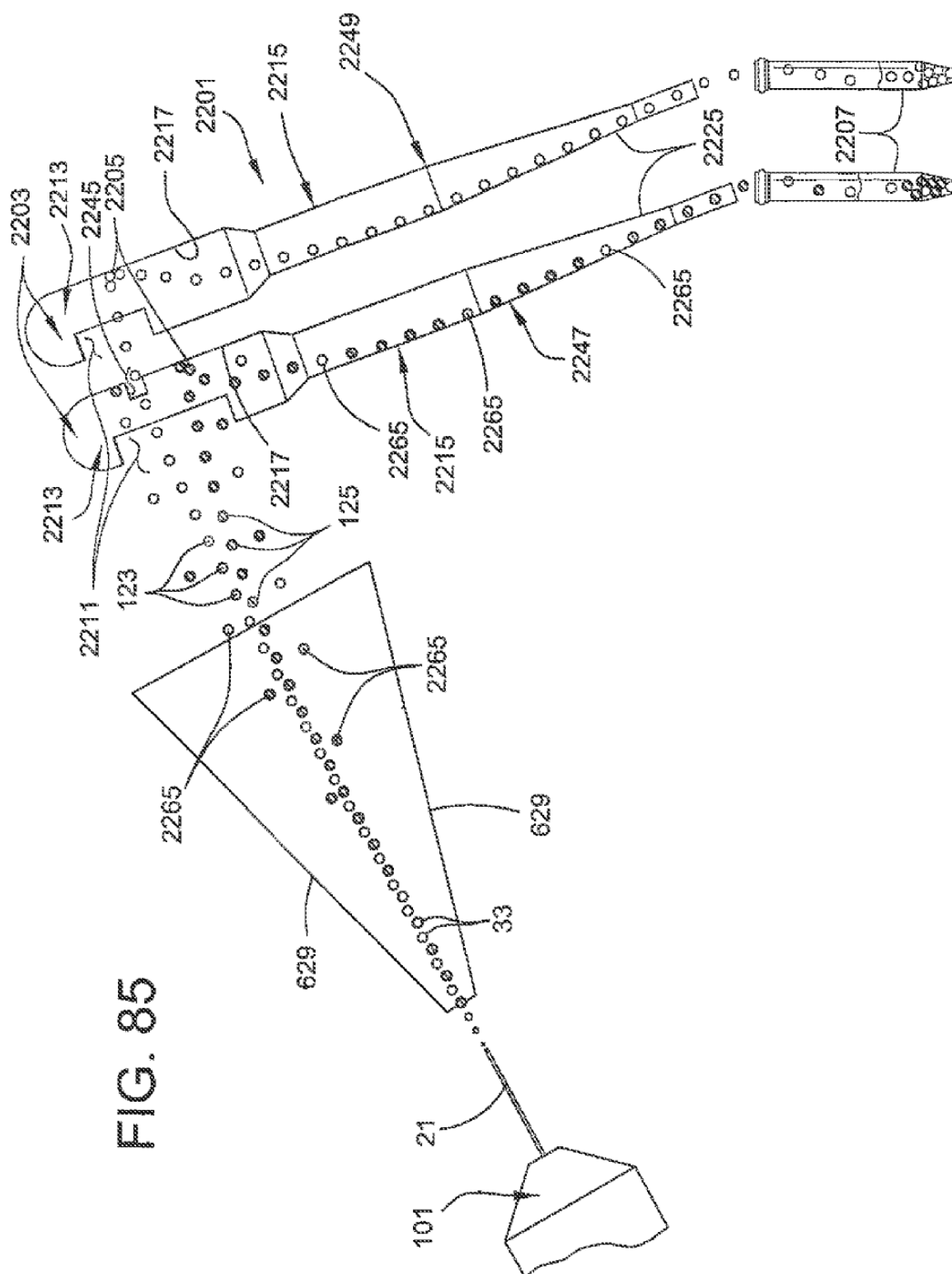


FIG. 85

FIG. 86

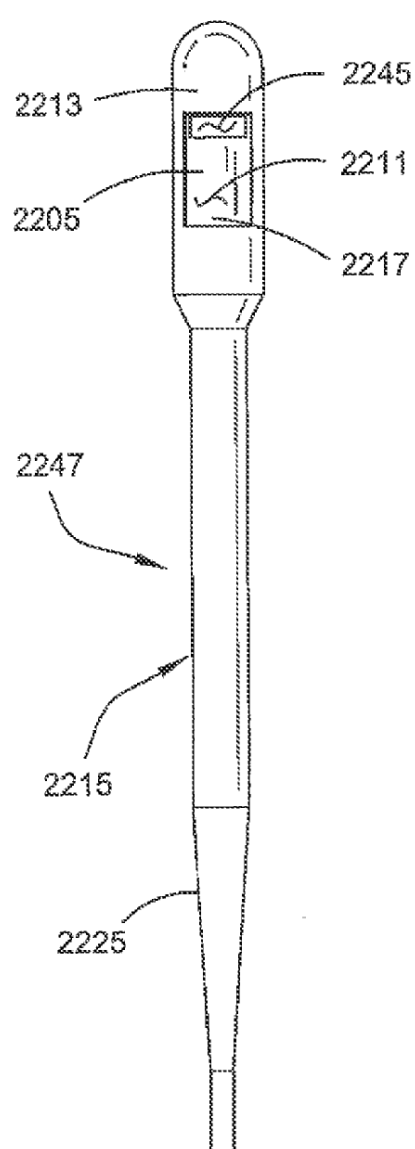


FIG. 87

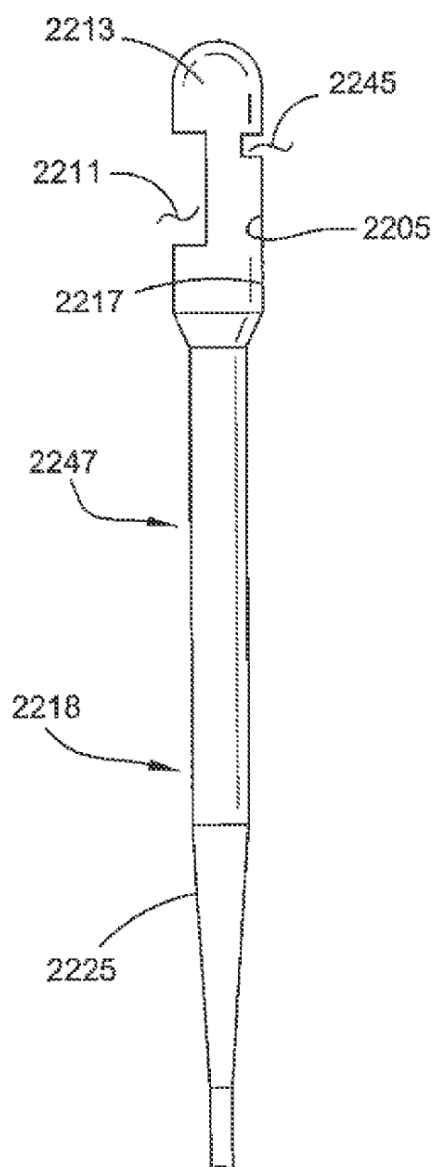


FIG. 88

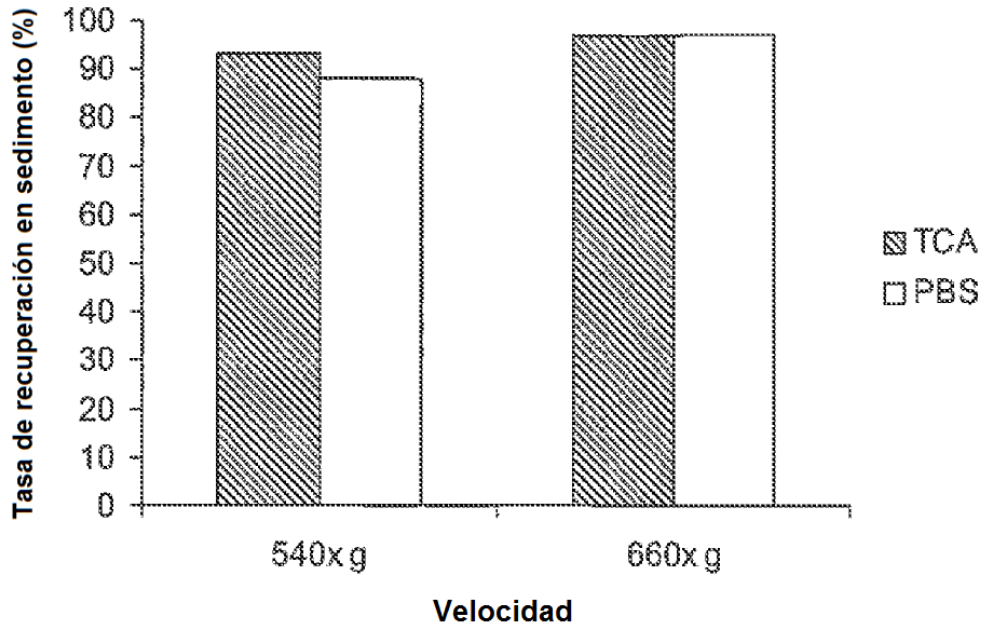


FIG. 89

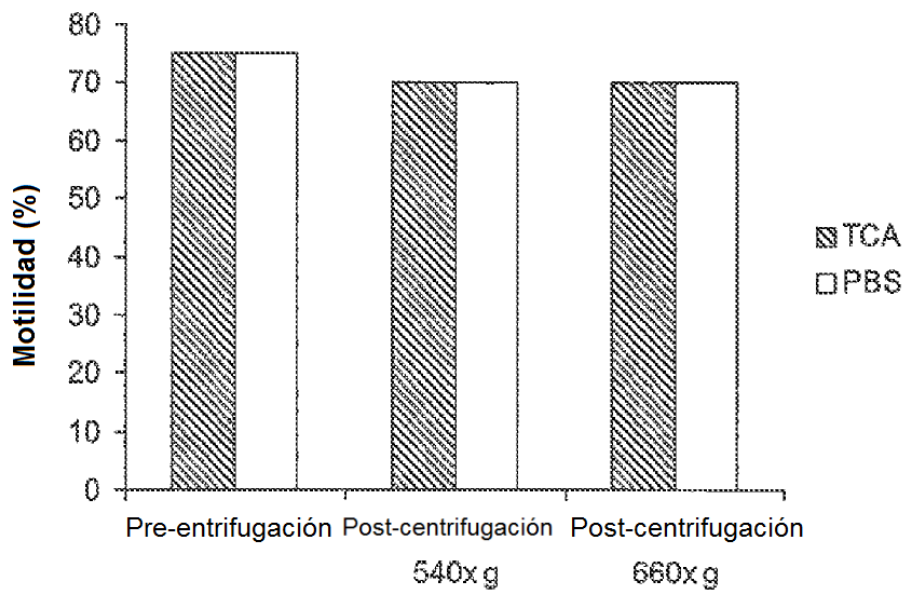


FIG. 90

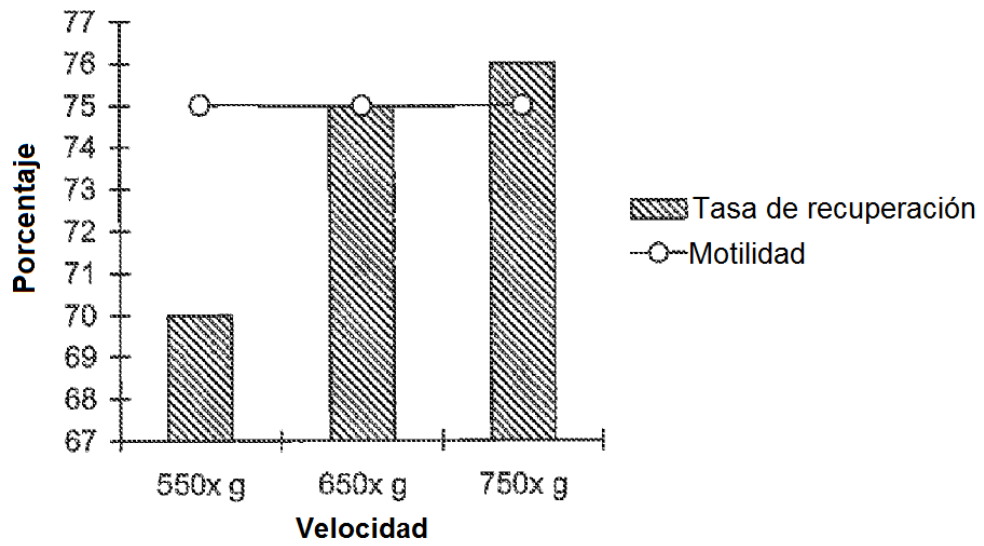


FIG. 91

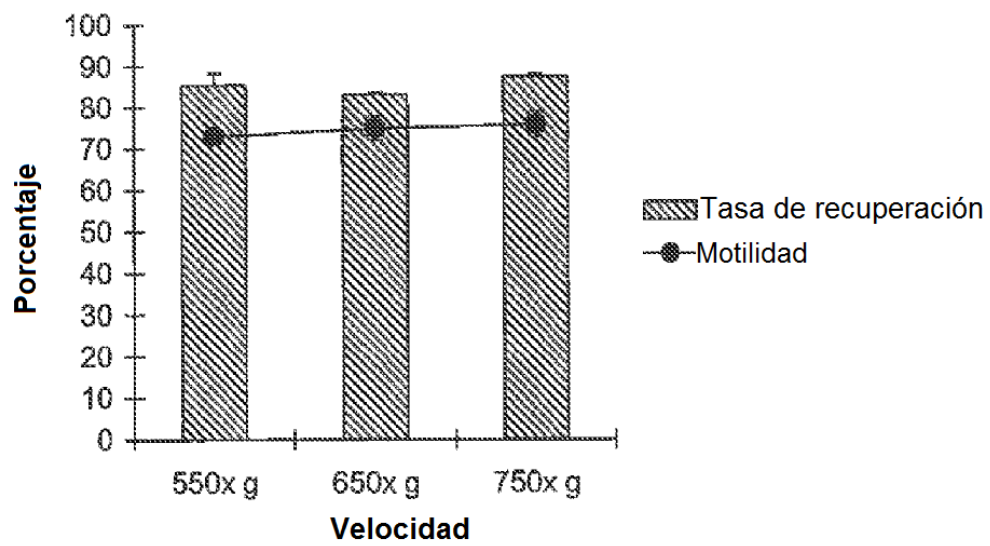


FIG. 92

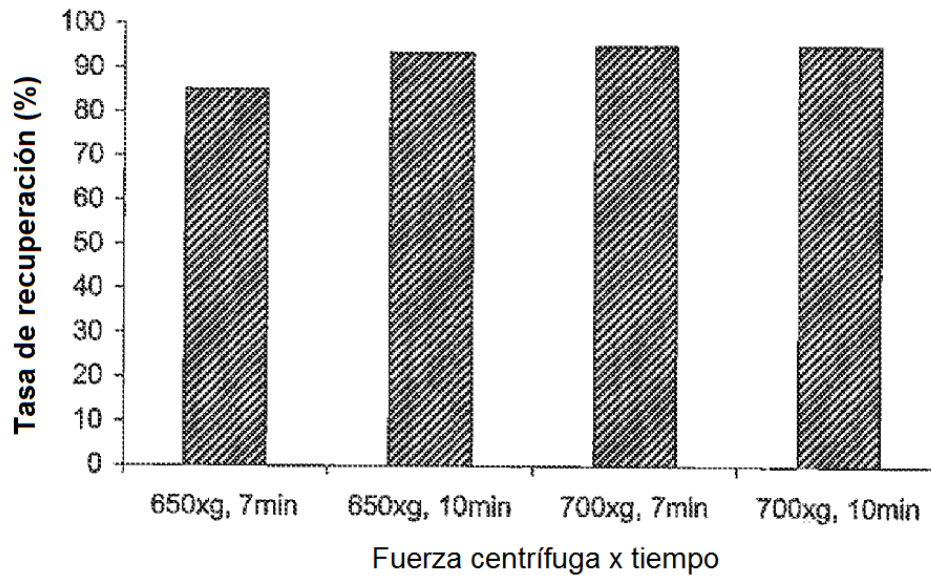


FIG. 93

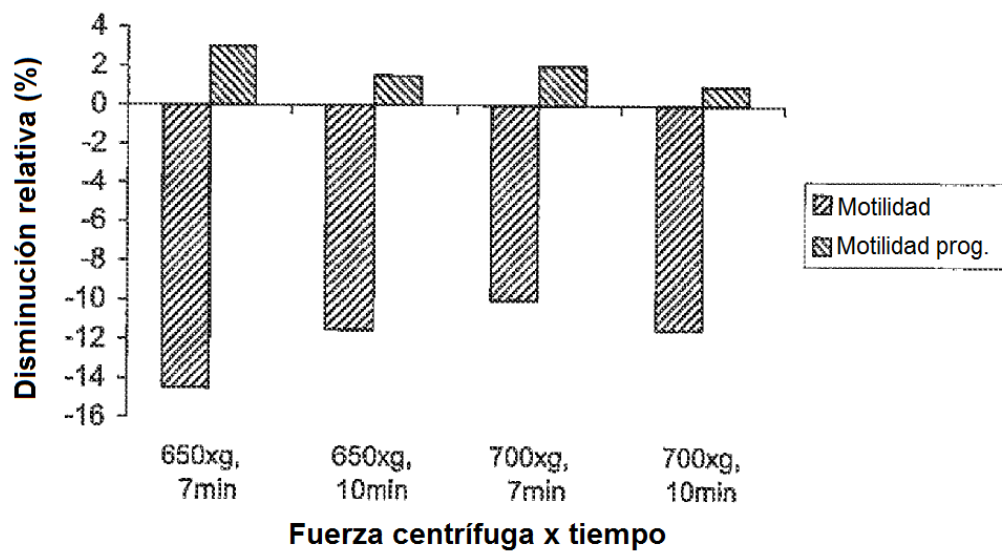


FIG. 94

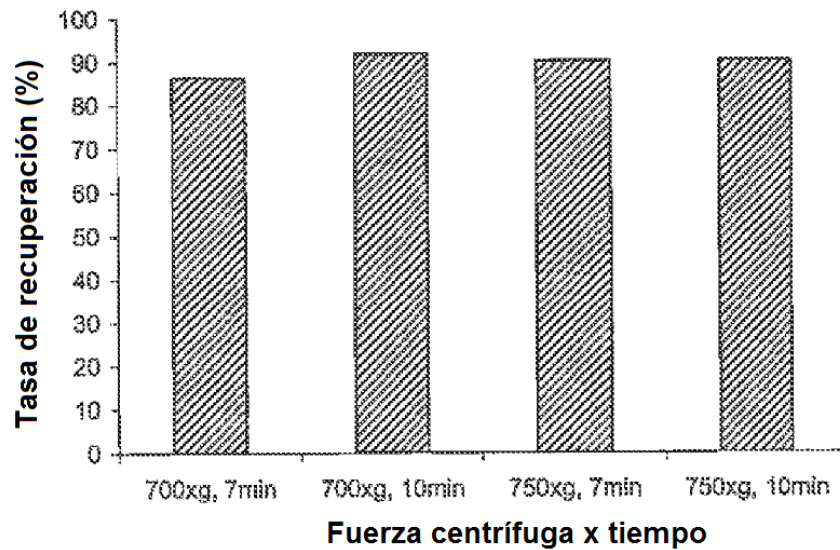
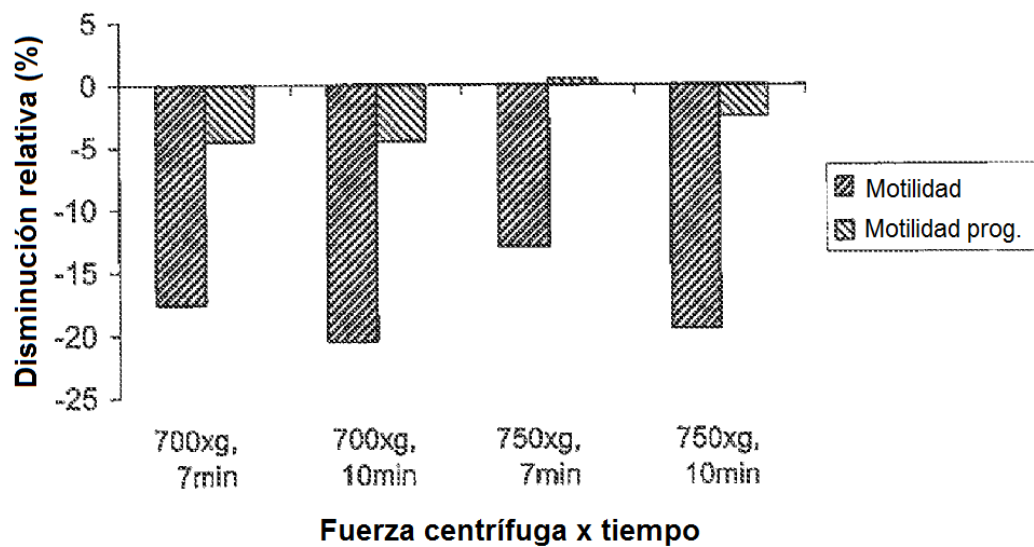


FIG. 95



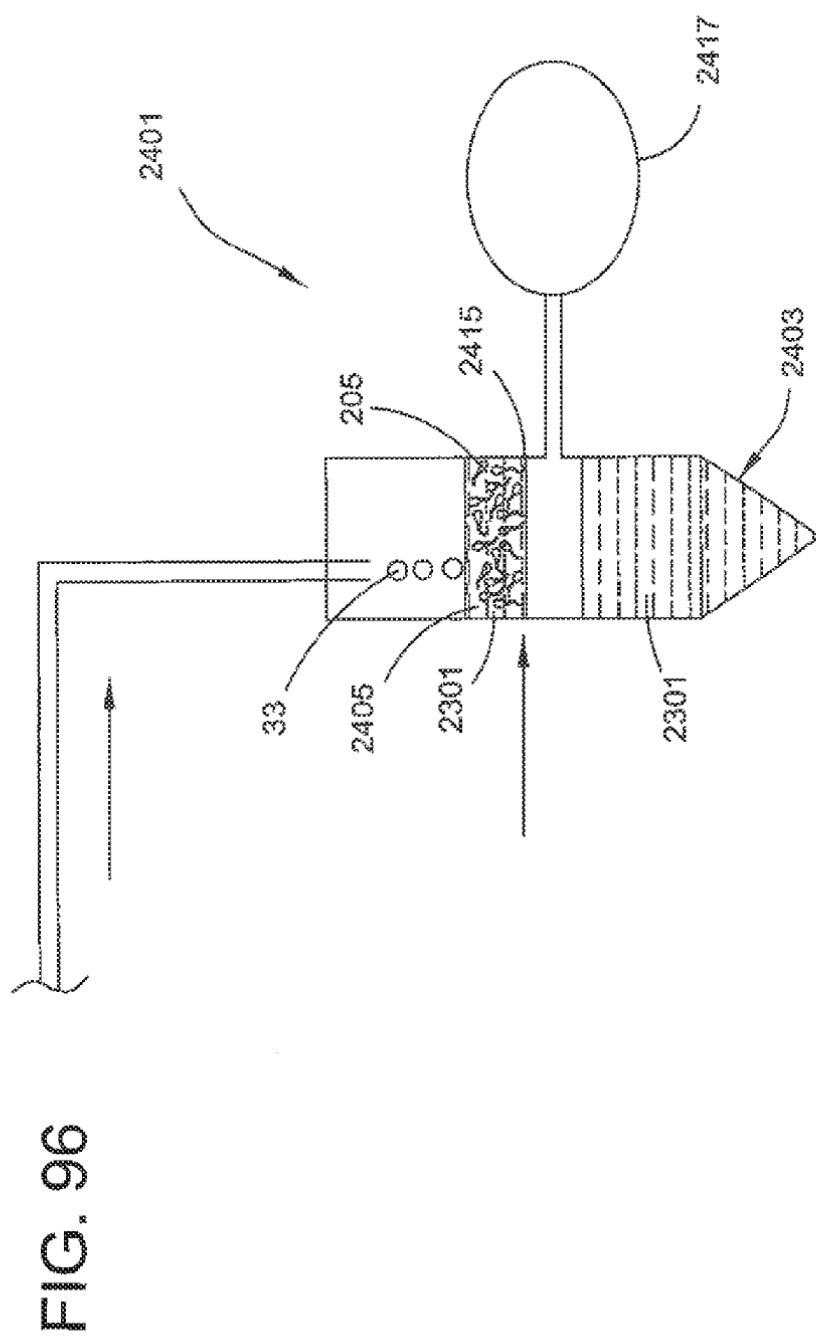


FIG. 97

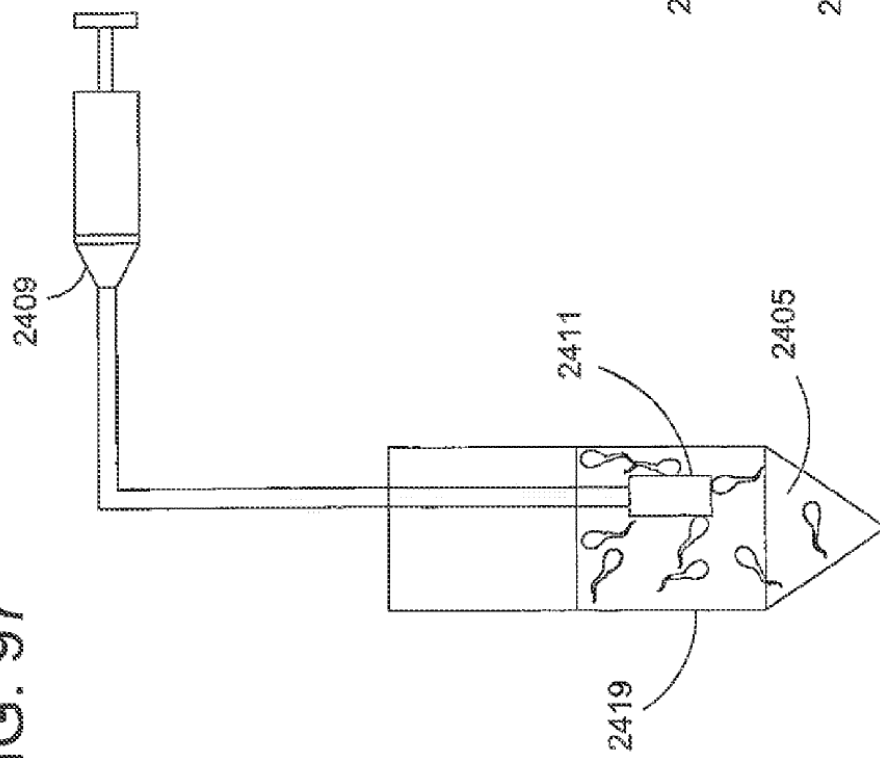
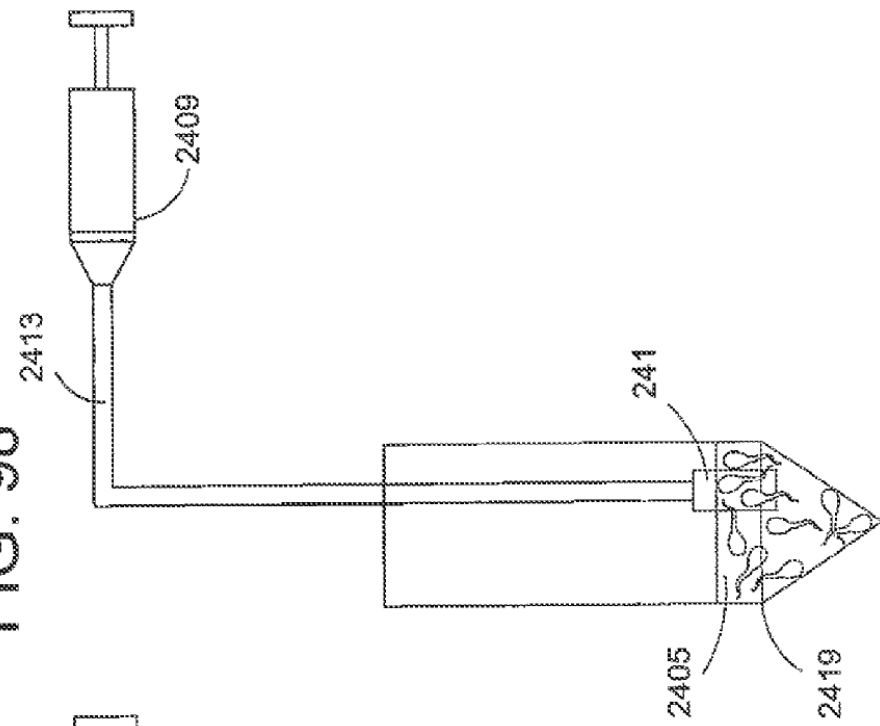
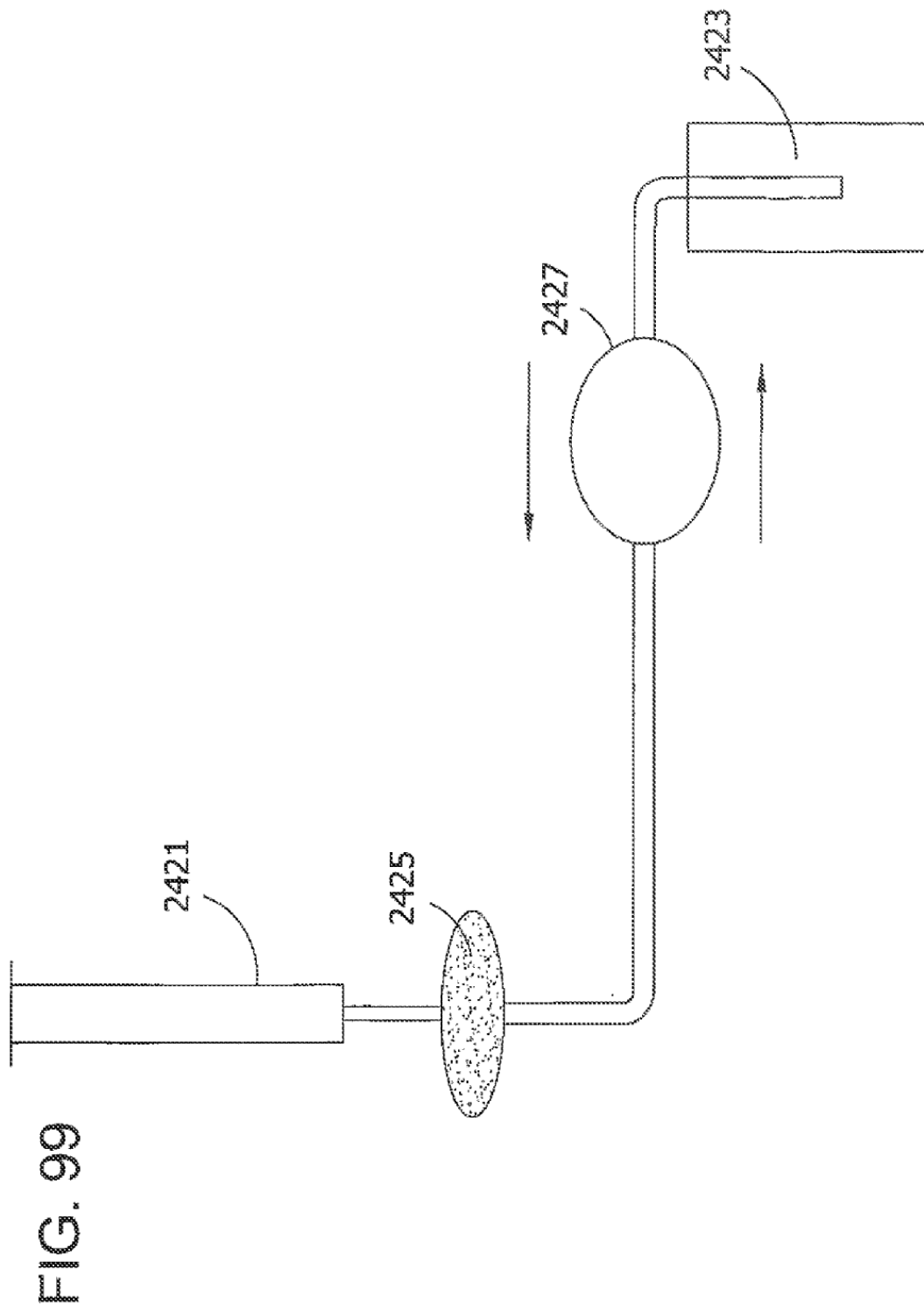


FIG. 98





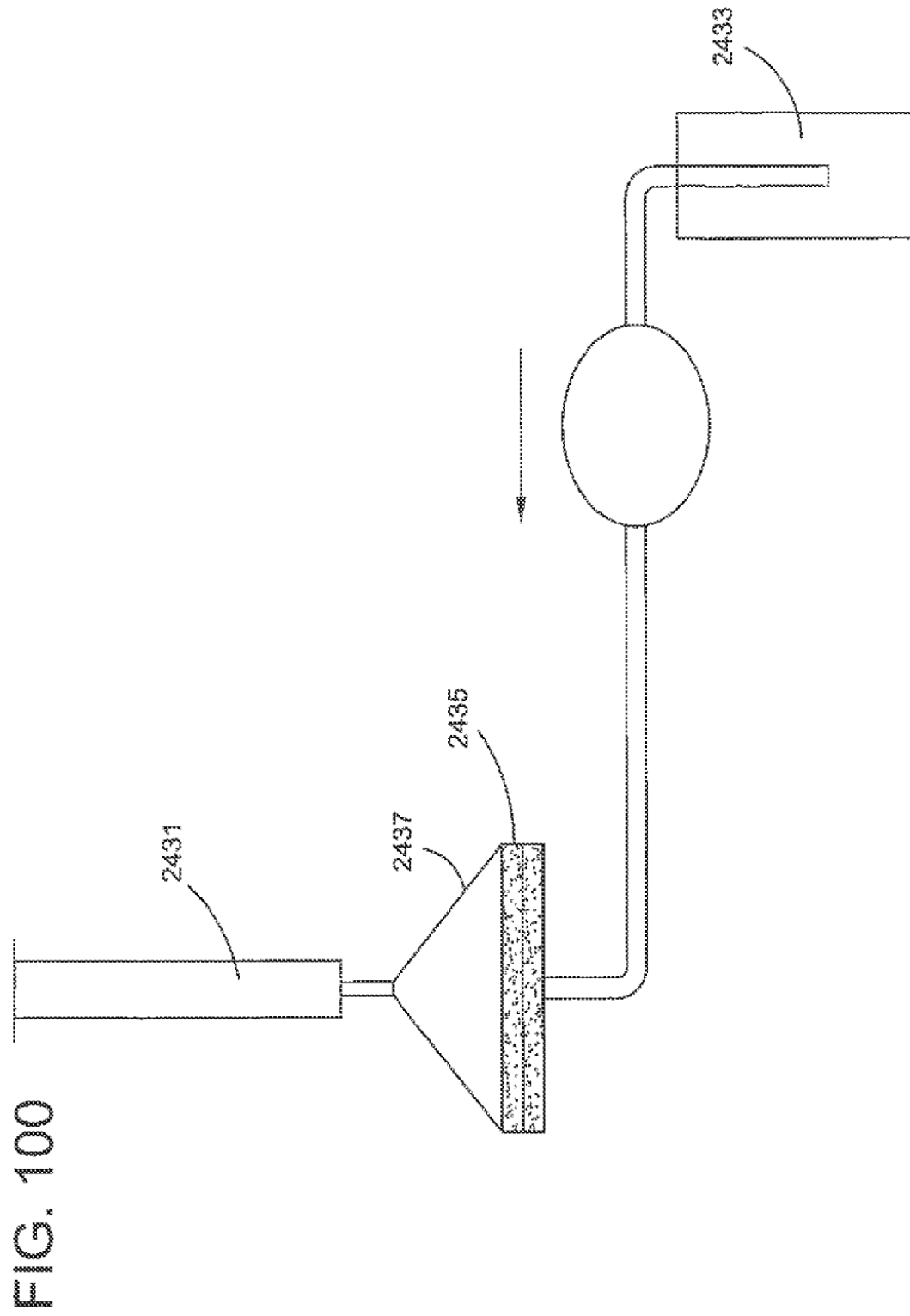


FIG. 101

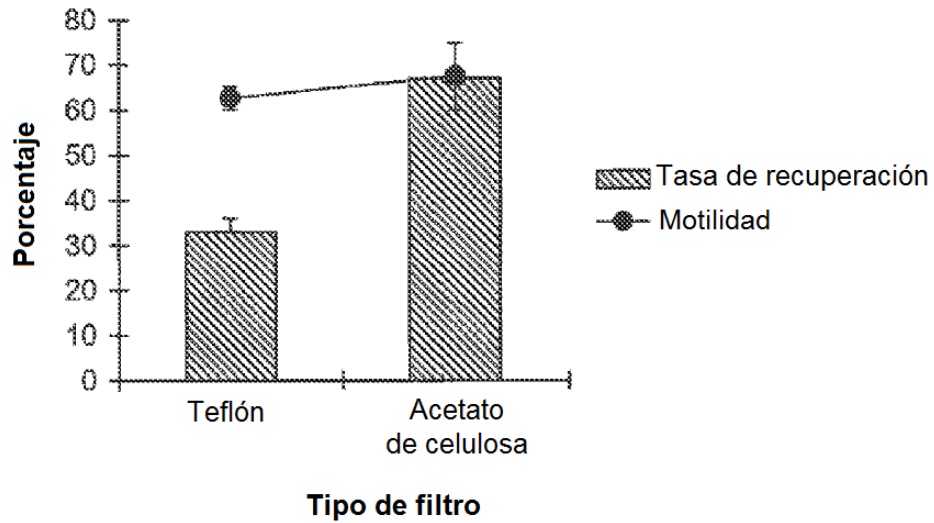


FIG. 102

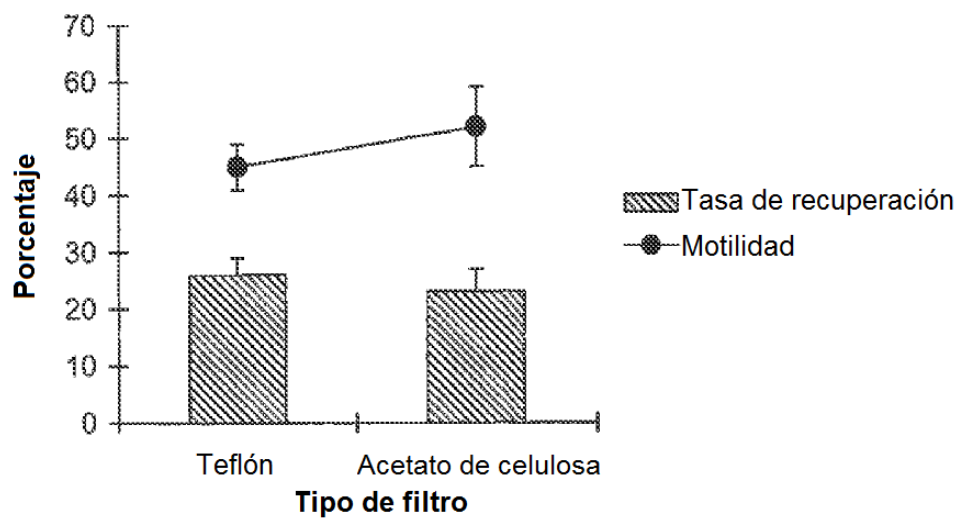


FIG. 103

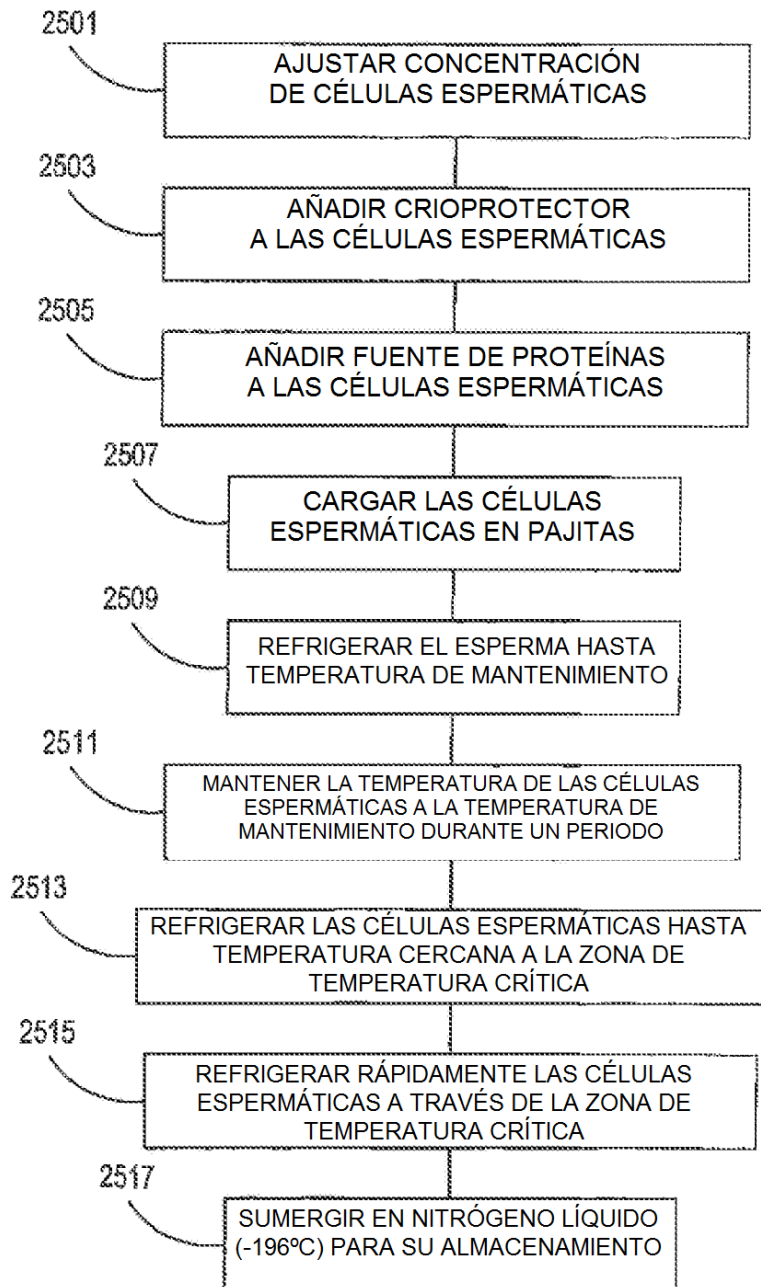


FIG. 104

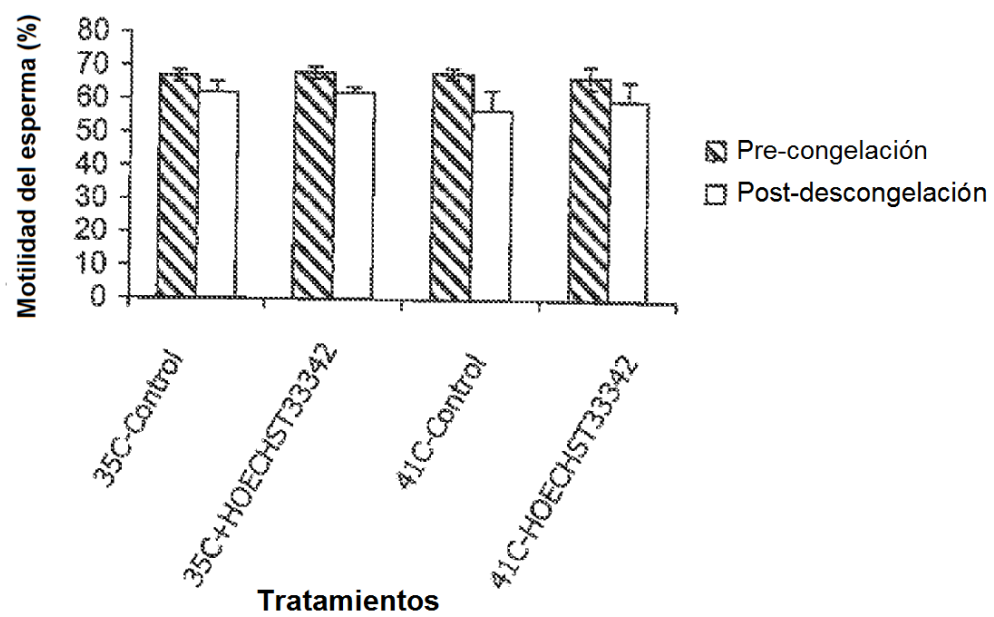
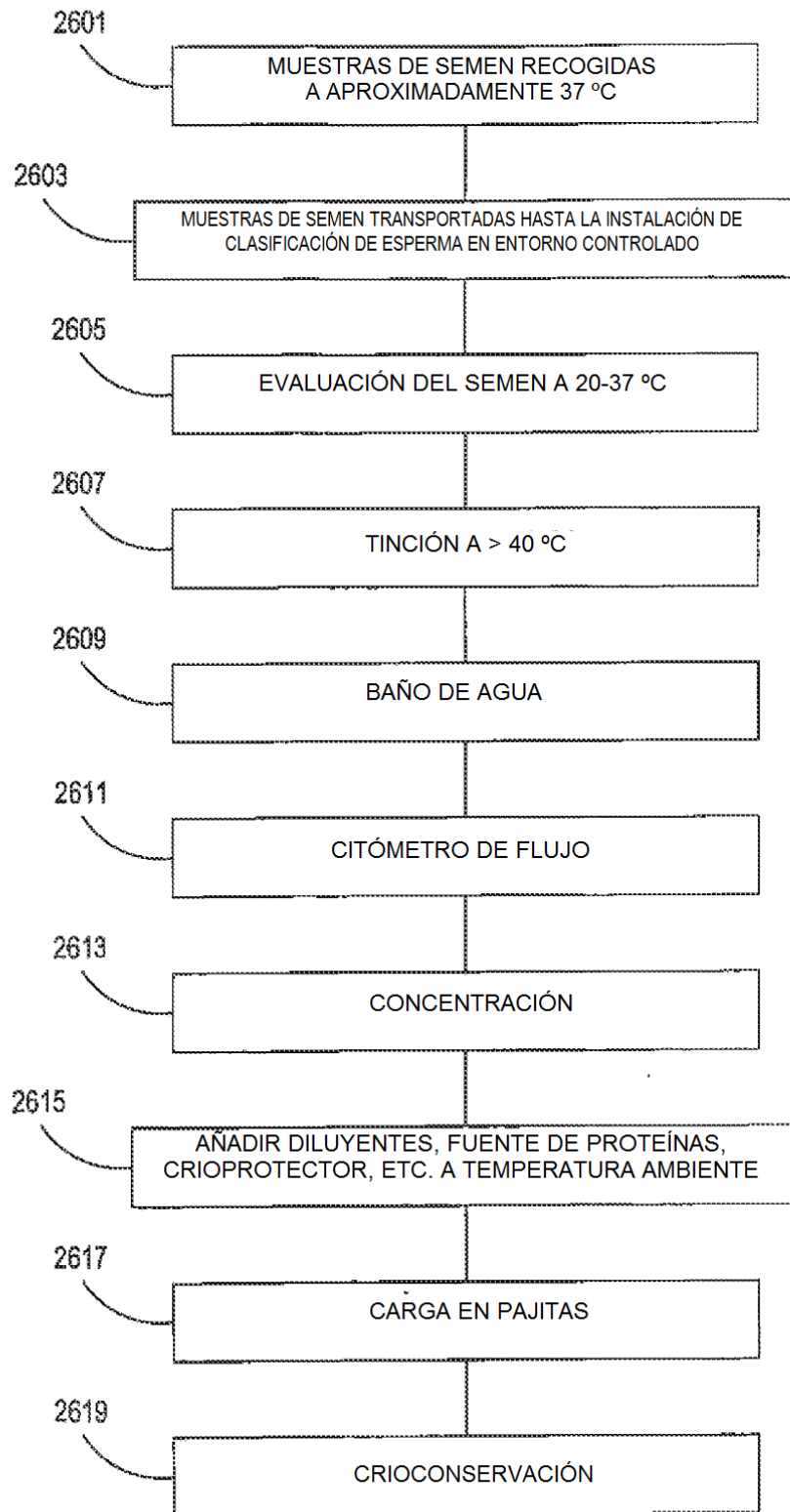


FIG. 105



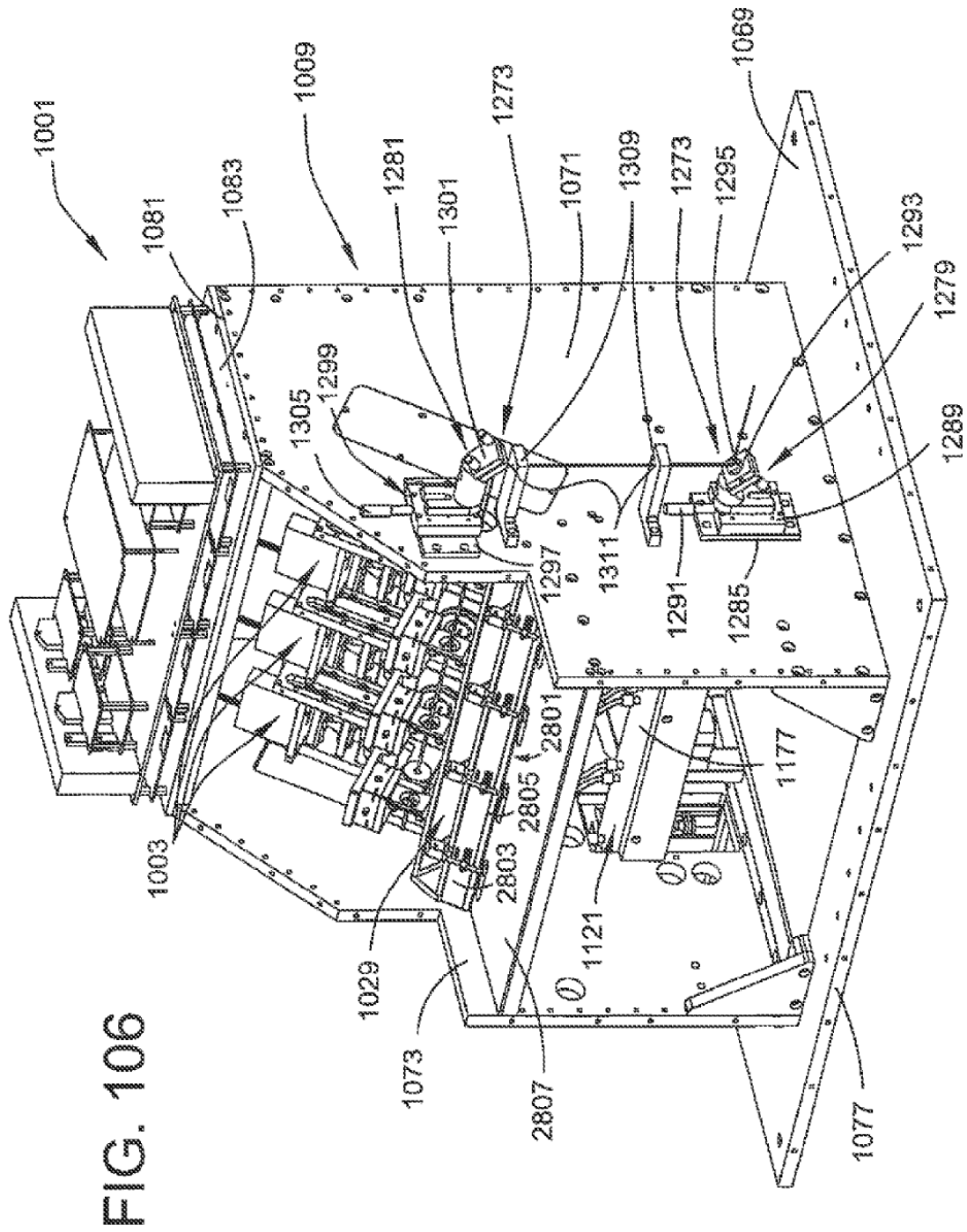


FIG. 107

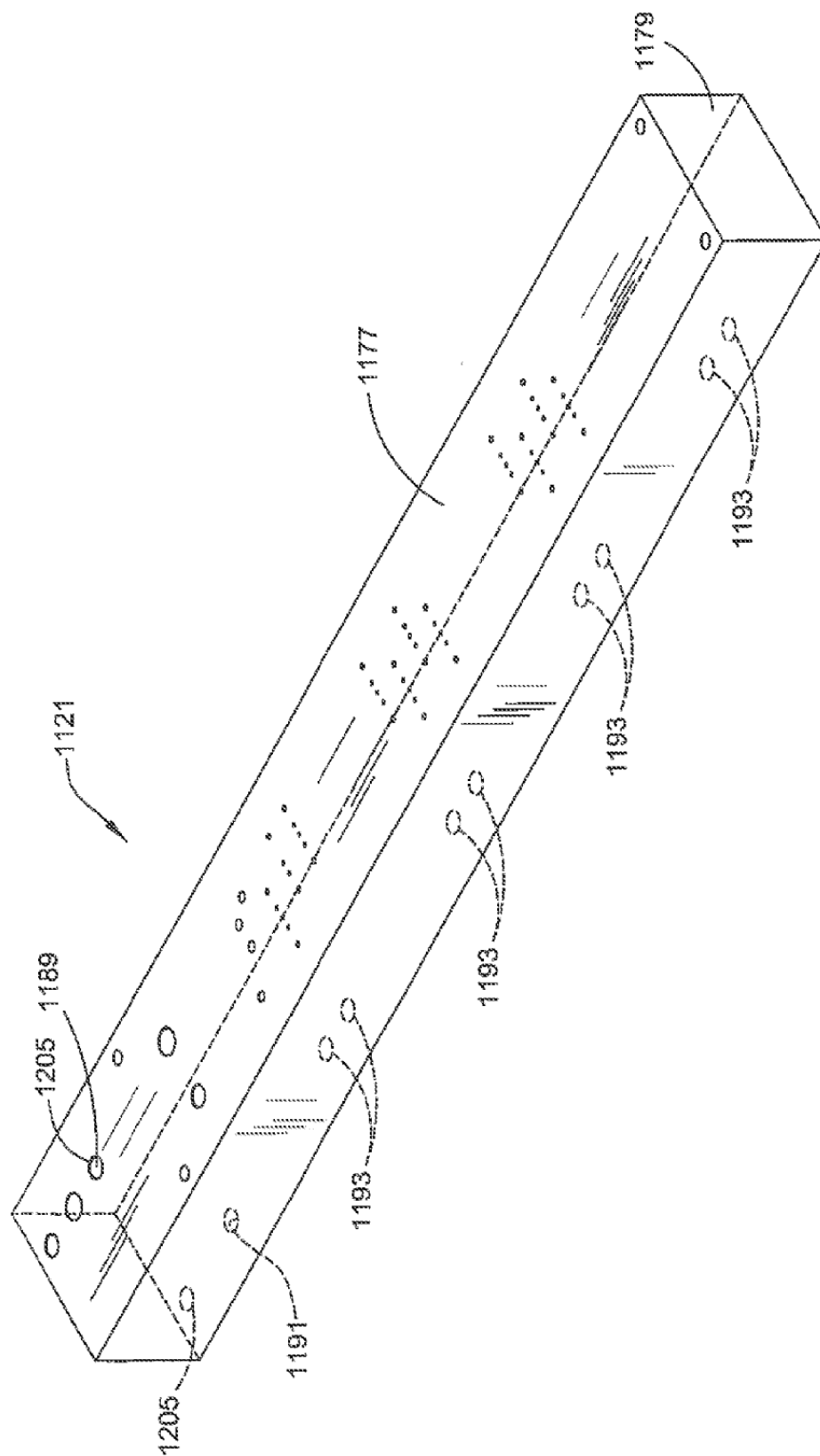
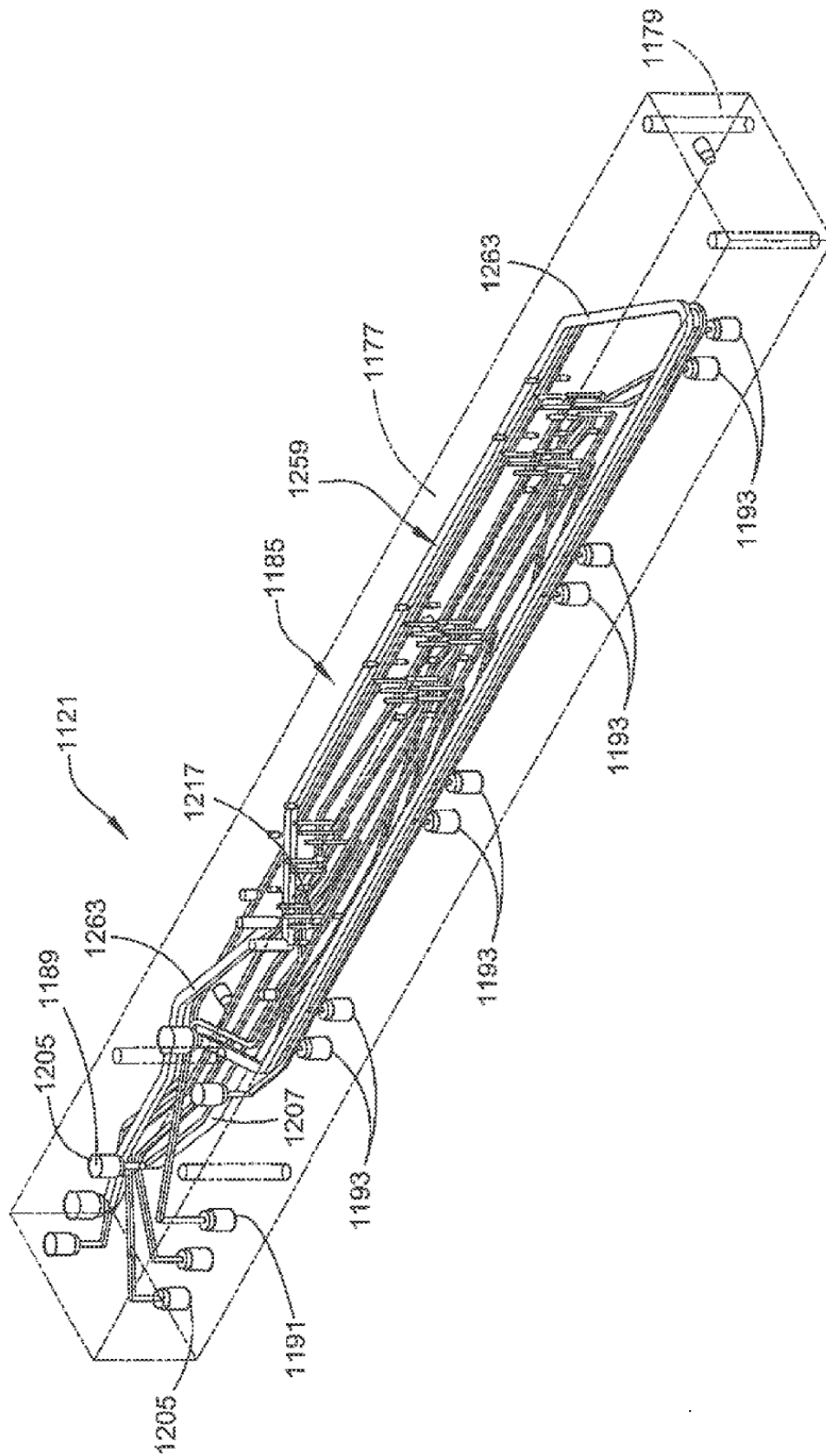
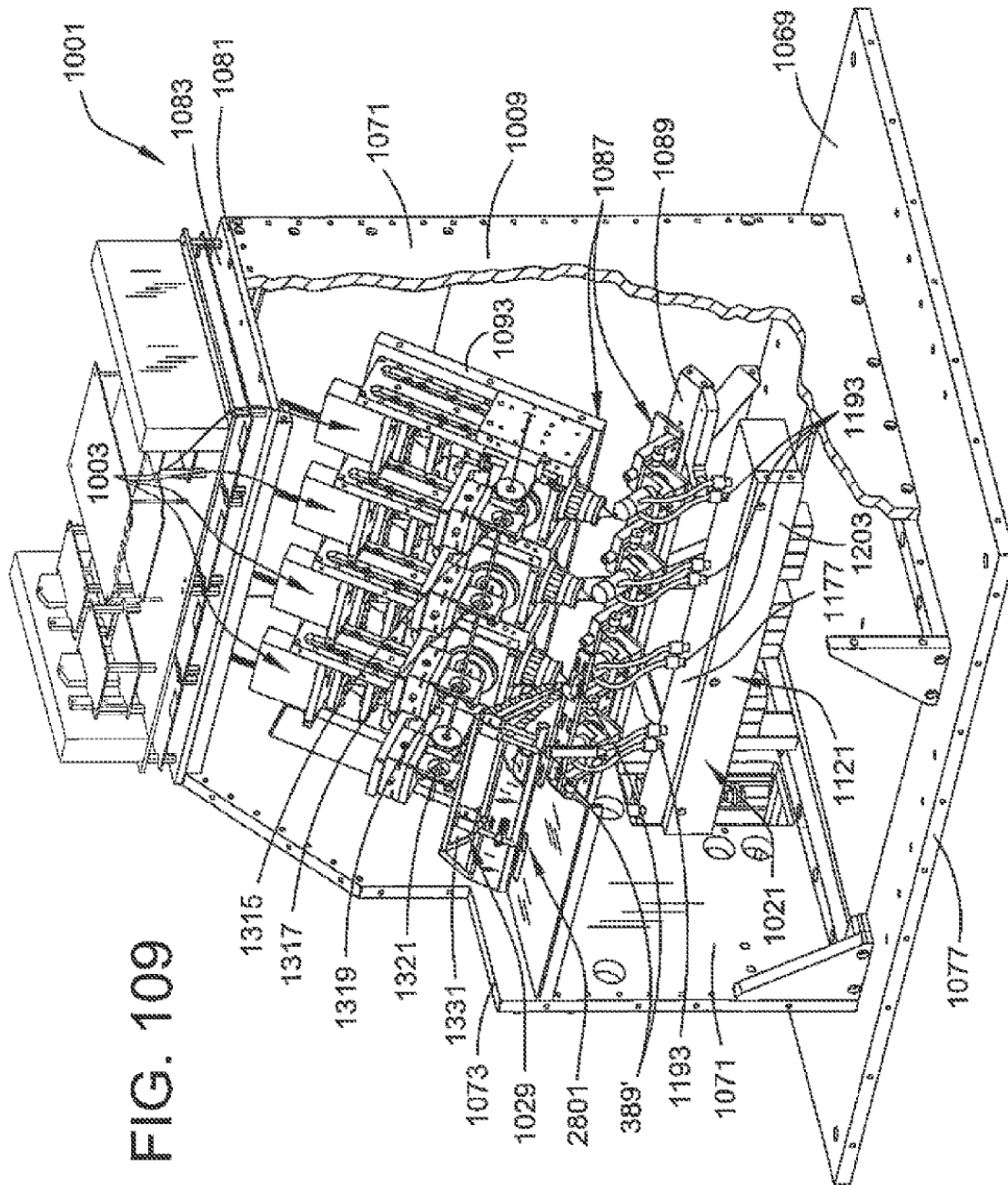


FIG. 108





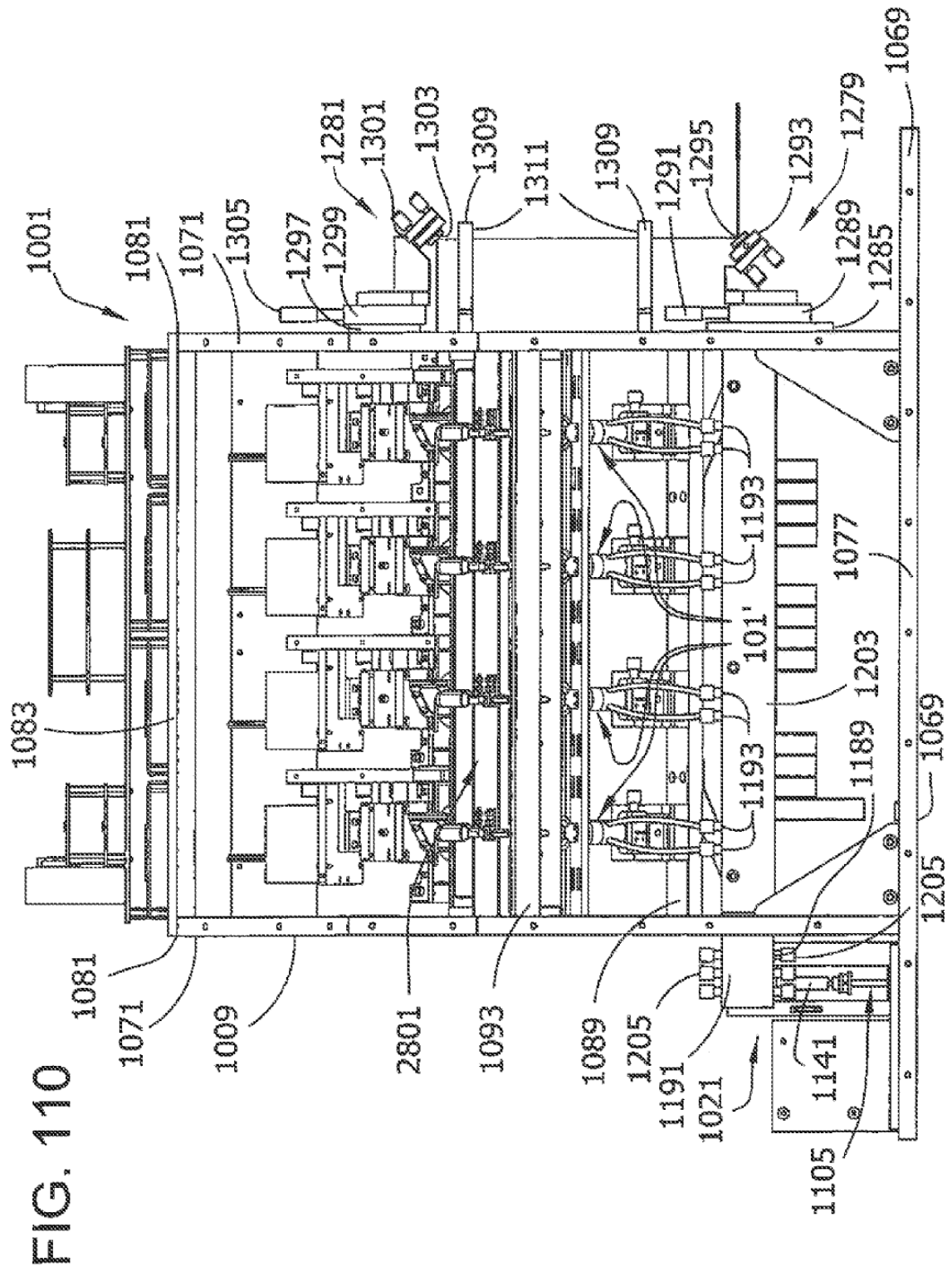


FIG. 111

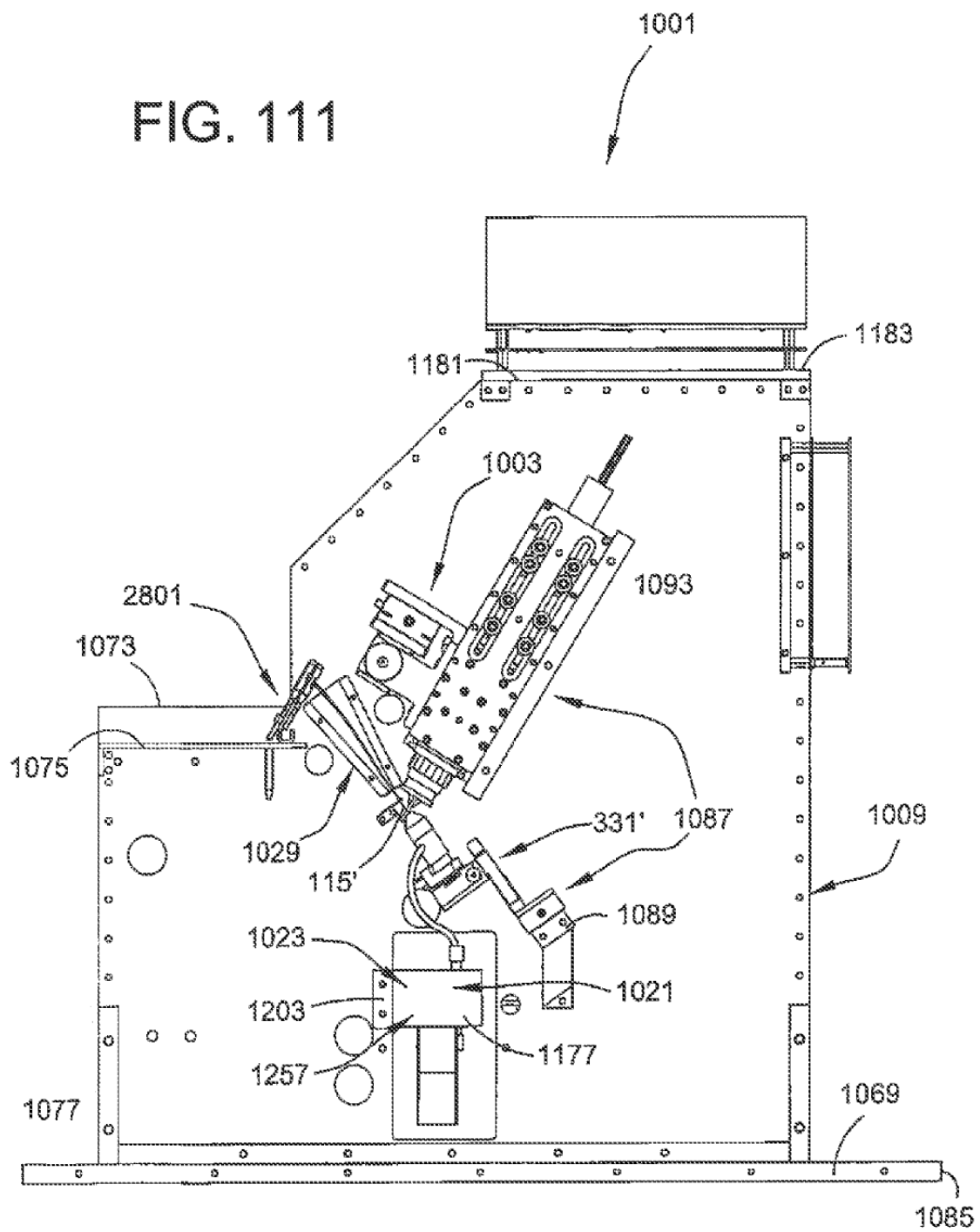
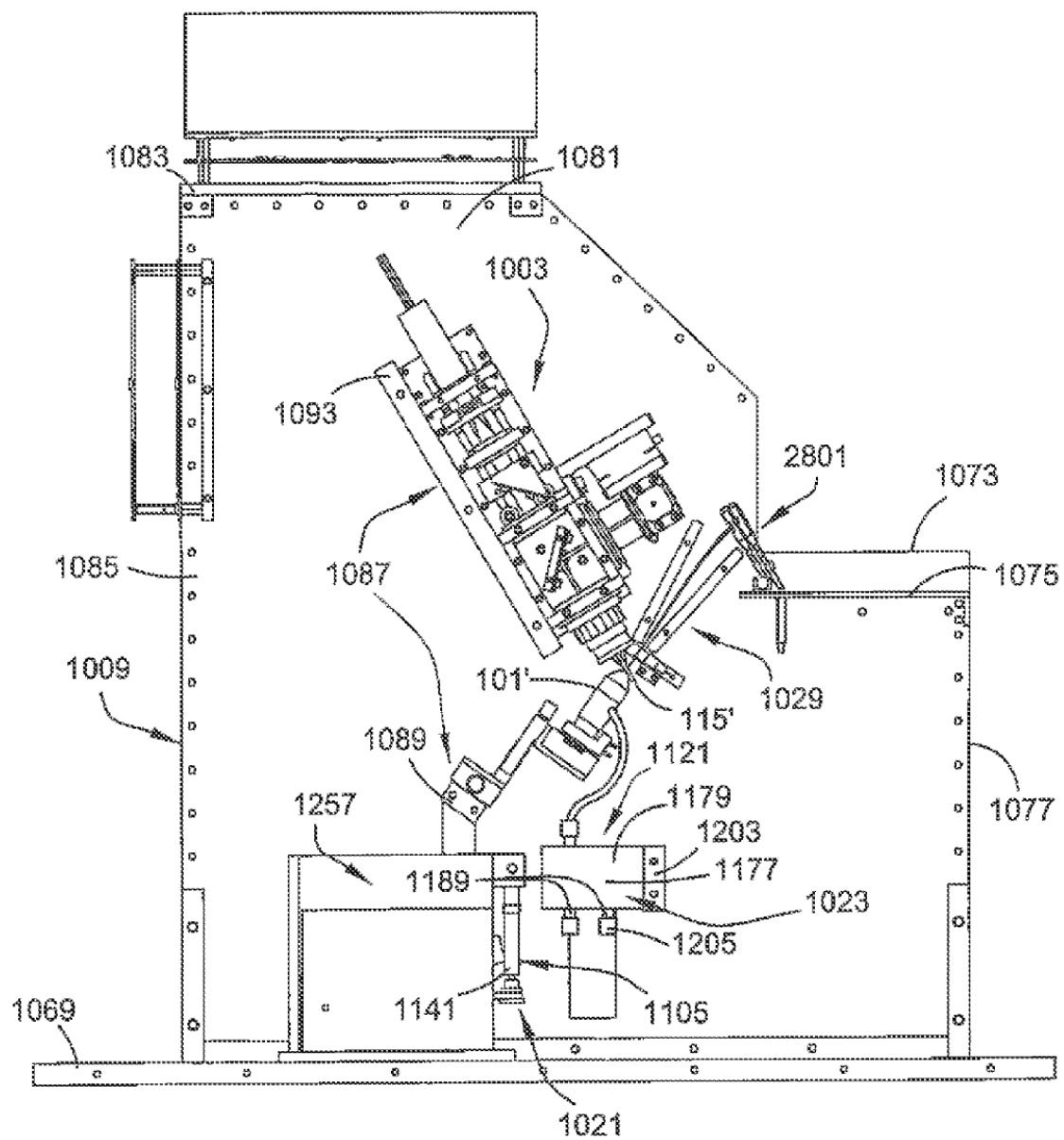


FIG. 112



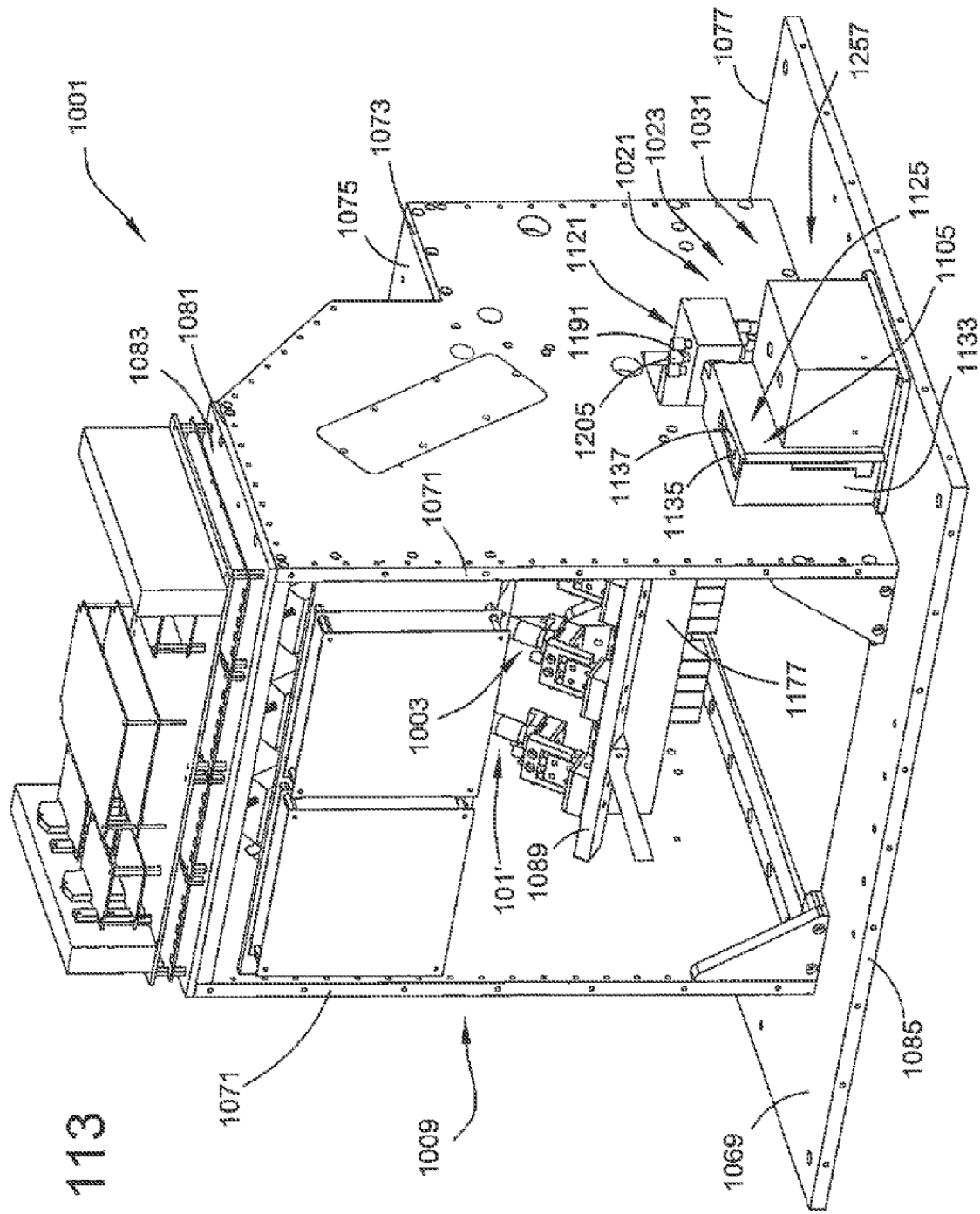
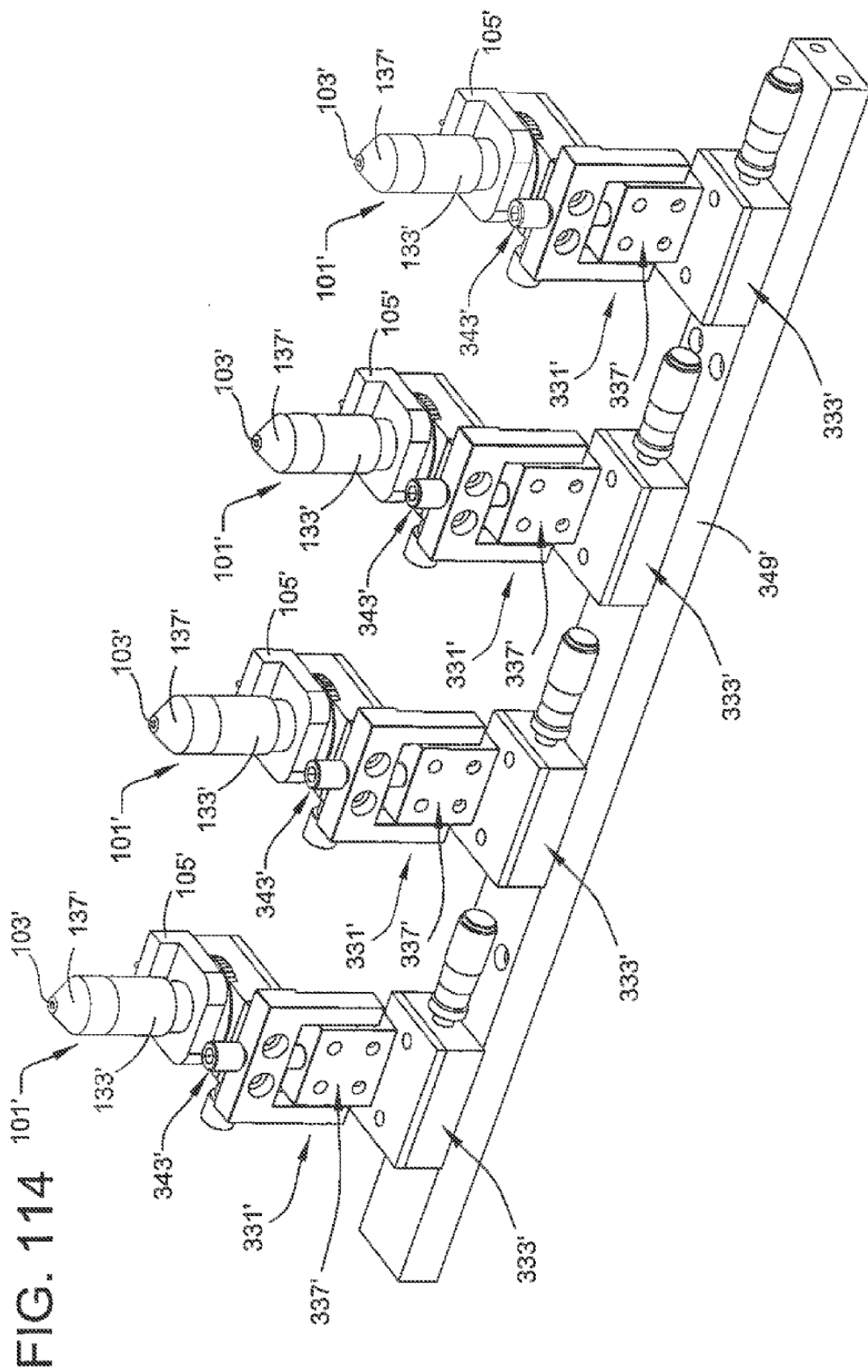
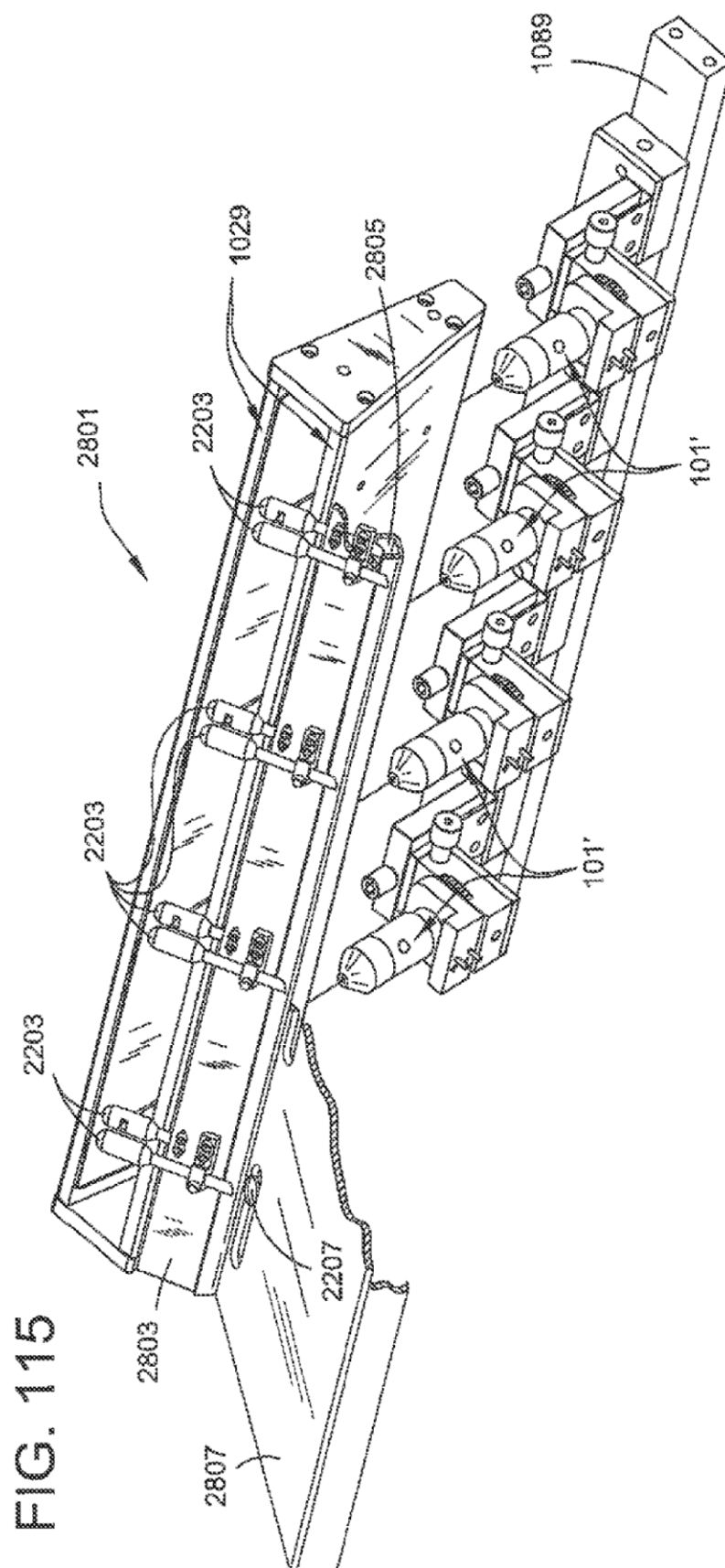


FIG. 113





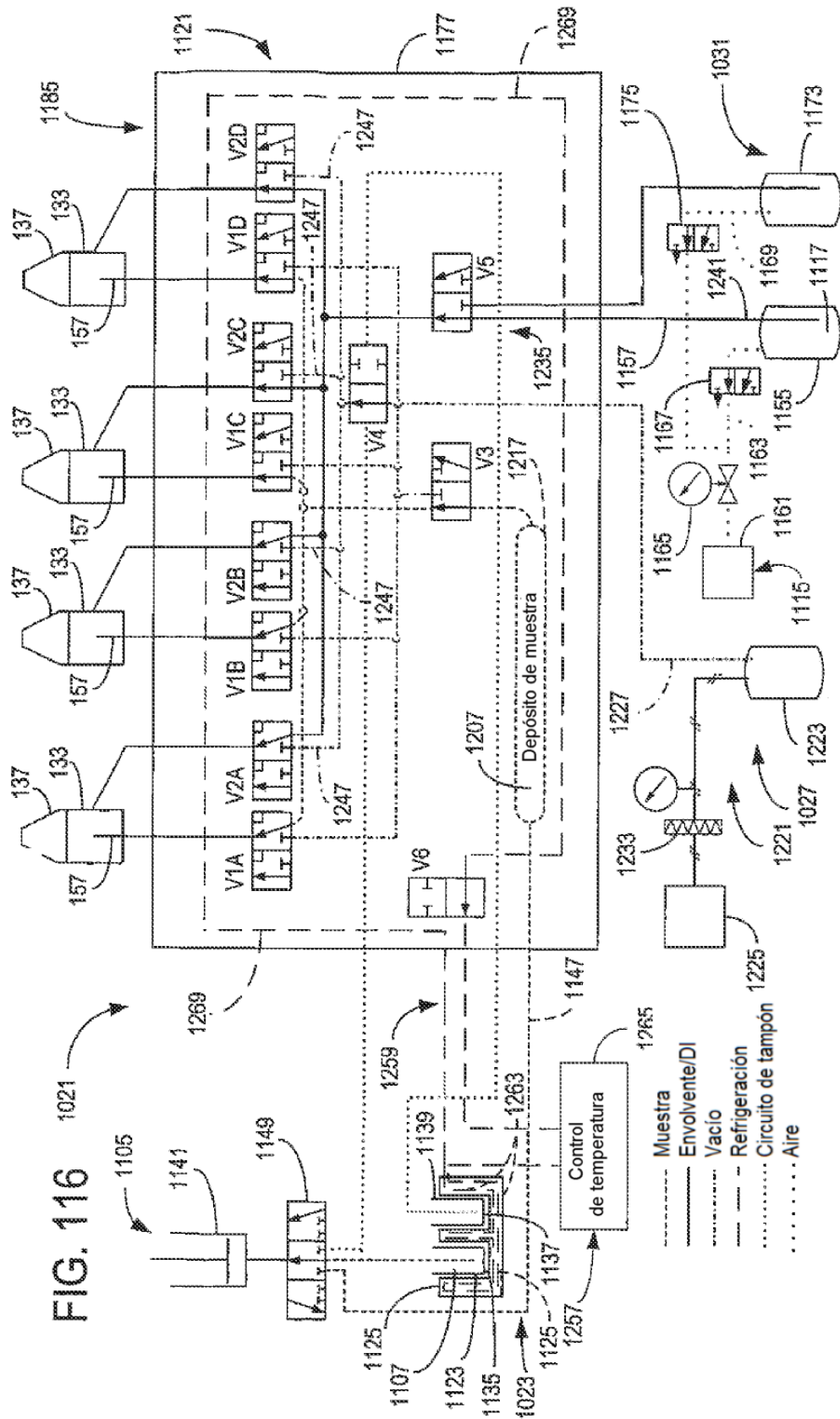


FIG. 117

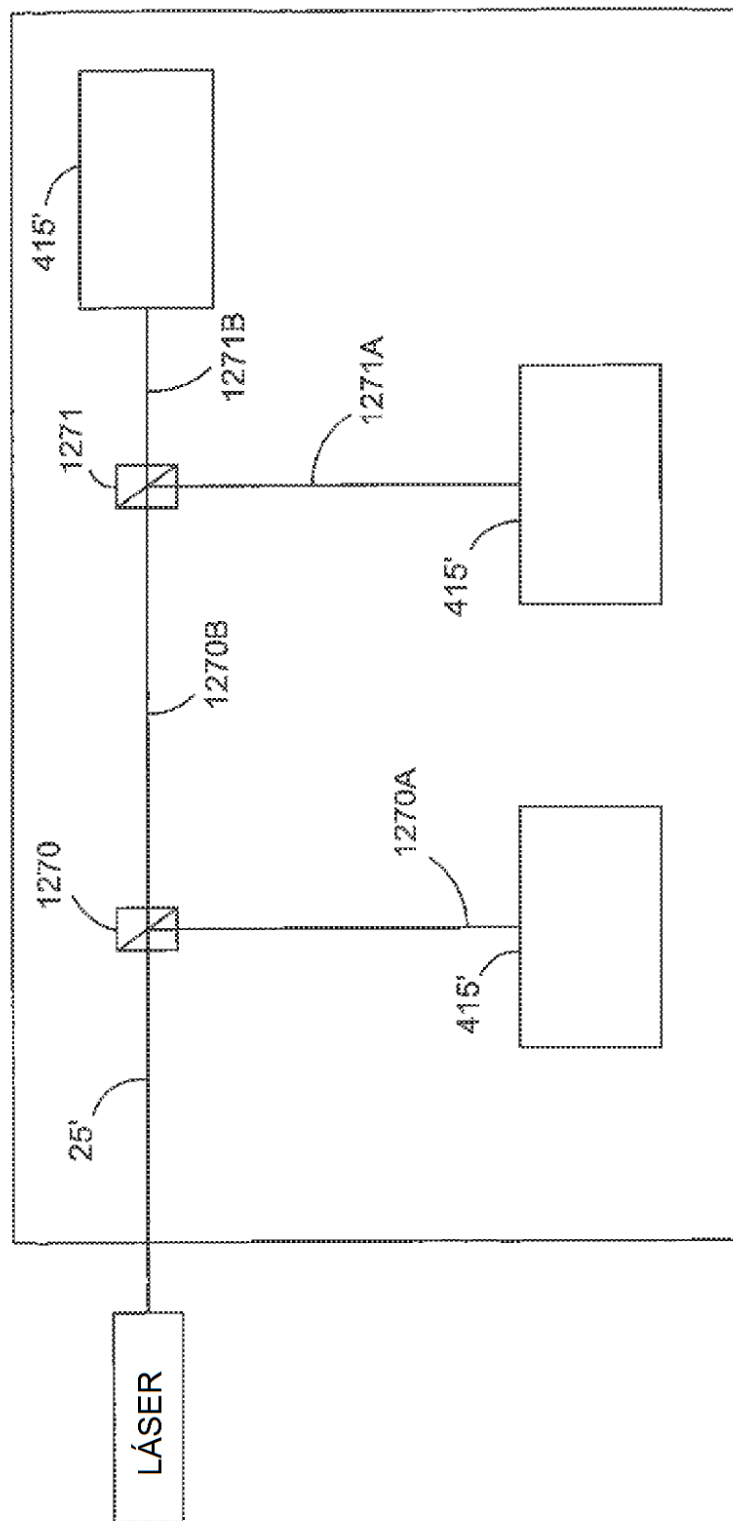
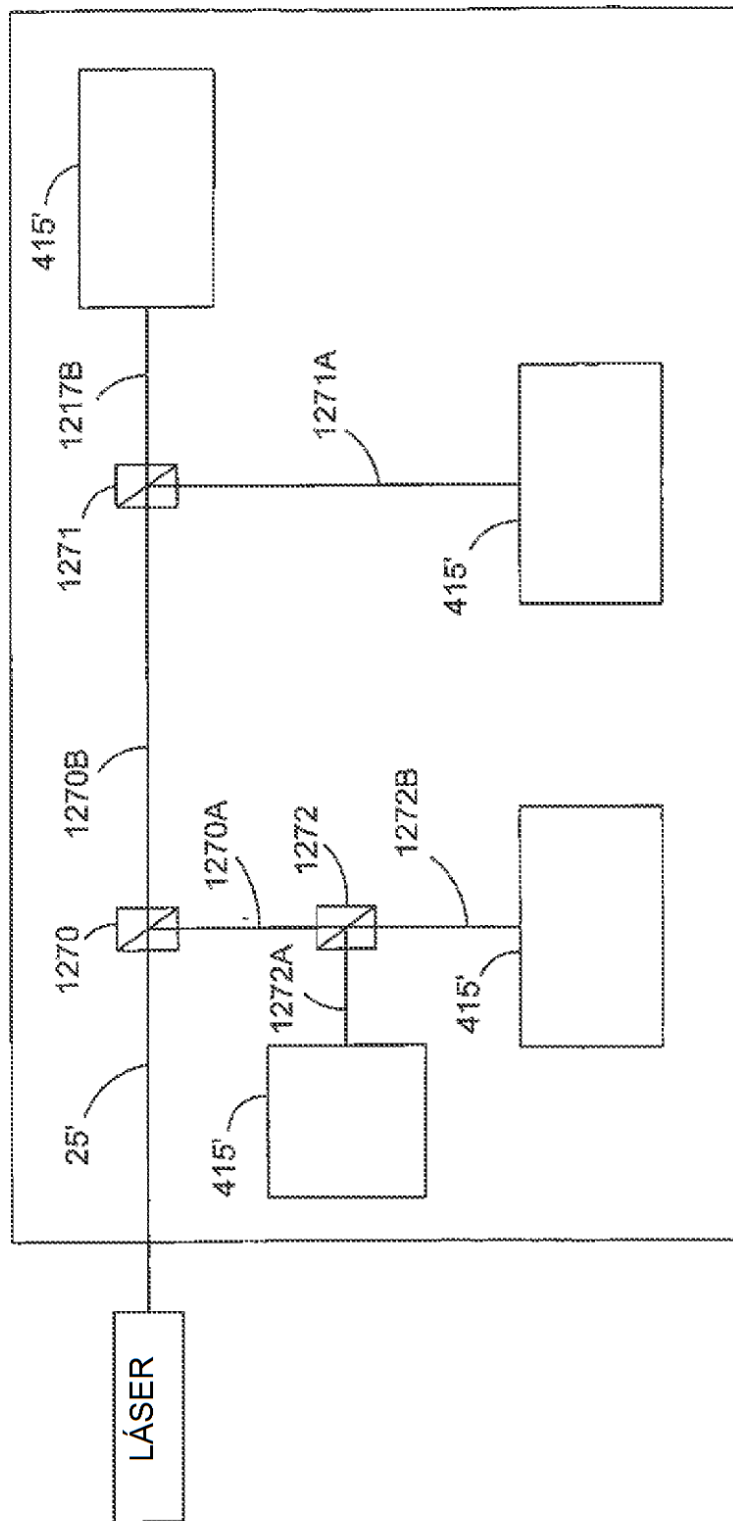
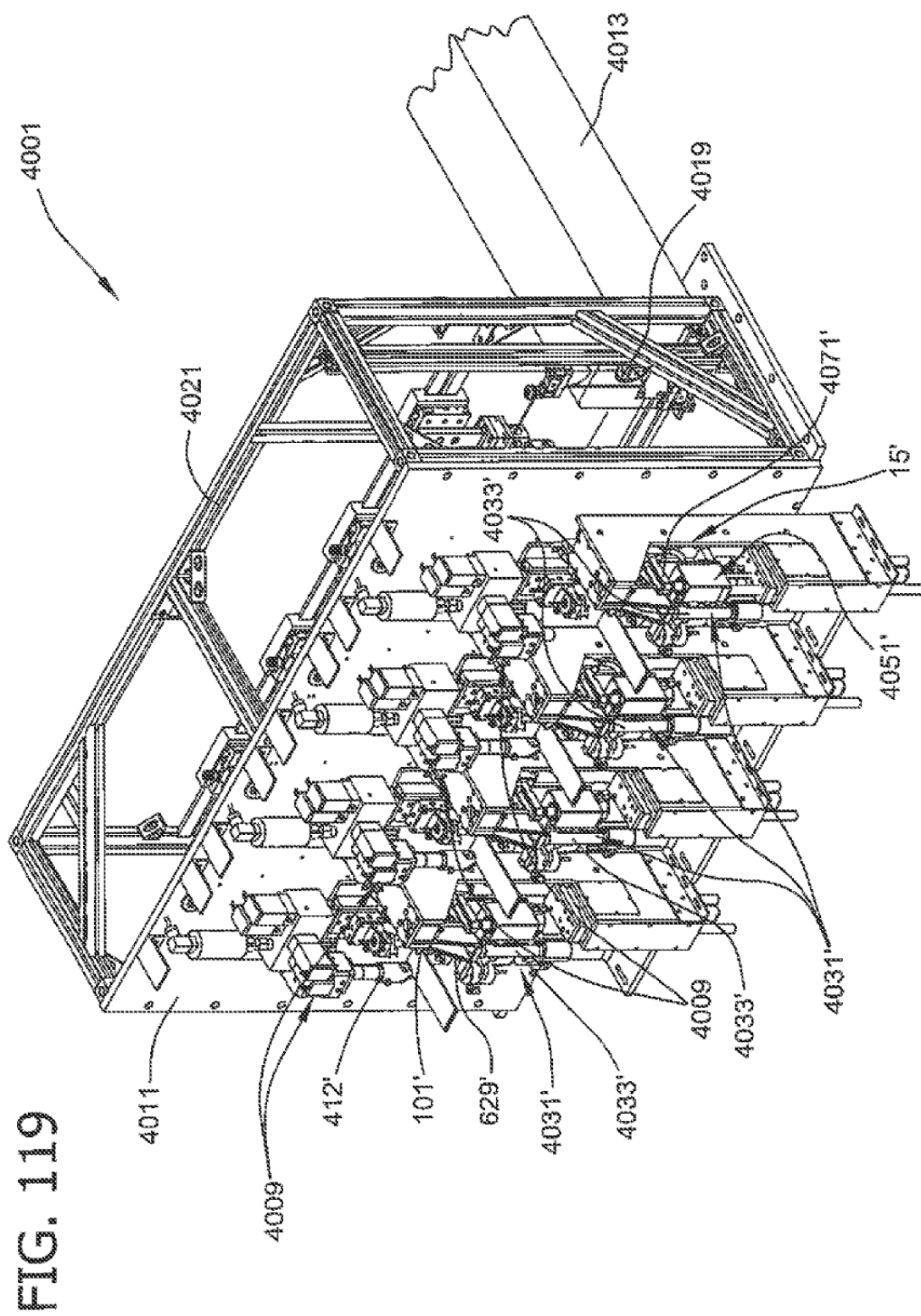


FIG. 118





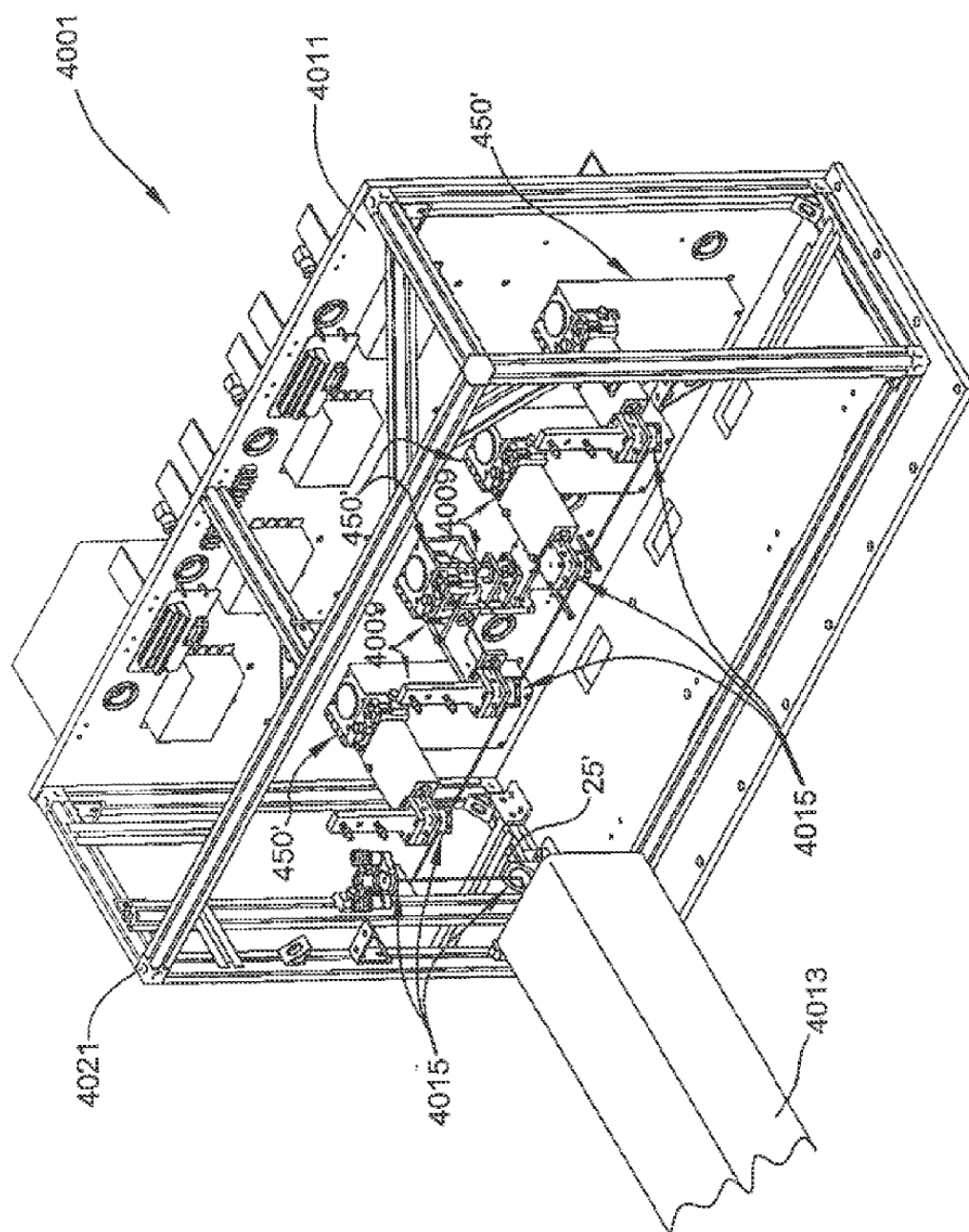


FIG. 120

FIG. 121

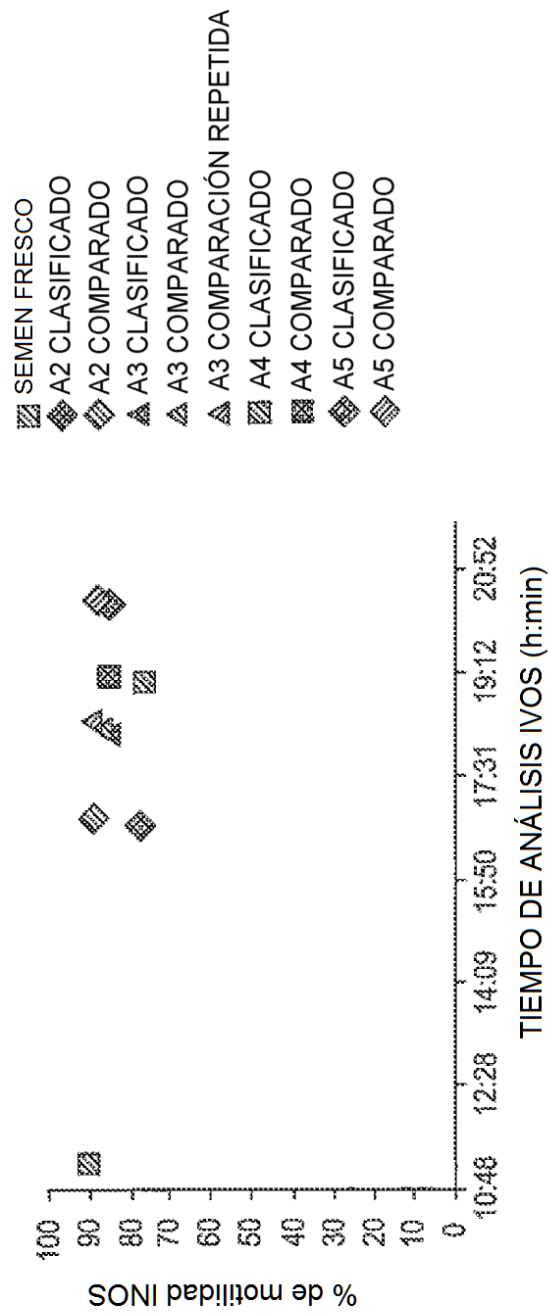


FIG. 122

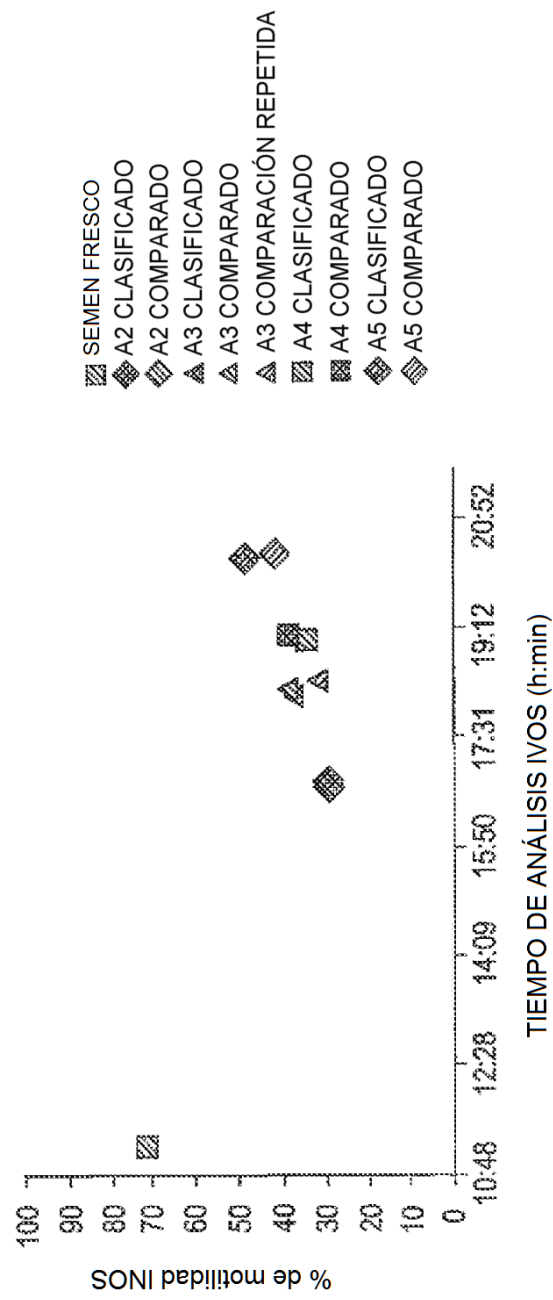


FIG. 123

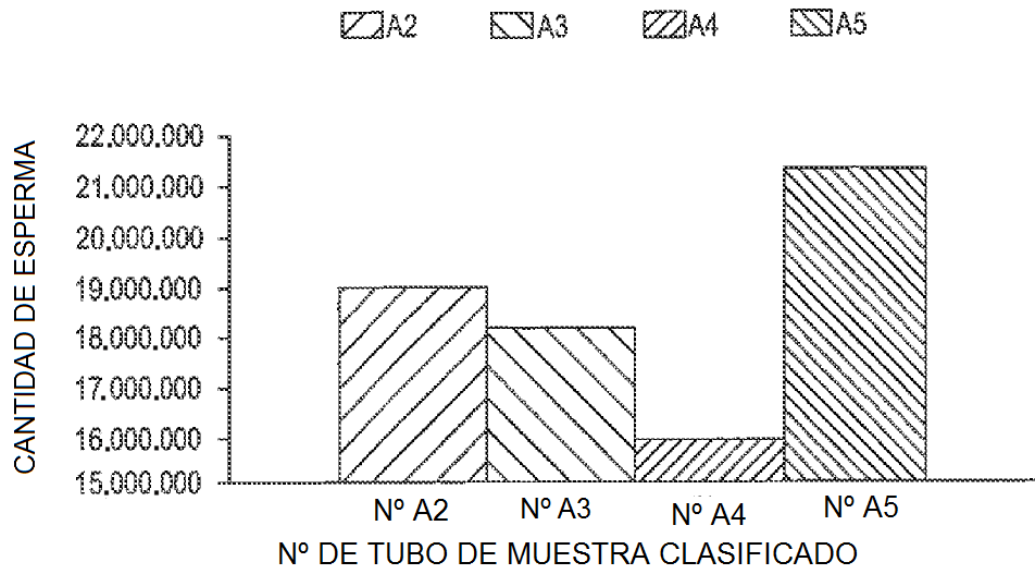


FIG. 124

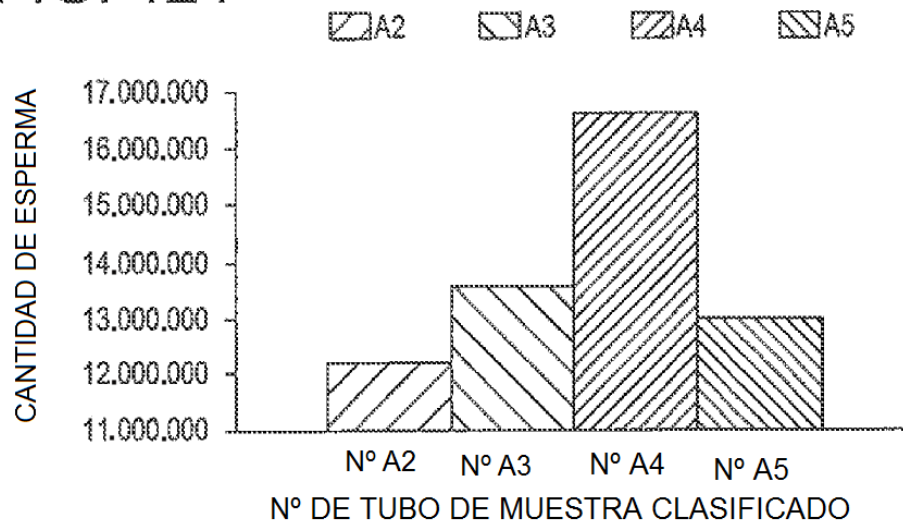


FIG. 125

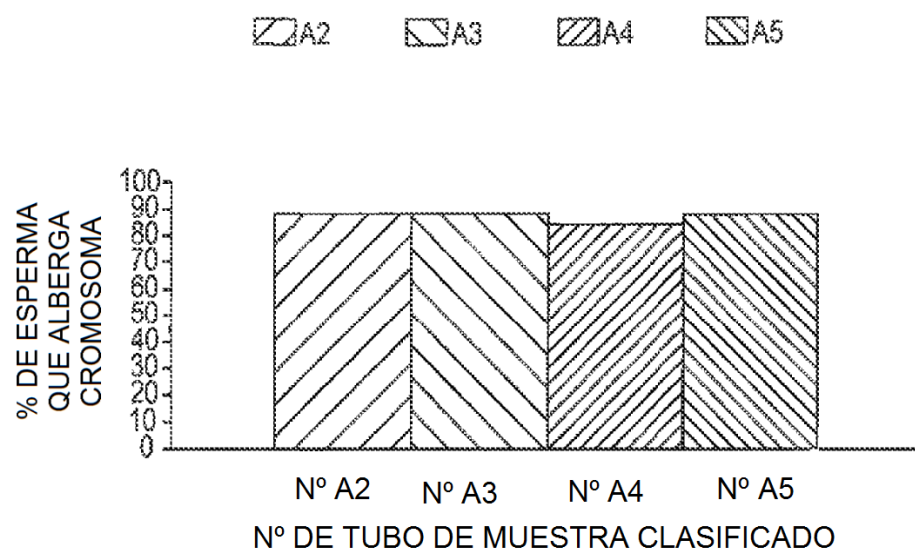


FIG. 126

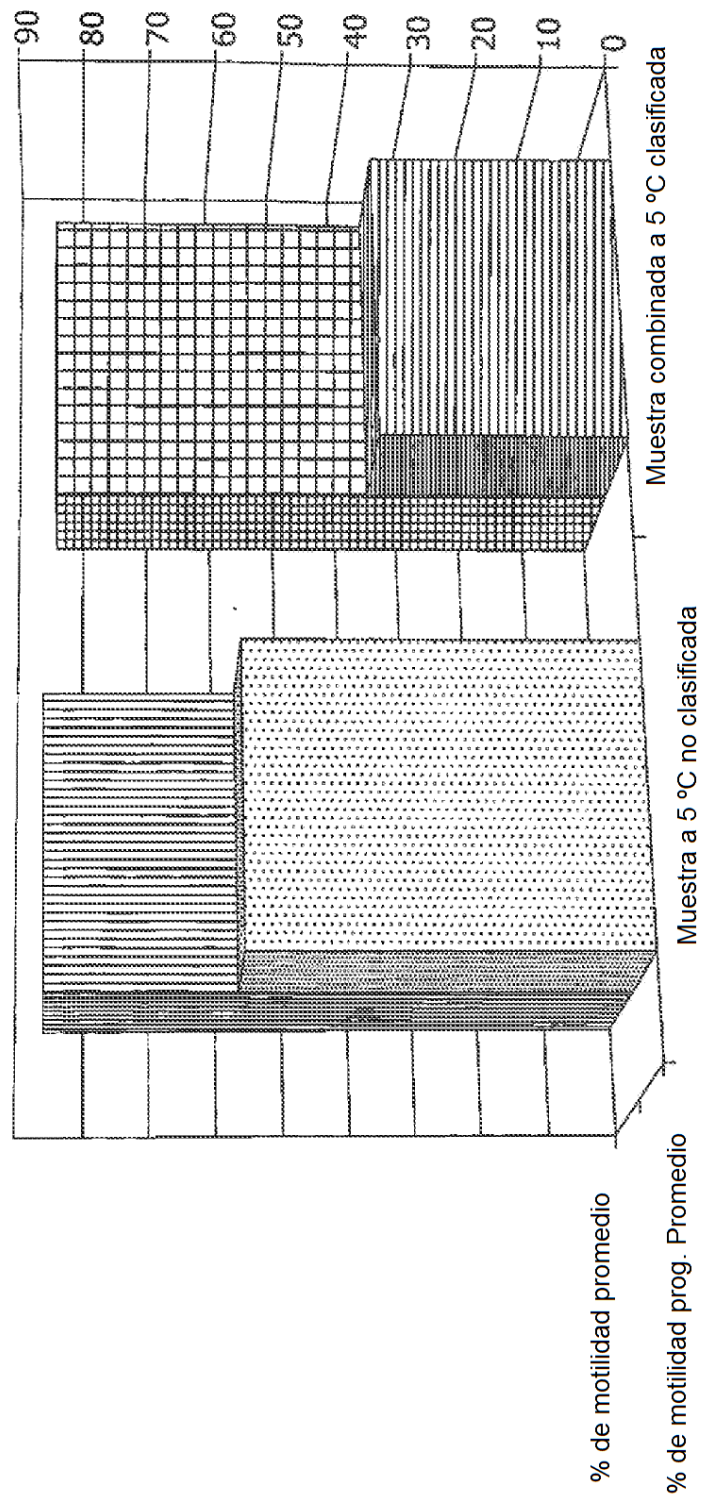


FIG. 127

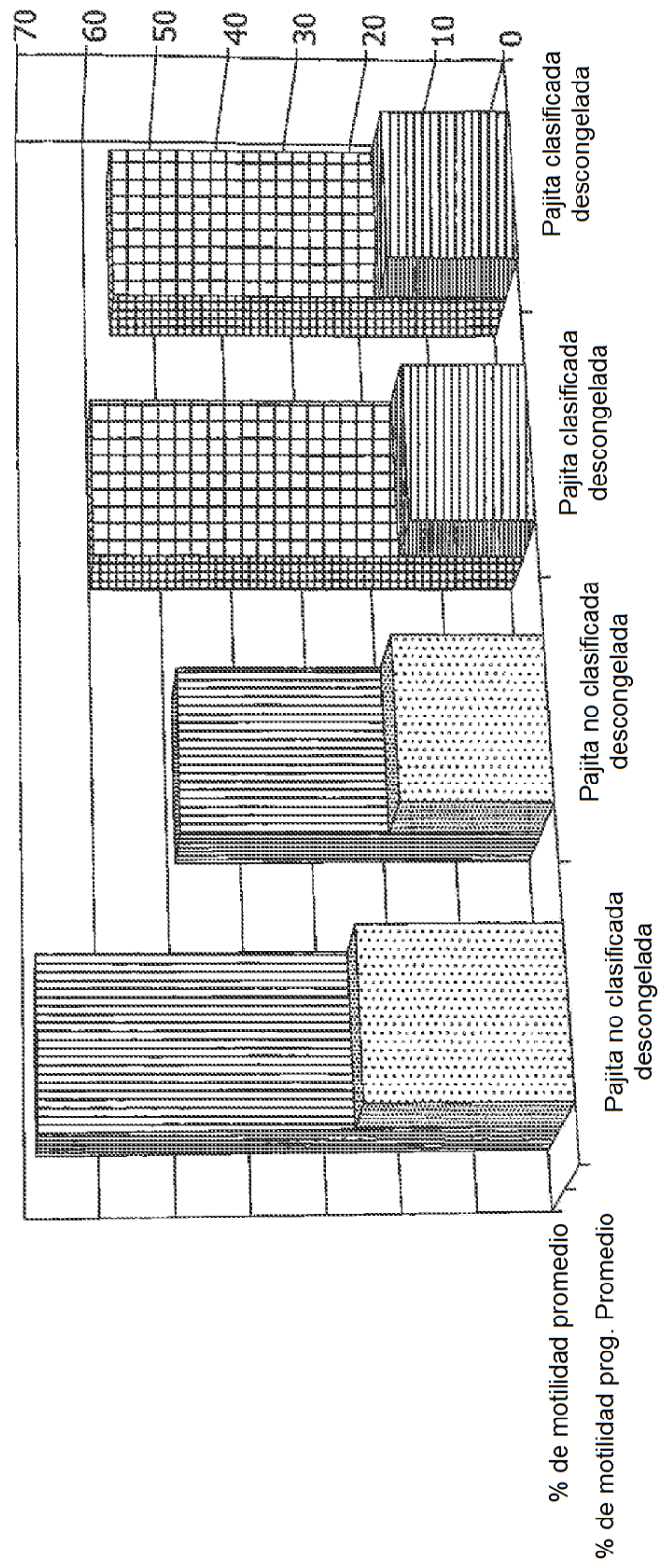


FIG. 128

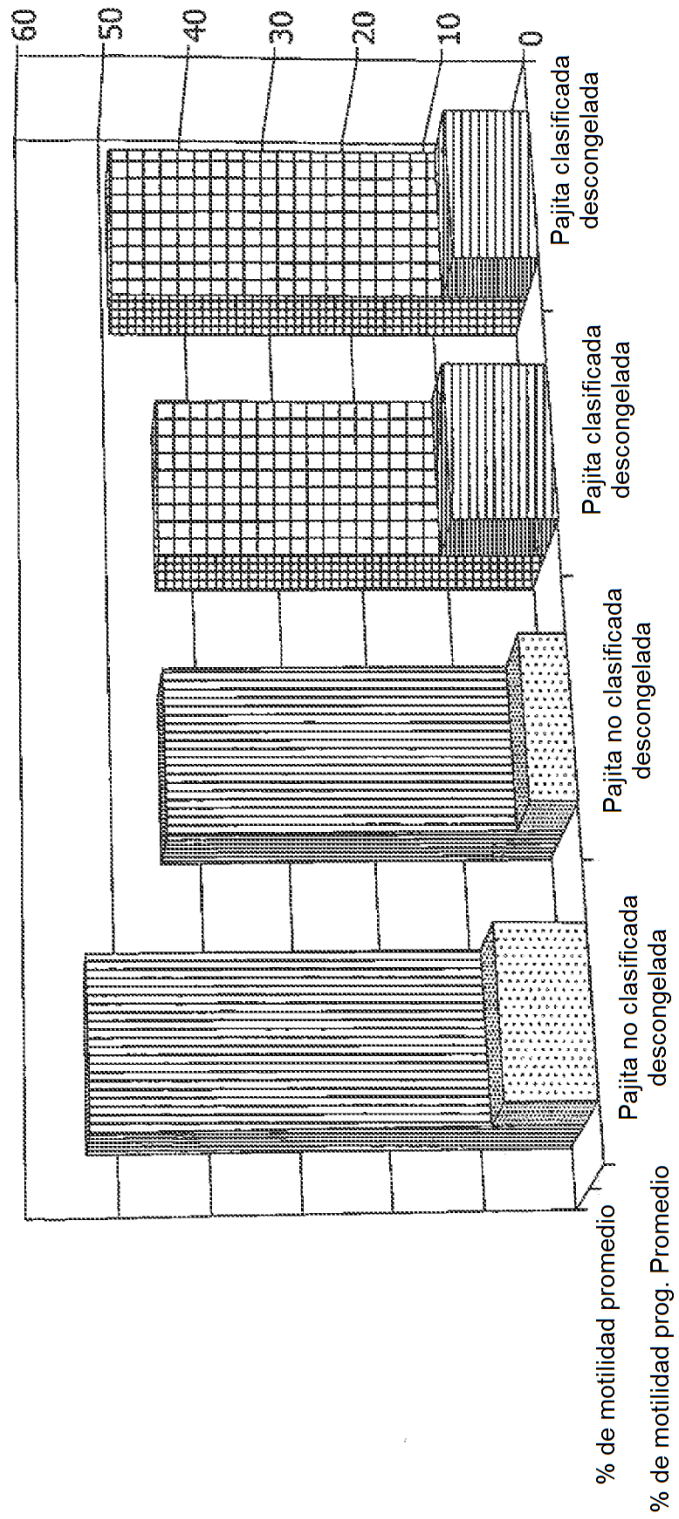


FIG. 129

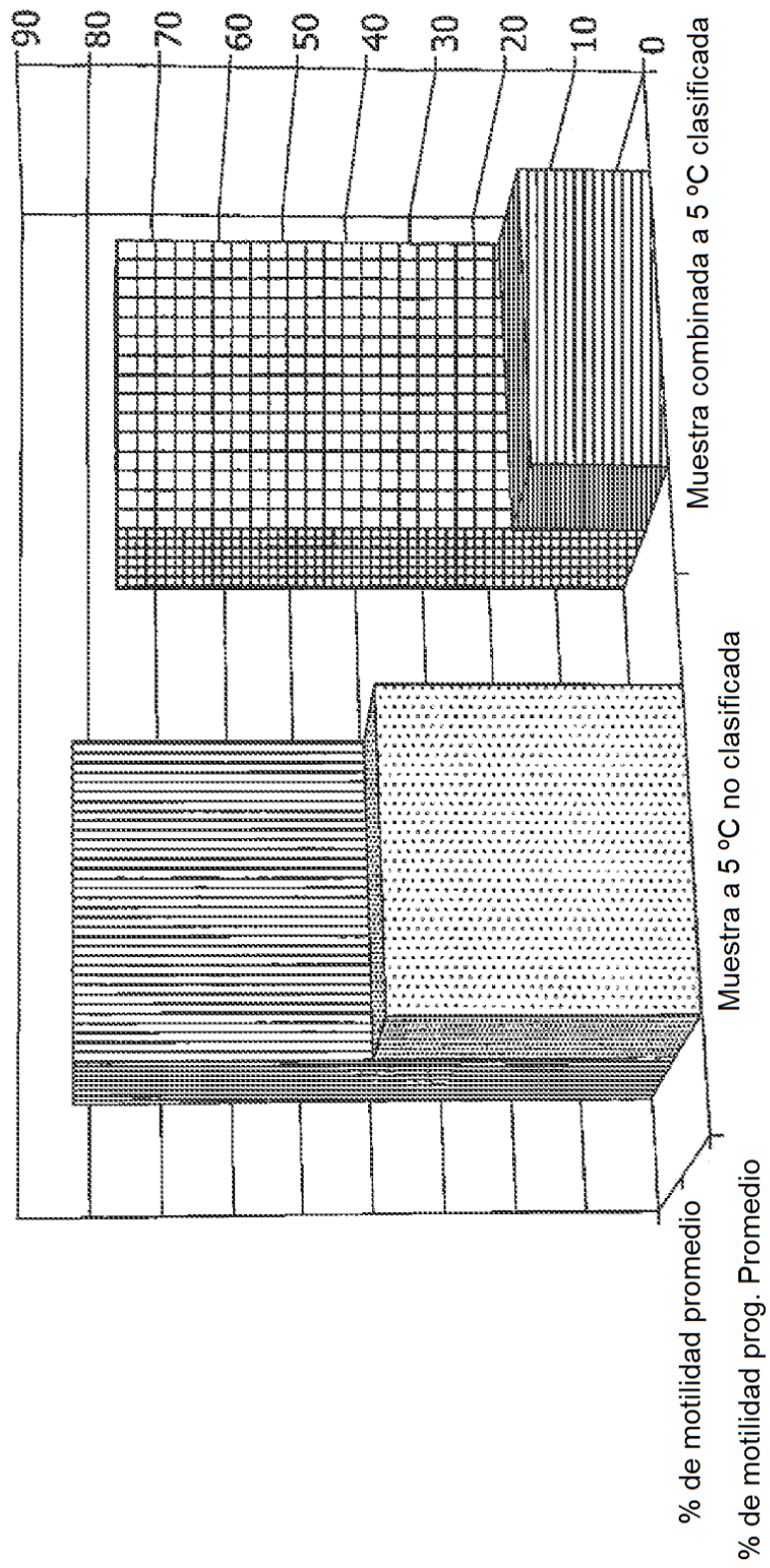


FIG. 130

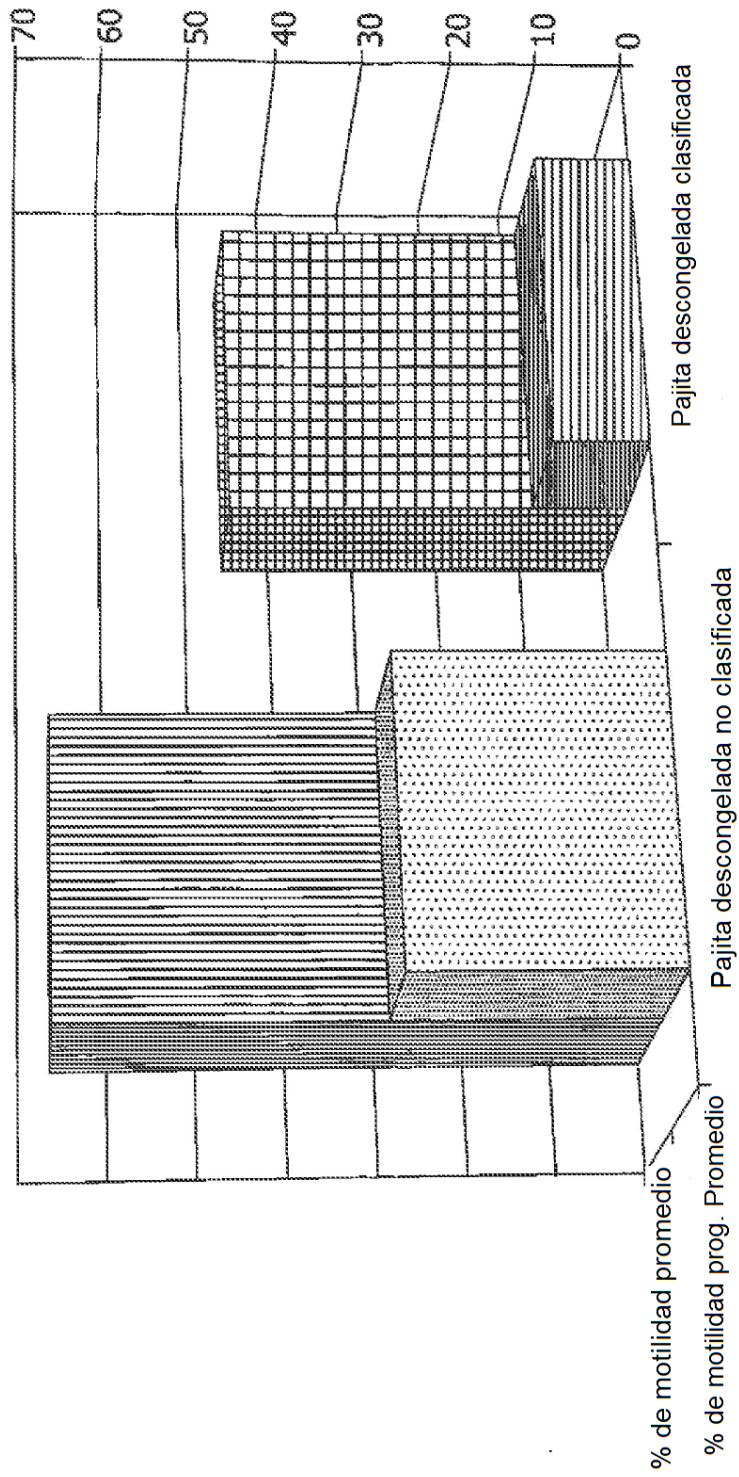


FIG. 131

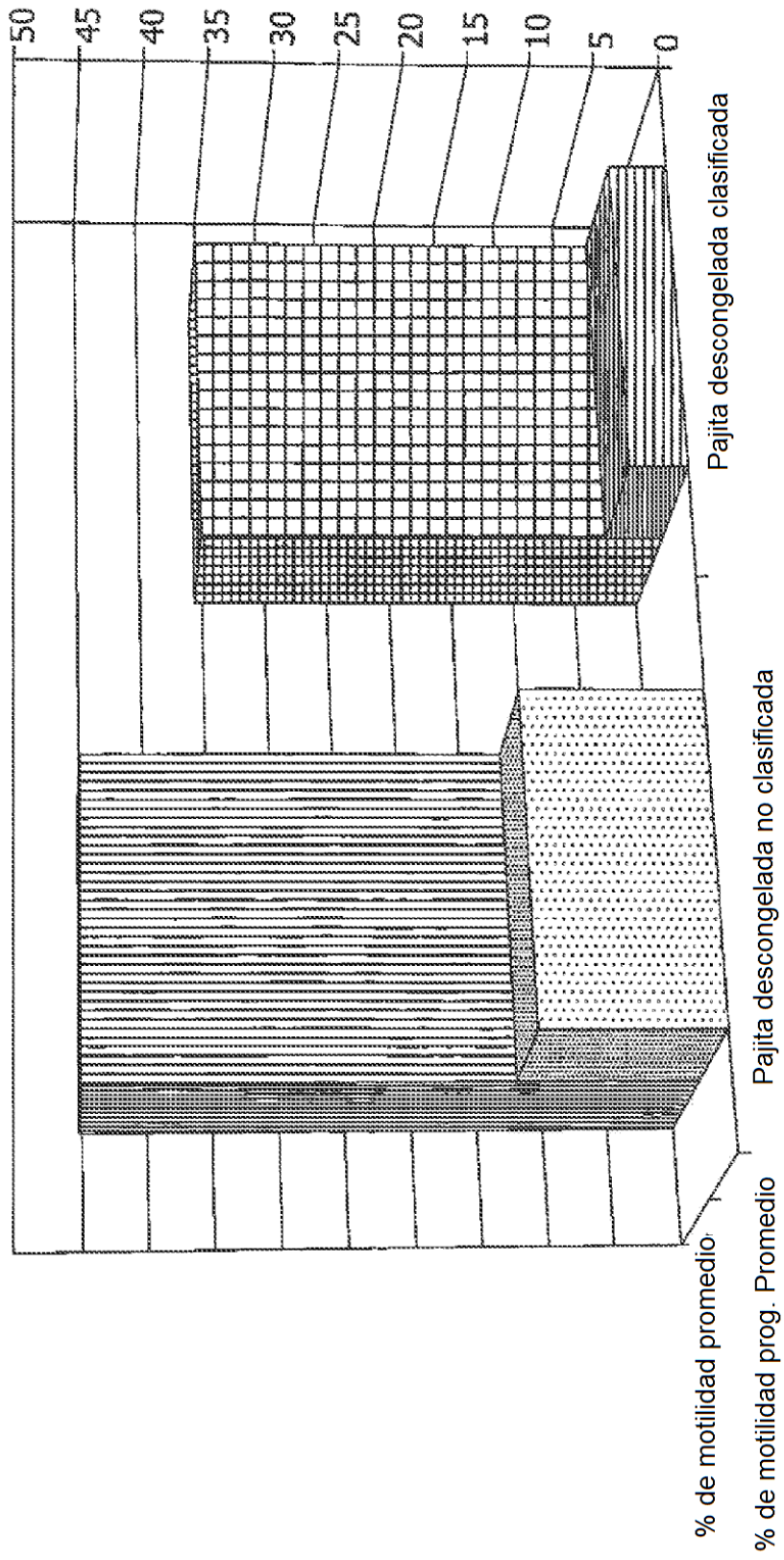


FIG. 132

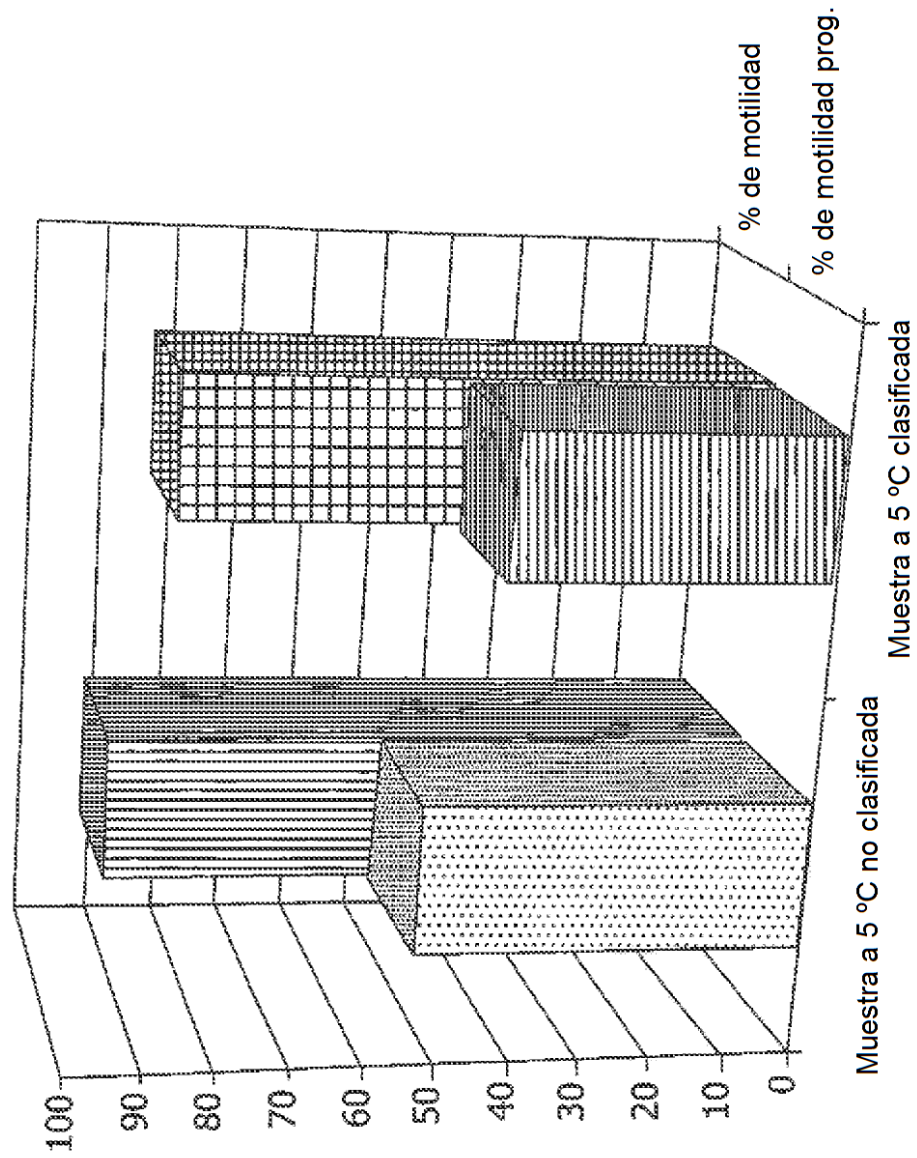


FIG. 133

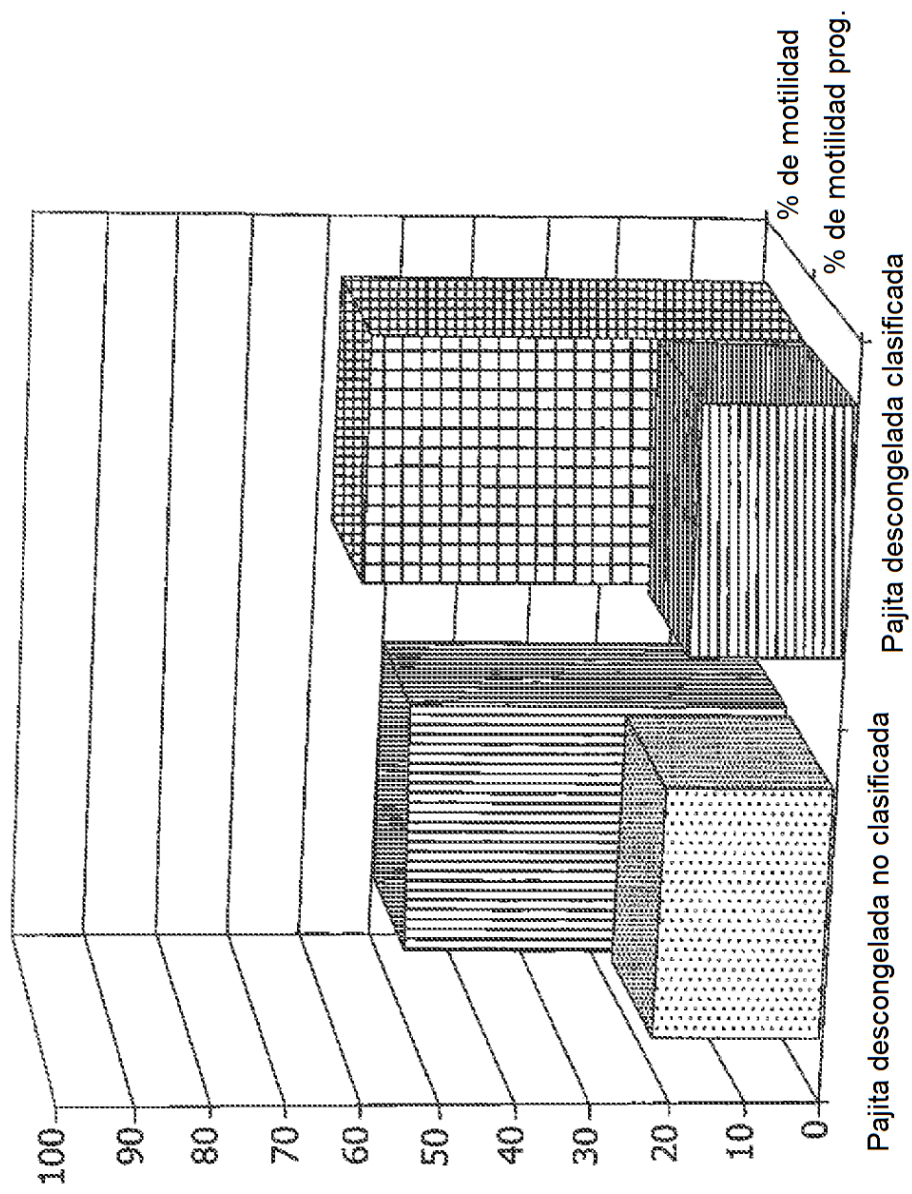


FIG. 134

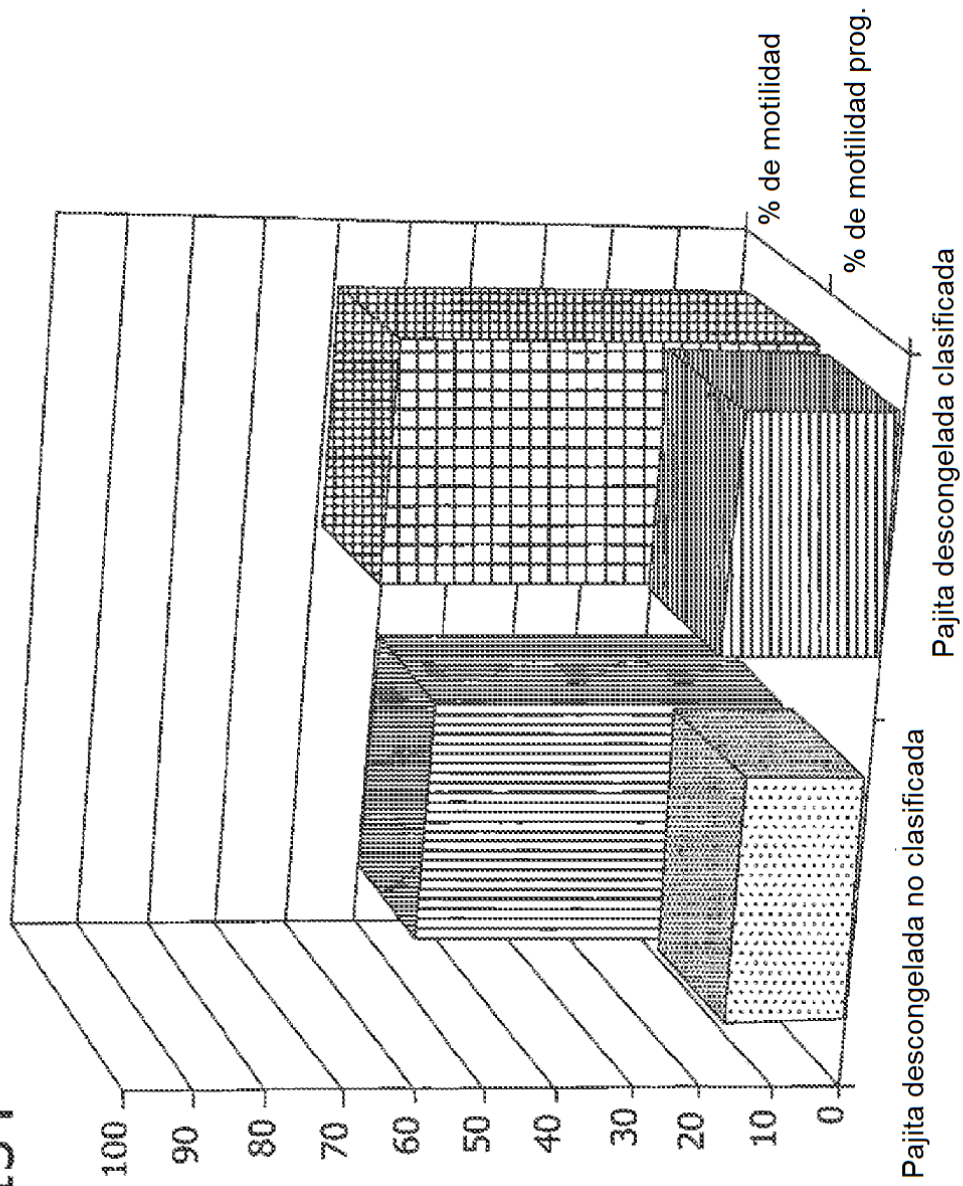


FIG. 135

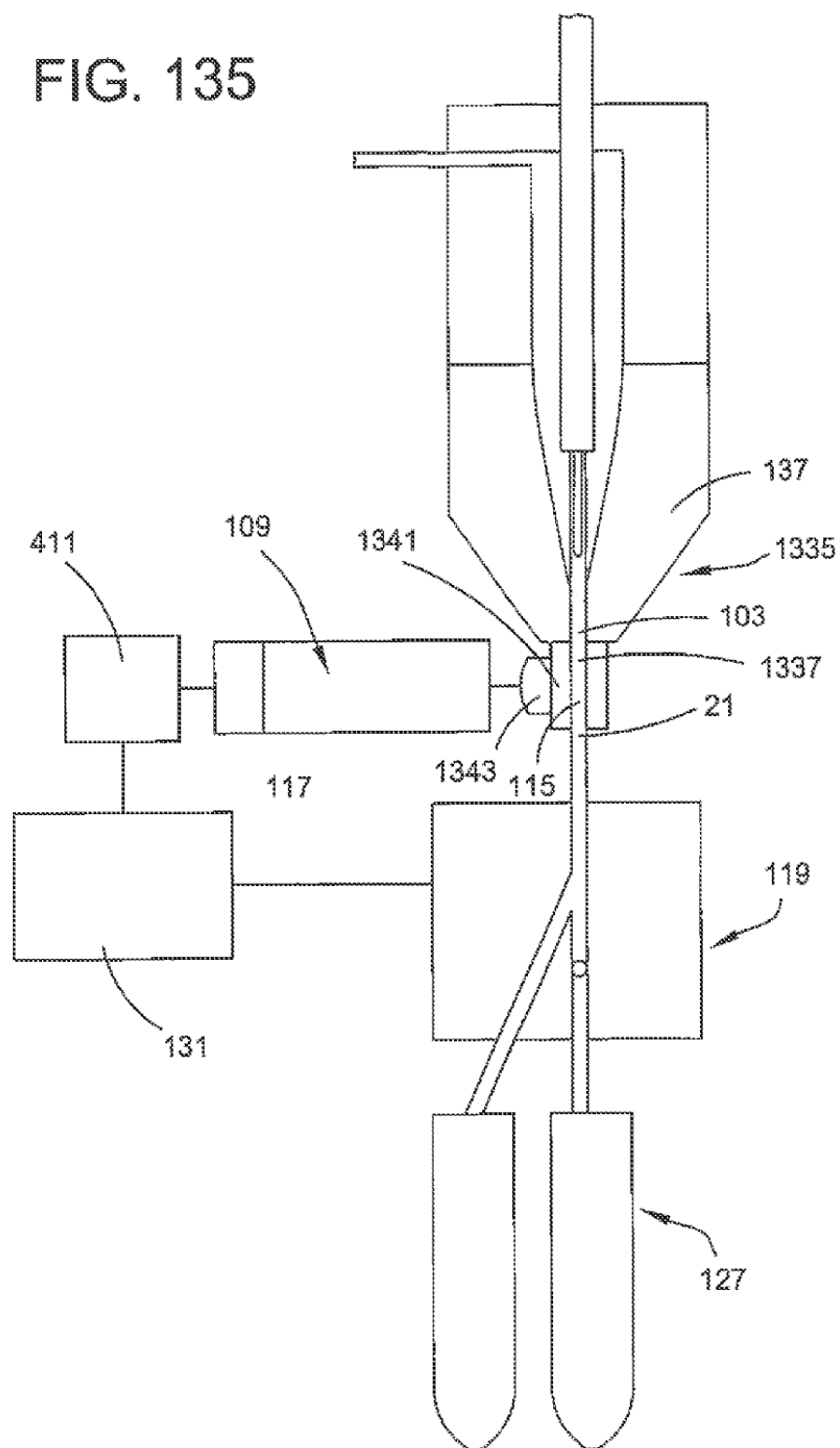


FIG. 136

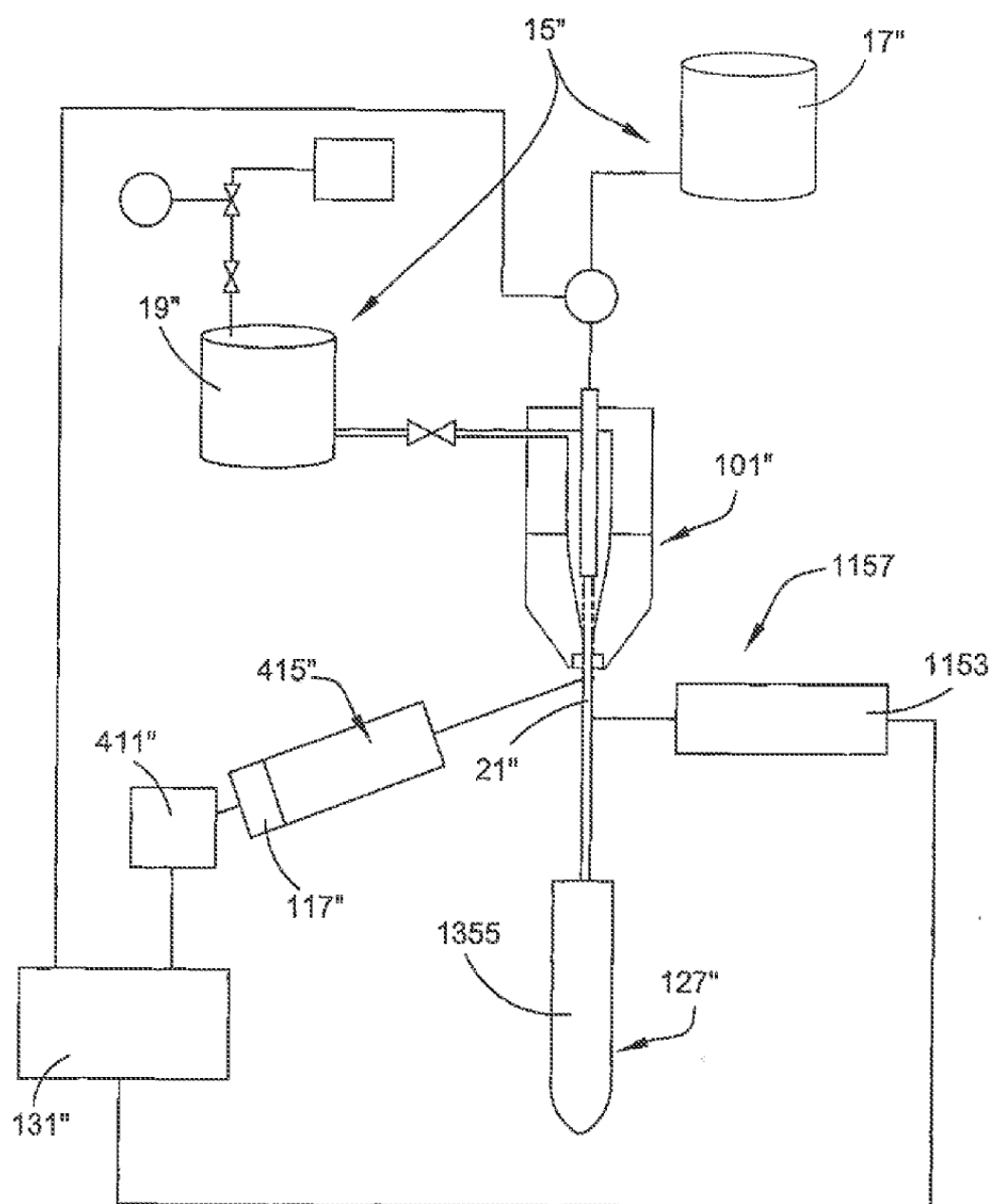


FIG. 137

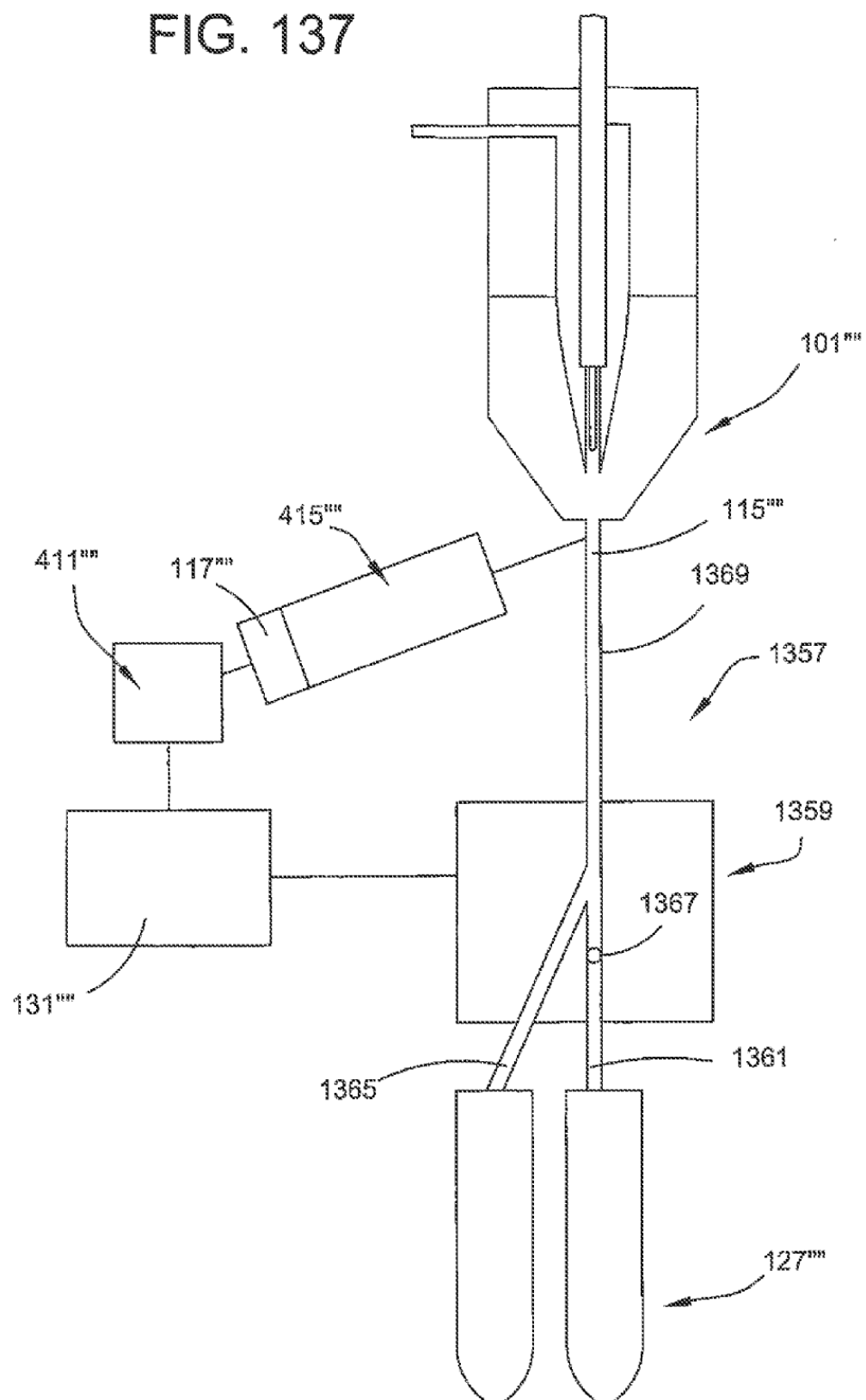


FIG. 138

