

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 937**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/00** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**G01N 1/40** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2014 PCT/DK2014/050117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014 E 14724296 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2991765**

54 Título: **Dispositivo para análisis de motilidad celular**

30 Prioridad:

**03.05.2013 DK 201370251**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.09.2018**

73 Titular/es:

**MOTILITYCOUNT APS (100.0%)  
Hvidkildevej 48, 2  
2400 Copenhagen NV, DK**

72 Inventor/es:

**LARSEN, JACOB MØLLENBACH y  
LAURSEN, STEEN BROCH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 680 937 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

Dispositivo para análisis de motilidad celular

La presente invención se refiere a un sistema de fluidos a mesoescala para analizar la motilidad celular en una muestra, en particular la motilidad de las células en una muestra de esperma. La presente invención también se refiere a un procedimiento para estimar la cantidad y calidad de células móviles en una muestra y a un procedimiento para extraer células móviles de células no móviles, en particular usando el sistema de fluidos a mesoescala.

### Técnica anterior

La toma de conciencia de la disminución en el potencial de fertilidad masculina ha sido alta durante las últimas décadas, creando así una demanda para por el análisis de muestras de esperma. En particular, se sabe que la concentración de espermatozoides móviles en una muestra es el factor más predictivo con respecto a la estimación de la fertilidad de una muestra (Tomlinson et al., 2013, Human Fertility, 1-19). Actualmente, un análisis para evaluar el número y la motilidad de las células en una muestra de esperma se lleva a cabo típicamente por profesionales en un entorno de laboratorio, y los dispositivos de diagnóstico domésticos para estimar el potencial de fertilidad masculina se han abordado de forma limitada en la técnica anterior. Dichos dispositivos de diagnóstico domésticos deberían ser de uso simple, y deberían estar disponibles a bajo coste para ser de naturaleza desechable sin la necesidad de equipo auxiliar tal como microscopios, electrodos para medidas de impedancia o similares.

Un dispositivo para analizar una muestra de esperma en la comodidad del entorno doméstico se describe en el documento WO 2012/126478. El documento WO 2012/126478 describe un sistema de fluidos a mesoescala capaz de separar las células móviles en función de su motilidad y permitir la detección y cuantificación de las células. El sistema comprende una primera cámara de análisis en comunicación fluida con una cámara de análisis adicional a través de un pasaje, en el que el pasaje tiene un puerto de entrada en comunicación fluida con la primera cámara de análisis y un puerto de salida en comunicación fluida con la cámara de análisis adicional, en el que el área de la sección del puerto de entrada es más grande que el área de la sección transversal del puerto de salida. Cada cámara de análisis comprende además una unidad de separación sólido-líquido que define una superficie corriente arriba enfrentada a la cámara de análisis y una superficie corriente abajo enfrentada a un canal de efluente, para permitir la comunicación fluida entre la cámara de análisis y el canal de efluente a través de la unidad de separación sólido-líquido. Las cámaras de análisis conectadas permiten que las células móviles se muevan desde la primera cámara de análisis a la siguiente, proporcionando así una estimación de la motilidad de las células en una muestra.

El documento WO 2012/126478 también describe una realización del sistema de fluidos a mesoescala que comprende además un filtro permeable a las células que define un lado de aplicación de muestra opuesto al lado del medio de acondicionamiento, donde el filtro permeable a las células tiene un tamaño de poro que permite que las células móviles nadan a través del filtro. Se dice que el filtro permeable a las células minimiza la mezcla del líquido de una muestra aplicada en el lado de aplicación de la muestra con un medio de acondicionamiento presente o agregado en el lado del medio de acondicionamiento. Por lo tanto, el filtro permeable a las células se proporciona para asegurar que las células no se transportan del lado de aplicación de muestra al lado del medio de acondicionamiento por convección, de modo que las células presentes en el lado del medio de acondicionamiento serán células móviles que han atravesado el filtro permeable a través de él. Un dispositivo de microfluidos con una membrana para la clasificación de partículas ha sido descrito por Wei et al. (Lab on a Chip, 2011, 11, 238-245). Existen algunos inconvenientes con los dispositivos de la técnica anterior, que proporcionan una precisión limitada cuando se estima el número de células móviles. En particular, los dispositivos actualmente disponibles no son capaces de reducir suficientemente la contaminación, por ejemplo mediante células inmóviles, incluso cuando están integrados filtros permeables a las células. Esto a su vez significa que las células inmóviles pueden incluirse en las estimaciones de la motilidad celular. Además, la migración de células espermáticas móviles a través de canales para fluidos puede disminuir la concentración en el punto de cuantificación a un nivel que es difícil de detectar. Esto parece ser particularmente cierto para sistemas que comprenden varias cámaras de análisis conectadas en serie.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención superar estos inconvenientes y proporcionar un sistema de fluidos a mesoescala que tenga una exactitud de estimación mejorada, y que al mismo tiempo cumpla con los requisitos de un dispositivo de diagnóstico doméstico funcional.

### Divulgación de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un sistema de fluidos a mesoescala que comprende un sustrato que tiene una cámara de muestra y una cámara de análisis; la cámara de muestra comprende un filtro permeable a las células de un tamaño de poro en el intervalo de 1 micrómetro a 20 micrómetros que define un compartimiento de aplicación de muestra y un compartimiento de medio de acondicionamiento;

la cámara de muestra tiene un puerto de entrada de muestra en el compartimiento de aplicación de muestra;

la cámara de análisis tiene un puerto de entrada y un puerto de salida;

estando el compartimiento del medio de acondicionamiento en comunicación fluida con el puerto de entrada de la cámara de análisis a través de un canal y comprendiendo el compartimiento del medio de acondicionamiento además un orificio de entrada del medio en comunicación fluida con el ambiente; en el que el compartimiento de aplicación de muestra está debajo del filtro permeable a las células y el compartimiento del medio de acondicionamiento está encima del filtro permeable a las células.

El sistema de fluidos a mesoescala según la presente invención se puede usar para estimar la cantidad de células móviles en una muestra, en particular en una muestra líquida. En general, se agrega una muestra al compartimiento de aplicación de muestra desde el cual las células móviles presentes en la muestra pasarán a través del filtro permeable a las células a un medio de acondicionamiento presente en el compartimiento del medio de acondicionamiento. El líquido en el compartimiento del medio de acondicionamiento se puede mover a la cámara de análisis, donde se pueden analizar las células, por ejemplo, se pueden cuantificar. Dado que las células móviles se separan de las células no móviles que no cruzan el filtro permeable a las células, las células cuantificadas en la cámara de análisis son células móviles.

Para la presente invención, el manual "WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen" (fifth edition, World Health Organization, 2010, ISBN 978 92 4 154778 9) proporciona información de antecedentes sobre las células de espermatozoides, y el manual es incorporado aquí por referencia en su totalidad.

El sustrato puede estar fabricado de cualquier material adecuado. La cámara de muestra puede tener cualquier forma o tamaño adecuado con la condición de que la cámara de muestra se pueda dividir en dos compartimientos separados mediante el filtro permeable a las células. El filtro permeable a las células define el compartimiento del medio de acondicionamiento y el compartimiento de aplicación de muestra, y se considera que el filtro permeable a las células tiene un lado del medio de acondicionamiento y un lado de la aplicación de la muestra mirando hacia el compartimiento del medio de acondicionamiento y el compartimiento de la aplicación de la muestra, respectivamente. En un uso previsto del sistema, se agrega un medio de acondicionamiento al compartimiento del medio de acondicionamiento. La muestra que se analizará se agrega al compartimiento de aplicación de muestra. El orden de adición del medio de acondicionamiento y la muestra no es importante, aunque en una realización específica, la muestra se agrega al compartimiento de aplicación de muestra antes de que el medio de acondicionamiento se agregue al compartimiento del medio de acondicionamiento. Por consiguiente, el compartimiento de aplicación de muestra y el compartimiento de medio de acondicionamiento pueden tener cualquier tamaño adecuado, respectivamente. El filtro permeable a las células define el compartimiento de aplicación de muestra y el compartimiento del medio de acondicionamiento extendiéndose a través de la cámara de muestra de modo que la única conexión para fluidos entre los dos compartimientos es a través del filtro permeable a las células. El filtro permeable a las células puede ser de cualquier diseño, material y forma apropiados, que permita analizar las células móviles a través del filtro, permitiendo así que las células viajen desde el compartimiento de la muestra de aplicación al compartimiento del medio de acondicionamiento. En particular, el filtro permeable a las células se selecciona con respecto al tamaño y a otras características de las células por separar, por ejemplo con respecto al tamaño de las células en relación con el tamaño de los poros del filtro permeable a las células. El filtro permeable a las células, por ejemplo los poros del filtro permeable a las células pueden comprender un material al son atraídas las células móviles. El compartimiento de aplicación de la muestra está debajo del filtro permeable a las células y el compartimiento del medio de acondicionamiento está por consiguiente encima del filtro permeable a las células. El término "debajo" se debe ver con referencia al campo gravitacional de modo que la fuerza de la gravedad se ejercerá en una dirección de "arriba" a "abajo". El filtro permeable a las células puede abarcar el compartimiento de la muestra de cualquier manera adecuada, lo que permite que el compartimiento de la muestra esté debajo del compartimiento del medio de acondicionamiento.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que el efecto de aplicar un filtro permeable a las células para separar células móviles de células no móviles mejora significativamente cuando el compartimiento de aplicación de muestra está debajo del filtro permeable a las células y el compartimiento del medio de acondicionamiento está por encima del filtro permeable a las células. En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para estimar la cantidad de células móviles en una muestra que comprende las etapas de: proporcionar un filtro permeable a las células;

aplicar una muestra que contiene células móviles debajo del filtro permeable a las células;

permitir que las células móviles en la muestra nadan a través del filtro permeable a las células;

detectar células móviles que nadan a través del filtro. En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para extraer células móviles de células no móviles que comprende las etapas de: proporcionar un filtro permeable a las células; aplicar debajo del filtro permeable a las células una muestra que contiene células móviles y células no móviles;

permitir que las células móviles en la muestra nadan a través del filtro permeable a las células;

extraer células móviles que nadan a través del filtro. En general, todas las variaciones y realizaciones descritas para cualquier aspecto de la invención son relevantes para cualquier otro aspecto de la invención, y las características de las realizaciones se pueden combinar libremente.

El sistema o los procedimientos de la invención pueden emplear un medio de acondicionamiento de células, que está presente o es añadido debajo del filtro permeable a las células. Un "medio de acondicionamiento de células" en el contexto de la invención es cualquier líquido destinado a soportar las células en la muestra, por ejemplo mantener las células viables, y puede, por ejemplo, contener nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad según sea apropiado para las células específicas. De forma similar, el sistema o los procedimientos de la invención pueden emplear un medio de muestra, que está presente o es añadido por encima del filtro permeable a las células. El "medio de muestra" también puede contener nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad según corresponda para las células específicas, y puede ser el mismo que el medio de acondicionamiento de células, o el medio de muestra y el medio de acondicionamiento de células de composición diferente. En ciertas realizaciones, el medio de acondicionamiento de células y/o el medio de muestra pueden comprender un agente de detección. En una determinada realización, el sistema de fluidos a mesoescala o los procedimientos no emplean un medio de muestra.

Se puede aplicar cualquier procedimiento adecuado para cuantificar las células móviles en el sistema de acuerdo con la presente invención, y la cámara de análisis puede tener cualquier forma o tamaño adecuado, que se adapte al procedimiento seleccionado. La cámara de análisis comprende un puerto de entrada y un puerto de salida. En el contexto de la invención, un "puerto" es cualquier abertura apropiada que permita la comunicación de fluidos a través del puerto. Un puerto puede estar abierto por defecto, o puede estar cerrado requiriendo apertura a través de un actuador, como una válvula. El puerto de entrada proporciona acceso para el líquido, por ejemplo el medio de acondicionamiento que contiene las células móviles a la cámara de análisis. El orificio de salida permite que el medio de acondicionamiento salga de la cámara de análisis, y además se puede aplicar un medio de acondicionamiento al compartimiento del medio de acondicionamiento a través del orificio de salida de la cámara de análisis. Del mismo modo, los puertos de la cámara de análisis permiten un flujo de fluido a través del sistema a mesoescala actual. El puerto de entrada y los puertos de salida pueden tener cualquier diseño adecuado, que proporcione esta funcionalidad, y los puertos pueden estar en comunicación fluida con canales para fluidos. En una realización específica, el puerto de entrada de muestra está en comunicación de fluidos, por ejemplo a través de un canal, con un pozo receptor para recibir una muestra, por ejemplo una muestra de esperma.

De acuerdo con esto, el sistema y los procedimientos mejoran la separación de las células móviles de las células no móviles en la muestra, células móviles que pueden cuantificarse en la cámara de análisis. La mezcla del líquido de muestra con el medio de acondicionamiento se minimiza puesto que el compartimiento de aplicación de muestra se separa del compartimiento del medio de acondicionamiento por un filtro permeable a las células. Los presentes inventores creen que, si bien la aplicación de un filtro permeable a las células no puede evitar completamente la convección de, por ejemplo, células inmóviles desde el lado de aplicación de muestra, han observado sin embargo una reducción significativa en la convección a través del filtro permeable a las células en un sistema de acuerdo con la presente invención, es decir, cuando el compartimiento de aplicación de muestra está por debajo del compartimiento del medio de acondicionamiento. En el contexto de la invención, el término "convección" generalmente describe cualquier transferencia pasiva de masa, por ejemplo una situación en la que los componentes líquidos se transportan junto con el flujo de un líquido. Los presentes inventores creen que la convección reducida, y también la difusión, pueden atribuirse, al menos en parte, a la fuerza gravitacional que actúa sobre la muestra. Es decir, se ejerce una fuerza descendente sobre todas las partículas, tales como las células de la muestra, limitando así el movimiento pasivo en la dirección ascendente. Las células inmóviles que no tienen medios para contrarrestar la fuerza gravitatoria son, en menor medida, transportadas por convección y difusión a través del filtro permeable a las células. Por otro lado, las células móviles que tienen los medios para transportarse activamente en cualquier dirección dada en el líquido de la muestra pueden superar fácilmente la fuerza gravitacional ejercida sobre ellas, y al nadar se transportan ellas mismas a través del filtro permeable a las células. En particular, una vez que las células móviles se encuentran con el filtro permeable a las células, tienden a nadar a lo largo de la superficie encontrada y nadan a través del filtro permeable a las células. Por lo tanto, el posicionamiento de la muestra debajo del filtro permeable a las células asegura en mayor medida que las células no sean transportadas pasivamente desde el lado de aplicación de muestra al lado del medio de acondicionamiento a través de la convección. Por lo tanto, durante un análisis de una muestra de esperma en el sistema según la presente invención, las células presentes en el lado del medio de acondicionamiento serán células móviles que han atravesado el filtro permeable a las células nadando a través de él. Otra ventaja del presente sistema es que la distancia que las células móviles tendrán que recorrer es corta en comparación con los sistemas, en donde la motilidad se mide por la distancia de desplazamiento de las células en un canal. Por lo tanto, la distancia más corta da como resultado menos tiempo requerido para llevar a cabo el análisis.

Los presentes inventores han observado además que el sistema de fluidos a mesoescala y los procedimientos de la invención reducen aún más la contaminación del medio de acondicionamiento en el compartimiento del medio de acondicionamiento. Las muestras tales como las muestras de esperma típicamente comprenden partículas, células y moléculas adicionales, que también pueden pasar a través del filtro permeable a las células y al medio de acondicionamiento. Sin embargo, la aplicación de la muestra debajo del filtro permeable a las células también reduce la convección y la difusión de dichos componentes adicionales de la muestra, lo que de otro modo podría

disminuir la calidad del análisis posterior de los contenidos del medio acondicionado. En particular, una muestra de esperma, por ejemplo el líquido de muestra, puede comprender enzimas que pueden tener un efecto negativo en el análisis y, por lo tanto, la separación de células móviles del líquido de muestra que aloja tales enzimas es especialmente ventajosa.

En consecuencia, los presentes inventores han descubierto que la aplicación de una muestra con células móviles debajo de un filtro permeable a las células, por ejemplo proporcionando un dispositivo que tiene el compartimiento de aplicación de muestra debajo del filtro permeable a las células y el compartimiento del medio de acondicionamiento encima del filtro permeable a las células, da como resultado una contaminación reducida del medio de acondicionamiento por células inmóviles y componentes contaminantes adicionales de la muestra. Se garantiza que solo las células móviles entren en las cámaras de análisis, lo que impide que las células inmóviles, desechos y otros componentes presentes en la muestra tengan una influencia negativa en el resultado de la prueba en forma de contribuciones falsas positivas y/o falsas negativas.

En la presente invención, el compartimiento del medio de acondicionamiento comprende además un puerto de entrada del medio, que está en comunicación de fluidos con el ambiente. El puerto de entrada del medio puede facilitar la entrada de un líquido, por ejemplo un medio de acondicionamiento de muestra que contiene componentes necesarios para el análisis de las células, y además el puerto de entrada del medio puede proporcionar una función de liberación de presión ya que puede estar en comunicación de fluidos con el ambiente. El puerto de entrada medio asegura que la muestra del compartimiento de la muestra no se transporte activamente a través del filtro permeable y al compartimiento del medio de acondicionamiento y/o cámara de análisis cuando se aplica una presión relativa negativa a través del puerto de salida de la cámara de análisis o cuando se aplica una presión relativa positiva a través del puerto de entrada del medio, ya que la caída de presión sobre el filtro permeable a las células es significativamente mayor que la caída de presión sobre el puerto de entrada del medio. Cuando el líquido se carga o se retira hacia o desde el compartimiento del medio de acondicionamiento, ya sea a través del puerto de entrada de la cámara de análisis o a través del puerto de entrada del medio, la presión ejercida se aliviará a través del puerto opuesto. En consecuencia, cuando el medio de acondicionamiento se carga en el compartimiento del medio de acondicionamiento a través de, por ejemplo, el puerto de entrada de la cámara de análisis, la presión ejercida por cualquier exceso de medio de acondicionamiento se aliviará a través del puerto de entrada del medio. Cuando el medio de acondicionamiento se retira del compartimiento del medio de acondicionamiento a través del orificio de entrada de la cámara de análisis, la presión se alivia mediante el orificio de entrada del medio, lo que impide por lo tanto la succión de, por ejemplo, células de la cámara de aplicación de muestra a través del filtro permeable a las células.

En una realización preferida de la presente invención, la cámara de análisis comprende un filtro de retención de celda que tiene una superficie corriente arriba orientada hacia el puerto de entrada y una superficie corriente abajo que mira hacia el puerto de salida. El filtro de retención de células puede ser de cualquier diseño, material y forma apropiados, lo que permite la separación, por ejemplo, reteniendo, las células de un líquido que contiene células suspendidas cuando el líquido pasa a través del filtro. El filtro de retención de la celda se extiende a través de la cámara de análisis de modo que la única conexión para fluidos entre el puerto de entrada y salida de la cámara de análisis es a través del filtro de retención de la celda. Cuando se retira un líquido en el compartimiento del medio de acondicionamiento de la cámara de muestra, por ejemplo a través de un canal de efluente en comunicación fluida con los puertos de la cámara de análisis, las células se retienen en el lado corriente arriba del filtro de retención de células para que las células se concentren en el líquido en la cámara de análisis o en la superficie corriente arriba del filtro de retención de células. Este efecto de concentración permitirá que las células móviles en la muestra, que se han transportado activamente al líquido en el compartimiento del medio de acondicionamiento (por ejemplo, el medio de acondicionamiento), se puedan observar visualmente, por ejemplo en la superficie corriente arriba del filtro de retención de células. El resultado también puede ser visible en la superficie corriente abajo del filtro de retención de la celda. Alternativamente, las células pueden suspenderse en un volumen reducido de líquido que permanece en la cámara de análisis de modo que se proporciona una mayor concentración de las células en la cámara de análisis en comparación con la concentración presente en el líquido antes de la extracción del líquido.

En una realización preferida, el posicionamiento del filtro de retención de células con relación al canal que proporciona la comunicación de fluidos entre el compartimiento de medio de acondicionamiento y la cámara de análisis, permite que la superficie corriente arriba y/o la superficie corriente abajo del filtro de retención de células sean observadas visualmente. Por ejemplo, el canal para llevar el compartimiento del medio de acondicionamiento en comunicación de fluidos con el puerto de entrada de la cámara de análisis presenta un giro o similar, de modo que la observación de la superficie corriente arriba del filtro de retención de celda requiere observación a lo largo del canal a través de la sección el canal entre el giro y el filtro de retención de la celda. En consecuencia, el filtro de retención de células se puede observar directamente y esto también facilita la fácil integración con la detección óptica.

En una realización de la presente invención, la cámara de análisis es físicamente accesible. Esto permite eliminar una o más células de la cámara de análisis y/o permite la manipulación de las células ya presentes en la cámara. El sistema también se puede usar para separar células en función de su motilidad con la intención de proporcionar un subconjunto de células a partir de una muestra que contenga dichas células. Esto es particularmente útil para separar células espermáticas de alta motilidad de células espermáticas de menor motilidad para su uso en

Tecnologías de Reproducción Asistida (ART). Por lo tanto, la separación puede llevarse a cabo en el sistema de acuerdo con la invención y las células móviles pueden extraerse de la cámara de análisis.

En una realización de la presente invención, el sistema de fluidos a mesoescala comprende además medios para proporcionar una fuerza impulsora de líquido para mover un líquido desde la cámara de muestra a la cámara de análisis y/o desde la cámara de análisis a la cámara de muestra. Cuando el líquido se mueve de la cámara de muestra a la cámara de análisis, el líquido puede ser un medio de acondicionamiento que comprende células móviles. Cuando el líquido, por otro lado, se mueve desde la cámara de análisis a la cámara de muestra, el líquido puede ser un medio de acondicionamiento. Se puede aplicar cualquier medio adecuado para proporcionar una fuerza impulsora de líquido en el sistema.

En una realización preferida, los medios para proporcionar una fuerza impulsora de líquido comprenden una jeringa. Una jeringa puede ser operada fácilmente, por ejemplo presionando un botón o activando otro actuador, y por lo tanto el funcionamiento de una jeringa requiere un mínimo esfuerzo del usuario final. Además, el mecanismo de una jeringa es un principio mecánico simple que contribuye a la robustez general del sistema. El movimiento del pistón en el cilindro de la jeringa también puede aplicar una fuerza impulsora de líquido en cualquier dirección a través del sistema de fluidos a mesoescala, es decir, desde el compartimiento del medio de acondicionamiento hasta la cámara de análisis o viceversa. Por lo tanto, una sola jeringa puede ser suficiente tanto para cargar el sistema con el medio de acondicionamiento como para extraer la muestra a través del sistema.

En una realización de la presente invención, el sistema de fluidos a mesoescala comprende además un medio de muestra, un medio de acondicionamiento y/o un agente de detección. En otras realizaciones, el medio de muestra, el medio de acondicionamiento y/o el agente de detección pueden agregarse en el uso del sistema de fluidos a mesoescala. En cualquier caso, el sistema cumple con los requisitos de un dispositivo de diagnóstico doméstico fácil de usar, ya que reduce aún más el riesgo de error humano ya que el usuario final necesita menos pasos. En una realización particular, el medio de muestra, el medio de acondicionamiento de muestras y/o el agente de detección se suministran en una o más cápsulas, jeringas o similares, o los componentes apropiados, por ejemplo un agente de detección o componentes del medio de muestra o medio de acondicionamiento de células, pueden secarse o recubrirse directamente en el sistema. Se puede integrar una cápsula o una jeringa en el sistema de fluidos a mesoescala o puede ser externa al sistema de fluidos a mesoescala. Tener los medios y/o componentes de los medios, por ejemplo los agentes de detección, en cápsulas o jeringas separadas, puede mejorar la vida útil del sistema de fluidos a mesoescala ya que los medios individuales pueden almacenarse en condiciones óptimas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para estimar la cantidad de células móviles en una muestra y, sin embargo, un aspecto adicional se refiere a un procedimiento para extraer células móviles de células no móviles como se describe anteriormente. En ambos procedimientos, una muestra que contiene las células móviles se aplica debajo del filtro permeable a las células; la muestra que contiene células móviles también puede contener células no móviles de las cuales se pueden separar las células móviles. En ambos procedimientos, puede estar presente o puede agregarse un medio de acondicionamiento celular por encima del filtro permeable a las células, es decir, en el lado del medio de acondicionamiento, y puede estar presente o puede agregarse un medio de muestra debajo del filtro permeable a las células. El medio de acondicionamiento celular y el medio de aplicación de muestra son como se definió anteriormente. Cualquier principio de detección relevante para el sistema de fluidos a mesoescala de la invención también es relevante para cualquier realización del aspecto del procedimiento de la invención, y para cualquier realización de los aspectos del procedimiento, el filtro permeable a las células puede ser como cualquier realización del sistema de fluidos a mesoescala. En realizaciones específicas, el filtro permeable a las células está contenido en un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con la invención. Cualquier realización del sistema de fluidos a mesoescala es relevante para ambos aspectos del procedimiento de la invención. Cuando se emplea el sistema de fluidos a mesoescala, el procedimiento puede comprender además los pasos de: agregar un medio de acondicionamiento a la cámara de muestra y la cámara de análisis y el canal entre ellos; opcionalmente, agregar un agente de detección a la cámara de muestra; agregar la muestra al compartimiento de aplicación de muestra; permitiendo que las células móviles de la muestra viajen al compartimiento del medio de acondicionamiento; proporcionar una fuerza impulsora de líquido desde la cámara de muestra a la cámara de análisis; cuantificar el agente de detección en las cámaras de análisis, por ejemplo en el filtro de retención de células si está presente o extraer las células móviles de la cámara de análisis. El sistema de fluidos a mesoescala puede así prellenarse con medios, por ejemplo medio de muestra y/o medio de acondicionamiento de células, o estos medios se pueden aplicar al sistema de fluidos a mesoescala durante el uso.

Los presentes inventores prevén un procedimiento para usar el sistema según la presente invención, en el que inicialmente se proporciona un medio de acondicionamiento en al menos el compartimiento del medio de acondicionamiento de la cámara de muestra. En ciertas realizaciones, el medio de acondicionamiento puede estar presente en un depósito o en el compartimiento del medio de acondicionamiento de la cámara de muestra, cuando se suministra al usuario final. Un depósito con un medio, por ejemplo medio de muestra y/o medio de acondicionamiento de células, o un agente de detección estará en comunicación fluida con la cámara o compartimiento apropiado. En otras realizaciones, el medio de acondicionamiento es agregado al compartimiento del medio de acondicionamiento a través de la cámara de análisis o a través del puerto de entrada de medio del compartimiento del medio de acondicionamiento, por ejemplo mediante el uso de una fuerza impulsora de líquido tal como una jeringa. Dependiendo del procedimiento de cuantificación, se puede agregar un agente de detección a la

cámara de muestra. El agente de detección puede ser un colorante apropiado para que las células móviles se puedan teñir con el agente de detección, permitiendo la detección y cuantificación de la población de células en una cámara de análisis a partir de la intensidad del colorante. El agente de detección también puede ser un colorante fluorescente de modo que las células se puedan cuantificar a partir de la medición de una señal de fluorescencia según sea apropiado. El agente de detección puede estar presente en un depósito o puede estar ya presente en la cámara de muestra, por ejemplo puede secarse o recubrirse directamente en el sistema. Luego se agrega una muestra al compartimiento de aplicación de muestra, y se permite un período de tiempo para que las células móviles de la muestra viajen al compartimiento del medio de acondicionamiento. El medio de acondicionamiento se extrae a continuación a través de la cámara de análisis por medio de una fuerza de accionamiento de líquido tal como una jeringa. Las células móviles en el medio de acondicionamiento son retenidas en la cámara de análisis, y las células retenidas se cuantifican. Si las células móviles son retenidas por un filtro de retención de células, típicamente se usa un agente de detección para que las células puedan cuantificarse en la cámara de análisis por medios visuales.

En consecuencia, los procedimientos mencionados anteriormente, por ejemplo el procedimiento que usa el sistema de fluidos a mesoescala de la presente invención, facilita una estimación precisa de células móviles en una muestra. Por lo tanto, es posible que un usuario final obtenga información sobre la motilidad de las células llevando a cabo el procedimiento en una muestra en un entorno doméstico sin experiencia previa y sin ningún conocimiento técnico avanzado.

El sistema de fluidos a mesoescala y los aspectos del procedimiento se pueden usar para analizar la cantidad y la motilidad de células móviles en una muestra o para separar células móviles en función de su motilidad, por ejemplo para fines de ART, según corresponda. Las células móviles pueden ser células procariotas, por ejemplo células bacterianas, o células eucariotas, tales como células de levadura, amebas, micro y macroparásitos y similares o tipos de células móviles de mamíferos. Un tipo de célula preferido es células de esperma, en particular células de esperma humano u otras células de esperma de mamífero, por ejemplo de animales domésticos, como ganado, caballos, ovejas, perros, gatos, etc.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit de piezas que comprende un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con cualquier aspecto de la invención, un agente de detección, un medio de muestra y un medio de acondicionamiento de células. El agente de detección, el medio de muestra o el medio de acondicionamiento de células pueden estar presentes en el sistema de fluidos a mesoescala, por ejemplo en depósitos o en las cámaras, o pueden estar contenidos en contenedores separados del sistema de fluidos a mesoescala. El kit también puede comprender instrucciones para el uso del kit. Un agente de detección preferido en el kit es un colorante de tetrazolio, tal como MTT.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un sistema para el análisis de células móviles en una muestra, comprendiendo el sistema un sistema de fluidos a mesoescala según el primer aspecto de la invención y un dispositivo detector externo que comprende: un detector óptico; un medio de almacenamiento legible por ordenador que contiene un código de programa informático configurado para cuantificar un agente de detección en las cámaras de análisis o en el filtro de retención de células del sistema de fluidos a mesoescala, si está presente; un procesador de datos para ejecutar el código del programa de ordenador.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un terminal de usuario móvil, por ejemplo un teléfono inteligente, que contiene un código de programa informático configurado para cuantificar un agente de detección en las cámaras de análisis o en el filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con el primer aspecto de la invención, si está presente.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento implementado por ordenador para determinar un valor de una medida cuantificable de la motilidad celular para una muestra de células que comprende las etapas de:

recibir datos de imágenes que comprenden una imagen de al menos una parte de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala; y

procesar los datos de imagen para determinar el valor de la medida cuantificable

en el que la etapa de procesar los datos de imagen comprende la etapa de mapear los datos de imagen en el valor de la medida cuantificable usando una función de mapeo, estando calibrada la función de mapeo para mapear datos de imagen de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de una sistema de fluidos a mesoescala particular como se describe en relación con el primer aspecto de la invención a un valor de la medida cuantificable.

En consecuencia, una medida cuantificable puede determinarse automáticamente y ser independiente del operador.

Todos los pasos del procedimiento pueden realizarse en un único sistema de procesamiento de datos tal como un terminal de usuario, por ejemplo un teléfono inteligente. El único sistema de procesamiento de datos también puede ser un sistema estacionario, por ejemplo un dispositivo clínico. Alternativamente, algunos de los pasos pueden realizarse en un servidor informático remoto, por ejemplo el paso de procesar los datos de imagen puede realizarse en un servidor de ordenador remoto.

La medida cuantificable puede ser una medida absoluta, por ejemplo la cantidad de células móviles en la muestra, una medida relativa, por ejemplo el porcentaje de células móviles en la muestra. La medida cuantificable también puede describir un estado como "bueno", "normal", "promedio", "bajo", etc. El "WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Appendix 1", proporciona valores de referencia para los análisis de semen, y el "WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Appendix 1" se incorpora aquí como referencia.

La calibración de la función de mapeo puede realizarse analizando la motilidad de un gran número de muestras usando tanto el sistema de fluidos a mesoescala particular como las técnicas tradicionales, por ejemplo técnicas manuales basadas en microscopio. Los procedimientos para el análisis microscópico de células de espermatozoides se describen en el capítulo 2, por ejemplo 2,7 y 2,8, del "WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen", que se incorporan aquí como referencia.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el paso de preprocesar los datos de imagen para determinar si los datos de imagen pueden utilizarse como entrada a la función de mapeo, en donde se genera un mensaje de error si se determina que los datos de imagen son no utilizables como entrada.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente el paso de:

mostrar el valor determinado de la medida cuantificable en una pantalla.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un producto de programa informático que comprende medios de código de programa adaptados para hacer que un sistema de procesamiento de datos realice los pasos del procedimiento implementado por ordenador descrito anteriormente, cuando los medios de código de programa se ejecutan en el sistema de procesamiento de datos.

En algunas realizaciones, el producto de programa informático comprende un medio legible por ordenador que tiene almacenados en él los medios de código de programa.

Un medio de almacenamiento de datos puede ser un medio transportable tal como un DVD, un dispositivo USB o similar. Alternativamente, un medio de almacenamiento de datos puede ser un disco duro en un servidor informático conectado a una red informática, por ejemplo los datos pueden almacenarse a través de servicios de Internet, como Dropbox™, o usando el almacenamiento en la nube.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un dispositivo para determinar un valor de una medida cuantificable de la motilidad celular para una muestra de células, comprendiendo el dispositivo una unidad de cámara para capturar una imagen de una parte de una cámara de análisis y/o filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala, una unidad de procesamiento para procesar la imagen capturada, una pantalla para visualizar el valor de la medida cuantificable de la motilidad celular y una unidad de entrada de usuario, donde, en respuesta a la activación de la unidad de entrada del usuario; la unidad de cámara está configurada para capturar una imagen de una parte de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala; y la unidad de procesamiento está configurada para procesar la imagen capturada para determinar el valor de la medida cuantificable de la motilidad celular utilizando una función de mapeo configurada para mapear la imagen capturada en el valor de la medida cuantificable, en la que la función de mapeo está calibrada para mapear datos de imagen de una cámara de análisis y/o filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala particular como se describe en relación con el primer aspecto de la invención en un valor de la medida cuantificable.

La unidad de cámara puede ser cualquier unidad capaz de recoger datos apropiados de una imagen, por ejemplo una cámara digital, un escáner láser, un lector CCD, un escáner de fotodiodo o similar.

La pantalla y la unidad de entrada del usuario se pueden combinar en una sola unidad, por ejemplo en una pantalla táctil.

En una realización particular, el dispositivo comprende una cámara de alojamiento para alojar el dispositivo de fluidos a mesoescala de la invención. La cámara de alojamiento puede configurarse para controlar las condiciones de iluminación que rodean al dispositivo de fluidos a mesoescala, por ejemplo, la cámara de alojamiento puede cerrar la luz externa. La cámara de alojamiento también puede estar equipada con lámparas, por ejemplo diodos emisores de luz, capaces de proporcionar luz de una composición controlada, por ejemplo con respecto a las longitudes de onda, y la intensidad. La cámara de alojamiento también se puede configurar para definir una distancia específica entre el dispositivo de fluidos a mesoescala y la unidad de cámara, o la distancia puede controlarse, por ejemplo usando un escenario o similar.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un medio de almacenamiento de datos que comprende un código legible por ordenador donde dicho código legible por ordenador está configurado para programar un terminal de usuario que comprende una unidad de procesamiento, una pantalla y una unidad de entrada de usuario.

Un terminal de usuario puede ser un teléfono inteligente o una tableta. El terminal de usuario también puede ser un ordenador portátil, por ejemplo un ordenador portátil o un ordenador estacionario. Por lo tanto, el código legible por



ordenador puede ser una aplicación configurada para programar el teléfono inteligente o tableta, por ejemplo una aplicación iOS de Apple®, una aplicación móvil de Windows® y/o una aplicación de Google® Android. Alternativamente, el código legible por ordenador puede ser una página web configurada para programar el terminal de usuario, por ejemplo una aplicación web.

## 5 Breve descripción de las figuras

A continuación, la invención se explicará con mayor detalle con la ayuda de ejemplos de realizaciones y con referencia a los dibujos esquemáticos, en los que

La figura 1 muestra una sección transversal esquemática del sistema de fluidos a mesoescala de la invención.

10 La figura 2 muestra un dibujo esquemático de un dispositivo para determinar el valor de una medida cuantificable de la motilidad celular para una muestra de células, de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 3 muestra los datos para la titulación de una muestra de semen.

La figura 4 muestra fotografías de filtros de retención de células de un dispositivo de fluidos a mesoescala de la invención después del uso.

15 Debe entenderse que también se contemplan combinaciones de las características en las diversas realizaciones, y que las diversas características, detalles y realizaciones se pueden combinar en otras realizaciones. En particular, se contempla que todas las definiciones, características, detalles y realizaciones con respecto al sistema de fluidos a mesoescala, el procedimiento de estimación de la cantidad de células móviles en una muestra y el procedimiento de extracción de células móviles de células no móviles se apliquen por igual a otro.

20 La referencia a las figuras sirve para explicar la invención y no debe interpretarse como una limitación de las características de las realizaciones específicas tal como se representan.

## Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a un sistema de fluidos a mesoescala capaz de separar células móviles en función de su motilidad, por ejemplo de separar células móviles de células no móviles y del líquido de muestra, y a un procedimiento para estimar la cantidad de células móviles en una muestra y a un procedimiento para extraer células móviles de células no móviles. Este sistema puede usarse para analizar el contenido o la cantidad y también la motilidad de las células en una muestra conocida o que se espera contenga células móviles. El sistema también se puede usar para separar células en función de su motilidad, con la intención de proporcionar un subconjunto de células a partir de una muestra que contenga dichas células. Esto es particularmente útil para separar células espermáticas de alta motilidad de células espermáticas de menor motilidad para su uso en Tecnologías de Reproducción Asistida (ART).

30 En el contexto de esta invención, los términos "móvil" y "motilidad" se refieren a células que son capaces de moverse en un líquido independientemente de cualquier flujo del líquido. En particular, las células móviles son capaces de moverse en líquidos que no fluyen. También se puede decir que las células móviles están "viajando" o "nadando", etc. La motilidad puede considerarse aleatoria, o las células pueden responder a un estímulo nadando, por ejemplo nadando hacia o alejándose de una condición dada. Los estímulos comunes pueden ser que las células móviles se muevan en respuesta a un gradiente químico ("quimiotaxis"), un gradiente de temperatura ("termotaxis"), un gradiente de luz ("fototaxis"), una línea de campo magnético ("magnetotaxis"), o un campo eléctrico ("galvanotaxis"). Los estímulos relevantes serán conocidos por la persona experta. En ciertas realizaciones, la motilidad celular puede inducirse proporcionando un estímulo relevante para una célula móvil de interés con el fin de hacer que la célula nade desde su punto de adición hacia cámaras de análisis posteriores en el sistema. Por ejemplo, se puede colocar una quimioquina u otro producto químico en el compartimiento del medio de acondicionamiento, por ejemplo en el medio de acondicionamiento, o la cámara de análisis para atraer células móviles añadidas en el compartimiento de aplicación de muestra o en un pozo receptor.

45 En el contexto de esta invención, el término "mesoescala" está destinado a cubrir un intervalo de tamaños en el que la dimensión más pequeña de los canales está en el intervalo de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 4 mm, por ejemplo aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3 mm, típicamente aproximadamente 2 mm, aunque los canales también pueden contener constricciones. Del mismo modo, una cámara puede tener una profundidad de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20 mm o más, tal como de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2 mm, por ejemplo aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 1 mm, y la dimensión horizontal más grande puede ser de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm, por ejemplo de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 30 mm o de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 20 mm, o de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm, por ejemplo desde aproximadamente 2 mm hasta aproximadamente 6 mm. El tamaño del pozo receptor, si está presente, debería ser suficiente para mantener el líquido de muestra para llenar el compartimiento de la muestra de la cámara de muestra con líquido para análisis, aunque también se contempla que la muestra se diluya en el pozo receptor para llenar el compartimiento de aplicación de muestra. En general, se puede decir que los fluidos en sistemas de fluidos a mesoescala fluirán en condiciones laminares, y los sistemas de

fluidos con canales o cámaras diferentes a los definidos anteriormente pueden describirse como "mesoescala" siempre que los fluidos contenidos en los sistemas fluyan en condiciones laminares.

Con referencia ahora a las figuras, en la figura 1 se representa un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con la presente invención, dicho sistema 1 de fluidos a mesoescala comprende un sustrato 2 que tiene una cámara 3 de muestra y una cámara 4 de análisis; la cámara de muestra que comprende un filtro 6 permeable a las células que define un compartimiento 7 de aplicación de muestra y un compartimiento 8 de medio de acondicionamiento; la cámara 3 de muestra que tiene un orificio 15 de entrada de muestra en el compartimiento 7 de aplicación de muestra; la cámara 4 de análisis que tiene un puerto 9 de entrada y un puerto 10 de salida; el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento está en comunicación fluida con el puerto 9 de entrada de la cámara 4 de análisis a través de un canal 5; donde el compartimiento 7 de aplicación de muestra está debajo del filtro 6 permeable a las células y el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento está encima del filtro 6 permeable a las células. El sistema 1 de fluidos a mesoescala también puede comprender un pozo 12 receptor en comunicación fluida con el compartimiento 7 de aplicación de muestra. La cámara de análisis puede comprender un filtro 13 de retención de células.

Un "filtro" de acuerdo con la presente invención se debe entender en los términos más amplios como una unidad capaz de separar sólidos, por ejemplo células y líquido. Por lo tanto, el filtro puede ser, por ejemplo un papel de filtro, una membrana de filtro, etc., un tamiz, un lecho compacto de partículas. El presente sistema comprende un filtro permeable a las células, que permite que las células atraviesen el filtro. Opcionalmente, el presente sistema también comprende un filtro de retención de células, que permite que el líquido atraviese y retenga las células. En consecuencia, los dos tipos de filtros deben tener diferentes tamaños de poro dependiendo de las celdas que se analizarán. El filtro 6 permeable a las células puede tener, por ejemplo, un tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ , por ejemplo 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ , como 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15  $\mu\text{m}$ , etc., lo que permite que las células móviles pasen a través de él mientras que al mismo tiempo proporciona una caída de presión a través del filtro. Un tamaño de poro preferido es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . En una realización, el filtro 6 permeable a las células es un filtro de nucleoporos. Los materiales apropiados para el filtro de retención de células 13 pueden tener un corte de tamaño de, por ejemplo aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , como 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0  $\mu\text{m}$ , aunque también pueden ser relevantes tamaños de corte mayores, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 12  $\mu\text{m}$ . Los tamaños de corte preferidos son 0,2  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$ . En particular, los tamaños de corte del filtro 6 permeable a las células y el filtro 13 de retención de células se seleccionan de modo que las células móviles de interés puedan atravesar el filtro 6 permeable a las células mientras son retenidas por el filtro 13 de retención de células. El filtro de retención de células es un filtro de ésteres de celulosa mixtos.

El sistema de fluidos a mesoescala de la invención se emplea con un medio de acondicionamiento. El término "medio de acondicionamiento" no pretende ser limitante, pero "acondicionamiento" se refiere a que el medio puede contener componentes necesarios para el análisis de las células móviles y también para mantener las células viables. Por lo tanto, el medio de acondicionamiento puede contener tampones de pH, sales, nutrientes según sea apropiado para un tipo de células de interés. El medio de acondicionamiento también puede contener un agente de detección, o un agente de detección puede agregarse por separado a un medio de acondicionamiento en el sistema o puede presentarse en forma seca en un canal o cámara.

Para la detección y cuantificación, el medio de acondicionamiento comprenderá típicamente un agente de detección. El agente de detección puede ser o comprender un colorante o un asociado de unión para una célula marcada con un colorante, por ejemplo un anticuerpo contra un marcador de superficie en la célula, anticuerpo que está marcado con un colorante o isótopo radioactivo o similar. Los colorantes apropiados pueden ser colorantes fluorescentes u otros colorantes; un colorante puede ser capaz de unirse específicamente o no específicamente a un tipo de célula de interés. Ejemplos de colorantes para usar como etiquetas de detección para cuantificar células de espermatozoides incluyen azul de Coomassie, azul de Trypan, azul cristalino, azul del Nilo, rojo del Nilo, hematoxilina, fucsina ácida, eosina, safranina, nigrosina, naranja de acridina, Giemsa, eritrosina, Papanicolaou, azul de metileno, rojo neutro, rojo de fenol, tinción de Hoechst, resazurina, marrón de Bismarck, colorantes de tetrazolio, G naranja, ácido peryódico-Schiff, tinción de RoWright, tinción de Jenner, tinción de Leishman, tinción de Giemsa, tinción de Romanowsky, tinción de Sudán, yoduro de propidio y bromuro de etidio. Colorantes preferidos son cualquier colorante de tetrazolio, tal como sales o compuestos de tetrazolio solubles en agua o insolubles en agua, por ejemplo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MMT), 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio (INT), por ejemplo como sus sales de bromuro o cloruro, 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (TTC), por ejemplo como sal de cloruro o dimetiltetrazolio. Los colorantes de tetrazolio y sus correspondientes ensayos son bien conocidos dentro de la técnica. Cuando el sistema de fluidos a mesoescala se emplea para separar células móviles en una muestra, por ejemplo para ser utilizado para ART, se prefiere que no esté presente colorante o etiqueta. En realizaciones específicas, se emplean dos o más agentes de detección diferentes donde agentes de detección adicionales pueden detectar o cuantificar características adicionales de las células móviles, por ejemplo los dos o más agentes de detección, por ejemplo, diferentes agentes de detección pueden cuantificar dos o más características según sea apropiado para los agentes de detección, en particular dos o más características diferentes. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos marcados apropiadamente como un agente de detección adicional para detectar o cuantificar un antígeno de superficie específico en las células móviles. Se pueden emplear agentes de detección adicionales como control negativo para asegurar que un componente

específico no esté presente en la cámara de análisis o en el lado del medio de acondicionamiento del filtro permeable a las células. En general, cualquier realización de la invención puede emplear dos o más agentes de detección.

Cuando están presentes varios tipos de células en la muestra, el agente de detección se puede unir de forma ventajosa específicamente y posiblemente también selectivamente a las células de interés. Se prefiere que el agente de detección cambie de color al unirse a tipos de células específicos, por ejemplo células espermáticas móviles en vivo. Por lo tanto, un agente de detección preferido no tendrá un color visible cuando no esté unido a una célula, pero al unirse a la célula cambiará para tener un valor detectable, por ejemplo un color visible. Se prefiere que el agente de detección no afecte negativamente a las células. En una realización preferida, un medio de acondicionamiento que contiene un agente de detección está contenido en un depósito, por ejemplo un pozo receptor, mientras que el líquido en las cámaras de análisis y los pasillos no contienen el agente de detección. Esto permitirá que las células móviles en las cámaras de análisis o en la superficie del filtro de retención de células no necesiten lavarse para su detección ya que el único agente de detección en las cámaras de análisis ha sido llevado allí por las células móviles. Alternativamente, se añade un agente de detección al pozo receptor, que contiene un medio de acondicionamiento libre de agente de detección, tras la adición de la muestra. Esto logrará el mismo efecto. En otra realización más, en particular cuando el sistema de fluidos a mesoescala no se llena con un medio de acondicionamiento, un agente de detección puede estar presente en forma seca en un canal o cámara o en el filtro permeable a las células, o el agente de detección puede estar presente en el filtro de retención de células o el sistema de fluidos a mesoescala puede contener un agente de detección absorbido en una almohadilla o similar. Por ejemplo, el agente de detección puede revestirse sobre una cámara o pared de canal. Tener el agente de detección en forma seca permitirá un funcionamiento fácil del sistema por parte del usuario final, ya que el agente de detección estará presente en una dosificación correcta y se volverá a solubilizar fácilmente tras la aplicación del medio de acondicionamiento de muestra. El agente de detección no unido se lavará típicamente a través del filtro de retención de células mientras se conservará el colorante unido a la célula. En realizaciones adicionales, pueden estar presentes agentes con funciones específicas, por ejemplo en forma seca, en una cámara de análisis o pasaje.

En una realización, el agente de detección es un colorante, que se disuelve en el medio de acondicionamiento, o se seca en el filtro de retención y se disuelve cuando se agrega medio de acondicionamiento al sistema. En otra realización, el agente de detección es un colorante, que se coloca en un compartimiento cerca del puerto 11 de entrada del medio o el canal 5 en forma seca y se disuelve cuando se llena el compartimiento del medio de acondicionamiento.

Durante el uso, se introduce una muestra que contiene células móviles en el compartimiento 7 de aplicación de muestra de la cámara 3 de muestra, opcionalmente a través del pozo 12 receptor. A continuación, se permite que las células se desplacen al compartimiento 8 de medio de acondicionamiento de la cámara 3 de muestra. El tiempo permitido después de la adición de una muestra dependerá del tipo de células móviles, pero típicamente será de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora, aunque también se pueden usar tiempos más cortos o más largos. Cuando el sistema se usa con células de esperma, el tiempo permitido puede constituir aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 40 minutos. Cuando el tiempo ha transcurrido, el medio de acondicionamiento puede retirarse del compartimiento 8 de medio de acondicionamiento de la cámara 3 de muestra y la cámara 4 de análisis. Las células en la cámara 4 de análisis pueden entonces detectarse y/o cuantificarse, o las células pueden ser retiradas de las cámaras 4 de análisis utilizando, por ejemplo, una pipeta. La detección de células móviles en el filtro 13 de retención de células o en las cámaras 4 de análisis se puede realizar simplemente comparando la intensidad de color observada, por ejemplo en la superficie corriente arriba del filtro de retención de células y comparándola con una indicación de la correlación entre el número de células y la intensidad del colorante, por ejemplo proporcionado en el sustrato 2 o desde una cámara de control opcional.

El filtro 6 permeable a las células puede contener además compuestos, por ejemplo ácido hialurónico, que atrae células al filtro 6 permeable a las células y nadan a través de él. El lado del medio de acondicionamiento se conectará a la cámara 4 de análisis. El filtro 6 permeable a las células puede minimizar adicionalmente, o incluso evitar, la mezcla del líquido de una muestra aplicada en el lado de aplicación de muestra con un medio de acondicionamiento presente o agregado al lado del medio de acondicionamiento. Por lo tanto, el filtro 6 permeable a las células asegurará que las células no se transporten del lado de aplicación de muestra al lado del medio de acondicionamiento por convección o difusión, de modo que las células presentes en el lado del medio de acondicionamiento serán células móviles que atraviesan el filtro 6 permeable a las células nadando a través de él.

El sistema 1 de fluidos a mesoescala de la invención comprende un sustrato 2, que puede estar fabricado de cualquier material conveniente, tal como un polímero, un vidrio, un metal, un material cerámico o una combinación de estos. El sustrato 2 está definido por una estructura sólida que tiene una parte superior y una inferior y una altura adecuada para comprender estructuras para fluidos a mesoescala tales como cámaras y canales. Las cámaras de las estructuras para fluidos a mesoescala pueden estar abiertas o cerradas, por ejemplo al ambiente, según sea adecuado. Por ejemplo, los puertos definidos anteriormente pueden cerrarse usando, por ejemplo, válvulas, o las cámaras también pueden comprender otras aberturas. Las cámaras pueden estar permanentemente cerradas en la parte superior, o el sistema puede presentar cualquier tipo de miembro susceptible de cierre, como una tapa deslizante o con bisagras o una tapa extraíble. Dichos medios de acceso pueden aplicarse a todo el sistema o a

cámaras y/o canales y/o estructuras individuales. En este contexto, el término "acceso físico", por ejemplo con respecto a la cámara 4 de análisis significa que se puede insertar una herramienta en el líquido en la cámara 4 de análisis para manipular el contenido de la cámara 4. Esta manipulación puede ser para eliminar una o más células de la cámara 4 de análisis, o puede implicar manipulaciones de células ya presentes en la cámara 4. Este tipo de acceso físico también puede proporcionarse para la cámara de muestra.

En una realización, el sustrato 2 tiene una forma más similar a un paralelepípedo. El sustrato 2 define una superficie inferior y una o más paredes laterales de la cámara 3 de muestra, la cámara 4 de análisis y el canal 5 entre las cámaras. Todas las estructuras están definidas en el sustrato 2. Cuando el sustrato 2 se observa desde arriba, las paredes laterales pueden formar perímetros para cada una de las cámaras que definen su forma. Dicha forma puede ser redonda, cuadrada, poligonal u oblonga, etc. En una realización preferida, la forma formada por el perímetro es redonda. Del mismo modo, el canal 5 puede tener cualquier forma conveniente cuando se observa desde arriba. Si el sustrato 2 está cerrado en la parte superior, el material utilizado es preferiblemente transparente. Se prefiere que solo una parte del material sea transparente permitiendo solo la observación de la sección relevante del sistema mientras que el material restante es opaco, por ejemplo blanco. El sistema 1 de fluidos a mesoescala de la presente invención se construye preferiblemente a partir de materiales esencialmente transparentes con superficies hidrófilas, aunque también se pueden usar regiones bien definidas de superficies hidrófobas. En ciertas realizaciones, el sistema 1 de fluidos a mesoescala puede comprender secciones de superficies superhidrófilas para permitir una humectación fácil de la cámara de muestra, la cámara de análisis y los conductos con líquidos acuosos. El sistema 1 de fluidos a mesoescala también puede construirse a partir de materiales no transparentes, por ejemplo blancos. El material de construcción es preferiblemente uno o más polímeros termoplásticos, aunque también se pueden usar otros materiales, tales como vidrio, silicio, metal, polímeros elastoméricos.

La cámara 3 de muestra puede tener cualquier forma adecuada con la condición de que la cámara 3 de muestra se pueda dividir en dos compartimientos separados 7, 8. En una realización típica, la cámara 3 de muestra está definida por una forma rebajada en el sustrato 2, donde el cuerpo de la forma tiene al menos una base inferior y al menos una pared que define el espacio hueco de la cámara 3 de muestra. La forma rebajada en el sustrato 2 está preferiblemente truncada de manera que no atraviesa por completo el fondo del sustrato 2. La forma de la cámara 3 de muestra puede, por ejemplo, ser cilíndrica, frustocónica, cúbica, paralelepípedica rectangular, etc. En una realización de la presente invención, la cámara 3 de muestra está definida por una forma cilíndrica rebajada en el sustrato 2, en el que el cuerpo de la forma cilíndrica tiene bases circulares paralelas y una pared con una sección transversal circular sustancialmente constante, y en el que las bases circulares son paralelas a al menos el plano inferior del sustrato 2. La cámara 3 de muestra puede estar abierta o cerrada en la parte superior. En una realización específica, la cámara 3 de muestra está abierta al ambiente, por ejemplo abierta hacia arriba, permitiendo la adición de medios y similares al compartimiento 8 de medio de acondicionamiento; esta realización puede comprender además una tapa para cerrar la cámara 3 de muestra. Lo mismo puede aplicarse a la cámara 4 de análisis.

En una realización, la cámara 3 de muestra está separada en compartimientos 7, 8 por el filtro 6 permeable a las células, donde el filtro 6 permeable a las células define una sección transversal similar a una lámina que atraviesa la cámara 3 de muestras, y en el que el filtro 6 permeable a las células es sustancialmente paralelo a al menos el plano inferior del sustrato. En una determinada realización, en la que la cámara 3 de muestra está definida por una forma cilíndrica rebajada en el sustrato 2, la cámara 3 de muestra está separada en compartimientos 7, 8 por un filtro 6 permeable a las células, que define una sección transversal circular paralela a al menos el plano inferior para formar la forma de un disco que divide la cámara 3 de muestra en dos compartimientos. En una realización específica, la distancia desde el fondo, por ejemplo el "suelo", de la cámara 3 de muestras al filtro 6 permeable a las células es de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5 mm, por ejemplo aproximadamente 4 mm o aproximadamente 2 mm, definiendo así la altura del compartimiento 7 de aplicación de muestra. Esta realización es especialmente adecuada para analizar células móviles; en una realización para la purificación preparativa de células móviles, esta distancia puede ser mayor, por ejemplo unos 30 mm. Los presentes inventores han descubierto que la separación de células móviles de células no móviles es particularmente eficaz cuando la altura del compartimiento 7 de aplicación de muestra es inferior a 5 mm. Se cree que una altura por debajo de 5 mm, por ejemplo 2 mm, mejora la posibilidad de que una célula móvil se encuentre con la superficie del filtro 6 permeable a las células y, por lo tanto, sea guiada para nadar a través del filtro 6 permeable a las células y hacia dentro del compartimiento del medio de acondicionamiento. En una realización específica, el compartimiento de muestra tiene una profundidad de 4,4 mm y el compartimiento del medio de acondicionamiento tiene una profundidad de 13,2 mm; el diámetro de la cámara de muestra es de 9,4 mm.

El compartimiento 7 de aplicación de muestra está debajo del filtro 6 permeable a las células y el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento está por encima del filtro 6 permeable a las células. Debe interpretarse que la presente invención abarca cualquier realización, en la que se cumple el principio general de proporcionar un compartimiento de aplicación de muestra debajo de un compartimiento de medio de acondicionamiento, compartimientos que están separados por un filtro permeable a las células. Es decir, la cámara de muestra puede dividirse en compartimientos por un filtro permeable a las células, que abarca la cámara 3 de muestras con una inclinación con respecto al fondo del dispositivo. De esto se deduce que los presentes inventores prevén que el filtro 6 permeable a las células puede presentar, por ejemplo una porción esférica parcial, que es cóncava o convexa con respecto a cualquiera de los compartimientos 7, 8. En otra realización de la presente invención, el filtro 6 permeable a las células se extiende por la cámara 3 de muestra de forma sustancialmente horizontal. Cuando la distancia

desde el fondo del compartimiento 7 de aplicación de muestra al filtro 6 permeable a las células es uniforme, por ejemplo cuando tanto el fondo como el filtro permeable a las células son horizontales, se ha observado una separación mejorada de células móviles de células no móviles, en particular cuando la distancia entre el compartimiento 7 de aplicación de muestra y el filtro 6 permeable a las células es inferior a 5 mm.

La cámara 3 de muestra debe tener un volumen adecuado para contener una muestra en el compartimiento 7 de aplicación de muestra y un medio de acondicionamiento en el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento. Una persona experta en la técnica conocerá fácilmente las dimensiones requeridas para la cámara 3 de muestra para contener la muestra. El compartimiento 7 de aplicación de muestra y el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento pueden ser de volúmenes aproximadamente iguales, aunque el compartimiento de aplicación de muestra es típicamente más grande, por ejemplo 2 a 5 veces más grande que el compartimiento de medio de acondicionamiento. Estas relaciones son particularmente relevantes para el análisis de células móviles. Para la purificación preparativa de células móviles, la relación puede ser aún mayor.

El puerto 15 de entrada de muestra debe interpretarse en un sentido amplio como un medio para colocar la muestra en el compartimiento 7 de aplicación de muestra. La muestra se coloca debajo del filtro 6 permeable a las células. En una realización preferida, el puerto 15 de entrada de muestra comprende un canal que proporciona comunicación fluida desde el exterior al compartimiento 7 de aplicación de muestra de la cámara 3 de muestra. El sistema 1 de fluidos a mesoescala también puede comprender ventajosamente un pozo 12 receptor en comunicación fluida con el puerto 15 de entrada de muestra. Los presentes inventores también prevén medios alternativos para colocar la muestra dentro del compartimiento 7 de aplicación de muestra. Alternativamente, el pozo 12 receptor puede tener la forma de un cajón o similar que tenga una ubicación de aplicación de muestra que permita la comunicación fluida con el ambiente y una ubicación de análisis de muestra que permita la comunicación fluida con el compartimiento 7 de aplicación de muestra. Por ejemplo, cuando el pozo receptor está en la ubicación ambiental, se puede agregar una muestra al pozo receptor. Cuando el pozo receptor, por ejemplo que contiene una muestra, se mueve a la ubicación de análisis de muestra en la que el pozo receptor está en comunicación fluida con el compartimiento 7 de aplicación de muestra pero ya no lo está con el ambiente.

En una realización preferida, el dispositivo 1 comprende un pozo 12 receptor en comunicación fluida con el puerto 15 de entrada de muestra. El pozo 12 receptor proporcionará una ubicación para agregar una muestra por analizar.

En una realización preferida, el posicionamiento del filtro 13 de retención de células con relación al canal que proporciona la comunicación fluida entre el compartimiento del medio de acondicionamiento y la cámara de análisis permite que la superficie corriente arriba y/o la superficie corriente abajo del filtro de retención de la celda sean observadas visualmente. Por ejemplo, el sustrato 2 o la cubierta, cuando se usan, pueden ser transparentes, lo que significa que se pueden observar los contenidos de una cámara 4 de análisis, por ejemplo a simple vista o usando un microscopio o similar. Sin embargo, además de ser transparente a la luz visible, el sustrato 2 o la cubierta también pueden ser transparentes a otras longitudes de onda, como la luz ultravioleta o la luz infrarroja. La transparencia a la luz ultravioleta permite que ciertas moléculas fluorescentes, por ejemplo colorantes o etiquetas, pueden excitarse con una fuente de luz apropiada. El sustrato 2 restante también puede ser transparente. El sustrato 2 y la cubierta pueden tener las mismas o diferentes características con respecto a la transparencia. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el sustrato 2 puede comprender filtros a intervalos de longitudes de onda para ayudar en la excitación y observación de colorantes fluorescentes. Por ejemplo, una parte del sustrato 2 puede ser transparente a una longitud de onda de excitación pero no a la longitud de onda de emisión y otro par puede a su vez ser transparente a la longitud de onda de emisión pero no a la longitud de onda de excitación. En ciertas realizaciones, el sustrato 2 o la cubierta encima de la cámara 4 de análisis comprende una lente de aumento. Esto permitirá una observación más fácil de los contenidos de una cámara 4 de análisis y preferiblemente también del filtro 13 de retención de células. Las lentes de aumento son bien conocidas por el experto.

En una realización de la presente invención, el sistema de fluidos 1 a mesoescala comprende además medios para proporcionar una fuerza impulsora de líquido para mover un líquido desde la cámara 3 de muestra, en particular el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento, a la cámara 4 de análisis o desde la cámara 4 de análisis a la cámara 3 de muestra. Se puede proporcionar una fuerza impulsora de líquido aplicando una presión relativa positiva al puerto 11 de entrada del medio para dispersar el líquido en la cámara 4 de análisis desde el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento. Alternativamente, se aplica una presión relativa negativa al canal 5 de efluente desde la cámara 4 de análisis a través del puerto 10 de salida creará el mismo efecto, es decir, moverá líquido desde el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento de la cámara 3 de muestra a la cámara 4 de análisis y extrae además líquido de la cámara 4 de análisis a través de la celda reteniendo el filtro 13, cuando está presente. Esencialmente, se puede extraer todo el líquido de la cámara 4 de análisis para concentrar las células móviles presentes en la cámara 4 de análisis en la superficie del filtro 13 de retención de células, permitiendo la detección de las células. Los medios para proporcionar una fuerza impulsora de líquido pueden integrarse o ser externos al sistema 1 de fluidos a mesoescala.

En una realización preferida, los medios para proporcionar una fuerza impulsora de líquido comprenden una jeringa. Una jeringa permite una operación fácil del dispositivo 1 por parte del usuario final sin requerir bombas auxiliares o similares. Una jeringa está diseñada preferiblemente para ser operable manualmente. La jeringa puede tener un pistón con ajustes predefinidos, para ayudar al usuario a operar el dispositivo. Por ejemplo, la jeringa puede tener

dos configuraciones con una primera configuración que define una "posición de inicio" y una segunda configuración que define una "posición final". En una realización, se aplica una muestra en el pozo 12 receptor con el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento lleno con medio de acondicionamiento; en este caso, el pistón de la jeringa está en la posición inicial; mover el pistón a la posición final creará una fuerza motriz para mover el líquido desde el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento a través de la cámara 4 de análisis a través del filtro 13 de retención de la celda y hacia el canal 5 de efluente. Alternativamente la jeringa puede contener el medio de acondicionamiento y moverse el pistón desde la posición de inicio hasta la posición final puede llenar el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento. Después de la aplicación de la muestra al pozo 12 receptor o al compartimiento 7 de aplicación de muestra, devolver el pistón desde la posición final a la posición inicial creará una la fuerza impulsora del líquido desde el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento a través de la cámara 4 de análisis a través del filtro 13 de retención de la celda y hacia el canal 5 del efluente. El pistón también puede tener más de dos configuraciones predefinidas con ajustes intermedios entre las posiciones inicial y etapas del funcionamiento del dispositivo 1.

También son posibles otros medios para proporcionar un flujo de líquido en el dispositivo. Por ejemplo, en la forma de una función peristáltica que actúa sobre el canal de efluente. Alternativamente, el sistema puede estar conectado a una bomba auxiliar externa o a un contenedor de vacío.

En una realización de la presente invención, el sistema 1 de fluidos a mesoescala comprende además un medio de muestra, un medio de acondicionamiento y/o un agente de detección. Por consiguiente, en una realización particular, el sistema 1 de fluidos a mesoescala se llena previamente con medio de acondicionamiento. El medio de acondicionamiento puede estar presente en la cámara 4 de análisis, la cámara 3 de muestra, en particular el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento, y los pasos 5, 14. El sistema 1 de fluidos a mesoescala también puede comprender depósitos separados para medio de acondicionamiento de muestra y/o un agente de detección. El sistema 1 de fluidos a mesoescala también puede comprender varios depósitos separados cuando se requieren diferentes reactivos en diferentes etapas de análisis de células móviles. Los depósitos están en comunicación fluida con la cámara 3 de muestra, en particular el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento, o la cámara 4 de análisis según sea apropiado, es decir, el medio de acondicionamiento puede aplicarse al sistema 1 a través de una cámara o compartimiento. En una realización de la presente invención, el medio de acondicionamiento de muestra se suministra en una cápsula, jeringa o similar por separado. En tal realización, el sistema 1 de fluidos a mesoescala puede comprender un canal separado con un puerto de aplicación de fluido externo, canal que está en comunicación fluida directa con la cámara 4 de análisis o la cámara 3 de muestra, en particular el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento. Sin embargo, el puerto de aplicación de fluido externo puede ser el puerto 10 de salida de la cámara 4 de análisis o el puerto 11 de entrada de medio del compartimiento 8 de medio de acondicionamiento. Una cápsula y el puerto de aplicación de fluido externo pueden estar equipados con dispositivos de conexión complementarios. La cápsula puede estar hecha de un material flexible que permita el ajuste, por ejemplo reducción del volumen para inyectar el contenido de la cápsula en el puerto de aplicación de fluido. Si el medio de acondicionamiento está contenido en un depósito, puede estar en comunicación fluida con el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento de la cámara 3 de muestra o la cámara 4 de análisis a través de un canal o similar. Dicho canal puede comprender una válvula o una membrana o estructura similar que impida un flujo en el canal hasta que la válvula o membrana se active para permitir un flujo. Esto asegurará que se evite la entrada prematura del medio de acondicionamiento en las cámaras. Por ejemplo, un accionador puede permitir la apertura del canal para el flujo de líquido desde el depósito a la cámara 3 de muestra, en particular el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento. Por lo tanto, en una realización, un medio de acondicionamiento de muestra está inicialmente contenido en un depósito, mientras que la cámara 3 de muestra y la cámara 4 de análisis no contienen líquido. Al abrir el canal al flujo, el medio de acondicionamiento fluirá desde el depósito a la cámara 3 de muestra y a la cámara 4 de análisis. Una vez que el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento de la cámara 3 de muestra y la cámara 4 de análisis contengan líquido, las células móviles pueden viajar desde el compartimiento 7 de aplicación de muestra hasta el compartimiento 8 de medio de acondicionamiento. En una realización alternativa, la cámara 4 de análisis puede estar provista de un líquido, que puede ser el mismo líquido presente en un depósito o en un líquido diferente. En otra realización más, no se proporcionan líquidos en el sistema 1 de fluidos a mesoescala, sino que se añaden al sistema antes del análisis de una muestra.

La superficie aguas abajo del filtro 13 de retención de células puede estar en comunicación fluida con un canal 14 de efluente. El sistema 1 de fluidos a mesoescala comprende preferiblemente solo un único canal 14 de efluente que permite que un único medio proporcione una fuerza impulsora de líquido, por ejemplo una bomba o una jeringa, puede emplearse para extraer líquido de la cámara 3 de muestra y la cámara 4 de análisis. El canal 14 de efluente tendrá dimensiones a mesoescala de modo que el flujo de líquido en el canal 14 de efluente será laminar como se define anteriormente. Típicamente, el diámetro del canal 14 de efluente será de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3 mm, por ejemplo alrededor de 1 mm. En general, es deseable que el diámetro del canal 14 de efluente no introduzca una caída de presión excesiva en el canal, de modo que el líquido de la cámara 3 de muestra y de la cámara 4 de análisis pueda retirarse fácilmente usando medios simples, por ejemplo una jeringa.

En una determinada realización, el sistema 1 de fluidos a mesoescala comprende un medio para regular la temperatura, en particular para aumentar la temperatura sobre la temperatura ambiente típica. Los medios apropiados para regular la temperatura pueden comprender así un elemento de calentamiento, tal como una bobina de un conductor eléctricamente conductor, un elemento Peltier, tubos para un líquido de calentamiento y/o

enfriamiento, o similar. Se observa que un elemento Peltier también se puede usar para enfriar el sistema si se desea.

Los canales, cámaras, pasillos y otras estructuras del sistema 1 de fluidos a mesoescala de la presente invención pueden formarse uniendo un primer sustrato que comprende estructuras correspondientes a los canales y cámaras con un segundo sustrato. A continuación, tales características se denominan generalmente "canales y cámaras", aunque esto no debe considerarse limitante. Por lo tanto, los canales y cámaras pueden formarse entre dos sustratos al unir los sustratos en capas. Los sistemas de fluidos a mesoescala no están limitados a dos capas de sustrato. En ciertas realizaciones, pueden usarse múltiples capas de sustrato donde cada una de las capas de sustrato puede comprender estructuras para canales y cámaras según sea apropiado. En particular, el filtro 6 permeable a las células y el filtro 13 que retiene las células pueden estar contenidos en una sola capa, y de la misma manera los canales 5, 14 pueden formarse cada uno entre dos capas de sustrato. Estas múltiples capas de sustrato se unen luego para ser ensambladas como un sistema 1 de fluidos a mesoescala.

Las estructuras correspondientes a los canales y cámaras en el sustrato se pueden crear usando cualquier procedimiento apropiado. En una realización preferida, los materiales del sustrato son polímeros termoplásticos, y los procedimientos apropiados comprenden molienda, microfresado, taladrado, corte, ablación con láser, estampado en caliente, moldeo por inyección y moldeo por microinyección, e impresión en 3D. Estas y otras técnicas son bien conocidas en el arte. Los canales también se pueden crear en otros materiales de sustrato usando procedimientos apropiados, tales como fundición, moldeo, litografía suave, etc. También es posible emplear diferentes tipos de materiales, por ejemplo materiales termoplásticos, vidrios, metales, etc. para hacer un solo sistema de fluidos a mesoescala. Los materiales del sustrato se pueden unir utilizando cualquier procedimiento apropiado. En una realización preferida, los materiales de sustrato son polímeros termoplásticos, y los procedimientos de unión apropiados comprenden encolado, unión con disolvente, sujeción, soldadura ultrasónica y soldadura por láser. Otros procedimientos relevantes son la fijación con tornillos u otros medios de sujeción.

En otra realización de la presente invención, el sistema de fluidos a mesoescala comprende un sustrato que tiene una cámara de muestra y dos o más cámaras de análisis; la cámara de muestra comprende un filtro permeable a las células que define un compartimiento de aplicación de muestra y un compartimiento de medio de acondicionamiento; la cámara de muestra tiene un puerto de entrada de muestra en el compartimiento de aplicación de muestra; las dos o más cámaras de análisis que tienen cada una un puerto de entrada y un puerto de salida; en el que el compartimiento de aplicación de muestra está debajo del filtro permeable a las células y el compartimiento del medio de acondicionamiento está por encima del filtro permeable a las células, y donde el compartimiento del medio de acondicionamiento comprende uno o más filtros permeables a la célula adicionales que definen dos o más subcompartimientos del compartimiento 8 de medio de acondicionamiento, y en el que cada uno de los dos o más compartimientos secundarios del compartimiento 8 de medio de acondicionamiento está en comunicación fluida con un puerto de entrada de una cámara de análisis correspondiente a través de un canal. En una realización preferida, el uno o más filtros permeables a células adicionales abarca la cámara de muestra en un plano paralelo al primer filtro 6 permeable a las células, que define la cámara 7 de aplicación de muestra y la cámara 8 de medio de acondicionamiento. El uno o más filtros permeables a células definen al menos dos compartimientos secundarios del compartimiento 8 de medio de acondicionamiento, creando así una serie de compartimientos secundarios uno encima del otro. Las células móviles pueden viajar entonces desde el compartimiento 7 de aplicación de muestra al primer subcompartimiento del compartimiento 8 de medio de acondicionamiento, los compartimientos conectados en serie permiten además que las células móviles se muevan desde el primer subcompartimiento al segundo y al tercero, etc. Las células móviles que tienen la motilidad más alta se desplazarán a otros subcompartimientos y las células acumuladas en cada subcompartimiento pueden detectarse entonces en la cámara de análisis respectiva conectada a los respectivos subcompartimientos. La motilidad de la población de células se puede estimar a partir del número de células en cada cámara de análisis. En consecuencia, la estimación de las células móviles se divide en fracciones adicionales de motilidad. En ciertas realizaciones, el sistema 1 de fluidos a mesoescala puede tener más de tres compartimientos secundarios del compartimiento 8 de medio de acondicionamiento y el número correspondiente de cámaras de análisis, por ejemplo, el sistema 1 de fluidos a mesoescala puede tener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o incluso más compartimientos y cámaras de análisis.

En otra realización de la presente invención, el sistema de fluidos a mesoescala comprende una cámara de análisis adicional para la estimación paralela del recuento total de células. La cámara de análisis adicional puede diseñarse de forma similar a la cámara de análisis para analizar células móviles. En una realización, la cámara de análisis adicional comprende un puerto de entrada y un puerto de salida. La cámara de análisis adicional puede estar en comunicación de fluidos a través del puerto de entrada a través de un canal con el compartimiento de aplicación de muestra. La cámara de análisis adicional puede estar alternativamente en comunicación fluida a través del puerto de entrada mediante un canal con una cámara de muestra adicional, en donde la cámara 3 de muestra y la cámara de muestra adicional pueden estar opcionalmente en comunicación fluida con el mismo pozo 12 receptor.

En una realización del sistema 1 de fluidos a mesoescala, el pozo 12 receptor, la cámara 4 de análisis y los pasajes están cubiertos con una cubierta, y donde al menos la parte de la cubierta, que está cubriendo la cámara 4 de análisis, es transparente. En otra realización, en el sistema de fluidos a mesoescala la parte transparente de la cubierta constituye una pantalla legible por la aplicación de software de teléfono inteligente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un sistema para el análisis de células móviles en una muestra, comprendiendo el sistema un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un dispositivo detector externo que comprende: un detector óptico; un medio de almacenamiento legible por ordenador que contiene un código de programa informático configurado para cuantificar un agente de detección en la cámara de análisis o en el filtro de retención de células del sistema de fluidos a mesoescala, si está presente; un procesador de datos para ejecutar el código del programa de ordenador. El dispositivo detector externo puede comprender además una pantalla para presentar resultados de cuantificación a un operador. Por ejemplo, los resultados pueden presentarse como una tabla con la cantidad estimada de células en cada cámara de análisis presentada como una cantidad absoluta o como una cantidad relativa, por ejemplo de la distribución relativa de las células en las cámaras de análisis, o el resultado se puede presentar como un resultado global para describir la muestra, por ejemplo la muestra puede describirse como "buena", "normal", "promedio", "baja", etc. El detector óptico puede ser cualquier detector capaz de leer los resultados del sistema de fluidos a mesoescala, por ejemplo cuantificando el agente de detección en el filtro de retención de células. Detectores ópticos particularmente útiles son los utilizados para escanear códigos de barras o similares, y en una determinada realización el detector óptico de selección del grupo que consiste en una cámara, un escáner láser, un lector CCD, un escáner de fotodiodos o similar. En una realización preferida, el dispositivo detector externo es un terminal de usuario móvil. Con "terminal de usuario móvil" se entiende cualquier dispositivo de cómputo portátil, tal como un teléfono móvil, teléfono inteligente, asistente digital personal, ordenador portátil, ordenador de tableta o similar. El terminal de usuario móvil es preferiblemente un dispositivo informático que emplea Apple iOS, Android, Symbian, Windows Phone o sistemas operativos similares.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un terminal de usuario móvil por ejemplo un teléfono inteligente, que contiene un código de programa informático configurado para cuantificar un agente de detección en el filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En una realización, la cuantificación de espermatozoides móviles se realiza usando un teléfono inteligente como un dispositivo detector externo. En esta realización, el pozo receptor, la cámara de análisis y los pasos del sistema de fluidos a mesoescala están cubiertos con una cubierta, donde al menos la parte de la cubierta que cubre las cámaras de análisis es transparente y constituye una pantalla legible por teléfono inteligente. Al usar un teléfono inteligente provisto con una cámara digital y un código de programa de ordenador, por ejemplo una aplicación que permite que el teléfono inteligente procese los datos obtenidos por la cámara, se puede leer la pantalla y se pueden obtener datos para la cuantificación y calificación (motilidad) de los espermatozoides móviles y, por lo tanto, proporcionar al usuario del teléfono inteligente un valor indicativo de resultado, por ejemplo en términos de la concentración y la motilidad de las células espermáticas. Los datos se pueden almacenar en el teléfono inteligente y se pueden usar para comparar datos de pruebas anteriores. En una realización particular, el código de programa informático está configurado para cargar los resultados en una base de datos para permitir la comparación con los resultados en la base de datos, por ejemplo de otros usuarios o de pruebas anteriores. Los datos cargados en la base de datos pueden almacenarse en la base de datos para futuras comparaciones.

Una realización de la presente invención se refiere al uso del sistema de fluidos a mesoescala, en el que la carga de la muestra de esperma comprende las etapas de: 1) recoger una muestra de esperma en un vaso de recolección de esperma; 2) transferir la muestra de esperma de la copa de muestra a un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con la presente invención por medios adecuados tales como el uso de una pipeta Pasteur.

La figura 2 muestra un dibujo esquemático de un dispositivo 220 para determinar un valor de una medida cuantificable de la motilidad celular para una muestra de células, de acuerdo con una realización de la invención. El dispositivo 220 comprende una unidad 221 de cámara para capturar una imagen de una parte de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala, una unidad 222 de procesamiento para procesar la imagen capturada, una pantalla 223 para mostrar el valor de la medida cuantificable de la motilidad celular, y una unidad 224 de entrada de usuario. En respuesta a la activación de la unidad 224 de entrada de usuario; la unidad 221 de cámara está configurada para capturar una imagen de una parte de la cámara de análisis y/o el filtro de retención de células del sistema de fluidos a mesoescala; y la unidad 222 de procesamiento está configurada para procesar la imagen capturada para determinar el valor de la medida cuantificable de la motilidad celular utilizando una función 225 de mapeo configurada para mapear la imagen capturada en el valor de la medida cuantificable. La función 225 de mapeo está calibrada para mapear datos de imágenes de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala particular de la invención en un valor de la medida cuantificable.

La pantalla 223 y la unidad 224 de entrada de usuario se pueden combinar en una sola unidad, por ejemplo en una pantalla táctil 226.

Para determinar un valor de la medida cuantificable de la motilidad celular para una muestra de células particular, se puede disponer un sistema de fluidos a mesoescala de la invención que comprende la muestra cerca del dispositivo 220. Esto se puede lograr disponiendo el dispositivo 220 y el sistema de fluidos a mesoescala en una unidad de alineación común. Alternativamente, el dispositivo 220 puede sostenerse a mano por encima del sistema de fluidos a mesoescala con la unidad de cámara apuntando hacia la cámara de análisis y/o el filtro de retención de células del sistema de fluidos a mesoescala. A continuación, en respuesta a la activación de la unidad 224 de entrada de



usuario, la unidad 221 de cámara captura una imagen de una parte de la cámara de análisis y/o filtro de retención de células del sistema de fluidos a mesoescala, y la unidad 222 de procesamiento procesa la imagen capturada para determinar el valor de la medida cuantificable de la motilidad celular.

5 Esto permite que la salida visual del sistema de fluidos a mesoescala se analice automáticamente. Esto puede mejorar la precisión, especialmente cuando el sistema de fluidos a mesoescala se usa para autodiagnóstico, es decir, cuando el usuario no es un profesional de la salud.

10 En una realización de la presente invención, la copa colectora de esperma es una parte integrada del dispositivo. Después de la eyaculación, la copa recolectora de esperma puede conectarse al dispositivo y, por lo tanto, cargar la muestra de esperma. En otra realización de la presente invención, el compartimiento 7 de aplicación de muestra comprende medios para asegurar que se proporciona un volumen de muestra preciso en el sistema para proporcionar resultados más precisos. En una determinada realización, los medios para asegurar un volumen de muestra preciso es un sistema de sobre flotación.

### Ejemplo 1

15 Se llevaron a cabo experimentos para comparar el efecto de tener el compartimiento de aplicación de muestra debajo del filtro permeable a las células y el compartimiento del medio de acondicionamiento por encima del filtro permeable a las células con aplicaciones previas de filtros permeables a la celda, donde el compartimiento de aplicación de muestra es, por ejemplo al lado o encima del compartimiento de medio de acondicionamiento.

Se llevó a cabo una comparación entre tener un compartimiento de aplicación de muestra por encima y por debajo del filtro permeable a las células.

20 Se usó una muestra de semen que contenía solo células inmóviles. La muestra se dividió en dos muestras para la prueba.

#### Compartimiento de aplicación de muestra sobre un filtro permeable a las células

25 Se aplicó una muestra a un sistema que tiene un compartimiento de aplicación de muestra por encima de un filtro permeable a las células y un medio de acondicionamiento debajo del filtro. El medio de acondicionamiento se transfirió con pipeta al compartimiento del medio de acondicionamiento y la muestra de semen se transfirió con pipeta al compartimiento de aplicación de muestra. Se extrajo una muestra de medio de acondicionamiento y se analizó en el intervalo de tiempo, proporcionado en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Tiempo	Recuento de células (millones/ml)
5 min	0,1
10 min	0,7
15 min	0,7

30 Evidentemente, los resultados muestran que las células inmóviles han atravesado la membrana permeable a las células, y los presentes inventores atribuyen este resultado al efecto de la fuerza gravitatoria.

#### Compartimiento de aplicación de muestra debajo de un filtro permeable a las células

35 La segunda parte de la muestra se aplicó a un sistema que tiene un compartimiento de aplicación de muestra debajo de un filtro permeable a las células y un medio de acondicionamiento encima del filtro. El medio de acondicionamiento se transfirió con pipeta al compartimiento del medio de acondicionamiento y la muestra de semen se transfirió con pipeta al compartimiento de aplicación de muestra. Se extrajo una muestra de medio de acondicionamiento y se analizó en el intervalo de tiempo proporcionado en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Tiempo	Recuento de células (millones/ml)
5 min	0
10 min	0
15 min	0

Los presentes inventores encontraron que ninguna célula había atravesado el filtro permeable a las células cuando la muestra se colocó debajo del filtro.

### Ejemplo 2

- 5 El rango dinámico de la intensidad de color de los valores RGB de los datos de imagen para una imagen de un dispositivo de fluidos a mesoescala de la invención se correlacionó con el recuento manual de una muestra de semen titulada. Una muestra de semen que contenía 185 millones de espermatozoides móviles por mililitro se diluyó dos veces en serie con plasma de semen. Las muestras se aplicaron a los dispositivos de prueba utilizando parámetros de incubación estándar usando MTT a una concentración de 0,5 mg/ml como agente de detección. Las fotografías de los resultados se tomaron con una cámara digital Life de Microsoft y se midieron las intensidades de color (valores RGB). El dispositivo de fluidos a mesoescala comprendía un filtro de retención de células, y para cada imagen para el análisis, el dispositivo de fluidos a mesoescala se colocó en una caja de luz para garantizar las mismas condiciones en todo momento. La caja de luz consistía en una caja e incluía la cámara colocada a aproximadamente 55 mm del objeto y una bombilla halógena de 12 voltios. Los atributos de la cámara fueron controlados por un programa Labview personalizado. Las condiciones en las que se realizó la prueba fueron: Temperatura: 20°C±1,5°C, humedad: 38% HR.

Los resultados se muestran en la Figura 3, que muestra el rango dinámico de la curva de titulación obtenida. Hay una relación lineal entre la intensidad del color y la concentración logarítmica de los espermatozoides móviles en las muestras. La intensidad de color de las manchas en el dispositivo de prueba está altamente correlacionada con la cantidad de espermatozoides móviles presentes en las muestras, ambas medidas por análisis óptico y manual mediante el ojo.

### Ejemplo 3

- Se probaron los posibles efectos de dos agentes de detección, MTT y cristal violeta, sobre la motilidad de los espermatozoides. Se prepararon soluciones madre de MTT y cristal violeta de 5 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente, y éstas se diluyeron dos veces en serie. Las soluciones del agente de detección se mezclaron con muestras de espermatozoides que comprendían 60 millones de células móviles por mililitro y 72 millones de células por mililitro en total (denotado como 60/72) en una relación 50:50 y las mezclas se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente antes de analizar las células microscópicamente

Tabla 3

MTT (mg/ml)	Células	Cristal violeta (mg/ml)	Células
0	60/72	0	60/72
5	18/64	1	40/63
2,5	30/63	0,5	27/43
1,25	34/65	0,25	32/56
0,625	48/77	0,125	37/56

Es evidente a partir de la Tabla 3 que el MTT tuvo un efecto sobre la motilidad celular. La relación de células móviles versus no móviles (% móviles) se redujo a las concentraciones más altas, mientras que la relación no se vio afectada por cristal violeta. Sin embargo, a concentraciones de MTT inferiores a 2,5 mg/ml no se observó ningún efecto sobre

la motilidad (no se muestra). Por lo tanto, se pueden usar ambos agentes de detección y dentro de las condiciones estándar, por ejemplo tiempo de incubación <30 min, 0,5 mg/ml para MTT, no se observan efectos sobre la motilidad. Se observa que estos efectos solo son relevantes en realizaciones en las que el agente de detección se mezcla con la muestra antes de permitir que las células migren a través del filtro permeable a las células.

#### 5 Ejemplo 4

Se probó un dispositivo de fluidos a mesoescala de la presente invención con muestras de esperma. El sistema comprendía un filtro permeable a las células de 13 mm de diámetro y un tamaño de poro de 10  $\mu$ m. El grosor del filtro permeable a las células fue de 10  $\mu$ m. El volumen del compartimiento de aplicación de muestra fue de aproximadamente 600  $\mu$ l y la distancia desde el fondo del compartimiento de aplicación de muestra hasta el filtro permeable a las células fue de 4,25 mm. Una copa de muestra estaba en comunicación fluida con el compartimiento de aplicación de muestra. Se aplicó una muestra de esperma a la copa de muestra que dio como resultado un volumen de muestra de 600  $\mu$ L que ingresa al compartimiento de aplicación de la muestra. Después de la aplicación de la muestra, se inyectó un medio de acondicionamiento (0,5 mg/ml de MTT) utilizando una jeringa, a través del orificio de salida de la cámara de análisis a través del filtro de retención de células y en el compartimiento del medio de acondicionamiento (de un volumen de 300  $\mu$ l). El dispositivo se incubó durante 30 min. Después de la incubación, la jeringa se usó para extraer líquido, que ahora incluía las células móviles, del compartimiento de aplicación de muestras para capturar las células móviles en el filtro de retención de células.

Las pruebas se realizaron utilizando muestras preparadas a partir de una muestra de semen en la que la concentración de células móviles se cuantificó microscópicamente y se diluyó para contener células en el intervalo de 0,6 millones por mililitro a 20 millones por mililitro. Las fotografías de los filtros de retención de células de los dispositivos se muestran en la figura 4, que muestra que, dentro del rango de concentración, podrían diferenciarse fácilmente 5 millones de células móviles por milímetro con respecto a concentraciones más bajas.

#### Ejemplo 5

El dispositivo de fluidos a mesoescala de la invención se ensayó frente a un ensayo de tira de prueba comercial conocido como SpermCheck. SpermCheck afirma diferenciar entre 20 millones de espermatozoides/ml por encima o por debajo, mientras que el presente dispositivo tiene un valor de corte de 5 millones de espermatozoides progresivos (criterios OMS 2010, WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen). Específicamente, el propósito de la prueba es que los profanos pongan los resultados de prueba generados por el dispositivo de fluidos a mesoescala de la invención, en dos categorías, "pobre" o "normal". Se obtuvieron 45 muestras de esperma y se analizaron microscópicamente antes de aplicar todas las muestras al dispositivo de fluidos a mesoescala de la invención o a tiras de prueba SpermCheck. Después de los análisis, todos los dispositivos y tiras de prueba se fotografiaron y las fotografías se incluyeron en una presentación a 5 personas diferentes (2 estudiantes universitarios de SDU y 3 ingenieros de la empresa 2C Engineering; en la Tabla 4 y Tabla 5 a continuación los sujetos se denominan como A a E, quienes fueron instruidos para clasificar las fotografías de acuerdo con las categorías "bajo" y "normal". El mismo tratamiento fue realizado por una persona interna (denominada "Control"). La Tabla 4 y la Tabla 5 muestran los resultados del experimento.

Tabla 4

Invención	A	B	C	D	E	Promedio	Control
Sensibilidad (%)	75	71	75	80	79	76	88
Especificidad (%)	89	89	84	89	89	88	84
PPV (%)	90	89	86	91	90	89,2	88
NPV (%)	74	71	73	76	77	74,2	84

Tabla 5

SpermCheck	A	B	C	D	E	Promedio	Control
Sensibilidad (%)	51	41	69	79	56	59,2	51

SpermCheck	A	B	C	D	E	Promedio	Control
Especificidad (%)	100	100	100	75	100	95	100
PPV (%)	100	100	100	97	100	99,4	100
NPV (%)	17	15	25	27	43	25,4	17

5 Los resultados de las pruebas por usuarios profanos estuvieron cerca de los resultados que obtuvimos al hacer la prueba internamente. Curiosamente, los resultados de la prueba desviados fueron muy similares entre los 5 profanos. Es importante destacar que el 80% de los resultados de la prueba desviados estaban muy cerca del valor de corte de 5 millones de espermatozoides móviles progresivos por ml. La sensibilidad de la tira de prueba SpermCheck es bastante baja, es decir, la prueba no puede identificar correctamente a los hombres con calidad de semen normal y el VAN es extremadamente bajo, es decir, la prueba no puede indicar al usuario un resultado negativo si el recuento de espermatozoides es bajo.

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema de fluidos a mesoescala para separar células móviles de células no móviles, comprendiendo el sistema un sustrato que tiene una cámara de muestra y una cámara de análisis; comprendiendo la cámara de muestra un filtro permeable a las células que define un compartimiento de aplicación de muestra y un  
5 compartimiento de medio de acondicionamiento, cuyo filtro permeable a las células tiene un tamaño de poro en el intervalo de 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ ;  
  
teniendo la cámara de muestra un puerto de entrada de muestra en el compartimiento de aplicación de muestra;  
  
teniendo la cámara de análisis un puerto de entrada y un puerto de salida;  
  
estando el compartimiento del medio de acondicionamiento en comunicación fluida con el puerto de entrada de la  
10 cámara de análisis a través de un canal y comprendiendo el compartimiento del medio de acondicionamiento además un orificio de entrada del medio en comunicación fluida con el ambiente;  
  
en el que con referencia al campo gravitatorio, el compartimiento de aplicación de muestra está debajo del filtro permeable a las células y el compartimiento del medio de acondicionamiento está encima del filtro permeable a las células.
- 15 2. El sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cámara de análisis comprende un filtro de retención de células que tiene una superficie corriente arriba orientada hacia el puerto de entrada y una superficie corriente abajo orientada hacia el puerto de salida, filtro de retención de células que tiene un tamaño de poro que retiene las células móviles, tamaño de poro que es menor que el tamaño de poro del filtro permeable a las células y está en el intervalo de 0,1  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ .
- 20 3. El sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende además medios, tales como una jeringa, para proporcionar una fuerza impulsora de líquido para mover un líquido desde la cámara de muestra a la cámara de análisis o desde la cámara de análisis a la cámara de muestra.
4. El sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un depósito en comunicación fluida con el compartimiento de aplicación de muestra, el  
25 compartimiento del medio de acondicionamiento o la cámara de análisis.
5. El sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un medio de muestra que comprende nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad, un medio de acondicionamiento que comprende nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad y/o un agente de detección.
- 30 6. Un procedimiento para separar células móviles, tales como aquellas seleccionadas de células eucariotas, tales como células de esperma de mamífero, por ejemplo células de esperma humano, o células procariotas, de células no móviles en una muestra que comprende los pasos de:  
  
proporcionar un filtro permeable a las células que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ , permitiendo que las células móviles se muevan a través del filtro permeable a las células;  
  
35 aplicar una muestra que contiene células móviles debajo del filtro permeable a las células;  
  
permitiendo que las células móviles en la muestra se muevan a través del filtro permeable a las células, y  
  
detectar células móviles que se han movido a través del filtro permeable a las células, o  
  
extraer células móviles que se han movido a través del filtro permeable a las células.
7. El procedimiento de separación de células móviles de células no móviles en una muestra de acuerdo con la  
40 reivindicación 6, en el que en la etapa de detección de células móviles que se han movido a través del filtro permeable a las células se detectan células móviles usando un agente de detección, tal como colorante de tetrazolio, por ejemplo MTT.
8. El procedimiento de separación de células móviles de células no móviles en una muestra de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 que comprende además la etapa de aplicar un medio de muestra que  
45 comprende nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad y/o un medio de acondicionamiento de células que comprende nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad debajo del filtro permeable a las células.
9. El procedimiento de separación de células móviles de células no móviles en una muestra de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el filtro permeable a células está contenido en un sistema de  
50 fluidos a mesoescala de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el procedimiento además los pasos de:

agregar un medio de acondicionamiento que comprende nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad a la cámara de muestra y a la cámara de análisis y al canal entre ellas;

opcionalmente, agregar un agente de detección a la cámara de muestra;

agregar la muestra al compartimiento de aplicación de muestra;

5 permitir que las células móviles de la muestra se muevan al compartimiento del medio de acondicionamiento;

proporcionar una fuerza impulsora de líquido desde la cámara de muestra a la cámara de análisis;

cuantificar el agente de detección en las cámaras de análisis o extraer las células móviles de la cámara de análisis.

10. Un kit de piezas que comprende un sistema de fluidos a mesoescala de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un agente de detección, tal como un colorante de tetrazolio, tal como MTT, un medio de muestra que comprende nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad y un medio de acondicionamiento de células que comprende nutrientes, sales, tampones y/o agentes modificadores de la viscosidad.

11. Un procedimiento implementado por ordenador para determinar un valor de una medida cuantificable de la motilidad celular para una muestra de células que comprende los pasos de:

15 recibir datos de imágenes que comprenden una imagen de al menos una parte de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala; y

procesar los datos de imagen para determinar el valor de la medida cuantificable; y

mostrar opcionalmente el valor determinado de la medida cuantificable en una pantalla;

20 en el que la etapa de procesar los datos de imagen comprende la etapa de mapear los datos de imagen en el valor de la medida cuantificable usando una función de mapeo, estando la función de mapeo calibrada para mapear datos de imagen de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala particular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un valor de la medida cuantificable.

12. Un procedimiento implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además el paso de preprocesar los datos de imagen para determinar si los datos de imagen pueden utilizarse como entrada a la función de mapeo, en el que se genera un mensaje de error si se determina que los datos de imagen no se pueden usar como entrada.

13. Un producto de programa informático que comprende medios de código de programa adaptados para hacer que un sistema de procesamiento de datos realice los pasos del procedimiento implementado por ordenador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, cuando los medios de código de programa se ejecutan en el sistema de procesamiento de datos, en el que el producto de programa informático comprende un medio legible por ordenador que tiene almacenados en él los medios de código de programa.

14. Un dispositivo para determinar el valor de una medida cuantificable de la motilidad celular para una muestra celular, comprendiendo el dispositivo una unidad de cámara para capturar una imagen de una parte de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala, una unidad de procesamiento para procesar la imagen capturada, una pantalla para visualizar el valor de la medida cuantificable de la motilidad celular, y una unidad de entrada de usuario, donde, en respuesta a la activación de la unidad de entrada del usuario;

la unidad de cámara está configurada para capturar una imagen de una parte de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala; y

40 la unidad de procesamiento está configurada para procesar la imagen capturada para determinar el valor de la medida cuantificable de la motilidad celular utilizando una función de mapeo configurada para mapear la imagen capturada en el valor de la medida cuantificable, en la que la función de mapeo está calibrada para mapear datos de imagen de una cámara de análisis y/o un filtro de retención de células de un sistema de fluidos a mesoescala particular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un valor de la medida cuantificable.

15. Un medio de almacenamiento de datos que comprende un código legible por ordenador en el que dicho código legible por ordenador está configurado para programar un terminal de usuario que comprende una unidad de procesamiento, una pantalla y una unidad de entrada de usuario para convertirse en un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 14.

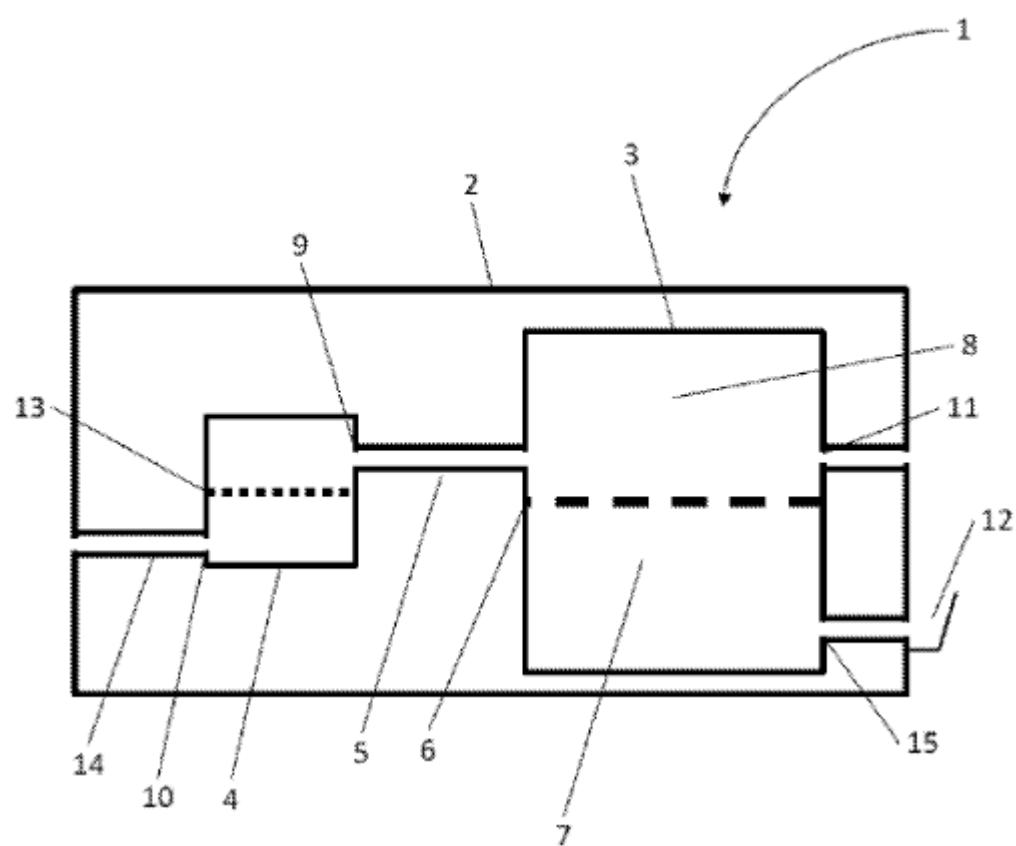


Fig. 1

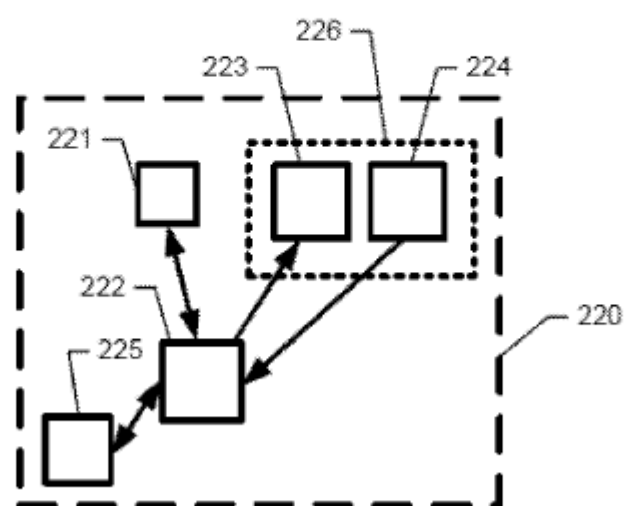


Fig. 2

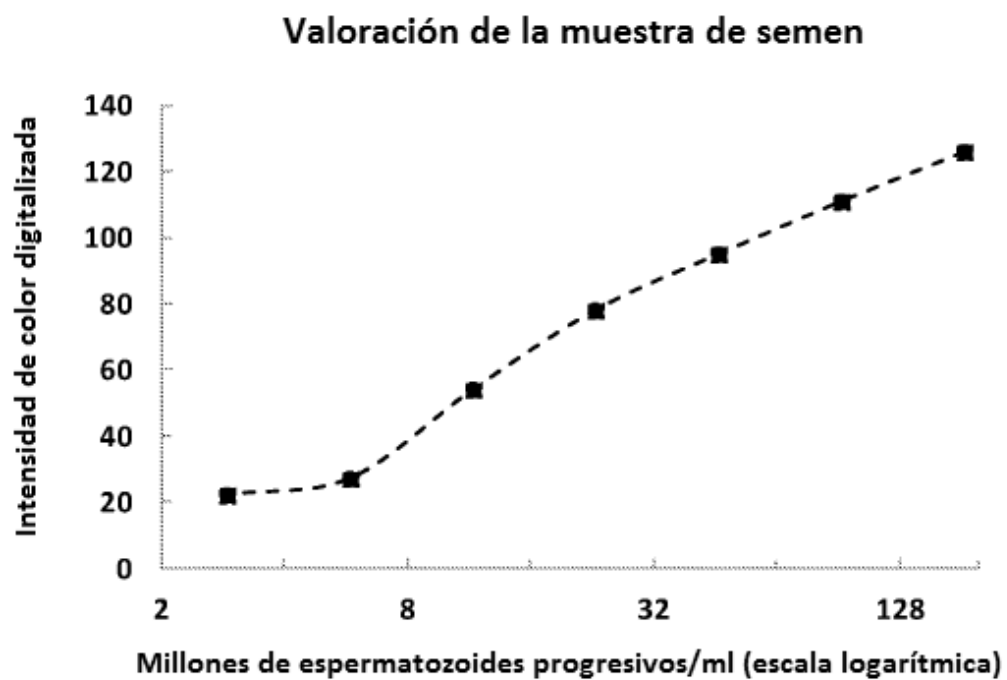


Fig. 3



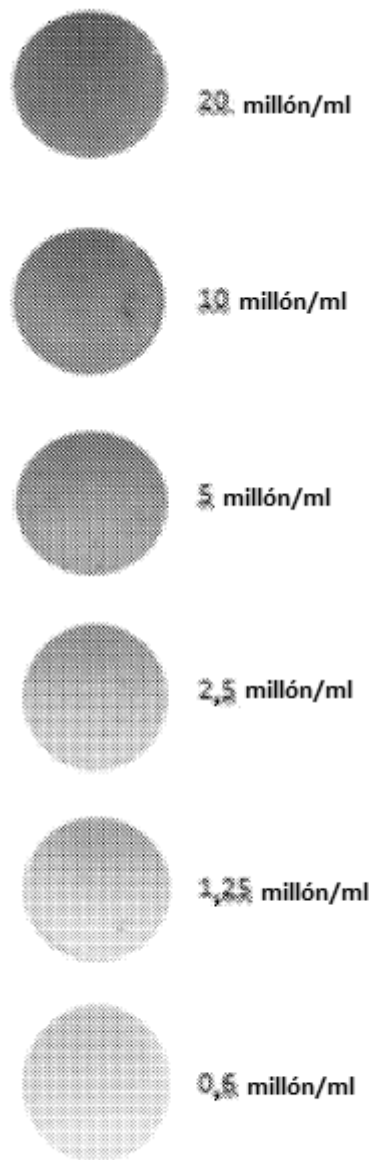


Fig. 4