

(12)

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 702 793

 (51) Int. CI.:

 C12Q 1/02
 (2006.01)

 G01N 15/14
 (2006.01)

 G01N 21/00
 (2006.01)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacior	nal:	18.05.2	2012	PCT/US2	012/038680
87) Fecha y número de publicación internacional:	29.11	.2012	WO12	162181	
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	18.05	.2012	E 1279	90268 (2)	
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea:	19.09.	2018	EP 27	10139	

54 Título: Análisis y clasificación de células móviles

(30) Prioridad:	73 Titular/es:
20.05.2011 US 201161488300 P	THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. (100.0%)
(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:	75 Francis Street Boston, MA 02115, US
05.03.2019	Inventor/es:
	DEMIRCI, UTKAN; ZHANG, XIAOHUI; KAYAALP, EMRE; SAFAEE, HOOMAN y TASOGLU, SAVAS (⁷⁴) Agente/Representante:
	UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Análisis y clasificación de células móviles

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente USA serie n.º 61/488 300, presentada el 20 de 5 mayo de 2011.

Declaración de investigación financiada con fondos federales

La presente invención se ha desarrollado con la ayuda del Gobierno gracias a las subvenciones R01 Al081534, R21 Al087107, y R21 EB007707 concedidas por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU.; una subvención del consorcio Integration of Medicine and Innovative Technology (CIMIT) (DAMD17- 02-2-0006) en virtud del Acuerdo de cooperación en actividades de adquisición de investigaciones médicas del Ejército de los Estados Unidos (*U.S. Army Medical Research Acquisition Activity Cooperative Agreement*); y una subvención (W81XWH-10-1-1050) concedida por el U.S. Army Medical Research & Materiel Command (USAMRMC) y el Telemedicine & Advanced Technology Research Center (TATRC). El Gobierno puede tener ciertos derechos en la invención.

Campo de la invención

10

30

15 La invención se refiere a sistemas y métodos para el análisis y la clasificación de células móviles, por ejemplo espermatozoides de mamífero.

Antecedentes de la invención

- La infertilidad afecta a 5,3 millones de parejas estadounidenses en edad fértil (9%) y el factor masculino es la causa de hasta el 50% de los casos. La fecundación *in vitro* (FIV), con o sin inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es la tecnología de reproducción asistida de uso más frecuente en la práctica clínica moderna para superar los problemas de infertilidad masculina. Uno de los obstáculos de la FIV y la ICSI reside en identificar y aislar los espermatozoides más móviles y presumiblemente más sanos en las muestras de semen que pueden presentar bajos recuentos de espermatozoides (oligozoospermia) y/o baja movilidad de los espermatozoides (astenozoospermia).
- 25 US2010291535 A1 divulga un método para utilizar un chip microfluídico para clasificar los espermatozoides, donde el esperma y el medio forman un flujo laminar espermático y un flujo laminar del medio en los microcanales.

US2008187991 A1 divulga la separación de partículas móviles de las partículas no móviles en un dispositivo de clasificación microfluídico, donde se hace que un torrente de fluido de clasificación que contiene partículas móviles y no móviles fluya adyacente a un torrente de medios de forma no turbulenta a través de un canal de clasificación y mientras fluyen las partículas móviles cruzan la interfaz entre los torrentes de flujos adyacentes, entrando en el

torrente de los medios, y formando un torrente de clasificación empobrecido en partículas móviles. US2006270021 A1 divulga un dispositivo integrado de aislamiento microfluídico de espermatozoides e inseminación de ovocitos, donde la separación de los espermatozoides se realiza en un canal de clasificación común y donde un

de ovocitos, donde la separación de los espermatozoides se realiza en un canal de clasificación común y donde un mayor número de espermatozoides móviles cruzan la interfaz entre los flujos colaminares de semen y medios.

35 **Resumen de la invención**

Un sistema de análisis y clasificación de células móviles como el que se describe en el presente puede capturar imágenes, seguir y clasificar una población de células móviles, como espermatozoides, *in situ* y en tiempo real dentro de un canal microfluídico con limitación de espacio. El sistema de análisis y clasificación de células móviles es un sistema sin productos químicos ni flujos capaz de analizar y clasificar células de forma rápida y con un alto

- 40 rendimiento. Se pueden determinar características de las células móviles, como la cantidad de células, la movilidad media y la movilidad de células concretas. El análisis de estas características es importante para el diagnóstico de diversos trastornos, como un recuento bajo de espermatozoides (oligozoospermia) y una baja movilidad de los espermatozoides (astenozoospermia), que pueden afectar a la fertilidad. Por otra parte, las células más móviles son clasificadas de forma pasiva por el sistema de análisis y clasificación sin necesidad de bombas u otros equipos
- 45 periféricos. En las tecnologías de reproducción asistida, por ejemplo, se recomienda utilizar muestras compuestas principalmente por espermatozoides altamente móviles.

La invención se define en las reivindicaciones. En un aspecto general, un método para clasificar células móviles que incluye la introducción de una población inicial de células móviles en un puerto de entrada de un canal microfluídico, donde la población inicial de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de la población de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de la población de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incubación de células móviles tiene una primera movilidad media; la incuba

50 células móviles en el canal microfluídico en ausencia de un flujo de medios; y la recopilación de una población clasificada de células móviles en un puerto de salida del canal microfluídico. La población clasificada de células móviles tiene una segunda movilidad media superior a la primera movilidad media.

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes.

Las células móviles comprenden espermatozoides, por ejemplo espermatozoides de un animal, como un mamífero.

55 El método incluye también la orientación del canal microfluídico en dirección horizontal o vertical.

La incubación de la población de células móviles incluye la incubación en ausencia de un flujo de medios.

La incubación de la población de células móviles incluye el calentamiento del canal microfluídico hasta una temperatura de unos 37 °C.

La incubación de la población de células móviles incluye la incubación de la población de células móviles durante un 5 tiempo suficiente para permitir que una parte de la población inicial de células móviles se desplace por el canal microfluídico, por ejemplo unos 20-60 minutos o unos 30 minutos.

La altura del canal microfluídico es inferior a unas 20 veces el tamaño de las células móviles, por ejemplo unas 3-10 veces el tamaño de las células móviles.

El método incluye también la determinación de la segunda movilidad media, incluyendo la obtención de una pluralidad de imágenes, por ejemplo imágenes sombreadas de una población recopilable de células móviles cerca del puerto de salida, donde la población recopilable de células móviles incluye la población clasificada de células móviles; y el análisis de la pluralidad de imágenes.

El método incluye también la determinación de la primera movilidad media basándose al menos en uno de los factores siguientes: velocidad de la trayectoria media (VAP), velocidad rectilínea (VSL) o linealidad de la población inicial de células móviles.

El método incluye también la determinación de la segunda movilidad media basándose al menos en uno de los factores siguientes: velocidad de la trayectoria media (VAP), velocidad rectilínea (VSL) o linealidad de la población clasificada de células móviles.

La introducción de la población inicial de células móviles incluye la suspensión de la población inicial de espermatozoides en un medio a una concentración de al menos unos 103 espermatozoides/µL, por ejemplo al menos unos 104 espermatozoides/µL. Una concentración de la población clasificada de células móviles en un medio es menor que o igual a unos 1,6 x 103 espermatozoides/µL.

En otro aspecto general, un método para analizar una población de células móviles incluye la introducción de una población inicial de células móviles en un puerto de entrada de un canal microfluídico; la incubación de la población de células móviles en el canal microfluídico; la adquisición de una pluralidad de imágenes de al menos una porción

25 de células móviles en el canal microfluídico; la adquisición de una pluralidad de imágenes de al menos una porción de la población de células móviles dentro del canal microfluídico; y la determinación de una característica de al menos una parte de la población de células móviles basándose en la pluralidad de imágenes.

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes.

15

40

Las células móviles incluyen espermatozoides, por ejemplo espermatozoides de un animal, como un mamífero.

30 La adquisición de una pluralidad de imágenes incluye la adquisición de una pluralidad de imágenes sombreadas de al menos una parte de la población de células móviles dentro del canal microfluídico.

La característica determinada incluye al menos una de las siguientes: movilidad, velocidad de la trayectoria media (VAP), velocidad rectilínea (VSL) o linealidad.

La característica determinada incluye al menos una de las siguientes: (1) una característica de una población clasificada de células móviles ubicada en los alrededores de un puerto de salida del canal microfluídico; y (2) una distribución de la población de células móviles a lo largo de la trayectoria del canal microfluídico.

La determinación de una característica incluye: la comparación de una característica de una población clasificada de células móviles ubicada en los alrededores de un puerto de salida del canal microfluídico con una de las características siguientes o con ambas: (1) una característica de la población inicial de células móviles; y (2) una característica de una población restante de células móviles ubicada en los alrededores del puerto de entrada tras la

incubación. El método incluye asimismo la determinación de una capacidad de clasificación del canal microfluídico basándose en

los resultados de la comparación. La determinación de una característica incluye la comparación de una característica de una población restante de

45 células móviles ubicada en los alrededores del puerto de entrada tras la incubación con una característica de una población clasificada de células móviles ubicada en los alrededores de un puerto de salida del canal microfluídico tras la incubación.

El método incluye también la determinación del estado de salud de la población inicial de células móviles basándose en la característica determinada.

50 El método incluye también la recopilación de una población clasificada de células móviles en un puerto de salida del canal microfluídico.

La incubación de la población de células móviles incluye la incubación en ausencia de un flujo de medios durante un tiempo suficiente para permitir que una parte de la población inicial de espermatozoides se desplace por el canal microfluídico, por ejemplo unos 20-60 minutos o unos 30 minutos.

La incubación de la población de células móviles incluye la incubación de la población de espermatozoides durante un tiempo suficiente para permitir que una parte de la población inicial de espermatozoides se desplace por el canal microfluídico.

La altura del canal microfluídico es inferior a unas 20 veces el tamaño de las células móviles, por ejemplo unas 3-10 5 veces el tamaño de las células móviles.

En otro aspecto general, un dispositivo para la clasificación de células móviles incluye un microcanal. La altura del canal microfluídico se selecciona para que tenga una dimensión de entre tres y diez veces el tamaño de la cabeza de las células móviles. El dispositivo incluye asimismo un puerto de entrada conectado a un primer extremo del canal microfluídico y configurado para recibir una población inicial de células móviles que tiene una primera movilidad

10 media y un puerto de salida conectado a un segundo extremo del canal microfluídico. El canal microfluídico está configurado para proporcionar una población clasificada de células móviles en el segundo extremo sin requerir un flujo de fluidos en el canal microfluídico. La población clasificada de células móviles tiene una segunda movilidad media superior a la primera movilidad media.

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes.

15 Las células móviles comprenden espermatozoides, por ejemplo espermatozoides de un animal, como un mamífero. La dimensión de las células móviles es el diámetro de la cabeza de los espermatozoides.

La dimensión de las células móviles es el diámetro de las células móviles.

La altura del canal microfluídico se selecciona para que sea entre tres y diez veces la dimensión de las células móviles, por ejemplo menos de unos 200 µm, por ejemplo menos de unos 60 µm, por ejemplo unos 3-20 µm.

20 La longitud del canal microfluídico se selecciona al menos en parte basándose al menos en uno de los factores siguientes: un tiempo de incubación de las células móviles en el canal y una velocidad de las células móviles, por ejemplo la longitud es inferior a unos 20 mm, por ejemplo de unos 12-15 mm.

La longitud del microcanal se selecciona al menos en parte basándose al menos en uno de los factores siguientes: un tiempo de incubación de las células móviles en el canal y una velocidad de avance de las células móviles.

25 El microcanal está configurado para proporcionar una población clasificada de células móviles tras un tiempo de incubación.

El canal microfluídico tiene una sección transversal rectangular, una sección transversal trapezoidal, una sección transversal triangular, una sección transversal circular u ovalada, una sección transversal que varía a lo largo del microcanal o una sección transversal con surcos.

30 El canal microfluídico es lineal o curvado.

El dispositivo incluye también un sistema de captura de imágenes configurado para capturar una pluralidad de imágenes de al menos una parte del canal microfluídico. El sistema de captura de imágenes incluye una fuente de luz configurada para iluminar al menos una parte del canal microfluídico; y un detector configurado para detectar una imagen, por ejemplo una imagen sombreada, de las células móviles en la porción iluminada del canal microfluídico.

35 El dispositivo incluye también un módulo de análisis configurado para determinar una característica de las células móviles en la parte del canal microfluídico cuya imagen ha sido capturada, basándose en las imágenes capturadas.

Una «célula móvil» es una célula que es capaz de moverse de forma espontánea y activa, por ejemplo mediante el movimiento de flagelos y/o cilios. Un ejemplo de células móviles a efectos de la presente solicitud incluye espermatozoides, por ejemplo espermatozoides de mamífero, neutrófilos, macrófagos, leucocitos y determinadas bacterias.

40 bacterias.

Los sistemas y métodos descritos en el presente ofrecen diversas ventajas. Por ejemplo, el sistema de análisis y clasificación de células móviles facilita la identificación y selección de células, como espermatozoides, que presentan una elevada movilidad. Se produce una gran cantidad de células móviles sin efectos nocivos para las células, incluso con las muestras de partida que presentan bajos recuentos de células o baja movilidad de las células. El sistema es

- 45 sencillo, compacto, económico y no requiere el uso de instrumentos complejos o equipos periféricos como tubos o bombas. Los resultados no dependen del operador. El sistema de análisis y clasificación de células móviles puede resultar útil para clínicas de fertilidad que desean seleccionar espermatozoides con una elevada movilidad para utilizarlos en tecnologías de reproducción asistida y para personas que desean comprobar su fertilidad en casa.
- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos del presente tienen el mismo significado que el que entenderá una persona con los conocimientos habituales en la técnica a la que pertenece la presente invención. A pesar de que en la práctica o en ensayos de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Por otra parte, los materiales, métodos y ejemplos se ofrecen únicamente a título ilustrativo y no tienen carácter limitador.
- 55 Otras características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto con la siguiente descripción detallada, así como con las reivindicaciones.

Breve descripción de los gráficos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un ejemplo de sistema de análisis y clasificación de células móviles.

La Fig. 2A es un diagrama esquemático de un ejemplo de chip microfluídico de un sistema de análisis y clasificación de células móviles descrito en el presente documento.

5 La Fig. 2B es una vista detallada del ejemplo de chip microfluídico de la Fig. 2A.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático de la geometría de un ejemplo de microcanal.

La Fig. 4 es un gráfico de la velocidad de la trayectoria media (VAP) y la velocidad rectilínea (VSL) de espermatozoides murinos clasificados y no clasificados.

Las Fig. 5 A y 5B son gráficos ampliados de vectores de movilidad de espermatozoides murinos en un microcanal orientado horizontal y verticalmente, respectivamente.

Las Fig. 6A-6C son gráficos de la velocidad de espermatozoides murinos, la linealidad de los espermatozoides y la aceleración de los espermatozoides, respectivamente, en microcanales con una orientación horizontal y vertical, respectivamente.

La Fig. 7 es un gráfico de distribuciones de espermatozoides murinos experimentales y simuladas dentro de los microcanales de un ejemplo de chip microfluídico tras la incubación durante 1 hora.

La Fig. 8 es un gráfico de distribuciones de espermatoz106 generaloides murinos experimentales y simuladas dentro de los microcanales de un ejemplo de chip microfluídico en forma de una función del tiempo de incubación.

Las Fig. 9A-D son gráficos de VAP, VSL, y linealidad, y del porcentaje de espermatozoides murinos móviles, respectivamente, en forma de una función de la longitud del canal y el tiempo de incubación.

20 La Fig. 10 es un gráfico de VAP y VSL de espermatozoides murinos y del porcentaje de espermatozoides recopilables para los espermatozoides clasificados en forma de una función de la longitud del canal.

Las Fig. 11A-11D son gráficos de VAP, VSL, linealidad, y del porcentaje de espermatozoides móviles murinos, para espermatozoides clasificados dentro de un chip microfluídico, espermatozoides clasificados mediante la técnica de *swim-up* y espermatozoides no clasificados.

La Fig. 12 es una imagen que muestra trayectorias de espermatozoides.

La Fig. 13 es un gráfico de la media de los desplazamientos cuadráticos medios de las trayectorias de espermatozoides de la Fig. 12 adaptados para un modelo de avance aleatorio persistente (PRW).

La Fig. 14 es un diagrama esquemático de la trayectoria de un espermatozoide que realiza un avance aleatorio persistente (PRW).

30 La Fig. 15 es un gráfico de la distribución de los espermatozoides en forma de una función de la longitud del canal.

Descripción detallada

45

50

Por lo que respecta a la Fig. 1, un sistema de análisis y clasificación de células móviles 100 captura imágenes, sigue y/o clasifica una población de células móviles, como espermatozoides, *in situ* y en tiempo real dentro de un canal microfluídico con limitación de espacio. El sistema de análisis y clasificación de células móviles 100 es un sistema

- 35 sin productos químicos ni flujos capaz de analizar y clasificar células de forma rápida y con un alto rendimiento. Se pueden determinar características de las células móviles, como la cantidad de células, la movilidad media y la movilidad de células concretas. El análisis de estas características es importante para el diagnóstico de diversos trastornos, como un recuento bajo de espermatozoides (oligozoospermia) y una baja movilidad de los espermatozoides (astenozoospermia), que pueden afectar a la fertilidad. Por otra parte, las células más móviles son
- 40 clasificadas de forma pasiva por el sistema de análisis y clasificación sin necesidad de bombas u otros equipos periféricos. En las tecnologías de reproducción asistida, por ejemplo, se recomienda utilizar muestras compuestas principalmente por espermatozoides altamente móviles.

El ejemplo de sistema de análisis y clasificación 100 incluye un chip microfluídico 102 que incluye uno o más canales microfluídicos 200. En algunas realizaciones, el chip microfluídico 102 está integrado en un sistema de captura de imágenes 106 que captura imágenes de los espermatozoides dentro de uno o más de los canales microfluídicos del chip microfluídico. El análisis de las imágenes permite determinar las características de los espermatozoides en los canales microfluídicos, como el número, la movilidad, la velocidad, la aceleración y/o la direccionalidad.

Por otra parte, los espermatozoides de un canal microfluídico se clasifican mientras se mueven (por ejemplo, nadando u otros tipos de movimiento autopropulsado) por el canal, de forma que se puede extraer una muestra clasificada de espermatozoides móviles de alta calidad en la salida del canal.

En la siguiente descripción, el sistema de análisis y clasificación de células móviles se describe por referencia a espermatozoides. Sin embargo, se entenderá que también se pueden utilizar otras células móviles con el sistema, tales como neutrófilos, macrófagos, leucocitos y determinadas bacterias, como la bacteria *E. coli*.

Estructura y fabricación del chip microfluídico

Por lo que respecta a las Fig. 2A y 2B, el chip microfluídico 102 tiene uno o más canales microfluídicos 200a, 200b, 200c, 200d. Los espermatozoides 202 son introducidos, por ejemplo mediante inyección con una pipeta 204, en un puerto de entrada 206a, 206b, 206c, 206d para su análisis y/o clasificación.

5 Tras un periodo de incubación suficiente, tal y como se expone más abajo, se extrae una muestra de espermatozoides clasificados por un puerto de salida 208a, 208b, 208c, 208d.

El chip microfluídico 102 es una estructura multicapa formada por una capa de base 210, una capa intermedia 212 y una capa de cubierta 214. Los canales 200 están formados en la capa intermedia 212; los puertos de entrada 206 y los puertos de salida 208 están formados en la capa de base 210. Un primer extremo de cada canal 200 está

- 10 alineado con su correspondiente puerto de entrada 206 y un segundo extremo de cada canal 200 está alineado con su correspondiente puerto de salida 208, creando así un canal de flujo entre el puerto de entrada 206 y el correspondiente puerto de salida 208 a través del canal 200. En algunas realizaciones, los canales 200 se extienden ligeramente más allá de sus respectivos puertos de entrada y salida 206, 208. Los canales tienen un tamaño adecuado para contener, por ejemplo, microlitros o mililitros de la solución que contiene los espermatozoides que se pretenden analizar v/o clasificar. Los canales también pueden tener un tamaño y una forma adecuados para realizar
- 15 pretenden analizar y/o clasificar. Los canales también pueden tener un tamaño y una forma adecuados para realizar una clasificación eficaz, tal y como se expone más abajo.

El chip microfluídico puede operar para el análisis y la clasificación en configuración horizontal (es decir, con los canales orientados horizontalmente) o en configuración vertical (es decir, con los canales orientados verticalmente).

- La capa de base 210 proporciona soporte estructural al chip microfluídico 102 y está formada de un material suficientemente rígido, como poli(metilmetacrilato) (PMMA; McMaster Carr, Atlanta, GA), de un grosor adecuado, como de unos 1,5 mm (por ejemplo, de unos 1 mm a 4 mm). Cuando resulta necesario, se utiliza una cortadora láser (VersaLaser™, Scottsdale, AZ) para cortar una pieza de PMMA más grande con el fin de conseguir el tamaño deseado para el chip microfluídico (por ejemplo, 24 mm x 40 mm) y para hacer los orificios en los puertos de entrada 206 y los puertos de salida 208. En algunos ejemplos, los puertos de salida 208 son más grandes que los puertos de
- entrada 206 para facilitar la recopilación de los espermatozoides que llegan al extremo de salida del canal 200. Por ejemplo, en algunos casos los puertos de entrada 206 tienen un diámetro de unos 0,375 mm y unos 0,65 mm (por ejemplo, entre unos 0,3 mm y 1,2 mm) y los puertos de salida tienen un diámetro diferente de unos 0,375 mm y unos 2 mm (por ejemplo, entre unos 0,3 mm y 3,4 mm).
- La capa intermedia 212 está formada de un material que se adhiere a la capa de base 210, como una cinta adhesiva de doble cara (DSA) (iTapestore, Scotch Plains, NJ). Los canales 200 se forman mediante el corte con láser de polígonos, como secciones rectangulares, en la capa intermedia 212, que también se corta con láser para conseguir el tamaño deseado (por ejemplo, el tamaño de la capa de base 210). La altura de los canales 200 viene determinada por el grosor de la capa intermedia 212, tal y como se expone detalladamente más abajo. La longitud y la anchura de los canales 200 vienen determinadas por la longitud y la anchura, respectivamente, de los polígonos cortados en la
- 35 capa intermedia 212. Por ejemplo y tal y como se expone detalladamente más abajo, los canales pueden tener unos 1-10 mm de ancho (por ejemplo, unos 4 mm de ancho) y unos 1-20 mm de largo (por ejemplo, unos 3 mm, 7 mm, 10 mm, 15 mm, o 20 mm de largo). En algunos casos, se forman múltiples canales de diversas longitudes y/o anchuras en la capa intermedia.
- Una vez que se han cortado los canales 200 en la capa intermedia 212, la capa intermedia se adhiere a la capa de base 210, de forma que el primer y el segundo extremo de cada canal 200 esté alineado o sobresalga ligeramente más allá de los correspondientes puertos de entrada y salida 206, 210. La capa de cubierta 214, que es por ejemplo un portaobjetos de vidrio con las mismas dimensiones laterales que la capa de base 210 y la capa intermedia 212, se adhiere sobre la cara expuesta de la capa intermedia, cerrando de este modo los canales 200. En la realización ilustrada en la Fig. 2, el chip microfluídico 102 está orientado de forma que la capa de cubierta 214 se encuentre en la parte inferior. En otras realizaciones, el chip microfluídico 102 puede estar orientado de forma que la capa de
- cubierta 214 se encuentre en la parte superior o de forma que la parte superior de los canales 200 quede abierta.

En general, el chip microfluídico 102 descrito en el presente documento es pasivo, es decir que no está conectado a un sistema de flujo activo. Es decir, que las células móviles se desplazan (por ejemplo, nadan) a lo largo de un microcanal 200 del chip microfluídico 102 por sí solas y sin ser impulsadas o movidas de otro modo por un flujo de fluido de propulsión externa (por ejemplo, flujo del medio en el que se encuentran suspendidas las células móviles).

Funcionamiento del sistema de captura de imágenes

50

55

Por lo que respecta de nuevo a la Fig. 1, en algunas realizaciones, el sistema de análisis y clasificación de espermatozoides 100 incluye el chip microfluídico 102, cuya estructura se ha descrito anteriormente, integrado con un sistema de captura de imágenes opcional 106. La integración del chip microfluídico 102 con el sistema de captura de imágenes 106 permite el seguimiento y el análisis de una población de espermatozoides o de un espermatozoide individual en uno o más de los canales microfluídicos 200. En algunas realizaciones, el sistema de captura de

individual en uno o más de los canales microfluídicos 200. En algunas realizaciones, el sistema de captura de imágenes 106 es un sistema de captura de imágenes sin lentes que consigue la captura automática de amplio campo de visión de imágenes de uno o más canales 200 del chip microfluídico 102. En otras realizaciones, el sistema de captura de imágenes 104 es un microscopio óptico con una lente, por ejemplo, de 10x.

El sistema de captura de imágenes 106 incluye una fuente de luz 108, como un diodo emisor de luz (LED) u otra fuente de luz. La fuente de luz 108 ilumina uno o más canales 200 del chip microfluídico 102. Se coloca un sensor de imágenes 110 en el lado opuesto a la fuente de luz 108 del chip microfluídico 102. Cuando la luz incide sobre un canal 200, los espermatozoides del canal iluminado difractan y transmiten luz. Las sombras generadas por la

- 5 difracción de la luz de los espermatozoides son capturadas por el sensor de imágenes 110, generando imágenes sombreadas de la población de espermatozoides en el canal 200 (es decir, imágenes en las que se capturan imágenes en forma de sombra de cada espermatozoide del canal 200). El sensor de imágenes puede ser cualquier sensor apropiado, como un sensor con dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) (Imperx, Boca Raton, FL) o un sensor basado en un chip semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS).
- El sistema de captura de imágenes sin lentes 106 genera imágenes sombreadas de los espermatozoides de los canales rápidamente (por ejemplo, en aproximadamente un segundo) y con amplio campo de visión (FOV). Por ejemplo, el FOV del sistema de captura de imágenes 106 puede ser de tan solo unos milímetros por unos milímetros (por ejemplo, 4 mm x 5,3 mm) hasta de unos centímetros por unos centímetros (por ejemplo, 3,725 cm x 2,570 cm), o de otro tamaño apropiado para capturar la imagen de una parte o de la totalidad de uno o más canales 200 (por ejemplo, basta dioz canales por estados para labor).
- 15 ejemplo, hasta diez canales paralelos).

40

En algunos casos, el FOV del sistema de captura de imágenes 106 puede abarcar cientos de miles de espermatozoides individuales. Por otra parte, gracias al amplio FOV del sistema de captura de imágenes 106, cada espermatozoide individual permanece dentro del FOV del sistema de captura de imágenes durante un periodo de tiempo relativamente largo. Por tanto, se puede seguir y analizar el movimiento y la actividad de un gran número de

- 20 espermatozoides, de forma colectiva o individual, durante un periodo de tiempo prolongado, lo que permite la obtención de estadísticas precisas. En algunas realizaciones, el sistema de captura de imágenes 106 está diseñado para capturar la imagen de los espermatozoides dentro del FOV con un contraste y una ratio señal/ruido suficientes como para que sean detectados o recontados individualmente, lo que puede en algunos casos sacrificar la resolución espacial.
- 25 Las imágenes son procesadas manual y/o automáticamente utilizando un software de análisis de imágenes (por ejemplo, ImagePro software, Media Cybernetics, Inc., MD) a fin de recontar, identificar, seguir y analizar la actividad de espermatozoides individuales o poblaciones de espermatozoides (por ejemplo, espermatozoides móviles) en el canal o los canales de los que se han capturado las imágenes. Por ejemplo, para analizar imágenes adquiridas para determinar la distribución de los espermatozoides en un canal concreto, se realiza un recuento y una identificación
- 30 automáticos de los espermatozoides de cada imagen. Los resultados de los recuentos se comparan con la teoría de la difracción, que incluye la distancia entre la región activa del sensor de imágenes 110 (por ejemplo, la superficie activa de un sensor CCD) y la ubicación del objeto microscópico capturado en la imagen (por ejemplo, el espermatozoide) como parámetros críticos. Para investigar cuantitativamente el efecto del diámetro sombreado de la célula sobre la intensidad de la señal detectada, las características de difracción capturadas de los espermatozoides
- 35 se adaptan a un modelo. En el ejemplo de un sistema de captura de imágenes sin lentes, se puede elaborar un modelo del funcionamiento del sistema resolviendo numéricamente la ecuación de difracción de Rayleigh-Sommerfeld.

El uso de un CDD de campo amplio y la incorporación del procesamiento por software adecuado, como códigos de seguimiento de partículas basados en vídeos, permiten una gran capacidad de conversión a escala, de forma que, por ejemplo, se puedan controlar y analizar simultáneamente millones de espermatozoides.

Uso del sistema de análisis y clasificación de espermatozoides

Los espermatozoides suspendidos en un medio biocompatible, como fluido tubárico humano (HTF) o solución salina fosfatada (PBS), se introducen en un canal microfluídico 200 del chip microfluídico 102 a través del puerto de entrada 206 del canal, utilizando, por ejemplo, una pipeta. El canal ya puede contener un medio biocompatible. El chip microfluídico 102 se incuba a 37 °C durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los espermatozoides móviles se desplacen por el canal hasta el puerto de salida 208 del canal. Por ejemplo, el periodo de incubación puede ser de unos 20-40 minutos, por ejemplo de unos 30 minutos, o de menos de una o dos horas, o menos de una cantidad de tiempo que provocaría el agotamiento de los espermatozoides en el puerto de salida.

- 50 Tras el periodo de incubación, los espermatozoides se extraen por el puerto de salida 208, utilizando un dispositivo de vaciado o una pipeta, por ejemplo con una punta fina o a través de un medio de bombeo en la entrada del chip. Dado que solo los espermatozoides móviles se desplazan por el canal, los espermatozoides extraídos por el puerto de salida son espermatozoides móviles; el periodo de incubación se puede optimizar para obtener solo espermatozoides de alta movilidad (por ejemplo, seleccionando aquellos espermatozoides que lleguen al puerto de
- 55 salida en un plazo de tiempo determinado). Los espermatozoides que permanecen en los alrededores del puerto de entrada son menos móviles que los que han sido capaces de atravesar la totalidad de la longitud del canal o espermatozoides no móviles que se han desplazado únicamente mediante un movimiento aleatorio. Por tanto, el chip microfluídico 102 consigue una clasificación simple, pasiva y sin flujo de espermatozoides y permite la extracción de una muestra de espermatozoides de alta movilidad.
- 60 Además de la clasificación, el sistema de análisis y clasificación de espermatozoides 100 permite realizar diversos tipos de análisis, como análisis de movilidad media de los espermatozoides, y un análisis y seguimiento de las

trayectorias y la movilidad de los espermatozoides individuales. Por ejemplo, la velocidad, la aceleración, la direccionalidad o la movilidad de una muestra de espermatozoides completa o de la muestra de espermatozoides clasificados extraída se pueden cuantificar, por ejemplo para identificar una muestra de espermatozoides de alta calidad o para diagnosticar un problema con la muestra de esperma (por ejemplo, para diagnosticar la muestra como muestra de oligozoospermia o astenozoospermia).

El sistema de clasificación de espermatozoides 100 puede operar en configuración horizontal (es decir, que el flujo por los canales 206 es horizontal) o en configuración vertical (es decir, que el flujo por los canales 206 es vertical y se utiliza la gravedad como discriminador adicional en la clasificación de los espermatozoides). Para fertilizar un óvulo *in vivo*, puede ser necesario que el espermatozoide avance por el óvulo en contra de la gravedad debido a la esternía víde de la respisición de los respisición de la respisición de la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la esternía víde de la respisición de la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra de la gravedad debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvulo en contra debido a la service por el óvu

10 anatomía y/o a la posición del sistema reproductor de la hembra. Por tanto, la realización del análisis y/o la clasificación de espermatozoides en orientación vertical puede permitir la caracterización o selección más realista de los espermatozoides que en orientación horizontal.

En algunas realizaciones, a fin de reducir los errores cuando se utiliza un sistema de captura de imágenes CCD sin lentes para el recuento de los espermatozoides, la concentración de espermatozoides máxima que se puede
resolver con el sistema de captura de imágenes se puede estimar basándose en un modelo (por ejemplo, tal y como se describe en Ozcan y Demirci, *Lab Chip*, 2008, 8, 98-106). Por ejemplo, para una área CCD de 4 mm x 5,3 mm, el modelo predice una concentración de espermatozoides máxima resoluble de 1,6 x 103 espermatozoides/µL. Cuando se coloca una muestra de espermatozoides en un canal microfluídico para su clasificación, especialmente en un canal largo, el control de los espermatozoides se puede realizar hacia el extremo de salida del canal, donde se

- 20 encuentran los espermatozoides móviles. En esta región, la concentración de espermatozoides es menor que en los alrededores del extremo de entrada. Por tanto, las concentraciones de espermatozoides superiores a la concentración de espermatozoides máxima resoluble, como concentraciones de espermatozoides tan elevadas como las concentraciones clínicamente observadas, pueden ser introducidas en la entrada de un canal sin que se reduzca la capacidad de resolución del sistema de captura de imágenes cerca de la salida del canal. Tal y como se
- 25 illustra en los ejemplos más abajo, la capacidad de introducir concentraciones de espermatozoides superiores a la concentración de espermatozoides máxima resoluble se validó experimentalmente: no se observaron solapamientos de sombras de los espermatozoides clasificados cerca de la salida del canal a pesar de haber introducido espermatozoides a una concentración de 2 x 10⁴ espermatozoides/µL en la entrada.

Parámetros que afectan a las capacidades de clasificación

5

- Por lo que respecta de nuevo a la Fig. 2, cuando se introducen espermatozoides en un canal microfluídico 200 a través de su puerto de entrada 206, los espermatozoides móviles se desplazan dentro del canal microfluídico. El canal microfluídico 200 presenta un entorno con limitación de espacio para los espermatozoides, que obliga a los espermatozoides móviles a desplazarse a lo largo del canal microfluídico hasta el puerto de salida 208. Como resultado, tras un periodo de incubación suficiente, una población de espermatozoides altamente móviles alcanza los alrededores del puerto de salida mientras que una población de espermatozoides menos móviles o no móviles
- 35 alrededores del puerto de salida mientras que una población de espermatozoides menos móviles o no móviles permanece en su posición original o cerca de esta posición en los alrededores del puerto de entrada 206. La limitación de espacio de los espermatozoides dentro del canal microfluídico provoca de este modo la clasificación pasiva en función de la movilidad de los espermatozoides dentro del canal.
- La geometría de los canales microfluídicos puede afectar a la eficiencia de la clasificación de los espermatozoides dentro del canal. Por ejemplo, las dimensiones y la forma del canal microfluídico afectan a la resistencia del fluido dentro del canal. Por otra parte, el movimiento de los espermatozoides se ve afectado por las interacciones entre espermatozoides, que resultan afectadas en parte por el espacio disponible en el canal.

Para conseguir el aislamiento del espacio de los espermatozoides dentro del canal microfluídico, la altura y/o la anchura del canal (es decir, el grosor de la capa intermedia 212 y la anchura del corte poligonal en la capa intermedia) se pueden seleccionar en función de las dimensiones de los espermatozoides que se pretenden clasificar dentro del canal. Por ejemplo, por lo que respecta a la Fig. 3, la altura h del canal 200 puede ser seleccionada para que sea un pequeño múltiplo de la dimensión d de la cabeza 302 del tipo de espermatozoide 300 que se pretende seleccionar (o más generalmente, basarse en una dimensión, como el diámetro, de la cálula móvil que se pretende seleccionar). En algunos ejemplos, la altura tiene 3-10 veces la dimensión de la cabeza del

- 50 espermatozoide o menos de 20 veces la dimensión d de la cabeza del espermatozoide. En otros ejemplos, la anchura w del canal 200 se puede seleccionar basándose en la dimensión d de la cabeza del espermatozoide o en una dimensión de la célula móvil. Tal y como se muestra en la Fig. 3, la dimensión d es el diámetro corto de la cabeza ovoide del espermatozoide 302. En otras realizaciones, la dimensión d puede ser el diámetro largo d' de la cabeza ovoide del espermatozoide 302 o la media de los diámetros largo y corto de la cabeza del espermatozoide.
- Más específicamente, para los espermatozoides humanos que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 2-3 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 6-30 µm, o menos de 60 µm. Para los espermatozoides de roedores (por ejemplo, ratón) que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 10 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 30-100 µm, o 50 µm, o menos de 200 µm. Para los espermatozoides de bovinos que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 pu
- 60 10-50 μm, o menos de 100 μm. Para los espermatozoides de equinos que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 3-4 μm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 10-40 μm, o menos de 80 μm. Para los espermatozoides de carnero que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 4 μm, la altura h del canal 200 puede

ser, por ejemplo, de unos 10-40 µm, o menos de 80 µm. Para los espermatozoides de conejo que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 4-5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 10-50 µm, o menos de 100

- µm. Para los espermatozoides de gato que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 3 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 10-30 µm, o menos de 60 µm. Para los espermatozoides de perro que tienen 5 una dimensión d de la cabeza de unos 3-4 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 10-40 µm, o menos de 80 µm. Para los espermatozoides de cerdo que tienen una dimensión d de la cabeza de unos 5 µm, la altura h del canal 200 puede ser, por ejemplo, de unos 15-50 µm, o menos de 100 µm. Para los espermatozoides de otras especies, se puede determinar el tamaño de los canales en consecuencia. En algunas realizaciones, las
- 10 dimensiones de los canales se determinan basándose en cantidades sin dimensiones que se establecen a través de simulaciones del movimiento de los espermatozoides dentro de un entorno de espacio limitado, tal y como se describe detalladamente más abajo.

En algunas realizaciones, la forma del canal microfluídico también se puede ajustar para realizar una clasificación más efectiva de los espermatozoides dentro del canal. Por ejemplo, se pueden utilizar canales no rectilíneos (por 15 ejemplo, canales curvados, canales en forma de S, canales sinusoidales, canales cuadrados o canales angulares). La anchura del canal microfluídico puede variar del lado del puerto de entrada del canal al lado del puerto de salida del canal (por ejemplo, un canal convergente o divergente). Las paredes laterales del canal microfluídico pueden ser angulares para producir, por ejemplo, un canal con una base ancha y una parte superior estrecha (por ejemplo, un canal con una sección transversal trapezoidal) o un canal con otra sección transversal, como una sección transversal

- 20 triangular, una sección transversal circular u ovalada, o una sección transversal con otra forma. La sección transversal también puede tener surcos, como los surcos formados con una estructura en forma de espina de pescado o los surcos con forma de aletas rectangulares. La profundidad del canal puede variar a lo largo del canal. También se pueden utilizar canales con otras formas o de otras características geométricas.
- La longitud del canal microfluídico 200 también se selecciona para conseguir una clasificación efectiva de los 25 espermatozoides dentro del canal. Para un tiempo de incubación determinado, la longitud del canal se selecciona para que sea lo suficientemente corta como para que los espermatozoides móviles sean capaces de alcanzar el extremo de salida del canal dentro del tiempo de incubación, pero lo suficientemente larga para que exista una separación suficiente entre los espermatozoides móviles del extremo de salida y los espermatozoides menos móviles y no móviles del extremo de entrada del canal. Por ejemplo, para un periodo de incubación de 30 minutos y
- 30 para los espermatozoides de ratón que tienen una velocidad de 80-120 µm/s, se puede seleccionar una longitud de canal de 12-15 mm. Para el mismo periodo de incubación de 30 minutos y para los espermatozoides humanos que tienen una velocidad de unos 50 µm/s, se puede seleccionar una longitud de canal de 8-12 mm.

También se pueden variar otros parámetros del diseño para optimizar la capacidad de clasificación del canal microfluídico. Por ejemplo, se puede variar el tiempo de incubación de las células móviles en el canal. Se pueden aplicar gradientes químicos, biológicos o de temperatura a lo largo del canal. Se puede variar el medio inmovilizado 35 o dinámico y los parámetros de superficie, como, por ejemplo, el transporte difusor de nutrientes y oxígeno, por ejemplo mediante la presencia de otras células como células del cúmulo. Se pueden variar asimismo las propiedades del medio de clasificación en el que están suspendidos los espermatozoides, tales como la densidad, la tensión superficial, la porosidad y/o la viscosidad del medio. También se pueden variar otros parámetros del diseño 40 que afectan a la capacidad del canal microfluídico.

En algunos casos, algunos o la totalidad de los parámetros de diseño para el chip microfluídico 102 se seleccionan en función de la especificación de un modelo de movilidad de los espermatozoides en un microcanal. El modelo puede simular el comportamiento de un espermatozoide individual y/o una población de espermatozoides en un entorno con limitación de espacio, incluyendo, por ejemplo, interacciones entre espermatozoides e interacciones

- entre espermatozoides y las superficies del microcanal. El modelo puede incorporar factores como, por ejemplo, 45 efectos hidrodinámicos colectivos, agotamiento de los espermatozoides, agregación de los espermatozoides u otras interacciones, la cooperatividad resultante de interacciones hidrodinámicas entre espermatozoides, la cooperatividad resultante de interacciones hidrodinámicas entre un espermatozoide y la pared del canal, y/o la forma de onda de los flagelos del espermatozoide. Por otra parte, el modelo puede incorporar parámetros de geometría del canal,
- 50 incluyendo la longitud, anchura, altura y forma.

EJEMPLOS

La invención se describe asimismo en los ejemplos siguientes. Todos los ejemplos que no se encuentran dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones se ofrecen con fines exclusivamente comparativos.

- En general, los siguientes ejemplos demuestran la capacidad del chip microfluídico para clasificar células móviles 55 como los espermatozoides. Las células con una alta movilidad se pueden recuperar por el extremo de salida del canal o los canales microfluídicos del chip, mientras que las células menos móviles o no móviles permanecen en el canal. La capacidad de clasificación del chip microfluídico depende de una serie de parámetros, incluyendo las dimensiones del canal y el tiempo de incubación. Las características de las células móviles, como los distintos parámetros cinemáticos de la movilidad, se pueden determinar mediante el análisis de imágenes de las células 60
- móviles en los canales microfluídicos.

Ejemplo 1 - Preparación de una muestra de espermatozoides

Se pueden obtener muestras de semen de ratones B6D2F1 de 7 a 12 semanas de edad de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se expusieron a CO₂ hasta que el movimiento cesó y, a continuación, se sometieron a eutanasia mediante dislocación cervical. Se realizó una pequeña incisión en la sección media, se retiró la piel y se

- 5 accedió al peritoneo con una disección profunda para exponer las vísceras. Se apartaron las dos capas de grasa para dejar expuestos los testículos y los epidídimos. La sección del epidídimo de la cauda y el túbulo deferente proximal se sometió a escisión y se colocó en una placa de pocillo central que contenía 300 µL de fluido tubárico humano (HTF) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) suplementado con 10 mg mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, St Louis, MO). Bajo un microscopio de disección, mientras se sujetaba el epidídimo en su posición con un
- par de pinzas, se realizaron incisiones en las partes distales del epidídimo para permitir la salida de los 10 espermatozoides. Los espermatozoides se retiraron del túbulo deferente proximal estabilizando el órgano con una aguja de insulina y pasando lentamente un par de pinzas de un extremo a otro. A continuación se colocó la placa en una incubadora (37 °C, 5% CO2) durante 10 minutos para permitir que todos los espermatozoides fluyeran hasta el exterior del epidídimo. El epidídimo, el túbulo deferente proximal y los desechos de mayor tamaño se extrajeron
- 15 manualmente y se desecharon.

60

La suspensión de espermatozoides se colocó en un tubo de Eppendorf de 0,5 mL, y se añadió una capa fina de aceite mineral estéril testado en embriones (Sigma, St Louis, MO) por encima para evitar la evaporación y permitir la transferencia de gases. El tubo abierto se colocó entonces en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos para la capacitación. Tras la capacitación, el tubo se golpeó con suavidad para mezclar la suspensión de espermatozoides.

- 20 Se introdujo con una pipeta una muestra de 10 µL de espermatozoides capacitados en un nuevo tubo de Eppendorf y se colocó en un baño de agua a 60 °C para obtener muestras de espermatozoides muertos para realizar recuentos utilizando la cámara Makler® Counting Chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel). La suspensión de espermatozoides restante se ajustó a una concentración de menos de 5000 espermatozoides/µL en un medio de HTF-BSA y se utilizó para los experimentos descritos en los siguientes ejemplos. En particular, la concentración de 25 espermatozoides introducida en el chip microfluídico se situó en un intervalo de 1500- 4000 espermatozoides/µL, tal
- y como se confirmó con el análisis de imágenes utilizando el software ImagePro (Media Cybernetics, Inc., MD).

En algunos de los ejemplos siguientes, los espermatozoides fueron previamente clasificados utilizando el método de swim-up antes de introducirlos en el chip microfluídico. Se añadieron 40 µL de medio de HTF/BSA nuevo en la parte superior de la suspensión de espermatozoides en un tubo de Eppendorf de 0,5 mL con posterioridad a la extracción

30 de los espermatozoides y una capa fina de aceite mineral estéril testado en embriones por encima del medio. El tubo se colocó en una incubadora a 37 °C durante 1,5 horas para permitir la separación de los espermatozoides. Los espermatozoides recuperados de la parte superior del tubo de Eppendorf se introdujeron en el chip microfluídico.

Ejemplo 2 - Clasificación de los espermatozoides de alta movilidad

Para demostrar la capacidad del chip microfluídico para clasificar los espermatozoide basándose en su movilidad, 35 las movilidades de los espermatozoides en el puerto de entrada y en el puerto se salida se compararon con las movilidades de los espermatozoides no clasificados en base a las imágenes secuenciales obtenidas utilizando un microscopio óptico. Para este ensayo de clasificación se utilizó un chip microfluídico con una longitud de canal de 7 mm, una anchura de canal de 4 mm, una altura de canal de 50 µm, un diámetro del puerto de entrada de 0,65 mm y un diámetro del puerto de salida de 2 mm. El diámetro del puerto de salida de gran tamaño se diseñó para facilitar la 40 extracción de los espermatozoides del canal.

El canal se llenó con medio de HTF nuevo que contenía 10 mg mL⁻¹ de BSA. El puerto de salida se llenó con 2 µL de medio de HTF/BSA y se colocó encima una capa fina de aceite mineral para evitar la evaporación. Se retiró 1 µL de espermatozoides capacitados tras la capacitación y se añadió al puerto de entrada. Se colocó el chip microfluídico en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos. Al final del periodo de incubación, se tomaron 20 imágenes

- 45 secuenciales de una región de 1,2 mm x 0,9 mm tanto en los puertos de entrada como en los puertos de salida utilizando un microscopio (TE 2000; Nikon, Japón) con un objetivo de 10x a una velocidad de una imagen por 0,4-1 segundos utilizando el software Spot (Diagnostic Instruments, Inc., versión 4.6, Sterling Heights, MI). Para la validación, el análisis del microscopio en múltiples ubicaciones del canal se comparó con un análisis CCD del canal.
- El recuento de espermatozoides y la movilidad de espermatozoides seleccionados aleatoriamente en el puerto de 50 entrada y en el puerto de salida se compararon entre sí, con los de muestras de control previamente clasificadas y con los de espermatozoides no clasificados basándose en las imágenes secuenciales del microscopio. Se cuantificaron los parámetros cinemáticos que definen la movilidad de los espermatozoides, incluyendo la velocidad de la trayectoria media (VAP), la velocidad rectilínea (VSL) y la linealidad (VSL/VAP). La VAP se define como la velocidad a lo largo de la distancia que cubre un espermatozoide en su dirección media de movimiento durante el
- 55 tiempo de observación, mientras que la VSL se define como la velocidad a lo largo de la distancia en línea recta entre los puntos de partida y de destino de la travectoria del espermatozoide. Solo se realizó el seguimiento de los espermatozoides que mostraban movilidad, aunque también se observaron los espermatozoides no móviles.

Por lo que respecta a la Fig. 4, la movilidad (es decir, la VAP y la VSL) de los espermatozoides en el puerto de salida era notablemente superior a la movilidad de los espermatozoides no clasificados y de los espermatozoides en el puerto de entradas tras la clasificación (p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística con p < 0.01; n = 33-66; los corchetes indican la relevancia estadística 0,01 entre los grupos).

Los resultados del ensayo de clasificación indican que el chip microfluídico puede clasificar con éxito los espermatozoides más móviles, que se puede recopilar en el puerto de salida una vez que se ha completado el proceso de clasificación, por ejemplo con un dispositivo de vaciado o un medio de bombeo desde el puerto de entrada. Por otra parte, dado el amplio rango de velocidades de los espermatozoides tras la clasificación, el control y el procesamiento basados en un único chip pueden permitir la separación de los espermatozoides móviles de

Ejemplo 3 - Efecto de la orientación del canal sobre la clasificación de los espermatozoides

máxima calidad utilizando configuraciones verticales u horizontales.

5

10

20

35

Para determinar el efecto de la orientación del canal sobre la movilidad de los espermatozoides, se registró el movimiento de los espermatozoides con orientaciones del canal horizontales y verticales. El canal tenía una longitud de 7 mm, una anchura de 4 mm y una altura de 50 µm. El canal se llenó con medio de HTF nuevo suplementado con 10 mg mL⁻¹ de BSA. Se tomó una muestra de espermatozoides de 1 µL de la parte más superior de la columna

swim-up como se ha descrito anteriormente y se introdujo con una pipeta en el puerto de entrada del canal. Se registraron 15 imágenes sombreadas secuenciales utilizando un sensor CCD sin lentes a una velocidad de una imagen por segundo. El sensor CCD cubrió la totalidad del canal de forma que se registraron todos los espermatozoides del canal. Los espermatozoides móviles fueron identificados y seguidos utilizando Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Para capturar imágenes de los espermatozoides en la configuración vertical, el chip microfluídico se sujetó al sensor CCD y se giró 90 grados el conjunto del sistema. Una vez que el chip microfluídico se había situado verticalmente, la anterior preparación y el proceso de captura de imágenes anteriormente descritos se repitieron utilizando espermatozoides del mismo ratón donante macho, manteniendo el sistema en la orientación vertical durante toda la captura de imágenes.

Se realizó un análisis de movilidad para 10 espermatozoides seleccionados aleatoriamente de cada configuración. En particular, se registró el movimiento de los espermatozoides tanto en orientaciones horizontales como verticales y los resultados se mostraron como vectores de movilidad en gráficos ampliados, tal y como se muestra en las Fig. 5A

25 y 5B, respectivamente. La distancia entre círculos concéntricos adyacentes es de 100 μm. En ambas configuraciones, los espermatozoides mostraron una gran diversidad en sus patrones de movimiento y dirección.

Para caracterizar mejor el movimiento de los espermatozoides en las orientaciones horizontales y verticales, se realizó un seguimiento de las trayectorias de movimiento de los espermatozoides y se midió la distancia de desplazamiento utilizando el software ImagePro (Media Cybernetics, Inc., MD). Se cuantificaron los parámetros cinemáticos que definen la movilidad de los espermatozoides, incluyendo la velocidad de la trayectoria media (VAP),

30 cinemáticos que definen la movilidad de los espermatozoides, incluyendo la velocidad de la trayectoria media (VAP), la velocidad rectilínea (VSL) y la linealidad (VSL/VAP). Solo se realizó el seguimiento de los espermatozoides que mostraban movilidad, aunque también se observaron los espermatozoides no móviles.

Por lo que respecta a la Tabla 1, se cuantificó la VAP, la VSL y la linealidad para cada uno de los 10 espermatozoides seleccionados en orientaciones horizontales y en orientaciones verticales. Como se puede observar, los espermatozoides H2 y H9 demostraron las movilidades más elevadas en la configuración horizontal y los espermatozoides V1 y V2 demostraron las movilidades más elevadas en la configuración vertical.

Tabla 1. Parámetros de movilidad para los espermatozoides seleccionados.

Espermatozoide	Velocidad de la trayectoria	Velocidad rectilínea (VSL)	Linealidad (VSL/VAP)	
	media (VAP)			
H1	69,10	57,14	0,83	
H2	85,19	66,07	0,78	
H3	19,95	13,57	0,68	
H4	21,56	17,86	0,83	
H5	36,82	17,86	0,48	
H6	67,36	61,43	0,91	
H7	21,61	14,29	0,66	
H8	26,33	18,57	0,71	
H9	80,05	65,36	0,82	
H10	29,57	8,57	0,29	
V1	90,03	75,00	0,83	
V2	86,75	67,86	0,78	
V3	47,76	39,29	0,82	
V4	92	66,07	0,71	
V5	28,72	22,14	0,77	
V6	55,31	45,71	0,83	
V7	37,09	23,57	0,64	

V8	69,9	57,50	0,82
V9	41,50	19,29	0,46
V10	53,18	10,71	0,20

Por lo que respecta a las Fig. 6A-6C, los espermatozoides cuyas imágenes fueron capturadas en orientaciones horizontales y verticales fueron analizados estadísticamente para determinar la VAP, la VSL (Fig. 6A), la linealidad (Fig. 6B), y la aceleración (Fig. 6C). Para un pequeño conjunto de espermatozoides capacitados móviles que fueron controlados durante un breve periodo de tiempo, la captura de imágenes en configuraciones horizontales y verticales no reveló ninguna diferencia de relevancia estadística (p > 0,05), lo que demuestra que el chip microfluídico se puede utilizar de forma sustancialmente intercambiable en cualquiera de las dos configuraciones. La aceleración de los espermatozoides, por el contrario, abarcó un intervalo más amplio de valores en la configuración vertical (-75 a 90 μ s⁻²) que en la configuración horizontal (-50 a 30 μ s⁻²).

5

25

35

45

- Para este ejemplo y otros ejemplos que se describen más abajo, la VAP, la VSL y la linealidad se analizaron estadísticamente para determinar la relevancia de la diferencia entre los siguientes grupos utilizando una prueba t Student paramétrica de dos muestras con relevancia estadística fijada en 0,05 (p < 0,05): (1) espermatozoides en las entradas y salidas tras la clasificación; (2) espermatozoides clasificados por el chip microfluídico con un tiempo de incubación de 30 minutos y espermatozoides clasificados por la técnica *swim-up*; y (3) espermatozoides clasificados
- 15 por el chip microfluídico con un tiempo de incubación de 30 minutos y espermatozoides no clasificados. El umbral de relevancia estadística se fijó en 0,05 (p < 0,05) para todas las pruebas y los datos se presentaron en forma de media ± error estándar (SEM). Para valorar mejor el potencial de clasificación del chip microfluídico, la VAP y la VSL también se analizaron para la condición no clasificada (n = 33), en las mediciones de entrada (n = 59) y de salida (n = 66) con análisis de varianza (ANOVA) de un factor con el test de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey con</p>
- 20 un umbral de relevancia estadística fijado en 0,01 (p < 0,01). La normalidad de los datos recopilados se analizó con el test de Anderson-Darling.

Ejemplo 4 - Efecto del tiempo de incubación sobre la clasificación de los espermatozoides

Para optimizar el tiempo de incubación para la clasificación de los espermatozoides utilizando el chip microfluídico, se capturaron imágenes y se analizó la distribución de los espermatozoides a lo largo de un canal de 20 mm de largo, 4 mm de ancho y 50 µm de alto para diversos tiempos de incubación.

El canal se llenó con medio de HTF que contenía 10 mg mL¹ de BSA. El puerto de salida se llenó con 2 μ L de medio de HTF/BSA; se colocó encima una capa fina de aceite mineral para evitar la evaporación. Se introdujo una muestra de 1 μ L de espermatozoides diluida hasta una densidad de 1500-4000 espermatozoides/ μ L en el canal desde el puerto de entrada y el puerto de entrada se cubrió con una capa fina de aceite mineral estéril testado con embriones para evitar la evaporación. El chip microfluídico se colocó en una incubadora a 37 °C para diversos tiempos de

30 para evitar la evaporación. El chip microfluídico se colocó en una incubadora a 37 °C para diversos tiempos d incubación, incluyendo 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

Tras la incubación, se capturaron imágenes de la distribución de los espermatozoides dentro del canal utilizando un microscopio (Carl Zeiss Micro Imaging, LLC, Thomwood, NY) con una platina automática controlada por el software AxioVision (Carl Zeiss Microimaging). El análisis automático y manual se utilizó para analizar la distribución de los espermatozoides. Para las regiones cercanas a la entrada, donde la concentración de espermatozoides es relativamente alta, se realizó un recuento automático de los espermatozoides utilizando el software ImagePro. Para las regiones con menor concentración de espermatozoides (por ejemplo, cerca de la salida), se utilizó el recuento manual.

También se realizó un experimento de control de la distribución colocando espermatozoides muertos por calor (20 minutos a 60 °C) y midiendo la distribución de los espermatozoides dentro del canal tras la incubación durante 5 minutos y 1 hora.

Para investigar los efectos del tiempo de agotamiento de los espermatozoides y el papel del porcentaje inicial de espermatozoides muertos sobre la distribución de los espermatozoides observada dentro del canal, la distribución de los espermatozoides experimental para cada tiempo de incubación se comparó con las distribuciones de los espermatozoides de control y con las predicciones de un modelo de grano grueso de la movilidad de los espermatozoides en el canal. Se elaboró un modelo de la movilidad activa de los espermatozoides en forma de avance aleatorio persistente (PRW); se elaboró un modelo de los espermatozoides muertos en forma de movimiento exclusivo por fuerzas brownianas imitado por un avance aleatorio isotrópico (como se ha expuesto anteriormente).

- La Fig. 7 muestra la distribución de espermatozoides experimental en diversos puntos a lo largo del canal tras la incubación durante 1 hora. Los resultados experimentales se comparan con el modelo de PRW con diversos parámetros: (1) modelo de PRW; (2) PRW con 25% de los espermatozoides inicialmente muertos; (3) PRW incluyendo 30 minutos de tiempo de incubación medio (±15 minutos); y (4) PRW incluyendo tanto 30 minutos de tiempo de incubación como un 25% de los espermatozoides inicialmente muertos. Las barras de error se refieren a la media ± error estándar. Los resultados experimentales presentan una mejor correspondencia en el modelo de
- 55 PRW en el que los espermatozoides tenían un tiempo de agotamiento medio (tiempo de incubación) de 30 minutos y en el que el 25% de los espermatozoides estaban inicialmente muertos. Estos resultados son coherentes con las

mediciones experimentales que indican que el 20% de los espermatozoides de una muestra de espermatozoides dada están muertos inmediatamente antes de la inyección de la muestra en el puerto de entrada.

La Fig. 8 muestra la distribución de los espermatozoides experimental dentro del canal tras periodos de incubación de 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora. La distribución experimental para cada tiempo de incubación se comparó con el modelo PRW incluyendo el mismo tiempo de incubación y teniendo el 25% de los espermatozoides inicialmente muertos. Las barras de error se refieren a la media ± error estándar.

Se observó un cambio de la distribución de los espermatozoides desde el puerto de entrada hasta el puerto de salida dentro de 30 minutos de incubación, lo que indica que una parte de los espermatozoides nadó desde el puerto de entrada hasta el puerto de salida durante la incubación. Este cambio de la distribución alcanzó su cota máxima al final del periode de incubación de 30 minutos. Más particularmente, el percentario de appenditozoides on las

- final del periodo de incubación de 30 minutos. Más particularmente, el porcentaje de espermatozoides en las ubicaciones del canal de 7-20 mm aumentó hasta el periodo de incubación de 30 minutos y, a continuación, descendió para los tiempos de incubación más prolongados. Se observó una tendencia similar, aunque inversa, para la distribución de los espermatozoides en las ubicaciones del canal de 1-3 mm. Estos resultados se pueden atribuir al agotamiento de los espermatozoides.
- 15 La simulación revela que un periodo de incubación de 30 minutos (desviación estándar ± 15 minutos) muestra la mejor coincidencia con los resultados experimentales.

Ejemplo 5 - Efecto de la longitud del canal sobre la clasificación de los espermatozoides

5

El efecto de la longitud del canal sobre la capacidad de clasificación de los espermatozoides se determinó comparando las características de los espermatozoides en el puerto de entrada y el puerto de salida de los canales de diversas longitudes.

Se prepararon muestras de espermatozoides y se llenaron los canales tal y como se ha expuesto anteriormente en el Ejemplo 4. Se utilizaron longitudes de canal de 7 mm, 10 mm, 10 mm y 20 mm. Para cada longitud de canal, se aplicaron tiempos de incubación de 30 minutos y 1 hora.

Por lo que respecta a las Fig. 9A-D y a la Tabla 2, se muestran la VAP, la VSL, la linealidad y el porcentaje de espermatozoides móviles en la entrada y la salida tras un tiempo de incubación de 30 minutos o 1 hora para cada longitud de canal. Tal y como se expone detalladamente más bajo, todas las longitudes de canales investigadas demostraron la capacidad de clasificación, aunque la movilidad de los espermatozoides (VAP, VSL y linealidad) y el porcentaje de los espermatozoides móviles varió entre las distintas longitudes de canales. La relevancia estadística entre longitudes de canales está marcada con * y la relevancia estadística entre la entrada y la salida está marcada 30 con #. Los datos se presentan en forma de una media ± error estándar (N = 22-109).

Tabla 2. Cambio en número de veces entre la entrada y la salida del sistema SCMS en la velocidad de la trayectoria media (VAP), la velocidad rectilínea (VSL), la linealidad y el porcentaje de movilidad de los espermatozoides, para diferentes longitudes de canales y tiempos de incubación.

	Cambio en número de veces entre la entrada y salida del sistema SCMS								
Longitud	7 mm		10 mm	10 mm		15 mm		20 mm	
Tiempo de incubación	30 min	1 hora	30 min	1 hora	30 min	1 hora	30 min	1 hora	
VAP	1,9	1,4	2,1	1,7	3,0	2,0	2,6	2,1	
VSL	1,9	1,3	2,3	1,8	3,8	2,1	2,8	2,1	
Linealidad	1,1	1,0	1,1	1,0	1,2	1,1	1,1	1,0	
Porcentaje de movilidad	1,3	1,6	1,6	3,1	1,7	2,2	2,0	2,3	

- Por lo que respecta específicamente a las Fig. 9A-9B y a la Tabla 2, para un periodo de incubación de 30 minutos, la VAP y la VSL de los espermatozoides en las salidas fueron 1,9, 2,1, 3,0, y 2,6 veces; y 1,9, 2,3, 3,8, y 2,8 veces más elevadas que la VAP y la VSL de los espermatozoides en las entradas para los canales de 7 mm, 10 mm, 15 mm y 20 mm de largo, respectivamente. Cuando el periodo de incubación se incrementó hasta 1 hora, la VAP y la VSL de los espermatozoides en las entradas para los canales de 7 mm, 10 mm, 15 mm y 20 mm de largo, respectivamente. Cuando el periodo de incubación se incrementó hasta 1 hora, la VAP y la VSL de los espermatozoides en las ser 1,4, 1,7, 2,0, y 2,1 veces; y 1,3, 1,8, 2,1, y 2,1 veces más
- 40 elevadas que la VAP y la VSL de los espermatozoides en las entradas para los canales de 7 mm, 10 mm, 15 mm y 20 mm de largo, respectivamente.

Por lo que respecta a la Fig. 9C y Tabla 2, se observaron diferencias significativas en la linealidad de los espermatozoides en las entradas y las salidas para todas las longitudes de canales para el periodo de incubación de 30 minutos. Sin embargo, para un periodo de incubación de 1 hora, la diferencia significativa en la linealidad de los

espermatozoides en las entradas y salidas se observó solamente para el canal con una longitud de 15 mm; no se observó ninguna diferencia significativa para los canales de 7 mm, 10 mm y 20 mm. Estos resultados demuestran que cuando el tiempo de incubación se incrementa más allá de un tiempo de incubación óptimo (en este caso, 30 minutos), los espermatozoides con menos movilidad y linealidad tienen más probabilidades de alcanzar la salida de un canal corto. El descenso de la linealidad de los espermatozoides en la salida del canal de 20 mm se puede

Por lo que respecta a la Fig. 9D y la Tabla 2, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles en las entradas y salidas para todas las longitudes de canales tanto en el periodo de incubación de 30 minutos como en el periodo de incubación de 1 hora, donde el porcentaje de espermatozoides

10 móviles se definió como la fracción de espermatozoides móviles con respecto al recuento de espermatozoides total. Para el periodo de incubación de 30 minutos, el porcentaje de espermatozoides móviles en las salidas fue 1,3, 1,6, 1,7, y 2,0 veces superior que el porcentaje de espermatozoides móviles en las entradas para los canales de 7 mm, 10 mm, 15 mm y 20 mm de largo, respectivamente. Cuando el periodo de incubación se incrementó hasta 1 hora, el porcentaje de espermatozoides móviles en las salidas fue 1,6, 3,1, 2,2, y 2,3 veces superior que el porcentaje de

5

atribuir al agotamiento.

- 15 espermatozoides móviles en las entradas para los canales de 7 mm, 10 mm, 15 mm y 20 mm de largo, respectivamente. El aumento del porcentaje de espermatozoides móviles en las salidas para el periodo de incubación de 1 hora en comparación con el periodo de incubación de 30 minutos se puede deber a que un mayor número de los espermatozoides móviles se aparta de las entradas durante el periodo de incubación más prolongado.
- En este ejemplo y en otros ejemplos relacionados con el efecto de la longitud del canal, la relevancia de la longitud 20 del canal, la geometría y los patrones de la superficie sobre el agotamiento y el resultado de la clasificación de los espermatozoides se testaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) de un factor no paramétrico con comparaciones post-hoc de Tukey.

Ejemplo 6 - Efecto de la longitud del canal sobre eficiencia de la clasificación de los espermatozoides

El efecto de la longitud del canal sobre la eficiencia de la clasificación de los espermatozoides se investigó comparando la movilidad de los espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides móviles tras la clasificación utilizando diversas longitudes de canal.

Por lo que respecta de nuevo a las Fig. 9A y 9B, para un periodo de incubación de 30 minutos, los espermatozoides clasificados con una canal de 15 mm de largo demostraron una VAP (130,0 ±31,1 μ m/s) y una VSL (120,6 ± 31,6 μ m/s) significativamente superiores que los espermatozoides clasificados con un canal de 7 mm de largo (VAP:

- 30 107,9 ± 28,1 μm/s; VSL: 98,3 ± 30,3 μm/s) y que los espermatozoides clasificados con un canal de 10 mm de largo (VAP: 109,8 ± 26,9 μm/s; VSL: 100,0 ± 30,3 μm/s). Sin embargo, al aumentar la longitud del canal hasta 20 mm no mejoró la clasificación de los espermatozoides (VAP: 127,2 ± 41,3 μm/s; VSL: 113,7 ± 38,0 μm/s) con respecto a la clasificación en el canal de 15 mm de largo. Estos datos indicaron que un aumento de la longitud del canal hasta 15 mm permitió que los espermatozoides móviles se moviesen más dentro del canal que los espermatozoides de baja
- 35 movilidad o no móviles, debido a las diferencias en la velocidad de los espermatozoides, resultando así en una clasificación mejorada de los espermatozoides.

Para el periodo de incubación de 1 hora, el canal de 15 mm de largo (VSL: 108,5 ± 27,8 μm/s) también demostró una mejor capacidad de clasificación que el canal de 7 mm de largo (VSL: 67,7 ± 25,2 μm/s) o que el canal de 10 mm de largo (VSL: 88,6 ± 27,8 μm/s). Sin embargo, los espermatozoides clasificados con el canal de 20 mm de largo demostraron una VAP significativamente superior (VAP: 127,3 ± 24,1 μm/s) que los espermatozoides clasificados con el canal de 7 mm de largo (VAP: 79,6 ± 23,6 μm/s) y que los espermatozoides clasificados con el canal de 7 mm de largo (VAP: 98,4 ± 27,1 μm/s).

No se observó ninguna mejora significativa en la velocidad de los espermatozoides entre el periodo de incubación de 30 minutos y el periodo de incubación de 1 hora.

- 45 Por lo que respecta a la Fig. 9C, para la linealidad de los espermatozoides, no se observó ninguna diferencia significativa entre diferentes longitudes de canales para el periodo de incubación de 30 minutos. Sin embargo, cuando el tiempo de incubación se incrementó hasta 1 hora, se observó una reducción significativa en la linealidad en comparación con el tiempo de incubación de 30 minutos para los espermatozoides clasificados con canales cortos (7 mm; p < 0,05), pero no para los espermatozoides clasificados con canales más largos (10 mm, 15 mm y 20</p>
- 50 mm). Este resultado se puede atribuir a que los espermatozoides con menor movilidad llegan a la salida de un canal corto cuando se proporciona un tiempo de incubación suficiente.

Por lo que respecta a la Fig. 9D, se realizó un análisis estadístico para identificar el porcentaje de espermatozoides móviles en la entrada y la salida de cada canal. Para el periodo de incubación de 30 minutos, los espermatozoides clasificados utilizando diferentes longitudes de canal no mostraron una diferencia estadística en el porcentaje de

- 55 espermatozoides móviles en la entrada y la salida del canal. Cuando el tiempo de incubación se incrementó hasta 1 hora, se observó un descenso significativo del porcentaje de espermatozoides móviles en la entrada y la salida para el canal de 7 mm de largo en comparación con los canales más largos. El descenso del porcentaje de espermatozoides móviles también se observó para el canal de 7 mm de largo con un periodo de incubación de 1 hora en comparación con el mismo canal con un periodo de incubación de 30 minutos. Sin embargo, al aumentar el comparación de a incubación basta 1 hora en comparación con el mismo canal con un periodo de incubación de 30 minutos. Sin embargo, al aumentar el comparación de a incubación basta 1 hora en comparación con el mismo canal con un periodo de incubación de 30 minutos.
- 60 tiempo de incubación hasta 1 hora no se observó un efecto significativo sobre el porcentaje de los espermatozoides móviles en los canales más largos. Estos resultados se pueden atribuir a que los espermatozoides con una

movilidad extremadamente baja llegan a la salida del canal de 7 mm cuando se proporciona un tiempo de incubación suficiente. Sin embargo, la posibilidad de que los espermatozoides de baja movilidad lleguen a la salida de un canal más largo (por ejemplo, un canal de 15 mm o 20 mm) incluso con un tiempo de incubación de 1 hora, fue baja.

- Por otra parte, el porcentaje de espermatozoides clasificados que se pueden recoger del chip microfluídico (denominado «porcentaje de espermatozoides recopilable») se valoró en comparación con los espermatozoides totales introducidos en el canal para cada longitud de canal, con un periodo de incubación de 30 minutos. En particular, el porcentaje de espermatozoides recopilable en un canal se calculó basándose en la distribución de los espermatozoides dentro del canal para un periodo de incubación de 30 minutos. Los volúmenes de espermatozoides clasificados a recopilar de los canales de 7 mm, 10 mm, 15 mm y 20 mm de largo fueron de 0,2 μL, 0,6 μL, 1 μL, y 1
- 10 μL, respectivamente (equivalentes al volumen de las muestras de espermatozoides de los últimos 1 mm, 3 mm, 5 mm y 5 mm de los canales), además de los medios en la salida (3 μL). El porcentaje de espermatozoides recopilable se calculó dividendo el recuento de espermatozoides total introducido en el canal por los espermatozoides clasificados que se recopilarían del canal en el volumen dado.
- Tal y como se muestra en la Fig. 10, los porcentajes de espermatozoides dentro de un intervalo recopilable cerca de la salida fueron del 25,6%, 19,7%, 9,4%, y 3,3% para los canales de 7 mm, 10 mm, 15 mm, y 20 mm de largo, respectivamente. Estos resultados indicaron que el número de espermatozoides dentro del intervalo recopilable cerca de la salida se redujo al aumentar la longitud del canal, un efecto que se puede deber a los espermatozoides con menor movilidad que se recogen de un canal corto junto con los espermatozoides con una movilidad superior. Los datos se presentaron en forma de una media ± error estándar con N = 3.
- 20 Basándose en los resultados anteriores, se puede concluir que la longitud del canal y el tiempo de incubación óptimos son 15 mm y 30 minutos, respectivamente, para conseguir una clasificación efectiva de los espermatozoides.

Ejemplo 7 - Comparación de la clasificación del chip microfluídico con la clasificación por swim-up convencional

25 Las características de los espermatozoides clasificados en un chip microfluídico con un canal de 15 mm de largo, 4 mm de ancho y 50 µm de alto y con un periodo de incubación de 30 minutos se compararon con las características de los espermatozoides clasificados con una técnica de *swim-up* convencional con un periodo de incubación de 30 minutos y con una muestra de espermatozoides no clasificados.

La clasificación de los espermatozoides utilizando el canal de 15 mm de largo se realizó como se ha expuesto 30 anteriormente.

Las muestras de espermatozoides se prepararon para la clasificación por *swim-up* incubando una muestra de esperma durante 30 minutos para permitir la capacitación de los espermatozoides, y a continuación se introdujeron con una pipeta 90 µL de la muestra de esperma en un tubo de Eppendorf y se diluyó la muestra hasta una concentración inferior a 5000 espermatozoides/µL. Se añadieron 60 µL de medio de HTF-BSA nuevo encima de la suspensión de espermatozoides para crear un medio suprayacente libre de residuos. Se añadió una capa fina de

- 35 suspensión de espermatozoides para crear un medio suprayacente libre de residuos. Se añadió una capa fina de aceite mineral estéril encima del medio de HTF-BSA para evitar la evaporación. El tubo de Eppendorf se colocó en una incubadora a 37 °C y se incubó durante 30 minutos o 1 hora. Tras la incubación, se tomó una muestra de 5 µL de esperma de la parte más superior del medio para realizar un análisis de la movilidad.
- Para analizar los espermatozoides clasificados utilizando la técnica de *swim-up*, las muestras de esperma se colocaron en un portaobjetos de PMMA (24 mm x 60 mm) para la captura de imágenes, eliminando así el efecto del sustrato sobre las mediciones del movimiento de los espermatozoides entre la técnica de *swim-up* y la técnica del chip microfluídico. En particular, se añadieron 5 µL de la muestra de esperma a una gota de 10 µL de medio de HTF-BSA colocado sobre el sustrato de PMMA. Se colocaron dos tiras de film DSA (3 mm x 25 mm) sobre el PMMA. La gota de esperma/medio se cubrió con un portaobjetos (25 mm x 25 mm); el film DSA posicionado entre el portaobjetos y el sustrato de PMMA creó un espacio para que los espermatozoides se pudiesen mover libremente.

Se capturaron imágenes de la muestra de esperma sobre el PMMA con un microscopio y se analizaron para determinar la movilidad de los espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides móviles. Se tomaron 25 imágenes secuenciales con un microscopio (TE 2000; Nikon, Japón) utilizando un objetivo de 10x a una velocidad media de una imagen por 0,6 segundos utilizando el software Spot (Diagnostic Instruments Inc., versión 4.6).

50 Estas técnicas de preparación y captura de imágenes de las muestras también se utilizaron para preparar la muestra de control de los espermatozoides no clasificados.

Por lo que respecta a las Fig. 11 A-11D, el canal de 15 mm de largo dio como resultado espermatozoides clasificados con una movilidad notablemente superior (VSL, VSL, y linealidad) y un porcentaje de espermatozoides móviles superior que los espermatozoides clasificados por la técnica de *swim-up* y que los espermatozoides no clasificados, lo que demuestra que el chip microfluídico es una forma efectiva de clasificar los espermatozoides de alta movilidad. Los datos se presentaron en forma de una media ± error estándar con N = 4-7.

Ejemplo 8 - Análisis teórico de las trayectorias de los espermatozoides

55

Una vez que se realizó el seguimiento de los espermatozoides individuales, se calculó el desplazamiento cuadrado medio (MSD) de cada espermatozoide. La Fig. 12 muestra las trayectorias de los espermatozoides de muestra obtenidas utilizando el software ImageJ con MTrackJ Plugin (Meijering, Dzyubachyk, Smal. Methods for Cell and Particle Tracking. Methods in Enzymology, vol. 504, cap. 9, febrero de 2012, pp. 183-200).

5 Considerando solo el movimiento del espermatozoide en el plano x-y, el MSD viene dado por

$$\langle d^2(t) \rangle = \langle (x(t) - x_0)^2 + (y(t) - y_0)^2 \rangle,$$

donde, x(t) e y(t) se corresponden con las coordenadas, y xo e yo son los orígenes de la trayectoria de cada espermatozoide. Los corchetes denotan las medias sobre las trayectorias de diferentes espermatozoides. El MSD resultante como una función del tiempo medio sobre 20 series de datos se muestra en la FIG. 14. En periodos breves, el movimiento de un espermatozoide individual es balístico ($\sim t^2$) y en periodos prolongados es difusor ($\sim t$).

10 breves, el movimiento de un espermatozoide individual es balístico (~t²) y en periodos prolongados es difusor (~t). Esta movilidad se describe por el modelo de avance aleatorio persistente (PRW). En un PRW, el MSD viene dado por

$$\langle d^2(t)\rangle = 2S^2 P[t - P(1 - e^{-t/P})],$$

15

$$\langle d^2(t) \rangle \cong S^2 t^2.$$

En el límite de los tiempos largos, es decir t » P, el MSD viene dado por

$$\langle d^2(t) \rangle \cong 2S^2 Pt.$$

Un coeficiente de movilidad aleatorio, similar a un coeficiente de difusión, viene dado por

20
$$\mu = \lim_{t \to \infty} \frac{\langle d^2(t) \rangle}{4t} = S^2 P/2.$$
(5)

Los datos del MSD mostrados en la Fig. 13 se pueden adaptar con éxito a la anterior expresión para el MSD en un modelo de PRW para obtener 5 « 42 μ *m*/*s* para la velocidad y *P* ~ 13 s para el tiempo de persistencia. El coeficiente de movilidad aleatorio viene dado por tanto por μ ~ 0,011 *mm*²/*s*.

Ejemplo 9 - Simulaciones de la movilidad de los espermatozoides

25 Se elaboró un modelo del movimiento de los espermatozoides de ratón activos en un microcanal en forma de avance aleatorio persistente (PRW), tal y como se ha expuesto anteriormente. Las simulaciones se limitaron a dos dimensiones, coherentes con el grosor de 50 μm del canal. El canal mide 20 mm por 4 mm, imitando la configuración experimental. La distribución inicial de los espermatozoides se muestra en la Fig. 12.

En el modelo, el espermatozoide activo se mueve en una dirección aleatoria dada 0(t) (Fig. 14) con una velocidad,

- 30 $\vec{S}(t) = S \cos \theta(t)\hat{i} + S \sin \theta(t)\hat{j}$, durante un periodo medio de P, antes de cambiar de dirección. $\theta(t)$ se selecciona de una distribución uniforme en el intervalo $(0, 2\pi)$. Si el paso de tiempo de simulación se denota con Δt (seleccionado como 1 s), entonces la probabilidad de seleccionar una nueva dirección $\theta(t)$ para el espermatozoide en cada paso de tiempo es Δt /P. Esto significa que el espermatozoide persiste con $\theta(t)$ constante durante una media de pasos de tiempo P/ Δt antes de cambiar de orientación.
- 35 En las simulaciones, se utilizaron los valores S y P obtenidos de los ajustes para los datos de seguimiento experimentales (véase el Ejemplo 8). Las ecuaciones resultantes del movimiento para la posición (x,y) de los espermatozoides son

$$x(t + \Delta t) = x(t) + S \cos \theta(t) \Delta t$$
$$y(t + \Delta t) = y(t) + S \sin \theta(t) \Delta t.$$

40

Cuando el espermatozoide no es activo, bien porque murió tras la inyección inicial en el canal o porque se agotó, no realiza el avance aleatorio persistente. Por el contrario, el espermatozoide realiza un avance aleatorio isotrópico (RW). Esto es equivalente con un PRW donde el tiempo de persistencia P es igual al paso de tiempo Δt. En otras palabras, el espermatozoide se desplaza en una nueva dirección aleatoria en cada paso de tiempo una distancia fija r_o , imitando las fuerzas brownianas de los medios circundantes. El coeficiente de difusión en este caso viene dado por D= $r_o^2/(4\Delta t)$. Este coeficiente de difusión se puede estimar utilizando la fórmula de Einstein- Smoluchowski [39], es decir D= k_BT/ζ , donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, y ζ es el coeficiente de fricción. Para determinar ζ , se elaboró un modelo del espermatozoide de ratón en forma de un cilindro rígido con una longitud de 100 µm y un radio de 0,5 µm, coherente con modelos anteriores y observaciones experimentales. Para un cilindro de longitud L a una distancia h de la superficie, el coeficiente de fricción a lo largo del eje largo viene dado por [41]

$$\zeta \cong \frac{2\pi\eta L}{\ln(2h/r)},$$

donde η es la viscosidad del medio y r es el radio del cilindro. Para imitar la solución salina fosfatada (PBS) en el canal, utilizamos $\eta=10^3$ Pa s, y tomamos h=25 pm de la ecuación anterior, dando como resultado $\zeta \simeq 1.4 \times 10^{-7} kg/s$ a temperatura ambiente. Utilizando la fórmula de Einstein-Smoluchowski, esto da como resultado un coeficiente de difusión de $D \stackrel{\approx}{} 0.03 \,\mu m^2/s$ para el espermatozoide. Esto significa que en un paso de tiempo dado, un

Dado que el grosor del canal (50 µm) es mucho menor que la anchura y la longitud de los canales, el modelo se limitó a dos dimensiones. Para las paredes del canal, se utilizaron condiciones de límites reflectantes, es decir cuando un espermatozoide choca contra una pared, se detiene y rebota en una nueva dirección aleatoria.

espermatozoide inactivo se moverá unos 0,3 µm, antes de cambiar su dirección.

En los experimentos, se observó que los espermatozoides ocupan los primeros 5 mm del canal poco después de la inyección. A fin de imitar este efecto en las simulaciones, los espermatozoides se distribuyeron inicialmente de forma aleatoria con una distribución similar a la de Fermi mostrada en la Fig. 15 y dada por

$$N(x) = \frac{N_T}{\mu(e^{\beta(x-\mu)}+1)},$$

20 donde μ denota la ubicación media de la interfaz, y β es un parámetro que ajusta la definición del frente de distribución inicial de los espermatozoides, y N_T es el número total de espermatozoides en el canal. Se puede demostrar que f $N(x)dx = N_T$. En las simulaciones, se utilizaron los valores siguientes: μ =5 mm, β =10 mm⁻¹, N_T=10⁵.

25

5

10

15

REIVINDICACIONES

10

1. Un método para clasificar células móviles, que comprende:

la introducción de una población inicial de células móviles en un puerto de entrada de un canal microfluídico, donde la población inicial de células móviles tiene una primera movilidad media;

5 la incubación de la población de células móviles en el canal microfluídico en ausencia de un flujo de medios; y

la recopilación de una población clasificada de células móviles en un puerto de salida del canal microfluídico, donde la población clasificada de células móviles tiene una segunda movilidad media superior a la primera movilidad media.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la orientación del canal microfluídico horizontal o verticalmente y/o donde la incubación de la población de células móviles incluye la incubación en ausencia de flujo de medios; y/o

la incubación de la población de células móviles incluye la incubación de la población de

células móviles durante un tiempo suficiente para permitir que una parte de la población inicial de células móviles se desplace a lo largo del canal microfluídico.

 El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende asimismo la determinación de la segunda movilidad media, incluyendo:

la obtención de una pluralidad de imágenes de una población recopilable de células móviles en los alrededores del puerto de salida, donde la población recopilable de células móviles incluye la población clasificada de células móviles; y

el análisis de la pluralidad de imágenes.

20 4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

donde la introducción de la población inicial de células móviles incluye la suspensión de la población inicial de células móviles en un medio a una concentración de al menos 10³ células móviles/µL y

donde una concentración de la población clasificada de células móviles en un medio es menor que o igual a 1,6 x 10³ células móviles/µL.

25 5. Un método para analizar una población de células móviles, que comprende:

la introducción de una población inicial de células móviles en un puerto de entrada de un canal microfluídico;

la incubación de la población de células móviles en el canal microfluídico en ausencia de un flujo de medios;

la adquisición de una pluralidad de imágenes de al menos una parte de la población de células móviles dentro del canal microfluídico; y

30 la determinación de una característica de al menos una parte de la población de células móviles en base a la pluralidad de imágenes.

6. El método de la reivindicación 5, donde la característica determinada incluye al menos una de las siguientes: movilidad, velocidad de la trayectoria media (VAP), velocidad rectilínea (VSL) o linealidad;

donde la característica determinada incluye al menos una de las siguientes:

35 una característica de una población clasificada de células móviles ubicada en los alrededores de un puerto de salida del canal microfluídico, y

una distribución de la población de células móviles a lo largo del canal microfluídico; y/o donde la determinación de una característica incluye la comparación de una característica de una población clasificada de células móviles ubicada en los alrededores de un puerto de salida del canal microfluídico con una de las características siguientes o con ambas:

40 con amba

una característica de la población inicial de células móviles, y

una característica de una población restante de células móviles ubicada en los alrededores del puerto de entrada tras la incubación y/o que comprende también la determinación del estado de salud de la población inicial de células móviles basándose en la característica determinada.

45 7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde la incubación de la población de células móviles incluye la incubación durante un tiempo suficiente para permitir que una

parte de la población inicial de células móviles se desplace a lo largo del canal microfluídico.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 7, donde la población de células se incuba durante 20-60 minutos, o durante 30 minutos.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 5-8, donde la altura del canal microfluídico es inferior a 20 veces el tamaño de las células móviles o a 3-10 veces el tamaño de las células móviles.

10. Un dispositivo para clasificar células móviles, que comprende:

5

15

un canal microfluídico, donde la altura del canal microfluídico se selecciona para que tenga una dimensión de entre tres y diez veces el tamaño de la cabeza de las células móviles;

un puerto de entrada conectado a un primer extremo del canal microfluídico y configurado para recibir una población inicial de células móviles que tiene una primera movilidad media;

un puerto de salida conectado a un segundo extremo del canal microfluídico, donde el canal microfluídico está configurado para proporcionar una población clasificada de células móviles en el segundo extremo, sin que se
 requiera un flujo de fluido en el canal microfluídico, donde la población clasificada de células móviles tiene una segunda movilidad media mayor que la primera movilidad media.

11. El dispositivo de conformidad con la reivindicación 10, donde el canal microfluídico tiene una

sección transversal rectangular, una sección transversal trapezoidal, una sección transversal triangular, una sección transversal circular u ovalada, una sección transversal que varía a lo largo del canal microfluídico o una sección transversal con surcos; y/o donde el canal microfluídico es lineal o curvado.

12. El dispositivo de las reivindicaciones 10 u 11, que incluye también un sistema de captura de imágenes configurado para capturar una pluralidad de imágenes de al menos una parte del canal microfluídico, donde el sistema de captura de imágenes comprende lo siguiente:

una fuente de luz configurada para iluminar al menos una parte del canal microfluídico; y

20 un detector configurado para detectar una imagen de las células motiles en la parte iluminada del canal microfluídico; y que comprende asimismo un módulo de análisis configurado para determinar una característica de las células móviles en la parte del canal microfluídico de la que se han capturado imágenes, basándose en las imágenes capturadas.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la población inicial de células móviles se introduce
 en el puerto de entrada del canal microfluídico del dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 10-12.

14. El método de la reivindicación 1, donde:

la incubación de la población inicial de células móviles comprende la incubación de la población de las células móviles de forma que al menos algunas de las células móviles fluyen desde el puerto de entrada hasta el puerto de salida del canal microfluídico;

30 donde una tercera población de células móviles en el puerto de entrada del canal microfluídico tras la incubación tiene una tercera movilidad media; y

donde la segunda movilidad media es mayor que la tercera movilidad media.







21



ES 2 702 793 T3



Fig. 4

ES 2 702 793 T3





(s/mu) səbiozoteməqsə sol əb bebiooləV





ES 2 702 793 T3





Fig. 10





Fig. 12



<q₅> (mm₅)

