

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 840**

51 Int. Cl.:

G01N 15/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2016 PCT/EP2016/073467**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17055581**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2016 E 16775706 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3356792**

54 Título: **Dispositivo microfluídico para la selección de semen**

30 Prioridad:

30.09.2015 EP 15187812

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

19.11.2020

73 Titular/es:

SEMEN REFINEMENT B.V. (100.0%)

Drienerlolaan 5

7522 NB Enschede, NL

72 Inventor/es:

DE WAGENAAR, BJORN;

SEGERINK, LOES IRENE;

OLTHUIS, WOUTER;

SPRENKELS, ADRIANUS JOSEPH y

BERG, VAN DEN, ALBERT

74 Agente/Representante:

CARBONELL CALLICÓ, Josep

ES 2 794 840 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico para la selección de semen

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un sistema para clasificar espermatozoides, así como a un método para clasificar espermatozoides.

10 **Antecedentes de la invención**

En la técnica, se conoce el mantenimiento de las características morfológicas y la movilidad de los espermatozoides para aumentar la tasa de éxito de la inseminación artificial y esto aparece descrito, por ejemplo, en el documento WO2004053465A2. En este documento, se describe un método y un dispositivo para analizar la movilidad de los espermatozoides en una dirección de avance y la densidad de los espermatozoides activos en una muestra de semen. El dispositivo incluye una estructura microfluídica que tiene un depósito de muestra, una región de recogida aguas abajo y un microcanal que se extiende entre medias. El microcanal está dimensionado para limitar la muestra de semen a un movimiento unidireccional dentro del canal, de modo que los espermatozoides en una muestra de semen colocada en el depósito de muestra entren y se desplacen a lo largo del microcanal hacia y dentro de la región de recogida. También se incluye un detector para detectar la presencia de espermatozoides marcados en el microcanal o la región de recogida y una unidad electrónica conectada operativamente al detector para (i) recibir señales del detector, (ii) en función de las señales del detector recibidas, determinar la movilidad y densidad de los espermatozoides en la muestra de esperma y (iii) mostrar información relacionada con la movilidad y densidad de los espermatozoides.

El documento EP2508253A1 describe un dispositivo de canal que incluye un canal de tamaño nanométrico a través del cual fluye una molécula individual, al menos un par de electrodos dispuestos cerca del canal de tamaño nanométrico y una fuente de alimentación de CA que aplica una tensión de CA a los electrodos. Este dispositivo de canal es útil para identificar moléculas una por una. Asimismo, se describe un dispositivo de canal que incluye un canal de tamaño nanométrico a través del cual fluye una molécula individual, una porción de ramificación y una pluralidad de canales de ramificación, en donde (i) un par de electrodos está dispuesto cerca del canal de tamaño nanométrico para intercalar el canal de tamaño nanométrico entre los electrodos, o (ii) un electrodo del par de electrodos se ubica cerca del canal de tamaño nanométrico, mientras que el otro está dispuesto cerca de los canales de ramificación. Este dispositivo de canal es útil para separar moléculas individuales. El dispositivo de canal logra la identificación o separación con una precisión del 100 % en principio. Un aparato de tratamiento de muestras de acuerdo con los inventores incluye un dispositivo de canal, una sección de medición y una sección de procesamiento aritmético. La sección de medición aplica una tensión (CC o CA) entre electrodos de un par de electrodos instalado en el canal de tamaño nanométrico, y mide una señal eléctrica cuando una molécula individual pasa entre los electrodos para identificar la molécula.

El documento EP2211164 A1 describe que las propiedades eléctricas de las soluciones de partículas pueden investigarse en una sola partícula utilizando canales microfluídicos. La impedancia se puede medir a través del canal utilizando al menos un par de electrodos conductores, siendo al menos un electrodo de un par un electrodo con dedos que tiene una pluralidad de dedos. El patrón de electrodos con dedos crea una forma de señal de medición más larga y más complicada que conduce a una mejora significativa de la sensibilidad de medición. Una aplicación para la tecnología propuesta consiste en mejorar significativamente la sensibilidad de medición de las mediciones de impedancia en los glóbulos sanguíneos, lo que conduce a una mejor diferenciación entre los diferentes tipos de glóbulos blancos. Una mejor sensibilidad de medición también permite la medición de partículas más pequeñas y un mayor rendimiento.

El documento US2005/0118705 A1 describe aparatos y métodos para realizar microanálisis de partículas usando un chip de sistema microelectromecánico (MEMS) para interrogar eléctricamente las partículas. El chip MEMS se fabrica típicamente mediante técnicas conocidas de micromaquinado litográfico, empleadas por ejemplo, en la industria de los semiconductores. Un sustrato porta una pluralidad de microelectrodos dispuestos en una zona de detección y espaciados a lo largo de un eje de un microcanal. El microcanal está dimensionado en sección transversal para hacer que las partículas transportadas por un fluido rebasen los electrodos en una fila individual. La impedancia se mide entre uno o más pares de electrodos para determinar la presencia de una partícula en la zona de detección.

El documento US2013/0256197 A1 describe un dispositivo de canal de flujo que incluye un canal de flujo en el que fluye un fluido que contiene una partícula, una pluralidad de canales de ramificación que se ramifican desde el canal de flujo y una unidad de electrodo. La unidad de electrodo incluye un primer electrodo que tiene una primera área y un segundo electrodo que tiene una segunda área diferente de la primera área, y está configurada para formar un campo eléctrico de guía en el canal de flujo, que guía la partícula a un canal de ramificación predeterminado fuera de la pluralidad de canales de ramificación. El segundo electrodo está en oposición al primer electrodo, de modo que el canal de flujo se intercale entre el primer electrodo y el segundo electrodo.

El documento US2014/0248621 A1 describe dispositivos y métodos microfluídicos que utilizan células tales como células cancerosas, células madre, glóbulos sanguíneos para un preprocesamiento, el cual clasifica diversos biodiagnósticos o aplicaciones terapéuticas. La detección eléctrica de microfluídica, como la medición del potencial de campo o la corriente, y fenómenos como la fluidez inmiscible, la fluidez inercial se utilizan como base para el procesamiento celular y molecular (por ejemplo, caracterización, clasificación, aislamiento, procesamiento, amplificación) de diferentes partículas, composiciones químicas o bioespecies (por ejemplo, diferentes células, células que contienen diferentes sustancias, diferentes partículas, diferentes composiciones bioquímicas, proteínas, enzimas, etc.). Específicamente, el documento describe algunos esquemas de clasificación para células madre, sangre entera y células tumorales circulantes y también extrayendo suero de sangre entera.

Segerink et al. describen en "On-chip determination of spermatozoa concentration using electrical impedance measurements" Lab on a Chip vol. 10 (8), (2010) un chip microfluídico para determinar la concentración de espermatozoides en el semen. Para el método, se describe un microcanal con un par de electrodos planos que permite la detección de espermatozoides que pasan por los electrodos mediante mediciones de impedancia eléctrica. Se describe además que las células distintas a los espermatozoides en el semen también provocan un cambio en la impedancia al pasar los electrodos, interfiriendo con el recuento de espermatozoides. El cambio en la impedancia eléctrica está relacionado con el tamaño de las células que pasan por los electrodos, lo que permite distinguir entre espermatozoides y células HL-60 suspendidas en medio de lavado o microesferas de poliestireno.

Cheung et al. describen en "Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation" Cytometry Part A vol. 65A, no. 2, (2005) la utilización de un citómetro de flujo de espectroscopía de impedancia microfabricado que permite la caracterización dieléctrica rápida de una población celular con un canal microfluídico simple. Las mediciones de impedancia en un amplio intervalo de frecuencia proporcionan información sobre el tamaño celular, la capacitancia de la membrana y la conductividad de citoplasma en función de la frecuencia.

Sumario de la invención

La inseminación artificial (IA) es una técnica totalmente arraigada en la industria animal para la producción ganadera. La selección de muestras de esperma para IA se basa en la concentración de espermatozoides, la movilidad celular y su morfología. Todos los factores han mostrado un impacto en la tasa de éxito de la fecundación y la abundancia de la descendencia. Por lo tanto, los centros de IA cumplen con altos estándares para suministrar muestras de esperma de alta calidad para garantizar una alta probabilidad de fecundación después de la IA. Algunos ejemplos de criterios para el rechazo de muestras de esperma son una baja movilidad de los espermatozoides (menos del 60 % de movilidad progresiva o 70 % de movilidad (tanto para ganado porcino como para ganado bovino), en la muestra fresca), una concentración general baja y un alto número de espermatozoides con morfología anormal (> 15-20 %). Un defecto frecuente de los espermatozoides es la presencia de una gota citoplasmática en el flagelo del espermatozoide. Esta gota es parte del citoplasma de las espermátides, que no se eliminó del flagelo al término de la espermiogénesis. Las gotas citoplasmáticas generalmente se encuentran en una de dos posiciones. Cerca de la cabeza de un espermatozoide se pueden encontrar gotas citoplasmáticas proximales, mientras que las llamadas gotas distales pueden estar presentes en la cola más lejos de la cabeza. Aunque el efecto de la retención de citoplasma residual en la infertilidad humana es un tema controvertido en la clínica, muchas fuentes muestran la contribución del contenido de la gota, especialmente el contenido de las gotas distales, en relación con la subfertilidad en especies domésticas. Por lo tanto, las muestras de esperma (de ganado tanto bovino como porcino) que contienen más del 20 % de células con gotas citoplasmáticas se retienen (en general) respecto de la IA. En el proceso de selección, se descarta un alto número de espermatozoides sanos normales en cuanto a morfología. Desafortunadamente, las técnicas rutinarias de refinamiento de espermatozoides, tales como la centrifugación de la densidad de espermatozoides y la acumulación de espermatozoides, no son adecuadas para recuperar estos espermatozoides con fines de IA.

Un posible enfoque para obtener estos espermatozoides sanos y normales en cuanto a morfología a partir de muestras descartadas es el uso de tecnología microfluídica. Se han utilizado sistemas microfluídicos para la manipulación, análisis y enriquecimiento de espermatozoides móviles viables.

Sin embargo, los sistemas conocidos no parecen ser capaces de realizar análisis y selección de espermatozoides en función de la morfología celular (en el nivel de una célula individual). La separación entre morfología normal y morfología anormal, como la gota citoplasmática que contiene espermatozoides, no es un proceso sencillo, ya que ambas especies son muy similares. Un criterio plausible para distinguir estas especies es la masa celular total, ya que las anomalías, y especialmente el contenido de gotas citoplasmáticas, puede afectar esta propiedad.

Por ende, es un aspecto de la invención proporcionar un sistema alternativo para clasificar células biológicas y especialmente espermatozoides, que preferentemente además al menos en parte evita uno o más de los inconvenientes descritos anteriormente. Al menos parte del sistema puede estar compuesto por un chip. Es un aspecto adicional de la invención proporcionar un método para clasificar espermatozoides, especialmente para realizar análisis y selección de espermatozoides en función de una característica celular, especialmente la morfología celular (en el nivel de una célula individual), preferentemente para evitar al menos en parte uno o más de

los inconvenientes descritos anteriormente.

Se divulga un sistema, que no forma parte de la presente invención, especialmente para clasificar (a) espermatozoides en un fluido, comprendiendo dicho sistema comprende (i) un canal de flujo de fluido para el transporte de dicho fluido, comprendiendo el canal de flujo de fluido una entrada, una zona de análisis configurada aguas abajo de dicha entrada y que comprende un primer par de electrodos que comprende una primera distancia entre electrodos, una zona de clasificación configurada aguas abajo respecto de dicha zona de análisis y (al menos dos) salidas configuradas aguas abajo respecto de dicha zona de clasificación, (ii) una fuente eléctrica configurada para proporcionar una señal eléctrica al primer par de electrodos, (iii) un dispositivo de medición acoplado funcionalmente al primer par de electrodos y configurado para medir una primera impedancia en función del tiempo del fluido entre el primer par de electrodos, y para proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo; (iv) un dispositivo de clasificación configurado para clasificar espermatozoides dirigiendo un espermatozoide en la zona de clasificación a una de las salidas en función de una comparación en una fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sistema tal y como se expone en la reivindicación 1. Especialmente el sistema comprende un sistema para clasificar y discriminar espermatozoides en función de las características de los espermatozoides, por ejemplo, morfología de los espermatozoides, integridad del ADN (de los espermatozoides), anomalías dentro de los espermatozoides tales como vacuolas, deficiencia de acrosoma, etc. Especialmente, el sistema comprende un sistema para realizar análisis y selección de espermatozoides en función de (a) características de espermatozoides de los espermatozoides (véase más adelante).

En las realizaciones, el sistema puede permitir discriminar espermatozoides que tengan diferentes morfologías de espermatozoides entre sí y, especialmente, separar sucesivamente los espermatozoides discriminados. Especialmente, el sistema comprende un sistema para realizar análisis y selección de espermatozoides en función de la morfología de espermatozoide de los espermatozoides (en el nivel de una célula individual).

Especialmente, en el presente documento, el término "clasificación" tal como en "clasificación de un espermatozoide" puede relacionarse con la discriminación de espermatozoides y, especialmente, con una clasificación física sucesiva, es decir, una separación de un espermatozoide respecto de otro espermatozoide (especialmente en función de una característica de los espermatozoides). Especialmente, la expresión "clasificación de un espermatozoide" puede relacionarse con la realización de análisis y selección de espermatozoides en función de una característica de espermatozoides, especialmente la morfología de los espermatozoides. Especialmente, la expresión "clasificación de un espermatozoide" puede relacionarse con la clasificación entre un primer espermatozoide y otro espermatozoide en función de una característica, especialmente en función de una presencia de la característica o un valor de la característica.

Especialmente, este sistema permite realizar análisis y selección de espermatozoides en función de las características de los espermatozoides (anormales), tales como la morfología celular (anormal), especialmente en un nivel de célula individual. Especialmente, el sistema se puede aplicar para detectar un espermatozoide que comprende una anomalía o característica específica, tal como una morfología anormal (del espermatozoide), en la zona de análisis y una clasificación de los espermatozoides que comprenden la anomalía o característica específica de un fluido que comprende los espermatozoides, especialmente un espermatozoide en una zona de clasificación configurada aguas abajo de la zona de análisis. El éxito de la discriminación, especialmente con respecto a la morfología celular, con este sistema puede ser superior al 65 %. Por ende, este sistema se puede utilizar para una detección rápida y de alta calidad, conducente a un descarte sustancialmente menor de espermatozoides sanos normales en cuanto a morfología, que de lo contrario podrían haberse retenido para la IA. Una ventaja del sistema microfluídico es que puede ampliarse fácilmente, tal como mediante un procesamiento paralelo en el mismo chip. Por ende, para clasificar entre un espermatozoide normal (en cuanto a morfología) (especialmente un espermatozoide que comprende una morfología de espermatozoide normal) y un espermatozoide anormal o un espermatozoide que comprende una característica (determinada), el sistema puede comprender especialmente dos salidas, tales como una primera salida y una segunda salida. Especialmente para clasificar entre un espermatozoide normal, un espermatozoide anormal y, por ejemplo, otro material particulado, el sistema puede comprender al menos tres salidas. Un material particulado que puede estar presente en el esperma es, por ejemplo, restos. Un espermatozoide, especialmente, (también) es un material particulado. Por ende, un material particulado puede comprender un espermatozoide. Un material particulado puede comprender especialmente otro material particulado, especialmente otro material particulado puede no comprender un espermatozoide. Por ende, el canal de flujo de fluido puede comprender dos o más salidas para clasificar espermatozoides y/u otro material particulado. Especialmente los términos "normal" y "anormal" tales como en "un espermatozoide normal" y "un espermatozoide anormal" pueden relacionarse con una característica (véase más adelante) de los espermatozoides (como la ausencia o presencia de una gota citoplasmática). Especialmente, un espermatozoide anormal comprende una anomalía.

En las realizaciones, el fluido puede comprender, por ejemplo, semen no diluido. Como alternativa o de manera adicional, el fluido puede comprender además otros líquidos. El fluido puede comprender, por ejemplo, semen diluido. Como diluyente, por ejemplo, se puede aplicar agua, opcionalmente en combinación con una o más sales

disueltas y/o azúcares, como en el caso de una solución descongeladora de Beltsville. El fluido puede comprender semen diluido en un intervalo de, por ejemplo, 10-10.000 veces de dilución. En las realizaciones, la concentración de espermatozoides en el fluido se selecciona del intervalo de 10^4 - $5 \cdot 10^8$ células/ml⁻¹. Especialmente, el fluido comprende un líquido. Especialmente, el fluido permite mover el espermatozoide (en el fluido) a través del sistema, especialmente a través del canal de flujo de fluido. El fluido (que comprende un espermatozoide) puede proporcionarse en la entrada del canal de flujo de fluido, en donde el fluido puede fluir adicionalmente a través del canal de flujo de fluido en la dirección de una salida dispuesta aguas abajo (durante la operación normal) de la entrada. La entrada está especialmente configurada para permitir que un fluido entre en el canal de flujo de fluido. La entrada puede estar en conexión de fluido con otro canal de fluido. La entrada puede estar además en conexión de fluido con un recipiente (depósito) que comprende el fluido. Especialmente, la entrada está en conexión de fluido con medios para suministrar el fluido (que comprende un espermatozoide), especialmente para proporcionar un flujo de fluido en el canal de flujo de fluido. La entrada puede comprender una entrada. La entrada también puede comprender más de una entrada. Por ende, el sistema puede incluir además una bomba configurada para proporcionar un flujo del fluido a través del canal de flujo del fluido.

La zona de análisis está especialmente configurada para permitir que el fluido (que comprende un espermatozoide) fluya a través de la zona de análisis (véase también más adelante) y para analizar (detectar o medir) una característica del fluido que comprende el espermatozoide, o el espermatozoide como tal, (que fluye) en la zona de análisis. El sistema puede estar provisto de un sensor para detectar las características del fluido (que fluye) en la zona de análisis. Especialmente, el sensor comprende el dispositivo de medición descrito en el presente documento configurado para medir una primera impedancia (y una segunda impedancia). El sistema, especialmente la zona de análisis, comprende un (primer) par de electrodos para analizar una característica, tal como la impedancia eléctrica, del fluido (que fluye) en la zona de análisis. Adicionalmente, el sistema puede comprender un sensor óptico y/o un sensor acústico para detectar o analizar las características del fluido (que fluye) en la zona de análisis. En función del análisis, el espermatozoide (y parte del fluido) puede dirigirse hacia una salida (específica) en la zona de clasificación.

La zona de clasificación está especialmente configurada para permitir dirigir un espermatozoide y/o fluido que comprende el espermatozoide hacia una salida, especialmente para separar el espermatozoide respecto de otros espermatozoides. Especialmente, el sistema comprende un dispositivo de clasificación configurado para dirigir un espermatozoide en la zona de clasificación a una de las salidas. En el presente documento, dirigir un espermatozoide a una de las salidas puede comprender dirigir el espermatozoide en el flujo de fluido a una de las salidas. Por ejemplo, dirigir el espermatozoide mediante fuerzas dielectroforéticas u otros medios, especialmente para dirigir el material (particulado) en un fluido. Como alternativa o de manera adicional, dirigir un espermatozoide a una de las salidas puede comprender dirigir el fluido que comprende el espermatozoide a una de las salidas. Dirigir el fluido (que comprende el espermatozoide) puede comprender, por ejemplo, dirigir el flujo de fluido por medio de válvulas o flujos de fluido adicionales u otros medios (hidrodinámicos) especialmente para dirigir un flujo de fluido (que comprende el espermatozoide). Por ende, el dispositivo de clasificación puede comprender un dispositivo para proporcionar fuerzas dielectroforéticas (en el espermatozoide) u otros medios especialmente para dirigir un material particulado, tal como un espermatozoide, en un fluido en la zona de clasificación. Especialmente, el sistema puede comprender electrodos para proporcionar fuerzas dielectroforéticas. Como alternativa o de manera adicional, el dispositivo de clasificación puede comprender un dispositivo para dirigir el fluido que comprende el espermatozoide a una de las salidas, por ejemplo, por medio de válvulas u otros medios, especialmente para dirigir un flujo de fluido. Especialmente el dispositivo de clasificación puede comprender una válvula.

Una (primera) impedancia tal y como se describe en el presente documento se refiere especialmente a una (primera) impedancia eléctrica. Especialmente, la impedancia tal y como se describe en el presente documento puede referirse a la impedancia eléctrica absoluta. La impedancia (eléctrica) es especialmente la respuesta del (volumen de) fluido entre los electrodos del par de electrodos que se puede medir cuando se introduce una diferencia (de potencial) de tensión (CA o CC, especialmente CA) sobre el (primer) par de electrodos para proporcionar una corriente (que fluye a través del fluido, especialmente, entre los electrodos del par de electrodos) (véase más adelante). Especialmente, se proporciona una señal eléctrica al primer par de electrodos (y opcionalmente un segundo par de electrodos, véase más adelante). Por ende, la impedancia eléctrica es especialmente una respuesta a una señal eléctrica provista a los electrodos del par de electrodos. La impedancia eléctrica se ve especialmente afectada por las características dieléctricas del (volumen) de fluido entre los electrodos. De este modo, si un fluido fluye entre (los electrodos) del par de electrodos, las características, tales como las características dieléctricas, del volumen que se mide entre los electrodos puede cambiar con el tiempo, y especialmente la impedancia medida puede cambiar con el tiempo. Por ende, "medir una (primera) impedancia en función del tiempo del fluido entre el (primer) par de electrodos" comprende medir el valor (o señal) de impedancia eléctrica (respuesta de una diferencia de potencial sobre los electrodos) del fluido (incluyendo cualquier espermatozoide y cualquier otro material opcional) entre los electrodos del par de electrodos durante un período de tiempo (y determinar los valores de impedancia (señal) en función del tiempo en ese período de tiempo). La impedancia (valor/señal) (eléctrica) se ve afectada por las características dieléctricas del fluido (incluido un posible espermatozoide u otro material particulado). Por ende, cuando un espermatozoide anormal o un espermatozoide que comprende una característica (específica), especialmente un espermatozoide que exhibe características celulares (anormales) que afectan las características dieléctricas del espermatozoide, fluye entre el par de electrodos y la impedancia (eléctrica) se mide con el tiempo, la

señal medida (impedancia) puede diferir sustancialmente de la observada en un espermatozoide normal o un espermatozoide que no comprende las características (específicas) y pueden identificarse los espermatozoides anormales/espermatozoides que comprenden las características (específicas).

- 5 Especialmente, la identificación se realiza en una fase de comparación (o fase de identificación). Las características celulares que afectan las propiedades dieléctricas de un espermatozoide comprenden, por ejemplo, alteraciones en la carga en la membrana espermática, distribución de carga sobre la membrana espermática y morfología anormal. Especialmente, una morfología anormal tal como variaciones de tamaño, vacuolas en la cabeza o deficiencia de acrosoma, así como la presencia de una gota citoplasmática puede mostrar un efecto sustancial en la señal de impedancia medida cuando el espermatozoide anormal pasa entre los electrodos.

El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 y el método de acuerdo con la reivindicación 9 descritos en el presente documento se aplican para detectar y clasificar un espermatozoide que comprende una característica anormal o específica que afecta las características dieléctricas del espermatozoide. Especialmente, el sistema y el método pueden aplicarse para detectar y clasificar un espermatozoide que comprende una anomalía morfológica, tal como un espermatozoide que comprende una gota citoplasmática. El sistema también puede configurarse para (y el método tal y como se describe en el presente documento también puede comprender) seleccionar la presencia de una característica específica (u otra) que tenga un efecto sobre las características dieléctricas de un espermatozoide, por ejemplo (la presencia de) dimensiones anormales de un espermatozoide, vacuolas anormales en el espermatozoide, anomalías en el acrosoma, anomalías en la carga de la membrana espermática o (la presencia de otras) anomalías morfológicas. Por ende, especialmente, el sistema de la invención puede configurarse para, y el método de la invención puede usarse para, clasificar un espermatozoide en función de una o más características. Especialmente, la característica puede seleccionarse del grupo que consiste en una dimensión del espermatozoide, una presencia de (una determinada) vacuola en el espermatozoide, un acrosoma (deficiente) (en el espermatozoide), una carga de una membrana del espermatozoide (la membrana espermática), una distribución de carga sobre la membrana espermática, una morfología (una característica morfológica) (del espermatozoide), presencia de una gota citoplasmática y una integridad del ADN.

A continuación, en el presente documento, el sistema se describe en mayor detalle. El sistema (y el método) también puede usarse para medir o analizar (solo) espermatozoides. Especialmente, para analizar espermatozoides, el dispositivo de clasificación puede no aplicarse para clasificar los espermatozoides (separando un espermatozoide respecto de otro espermatozoide) en la zona de clasificación. Especialmente, para dicha aplicación no se requiere zona de clasificación (ni dispositivo de clasificación). El sistema (y el método) se explica especialmente en mayor detalle para identificar y clasificar un espermatozoide anormal en cuanto a morfología, especialmente un espermatozoide que comprende una morfología que difiere de la morfología de otros espermatozoides.

Cuando un espermatozoide anormal fluye entre el par de electrodos y la impedancia se mide con el tiempo, la señal medida puede diferir sustancialmente de la observada en un espermatozoide normal. De ese modo, se puede identificar y distinguir un espermatozoide anormal (y también el espermatozoide normal) (especialmente en la fase de comparación). Especialmente, el sistema (y el método) descrito en el presente documento está (configurado) para la identificación y distinción de un espermatozoide en función de una característica del espermatozoide. El espermatozoide identificado (anormal) puede dirigirse a una de las salidas mediante el dispositivo de clasificación, mientras que un espermatozoide normal (o un espermatozoide que no comprende características específicas) puede dirigirse a (una de) la(s) otra(s) salida(s). Una salida puede comprender una abertura para salir del canal de flujo de fluido. Una salida puede estar en conexión de fluido con uno o más canales de flujo de fluido adicionales, por ejemplo para dirigir el espermatozoide seleccionado a una fase adicional de procesamiento o almacenamiento. Como alternativa o de manera adicional, una o más de las salidas pueden estar en conexión de fluido con un recipiente, especialmente para contener (un fluido que comprende) los espermatozoides clasificados. En una realización, una de las salidas está configurada como una continuación del canal de flujo de fluido, mientras que la(s) otra(s) salida(s) está(n) configurada(s) como un lado o salida del canal principal de flujo de fluido. Especialmente, en dicha realización, se puede proporcionar un flujo de fluido predeterminado desde la entrada a la salida configurado como una continuación del canal de flujo de fluido y un espermatozoide identificado (y/o cualquier otro material identificado, véase más adelante) puede eliminarse del flujo de fluido principal dirigiéndolo (el espermatozoide identificado y/u otro material) a (una de) la(s) salida(s) configurada(s) como salida. Dicho de otra forma, un eje del canal aguas arriba de dicha salida de "continuación" y un eje del canal aguas abajo de la misma pueden configurarse sustancialmente en paralelo y sustancialmente sin una distancia mutua (especialmente sustancialmente alineados mutuamente entre sí).

Especialmente, en una realización que comprende al menos tres salidas, el sistema puede configurarse además para una clasificación adicional, por ejemplo, clasificación entre un espermatozoide normal, un espermatozoide que comprende una gota citoplasmática distal y un espermatozoide que comprende una gota citoplasmática proximal. El dispositivo de clasificación puede configurarse adicionalmente para dirigir el espermatozoide normal a, por ejemplo, una primera salida, y los espermatozoides anormales (que comprenden, por ejemplo, una gota citoplasmática distal y una gota citoplasmática proximal) pueden dirigirse a una de las salidas segunda y tercera respectivas y opcionalmente otras salidas (en función de una comparación en una fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos). Todas las salidas pueden configurarse

sustancialmente en la misma ubicación con respecto al eje del canal de flujo de fluido, por ejemplo, como en el caso de una bifurcación o una trifurcación. Especialmente, el eje del canal de flujo de fluido comprende el eje longitudinal del canal de flujo de fluido. Especialmente, el fluido que sale de las diferentes salidas puede dirigirse en diferentes direcciones de flujo. Especialmente, en dicha realización, un dispositivo de clasificación puede configurarse para

5 dirigir el espermatozoide a cualquiera de las salidas. Como alternativa, se puede configurar más de un dispositivo de clasificación para dirigir el espermatozoide a una salida específica.

De forma adicional o como alternativa, las salidas también se pueden organizar en serie. Por ejemplo, para clasificar los tres tipos de espermatozoides mencionados anteriormente, puede ser ventajoso clasificar primero entre un

10 espermatozoide normal y uno anormal y dirigir todos los espermatozoides normales a una primera salida y todos los anormales a una segunda salida. La segunda salida puede configurarse aguas abajo de la primera salida. Aguas abajo de la segunda salida, pero en el mismo canal que la primera salida, se pueden configurar una o más salidas adicionales. Como alternativa o de manera adicional, dicha segunda salida puede comprender una o más salidas adicionales, como una tercera salida o más, configurada aguas abajo de la segunda salida en otro canal que no sea

15 el canal que comprende la primera y la segunda salida. Se pueden usar diferentes realizaciones para dirigir sucesivamente espermatozoides normales a una primera salida y anormales, por ejemplo, a una segunda salida, con, por ejemplo, las células espermáticas que comprenden, por ejemplo, una gota citoplasmática distal a la salida adicional (específica). En otra realización, el dispositivo de clasificación puede configurarse para dirigir un espermatozoide normal y un espermatozoide anormal, respectivamente, a una primera y una segunda salida,

20 mientras que (sin células espermáticas que comprendan) el material adicional (particulado) (tal como restos celulares) comprendido en el fluido puede dirigirse a otra salida (adicional).

Por ende, en una realización adicional, el sistema comprende (una primera salida, una segunda salida y) una salida más, y el dispositivo de clasificación está configurado además para clasificar un material particulado adicional dirigiendo el material particulado adicional en la zona de clasificación a una de las salidas (primera, segunda o más),

25 especialmente en función de una comparación en una fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos. Especialmente, los datos de referencia pueden comprender datos de referencia para el material particulado adicional. Dicho sistema puede ser especialmente relevante cuando el fluido puede comprender además un material particulado adicional (además de los

30 espermatozoides).

El dispositivo de clasificación está configurado para clasificar espermatozoides entre espermatozoides (con características morfológicas) normales y espermatozoides (con características morfológicas) anormales, dirigiendo el espermatozoide en la zona de clasificación a una de las salidas en función de una comparación en una fase de

35 comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos, en donde un espermatozoide anormal se dirige a una de las salidas mediante el dispositivo de clasificación y un espermatozoide normal se dirige a otra salida.

La fuente eléctrica puede proporcionar una corriente alterna a los electrodos. La fuente eléctrica también puede proporcionar una corriente continua a los electrodos. La fuente electrónica también puede proporcionar la señal eléctrica que comprende ondas, tales como una onda sinusoidal, una onda de bloque o un triángulo o una onda de

40 sierra. En una realización, la fuente eléctrica está comprendida en un dispositivo eléctrico separado. En otra realización más, la fuente eléctrica también puede estar comprendida en el dispositivo de medición (véase más adelante). En una realización específica, un espectroscopio de impedancia comprende el dispositivo de medición, así como la fuente eléctrica. Sin embargo, en otra realización más, un generador de ondas eléctricas comprende la

45 fuente eléctrica, y el dispositivo de medición comprende un espectroscopio de impedancia.

Los datos de impedancia dependientes del tiempo proporcionados pueden comprender diferentes representaciones. Los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden comprender en una realización, por ejemplo, una serie de

50 datos (como una tabla) que comprende los datos de medición sin procesar, es decir, el tiempo (de medición) y la respectiva señal de impedancia medida, especialmente la parte imaginaria y real respectiva de la señal medida. En otra realización, los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden comprender un valor individual, tal como la señal de impedancia máxima medida (durante la medición de la impedancia de un fluido que comprende un espermatozoide) o, por ejemplo, un nivel de aumento de la impedancia (durante un período de medición específico).

55 En una realización adicional, los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden comprender una serie de datos que comprenden los valores de impedancia medidos mínimos y máximos y los tiempos de medición respectivos. En otra realización complementaria, los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden comprender una representación gráfica de la impedancia medida frente al tiempo de medición, especialmente configurado como una curva de medición. En una realización adicional más, los valores de impedancia medidos se

60 transforman en datos de impedancia absoluta y los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden comprender los valores absolutos de la impedancia (y el tiempo de medición respectivo). Especialmente, se puede usar el valor absoluto de los datos de impedancia medidos. Especialmente, en las realizaciones, los datos de impedancia dependientes del tiempo comprenden los valores absolutos de la señal de impedancia medida (en función del tiempo de medición). En otra realización más, los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden

65 comprender las partes reales e imaginarias de los valores de impedancia medidos. Como alternativa o de manera adicional, la señal de impedancia medida puede corregirse para la deriva y/o el desplazamiento en los datos

medidos; la fecha de impedancia dependiente del tiempo puede (también) comprender datos corregidos. En una realización adicional más, los datos de impedancia dependientes del tiempo comprenden al menos dos de las representaciones (realizaciones) dadas anteriormente. Por ende, el dispositivo de medición puede configurarse especialmente para proporcionar diferentes tipos de datos de impedancia dependientes del tiempo, tales como los que se dan en las realizaciones anteriores. Los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden incluir datos medidos originalmente así como datos procesados. Además, los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden incluir una pluralidad de datos u opcionalmente incluso un valor individual.

Cuando un espermatozoide normal (u otro material particulado) fluye entre un par de electrodos y la impedancia del fluido (que comprende el espermatozoide) entre los electrodos se mide con el tiempo, los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden compararse con los datos de referencia predefinidos de diferentes maneras. En las realizaciones, la comparación puede comprender diferentes tipos de análisis de datos matemáticos y/o estadísticos conocidos en la técnica. Los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden comprender los datos (de señal) de impedancia medidos (en primer lugar) a lo largo del tiempo y, por ejemplo, pueden analizarse directamente y compararse con datos de referencia predefinidos. Los datos de impedancia dependientes del tiempo también pueden transformarse y/o visualizarse en la fase de comparación mediante técnicas conocidas en la técnica y compararse con datos de referencia predefinidos. En una realización, los datos pueden almacenarse en una memoria (temporal) y solo se usa el valor más alto para comparar con datos de referencia predefinidos. En otra realización, los valores de impedancia dependientes del tiempo máximo y mínimo se comparan con datos de referencia predefinidos, especialmente la diferencia entre el valor de impedancia máximo y mínimo puede calcularse (en la fase de comparación) y compararse con los valores comprendidos por los datos de referencia predefinidos. De acuerdo con la presente invención, los datos de impedancia dependientes del tiempo comprenden una curva de medición (corregida) (datos) y los datos de referencia predefinidos comprenden una curva de impedancia de referencia de un espermatozoide normal y/o una curva de referencia (datos) de un espermatozoide anormal, y la curva de impedancia de medición se compara con la(s) curva(s) de impedancia de referencia o los datos de la(s) curva(s) de impedancia de referencia. Adicionalmente, la curva de medición también puede ser proporcionada por un modelo de ajuste óptimo de los datos medidos y comparada con un modelo matemático de una curva de impedancia de referencia de un espermatozoide normal (en cuanto a morfología) y/o un modelo matemático de curva de referencia de un espermatozoide anormal en cuanto a morfología o diferentes tipos de espermatozoides anormales en cuanto a morfología o incluso otro material particulado. Una curva de medición puede estar representada por datos y por una representación gráfica de los datos. Especialmente, en las realizaciones, una curva de medición puede comprender datos así como una representación gráfica, especialmente en donde los datos pueden usarse con fines de comparación y especialmente la representación gráfica con fines ilustrativos. Sin embargo, en otras realizaciones, como alternativa o adicionalmente, la representación gráfica se puede usar con fines de comparación (únicamente).

La invención también incluye realizaciones que usan técnicas de comparación alternativas. Si la impedancia se mide con el tiempo cuando un espermatozoide pasa entre los electrodos, en la señal medida (impedancia) (a lo largo del tiempo) se puede observar un aumento y una disminución en la impedancia causada por la cabeza del espermatozoide. El aumento y la disminución de la impedancia pueden representarse (gráficamente) mediante un pico. Para un espermatozoide normal (en cuanto a morfología), una cola posterior del espermatozoide que pasa entre los electrodos solo puede tener un efecto en la señal de impedancia medida entre los electrodos en un grado muy limitado. Por ende, un espermatozoide normal en cuanto a morfología puede mostrar sustancialmente solo un aumento gradual seguido de una disminución gradual de la señal medida (impedancia) (a lo largo del tiempo) en la que la disminución puede mostrar cierta disminución. El pico puede ser sustancialmente simétrico, especialmente cuando se usa un campo eléctrico homogéneo entre los electrodos. En el presente documento, "simétrico" significa que el pico o la curva muestra simetría sobre un eje, es decir, el borde delantero del pico muestra aproximadamente la misma forma (pero reflejada) que el borde trasero de ese pico. Es más, varios espermatozoides normales (en cuanto a morfología) pueden mostrar una señal (impedancia) sustancial medida igualmente. Es más, los espermatozoides normales diferentes (sus mediciones) pueden mostrar sustancialmente la misma forma de la curva de medición (con el tiempo), especialmente cuando los espermatozoides fluyen sustancialmente a través de la misma ubicación entre los electrodos. Especialmente, la expresión "curva de medición" se refiere a una señal de impedancia medida en función del tiempo.

Cuando un espermatozoide anormal (en cuanto a morfología) fluye entre el par de electrodos y la impedancia se mide con el tiempo, la señal medida (impedancia) puede diferir sustancialmente de la observada en el espermatozoide normal. Especialmente, una anomalía en forma de la presencia de una gota citoplasmática, por ejemplo, puede mostrar sustancialmente el mismo pico en la curva de medición que muestra un espermatozoide normal. Sin embargo, además del pico simétrico sustancial, un pico adicional (pequeño) puede estar presente en la curva de medición causado por la impedancia (adicional) inducida por la gota citoplasmática. Por ende, la gota citoplasmática puede estar representada por un (segundo) pico pequeño identificable. La gota citoplasmática también se puede identificar por una asimetría adicional o una punta en la curva de medición. Especialmente, el segundo pico puede superponerse al primer pico y puede identificarse por una punta (pico) en la curva de medición. Por ende, el sistema y el método descritos en el presente documento permiten identificar la presencia de la gota citoplasmática y dirigir aún más el espermatozoide anormal a otra salida del canal de flujo de fluido (a la que puede dirigirse un espermatozoide normal). Especialmente, un espermatozoide anormal comprende una característica

(pre)determinada, especialmente una gota citoplasmática. Especialmente, el sistema y el método tal y como se describen en el presente documento pueden identificar la presencia de la gota citoplasmática en función de una curva de medición asimétrica para dirigir adicionalmente el espermatozoide anormal a una de las salidas. Especialmente, el sistema y el método tal y como se describen en el presente documento pueden identificar un espermatozoide normal en función de una curva de medición sustancialmente simétrica para dirigir adicionalmente el espermatozoide normal a una de las salidas, especialmente mientras dirige otro material particulado a otra salida.

Para facilitar el posicionamiento de los espermatozoides (entre los electrodos), se puede configurar una zona de enfoque opcional aguas arriba de la zona de análisis. Especialmente, la zona de enfoque está configurada para dirigir un espermatozoide a una ubicación específica en el flujo de fluido, especialmente hacia un eje central del canal de flujo de fluido, especialmente hacia el eje del canal de flujo de fluido (en la ubicación de la zona de enfoque). Las células espermáticas de enfoque pueden proporcionarse mediante adaptaciones especiales en el canal de flujo, como pequeñas restricciones o un estrechamiento del canal de flujo. El enfoque puede proporcionarse adicionalmente mediante la aplicación de ultrasonido. Sin embargo, se descubrió que los espermatozoides pueden posicionarse ventajosamente sin perder viabilidad al someter el espermatozoide a un campo eléctrico no uniforme. De este modo, en el presente documento, la invención también proporciona que el posicionamiento de un espermatozoide dentro del canal de flujo pueda controlarse mediante fuerzas dielectroforéticas (en la zona de enfoque).

También en la zona de clasificación, un espermatozoide se puede dirigir ventajosamente a una salida específica que proporciona fuerzas dielectroforéticas en el espermatozoide.

Por ende, se pueden proporcionar fuerzas dielectroforéticas en la zona de enfoque y/o en la zona de clasificación para dirigir un espermatozoide. Las fuerzas dielectroforéticas pueden proporcionarse especialmente en la zona de clasificación e incluso más especialmente en la zona de enfoque y la zona de clasificación.

Por ende, en una realización, el sistema, especialmente el dispositivo de clasificación, comprende un primer dispositivo electromagnético para proporcionar un campo eléctrico en la zona de clasificación, y el primer dispositivo electromagnético está configurado para dirigir el espermatozoide mediante una fuerza dielectroforética (dielectroforesis) (en la zona de clasificación). De esta forma, se puede llevar a cabo la clasificación de los espermatozoides.

En una realización adicional, el sistema comprende un segundo dispositivo electromagnético para proporcionar un campo eléctrico en la zona de enfoque. Especialmente, el segundo dispositivo electromagnético está configurado para dirigir el espermatozoide mediante fuerza dielectroforética, especialmente al eje del canal de flujo de fluido. De esta forma, los espermatozoides pueden verse impulsados a fluir, por ejemplo, sustancialmente en el medio del eje del canal de flujo de fluido.

Por ejemplo, la fuerza dielectroforética se puede proporcionar aplicando un campo eléctrico en el intervalo de MHz utilizando los microelectrodos integrados en el chip. Especialmente, el enfoque y la clasificación de las células se pueden realizar aplicando una excitación sinusoidal de 10 MHz, $6 V_{pp}$ mediante los dispositivos electromagnéticos primero y/o segundo y los dispositivos electromagnéticos primer y/o segundo están configurados para proporcionar estas excitaciones. Especialmente, una fuerza dielectroforética pueden proporcionarla al menos dos electrodos. Especialmente, los electrodos pueden estar en contacto físico con el fluido (en el canal de flujo de fluido). En una realización, la fuerza dieléctrica es proporcionada por dos electrodos, especialmente aplicando un campo eléctrico de CA o CC, especialmente y un campo eléctrico CA, entre los dos electrodos. Especialmente, un espermatozoide u otro material particulado pueden dirigirse en la dirección (o en oposición a la dirección) de las líneas de campo del campo eléctrico. En una realización adicional, la fuerza dielectroforética la proporcionan cuatro electrodos, especialmente un primer conjunto de dos electrodos y un segundo conjunto de dos electrodos, especialmente en donde se aplica un primer campo eléctrico (CA o CC) entre el primer conjunto de dos electrodos y se aplica un segundo campo eléctrico (CA o CC) entre el segundo conjunto de dos electrodos. Especialmente, al disponer el primer conjunto de electrodos aguas arriba del segundo conjunto de electrodos, se puede proporcionar una fuerza dieléctrica para dirigir un espermatozoide. Especialmente, los dos electrodos del primer conjunto (de electrodos) pueden configurarse a 0° y 180° respectivamente con respecto al eje de flujo de fluido. Especialmente, los dos electrodos del segundo conjunto (de electrodos) pueden configurarse respectivamente a 90° y 270° con respecto al eje del canal de flujo de fluido. Los dos conjuntos de electrodos pueden configurarse en al menos un plano perpendicular al eje del canal de flujo de fluido. Especialmente, los dos conjuntos de electrodos pueden configurarse en dos planos perpendiculares al eje del canal de flujo de fluido, especialmente cada conjunto en un plano perpendicular al canal de flujo de fluido. Especialmente, de esta forma, un espermatozoide puede dirigirse en un plano perpendicular al eje del canal de flujo de fluido. Especialmente, un espermatozoide puede dirigirse al eje del canal de flujo de fluido. En una realización adicional, el enfoque se proporciona mediante ultrasonido.

Un espermatozoide normal (en cuanto a morfología) (de un toro y/o un jabalí) puede tener un tamaño de cabeza de 8-9 μm en una primera dirección paralela a un eje longitudinal de la cabeza, y 4-5 μm en una segunda dirección perpendicular al eje longitudinal, y menos de 1 μm en una tercera dirección perpendicular a la primera y segunda dirección, y una cola de 40 - 45 μm . Un espermatozoide que comprende una gota citoplasmática también puede

tener sustancialmente la misma dimensión que el espermatozoide normal en cuanto a morfología, con la excepción de que comprende una gota, que normalmente se posiciona en algún punto en el medio de la cola de los espermatozoides (una gota citoplasmática distal) o detrás de la cabeza (una gota citoplasmática proximal). La cabeza de un espermatozoide no es sustancialmente redonda, sino que puede ser relativamente plana, especialmente en la tercera dirección. Por ende, también puede ser ventajoso disponer una restricción en el canal de flujo de fluido configurado para orientar el espermatozoide que se va a analizar teniendo la cabeza en una dirección específica. Especialmente, se puede configurar una restricción para girar el espermatozoide alrededor de su eje longitudinal. Especialmente, una zona de orientación, que comprende dicha restricción, puede proporcionarse en el canal de flujo de fluido aguas abajo de la zona de enfoque y aguas arriba de la zona de análisis. Por ende, en una realización, el sistema comprende además una zona de orientación configurada aguas abajo de la entrada y (si está presente) de la zona de enfoque opcional y aguas arriba de la zona de análisis, en donde la zona de orientación comprende al menos una restricción (un elemento) en el canal de flujo de fluido para orientar el espermatozoide. La orientación puede comprender la rotación del espermatozoide alrededor de su eje longitudinal. De forma adicional o como alternativa, la orientación puede comprender alinear (el eje longitudinal del) espermatozoide con el eje del canal de flujo de fluido en la ubicación del par de electrodos, especialmente en donde la cabeza del espermatozoide está dispuesta más abajo que la cola. Por ende, la orientación puede comprender alinear un espermatozoide con el eje del canal de flujo de fluido en el que la cabeza del espermatozoide está dispuesta más abajo de la cola (del espermatozoide) y especialmente girar el espermatozoide alrededor de su eje para proporcionar un ángulo sustancialmente constante entre la tercera dirección de la cabeza del espermatozoide y las líneas del campo electromagnético (entre el par de electrodos). Se ha observado que la orientación también puede proporcionarse mediante fuerzas dielectroforéticas. Por ende, las fuerzas dielectroforéticas pueden usarse para dirigir un espermatozoide a una dirección específica. Como alternativa o de manera adicional, se pueden aplicar fuerzas dielectroforéticas para dirigir y posicionar un espermatozoide en una ubicación específica. Especialmente, una zona de enfoque que comprende un dispositivo electromagnético configurado para dirigir un espermatozoide también puede proporcionar una orientación del espermatozoide. Por ende, la funcionalidad de la zona de orientación (opcional) también puede estar comprendida en la zona de enfoque (opcional). Especialmente, en una realización, el segundo dispositivo electromagnético (para dirigir un espermatozoide en la zona de enfoque) está configurado además para orientar el espermatozoide (en la zona de enfoque).

La señal de impedancia medida puede ser sensible a pequeñas perturbaciones (ruido), presentes internamente en el sistema, así como a perturbaciones (ruido) presentes externamente respecto del sistema. Por ejemplo, pequeñas fluctuaciones en la conductividad del fluido, en la señal eléctrica proporcionada a los electrodos, o las fluctuaciones de cualquier radiación electromagnética externa del sistema, pueden tener todas un efecto en la señal de impedancia medida. Por ende, de acuerdo con la invención, un segundo par (o adicionalmente incluso más pares, tales como un tercero, un cuarto, un quinto o incluso un décimo par) de electrodos (aguas abajo del primer par de electrodos) se proporciona en la zona de análisis y se mide la impedancia en ubicaciones sucesivas en la zona de análisis. Puede ser ventajoso que un par de electrodos comprenda un electrodo primario para conectarse a la fuente eléctrica y un electrodo de medición para conectarse al dispositivo de medición. Sin embargo, la locución "par de electrodos" (o el término "par") no solo se refiere a "dos" electrodos. Un par de electrodos también puede referirse a un par de electrodos que comprenden un electrodo primario y dos o más electrodos de medición. De igual manera, dos pares de electrodos pueden comprender solo un electrodo primario (mutuo) y dos electrodos de medición. Un par de electrodos puede referirse además a uno o más electrodos primarios y uno o más electrodos de medición. Especialmente, un electrodo primario puede estar compuesto por uno o más pares de electrodos. Especialmente, al usar dos (o más) pares de electrodos, los datos de impedancia dependientes del tiempo (para un espermatozoide) pueden proporcionarse en función de las señales de impedancia medidas entre el primer par de electrodos y la señal de impedancia medida entre el segundo par de electrodos (y, si los hay, también entre los pares de electrodos adicionales). Si se usan dos (o más) pares de electrodos en el sistema, se puede detectar un espermatozoide varias veces y se puede generar información adicional sobre el espermatozoide que se puede utilizar para reducir el efecto del ruido. Las señales de impedancia medidas de los dos o más pares de electrodos pueden promediarse, por ejemplo, para proporcionar los datos de impedancia dependientes del tiempo (usando diferentes marcas de tiempo para corregir el tiempo requerido para fluir desde el primer par de electrodos al(a los) par(es) sucesivo(s) de electrodos) para eliminar parte del ruido y/o mejorar una posible corrección de la línea de base (deriva). Sin embargo, sorprendentemente, se descubrió que al usar dos pares de electrodos y realizar mediciones diferenciales, el efecto de los errores en el sistema puede disminuir sustancialmente en comparación con los registros de impedancia separados. Al restar (diferencialmente) las señales de los dos pares de electrodos (en donde los puntos de datos medidos al mismo tiempo en el primer par y el segundo par de electrodos se restan entre sí), se resuelve un error en el sistema que está presente dentro de la espectroscopía de impedancia. Especialmente, al restar (diferencialmente) las señales se proporciona una señal diferencial de datos de impedancia dependiente del tiempo. Al usar una señal diferencial, un espermatozoide que pasa está representado en una curva de medición (datos de impedancia dependientes del tiempo configurados como) por un pico positivo (que comprende valores de impedancia diferencial positivos) seguido de un pico negativo (que comprende valores de impedancia diferencial negativa). La forma de la curva de medición (o cualquier otro tipo de datos de impedancia dependientes del tiempo en función de una diferencia entre los datos medidos del primer y el segundo par de electrodos) contiene información sobre la presencia de una anomalía, especialmente un espermatozoide que comprende una morfología anormal, como especialmente una gota citoplasmática. Un espermatozoide normal (en cuanto a morfología) muestra un pico positivo y negativo causado por la cabeza del espermatozoide en la curva de medición (la señal diferencial).

Especialmente el pico negativo puede exhibir un pico de cola causado por la cola del espermatozoide (para una cabeza del espermatozoide que viaja primero entre los electrodos). Sin embargo, un espermatozoide que comprende una anomalía morfológica, como una gota citoplasmática, muestra una punta adicional (o pico adicional) entre el pico negativo y la cola del pico negativo de la señal diferencial (impedancia). Especialmente, la sustracción diferencial comprende restar un (segundo) punto de datos medido a la vez en el segundo par de electrodos de un (primer) punto de datos medido en dicho tiempo en el primer par de electrodos (o viceversa). Por supuesto, esto puede hacerse para una pluralidad de segundos puntos de datos y primeros puntos de datos.

Por ende, la invención proporciona el sistema, en donde la zona de análisis comprende además un segundo par de electrodos que comprende una segunda distancia entre electrodos y configurada a una distancia entre electrodos del primer par de electrodos, y en donde (i) la fuente eléctrica está configurada para proporcionar además una señal eléctrica al segundo par de electrodos; y (ii) el dispositivo de medición está adicionalmente acoplado funcionalmente al segundo par de electrodos y configurado para medir adicionalmente una segunda impedancia en función del tiempo del fluido entre el segundo par de electrodos y configurado para proporcionar los datos de impedancia dependientes del tiempo en función de la primera impedancia y la segunda impedancia. La distancia entre electrodos se define especialmente como la distancia más corta entre el primer par de electrodos y el segundo par de electrodos.

El primer par de electrodos está configurado especialmente en dos lados opuestos del canal de flujo, con el canal de flujo entre medias. De igual manera, el segundo par de electrodos está configurado especialmente en dos lados opuestos del canal de flujo, con el canal de flujo entre medias. Especialmente, la distancia entre un electrodo de un par de electrodos y el eje del canal de flujo de fluido es igual a la distancia entre otro electrodo del par de electrodos y el eje del canal de flujo de fluido. El primer par de electrodos y el segundo par de electrodos están especialmente configurados para estar en contacto físico con un fluido que fluye entre los electrodos. Los electrodos de los pares de electrodos comprenden material conductor de electricidad, como un metal u otro material conductor. Especialmente, los electrodos pueden comprender uno o más metales seleccionados del grupo que consiste en hierro, cobre, aluminio, oro, plata, níquel, platino, titanio, tantalio, estaño y sus aleaciones. En una realización, los electrodos comprenden platino y/o titanio. En una realización adicional, los electrodos (también) comprenden tantalio y/o titanio. Como alternativa o de manera adicional, los electrodos pueden (también) comprender grafito.

De acuerdo con la presente invención, los datos relacionados con la impedancia dependiente del tiempo se basan en una diferencia entre un valor absoluto de la primera impedancia en un tiempo y un valor absoluto de la segunda impedancia en dicho tiempo. Sin embargo, en otra realización, la impedancia dependiente del tiempo puede basarse en los valores promedio de las señales medidas (impedancia) del primer y segundo par de electrodos.

Los datos de impedancia dependientes del tiempo basados en dos pares de electrodos pueden comprender sustancialmente los mismos datos proporcionados con solo un par de electrodos. Es más, los datos de impedancia dependientes del tiempo proporcionados en la presente invención que comprenden dos pares de electrodos comprenden los datos basados en el primer par de electrodos, datos basados en el segundo par de electrodos y datos procesados basados en los datos de medición del primer y segundo par de electrodos.

Además, los datos de referencia predefinidos en la invención que comprenden dos pares de electrodos pueden comprender los mismos datos de referencia basados en un solo par de electrodos, especialmente los datos de impedancia predefinidos basados en dos pares de electrodos pueden comprender los datos de referencia con respecto al primer par de electrodos, los datos de referencia con respecto al segundo par de electrodos y los datos de referencia con respecto a los datos procesados del primer y segundo par de electrodos. Por ende, al predefinir los datos de referencia en función de la representación de los datos de impedancia dependientes del tiempo, la clasificación (su método) de los espermatozoides en el ejemplo que comprende un par de electrodos y la realización de la presente invención que comprende dos pares de electrodos es sustancialmente la misma. Especialmente, los datos de referencia pueden contener información para (que permite) clasificar entre espermatozoides en función de una característica, especialmente para clasificar entre los espermatozoides normales en cuanto a morfología y los espermatozoides que comprenden una anomalía morfológica, como una gota citoplasmática. Especialmente, los datos de referencia también pueden contener información para clasificar entre un espermatozoide y uno o más materiales particulados. Por ende, en una realización, los datos de referencia contienen información sobre la presencia y/o ausencia de una anomalía morfológica. En una realización adicional, los datos de referencia contienen información sobre la presencia y/o ausencia de una gota citoplasmática. En una realización adicional, los datos de referencia contienen información sobre una característica (adicional) de espermatozoides. En una realización adicional más, los datos de referencia contienen información sobre un material particulado, especialmente restos. Además, los datos de referencia pueden incluir información sobre una desviación respecto de los datos de referencia dentro de los cuales una especie que se va a clasificar pertenece a una clase específica (como esperma normal o esperma anormal) o fuera de la cual una especie que se va a clasificar no pertenece a una clase específica (tal como esperma anormal o esperma normal). Especialmente, una característica de un espermatozoide anormal puede diferir de la característica de un espermatozoide normal (tal y como conoce el experto en la materia).

Por ende, la invención proporciona un sistema para clasificar un espermatozoide en un fluido, especialmente un sistema para realizar análisis y selección de espermatozoides en función de una característica de espermatozoide

de los espermatozoides, especialmente en función de la morfología de los espermatozoides, comprendiendo el sistema: (i) un canal de flujo de fluido para el transporte de dicho fluido, comprendiendo el canal de flujo de fluido una entrada, una zona de análisis configurada aguas abajo de dicha entrada y que comprende un primer par de electrodos que comprende una primera distancia entre electrodos y un segundo par de electrodos que comprende una segunda distancia entre electrodos y configurada a una distancia entre electrodos del primer par de electrodos, (al menos dos) salidas configuradas aguas abajo de dicha zona de clasificación y, opcionalmente, una zona de enfoque configurada aguas abajo de dicha entrada y aguas arriba de dicha zona de análisis; (ii) una fuente eléctrica configurada para proporcionar una señal eléctrica al primer par de electrodos y una señal eléctrica al segundo par de electrodos; (iii) un dispositivo de medición acoplado funcionalmente al primer par de electrodos y al segundo par de electrodos y configurado para medir una primera impedancia en función del tiempo del fluido entre el primer par de electrodos y para medir una segunda impedancia en función del tiempo del fluido entre el segundo par de electrodos, y para proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo en función de la primera impedancia y la segunda impedancia; (iv) un dispositivo de clasificación configurado para clasificar espermatozoides dirigiendo el espermatozoide en la zona de clasificación a una de las salidas en función de una comparación en una fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos.

El sistema puede aplicarse para analizar y clasificar un espermatozoide en un fluido. El sistema puede aplicarse especialmente para analizar un espermatozoide en un fluido. Especialmente, para el objetivo de analizar un espermatozoide en un fluido, el espermatozoide no tiene por qué ser clasificado. Por ende, la invención también proporciona en un aspecto adicional un sistema para analizar un espermatozoide en un fluido, comprendiendo el sistema para analizar un espermatozoide: (i) un canal de flujo de fluido para el transporte de dicho fluido, comprendiendo el canal de flujo de fluido una entrada, una zona de análisis configurada aguas abajo de dicha entrada y que comprende un primer par de electrodos que comprende una primera distancia entre electrodos y un segundo par de electrodos que comprende una segunda distancia entre electrodos y configurada a una distancia entre electrodos del primer par de electrodos, (una salida configurada aguas abajo de dicha zona de análisis) y, opcionalmente, una zona de enfoque configurada aguas abajo de dicha entrada y aguas arriba de dicha zona de análisis; (ii) una fuente eléctrica configurada para proporcionar una señal eléctrica al primer par de electrodos y una señal eléctrica al segundo par de electrodos; (iii) un dispositivo de medición acoplado funcionalmente al primer par de electrodos y al segundo par de electrodos y configurado para medir una primera impedancia en función del tiempo del fluido entre el primer par de electrodos y para medir una segunda impedancia como función del tiempo del fluido entre el segundo par de electrodos, y proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo en función de la primera impedancia y la segunda impedancia; y en donde el espermatozoide se analiza en función de una comparación en una fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos. Especialmente, el análisis puede comprender la determinación de las características de los espermatozoides, especialmente la cantidad de espermatozoides anormales en cuanto a morfología en el esperma. Especialmente, el sistema (especialmente el sistema para analizar un espermatozoide en un fluido) comprende un sistema para realizar análisis de espermatozoides, especialmente en función de una característica de un espermatozoide, especialmente la morfología de espermatozoide de los espermatozoides.

Las dimensiones de los sistemas descritos en el presente documento pueden configurarse especialmente para transportar un fluido que comprende un espermatozoide y posicionar el espermatozoide, especialmente en el centro del canal de flujo, especialmente en el eje del canal de flujo de fluido en la zona de enfoque.

Los electrodos, están especialmente configurados además para no obstruir el flujo de fluido en el canal de flujo. Puede ser ventajoso incorporar los electrodos en una pared del canal de flujo de fluido, o en dos paredes en lados opuestos del eje del canal de flujo de fluido. En una realización, los electrodos están integrados en la pared del canal de flujo (en la zona de análisis). Especialmente, los electrodos son microelectrodos. En una realización adicional, una pequeña región de una pared del canal de flujo de fluido se elimina por grabado y se reemplaza por un metal u otro material eléctricamente conductor configurado como un electrodo para proporcionar un (micro)electrodo integrado (en la pared). En una realización, al menos dos pequeñas regiones de la pared del canal de flujo de fluido se eliminan mediante grabado y se reemplazan por un material conductor configurado como electrodos para proporcionar (en la pared) (micro)electrodos integrados.

Los electrodos que proporcionan un par de electrodos pueden configurarse especialmente a una distancia entre electrodos que permite que pase un espermatozoide. Especialmente un electrodo puede comprender un ancho, una longitud y una altura. En el presente documento, la distancia entre electrodos es la distancia más pequeña entre electrodos de un par de electrodos. Sin embargo, una gran distancia entre electrodos puede tener un efecto negativo en la sensibilidad de la medición. Por ende, una diferencia entre electrodos es preferible en el intervalo de más grande que (una vez) el tamaño de la cabeza de un espermatozoide y no más grande que 5 veces el tamaño de la cabeza de un espermatozoide. Especialmente, la distancia entre electrodos entre un par de electrodos está en el intervalo de 5 - 400 μm , especialmente 5-20 μm . Por ende, en una realización, la invención proporciona el sistema, en donde la primera distancia entre electrodos se selecciona del intervalo de 5 - 400 μm , especialmente en el intervalo de 5-20 μm . En una realización adicional, la segunda distancia entre electrodos también se selecciona del intervalo de 5 - 400 μm , especialmente en el intervalo de 5-20 μm . Especialmente, en realizaciones que comprenden un segundo par de electrodos, la primera distancia entre electrodos y la segunda distancia entre electrodos se

seleccionan para que sean sustancialmente las mismas. En una realización, la primera distancia entre electrodos y la segunda distancia entre electrodos son sustancialmente las mismas, especialmente la primera distancia entre electrodos y la segunda distancia entre electrodos son sustancialmente de 10 μm . En otra realización, la primera distancia entre electrodos y la segunda diferencia entre electrodos son sustancialmente de 20 μm . En otra realización más, la primera distancia entre electrodos y la segunda diferencia entre electrodos no son las mismas. En una realización específica, la pared del canal de flujo de fluido (en la zona de análisis) comprende los electrodos. Especialmente, en dicha realización, la distancia (primera y segunda) entre electrodos puede ser igual a una dimensión específica del canal de flujo de fluido, tal como una altura, o un ancho o un diámetro del canal de flujo de fluido.

El canal de flujo de fluido descrito en el presente documento puede comprender una sección transversal (del canal de flujo de fluido y abierta para flujo de fluido) perpendicular al eje del canal de flujo de fluido y comprende una primera dimensión del canal de flujo de fluido y una segunda dimensión del canal de flujo de fluido perpendicular a la primera dimensión.

En las realizaciones, el canal de flujo de fluido puede comprender una sección transversal circular o una sección transversal sustancialmente cuadrada. Especialmente, la primera dimensión y la segunda dimensión del canal de flujo de fluido pueden ser sustancialmente las mismas.

La primera dimensión y la segunda dimensión del canal de flujo de fluido también pueden diferir entre sí y la sección transversal puede comprender, por ejemplo, una selección transversal rectangular, o incluso de otro tipo.

Especialmente, la distancia entre electrodos está configurada para ser sustancialmente igual o menor que la primera dimensión del canal de flujo de fluido y/o la segunda dimensión del canal de flujo de fluido (en la ubicación del par de electrodos).

El canal de flujo de fluido está especialmente configurado para transportar espermatozoides, véase lo expuesto anteriormente. Por ende, las dimensiones mínimas (en sección transversal) del canal de flujo de fluido deben permitir que pase un espermatozoide. Por ende, la primera dimensión del canal de flujo de fluido y la segunda dimensión del canal de flujo de fluido se seleccionan al menos para permitir un espermatozoide en el canal de flujo de fluido. El canal de flujo de fluido puede comprender además restricciones u otros medios para enfocar u orientar un espermatozoide. Por ende, especialmente la primera dimensión del canal de flujo de fluido se selecciona en el intervalo de 5 - 400 μm , especialmente en el intervalo de 5 - 200 μm , especialmente 5 - 100 μm , tal como 10-20 μm . La segunda dimensión del canal de flujo de fluido se selecciona en el intervalo de 5 - 400 μm , especialmente en el intervalo de 5 a 200 μm , especialmente 5 - 100 μm , tal como 10 - 20 μm . Por ende, en una realización, la invención proporciona el sistema, en donde la primera dimensión del canal de flujo de fluido se selecciona del intervalo de 5 - 400 μm y la segunda dimensión del canal de flujo de fluido se selecciona en el intervalo de 5 - 400 μm . Especialmente, el área de la sección transversal (del canal de flujo de fluido) es de al menos 100 μm^2 , tal como en el intervalo de 100 - 10.000 μm^2 . Las diferentes zonas (zona de análisis, zona de clasificación, así como zona de enfoque opcional y zona de orientación) en el canal de flujo pueden comprender (todas) dimensiones que difieren entre sí. Especialmente, sin embargo, las dimensiones (de la sección transversal) de una primera zona en el lado más aguas abajo de la primera zona pueden ser sustancialmente iguales a las dimensiones (de la sección transversal) en el lado más aguas arriba de una segunda zona en contacto con la primera zona y disponerse aguas abajo de la primera zona. Las expresiones "primera dimensión" y "segunda dimensión" se refieren especialmente a la altura y al ancho, respectivamente. En el supuesto de que el canal de flujo de fluido tuviera una sección transversal cuadrada o circular, la primera dimensión y la segunda dimensión serían idénticas.

Para una pequeña distancia entre los pares de electrodos, una parte significativa de un espermatozoide, como la cabeza del espermatozoide, puede estar presente entre (o detectarse mediante) el primer par de electrodos, así como entre el segundo par de electrodos. La medición de la impedancia entre el primer par de electrodos puede afectar la medición de la impedancia entre el segundo par de electrodos, y viceversa. Especialmente, la distancia entre electrodos es la distancia más corta entre (un electrodo del) primer par de electrodos y (un electrodo del) segundo (o más) par(es) de electrodos. Especialmente, si el primer par de electrodos y el segundo par de electrodos comprenden el mismo (contra)electrodo (mutuo), la distancia entre electrodos es la distancia más corta entre un electrodo, que no es el electrodo mutuo, del primer par de electrodos y un electrodo, que no es el electrodo mutuo, del segundo (o más) par(es) de electrodos. Las grandes distancias entre electrodos requieren una zona de análisis más amplia y pueden generar pérdida de información debido a que las mediciones pueden volverse más sensibles a la deriva. Las grandes distancias entre electrodos también pueden requerir un rendimiento reducido, especialmente cuando se realizan mediciones diferenciales. Especialmente, puede ser ventajoso que los dos pares de electrodos estén configurados a una distancia entre electrodos en la que la medición de la primera impedancia no afecte la medición de la segunda impedancia, especialmente, en donde la distancia entre los dos electrodos se minimiza. Por ende, en una realización, la distancia entre electrodos se selecciona del intervalo de 10 - 100 μm , especialmente 15 - 60 μm , tal como aproximadamente 20 - 40 μm .

El chip puede ser especialmente un chip de PDMS. Por lo tanto, el canal de flujo de fluido puede estar compuesto por un chip (de PDMS).

Se divulga un método para clasificar los espermatozoides, especialmente entre los espermatozoides que comprenden una característica (determinada) y los espermatozoides que no comprenden la característica (determinada), especialmente entre los espermatozoides normales (en cuanto a morfología) y los espermatozoides anormales (en cuanto a morfología), sin que el método forme parte de la presente invención, en donde el método para clasificar espermatozoides comprende: proporcionar un flujo de fluido que comprende un espermatozoide en un canal de flujo de fluido, en donde el canal de flujo de fluido comprende un primer par de electrodos; enfocar opcionalmente el espermatozoide en el canal de flujo de fluido; proporcionar una señal eléctrica al primer par de electrodos y medir una primera impedancia (señal) (eléctrica) en función del tiempo del fluido entre el primer par de electrodos para proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo; y clasificar los espermatozoides en función de la comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con los datos de referencia predefinidos en una fase de comparación. Especialmente, la clasificación puede comprender la separación física de los espermatozoides. Especialmente, la clasificación se basa en una característica de un espermatozoide, especialmente, para determinar una morfología del espermatozoide. Por ende, el método es un método *ex vivo*.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método tal y como se indica en la reivindicación 9. En el método, se mide la impedancia (eléctrica) (señal). Especialmente, los datos de impedancia dependientes del tiempo comprenden la primera impedancia en función del tiempo. En consecuencia, los espermatozoides pueden clasificarse en función de la comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos, especialmente, datos de referencia predefinidos que comprenden características de un espermatozoide anormal y características de un espermatozoide normal. Especialmente, la clasificación de los espermatozoides (entre un espermatozoide anormal y normal) puede basarse en la comparación de (la simetría de) una curva de medición que comprende los datos de impedancia dependientes del tiempo con (la simetría de) una curva simétrica. Especialmente, la clasificación de los espermatozoides puede comprender la clasificación entre un espermatozoide que no comprende una gota citoplasmática y un espermatozoide que comprende una gota citoplasmática. Por ende, la invención proporciona un método que incluye (a) una fase de enfoque opcional, (b) una fase de análisis, (c) una fase de comparación y (d), opcionalmente, una fase de clasificación, en donde en la fase de análisis se aplica el dispositivo de sensor tal y como se ha descrito en el presente documento, comprendiendo especialmente el dispositivo de sensor el dispositivo de medición configurado para proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo.

Especialmente, el método puede comprender usar el sistema para clasificar un espermatozoide tal y como se ha descrito en el presente documento. Especialmente, el sistema para clasificar un espermatozoide puede comprender el método descrito en el presente documento.

En una realización, el fluido comprende espermatozoides de jabalí. En otra realización, el fluido comprende espermatozoides de ganado bovino, especialmente espermatozoides de toro. Especialmente, el fluido en el método y el sistema para clasificar espermatozoides tal y como se describe en el presente documento puede comprender espermatozoides en una concentración de 210^3 - 210^8 células/ml.

La espectroscopía de impedancia se conoce en la técnica para el análisis sin etiquetas de células adherentes o células en suspensión. Esta técnica se ha utilizado ampliamente para investigar las propiedades dieléctricas de las células en los sistemas microfluídicos. Cuando se introduce un espermatozoide entre un par de electrodos, las propiedades capacitivas y resistivas se verán alteradas por la membrana celular (capacidad) y el citoplasma de la célula (resistencia_{cyt}), respectivamente. Se puede mostrar un efecto significativo de una doble capa sobre la impedancia absoluta. Debido a una pequeña área superficial del electrodo, la impedancia puede disminuir en un amplio intervalo de frecuencia. Sin embargo, en función de las propiedades de los electrodos, el canal de flujo y el fluido (que comprende un espermatozoide), a una frecuencia específica se puede formar una meseta resistiva. Se ha mostrado que en el sistema y el método tal y como se describen en el presente documento, una frecuencia de medición de 1,3 MHz es una opción apropiada para el análisis de impedancia de esperma en esta configuración. En una realización, se proporciona el método, en donde medir la impedancia comprende medir la impedancia a una frecuencia de 1,3 MHz. Además, puede ser ventajoso aplicar múltiples frecuencias al mismo tiempo, especialmente frecuencias que no interfieren entre sí. Por ende, en una realización, se proporciona el método, en donde medir la impedancia comprende medir la impedancia a una frecuencia seleccionada del intervalo de 10 kHz - 100 MHz. En el presente documento, el término "frecuencia" también puede relacionarse con una pluralidad de frecuencias (diferentes).

El espermatozoide en el flujo de fluido puede dirigirse, especialmente hacia el centro del canal de flujo de fluido, especialmente al eje del canal de flujo de fluido. Especialmente, dirigir (enfocar) el espermatozoide en el centro del canal de flujo de fluido puede mejorar la reproducibilidad del método. Dirigir un espermatozoide puede comprender dirigir el espermatozoide en el flujo de fluido. También puede comprender dirigir el flujo de fluido, incluido el espermatozoide. Por ende, en una realización del método, enfocar el espermatozoide comprende proporcionar un flujo de fluido adicional de un líquido direccionador al canal de flujo de fluido. Es más, en una realización, el sistema comprende además una o más entradas adicionales en la zona de enfoque configuradas para proporcionar un flujo adicional de un líquido direccionador en el canal de flujo de fluido. Proporcionar un líquido direccionador adicional también puede diluir ventajosamente el fluido en el canal de flujo de fluido. Especialmente, en un fluido más diluido,

los espermatozoides pueden transportarse más separados (en una dirección longitudinal en el canal de flujo) entre sí, lo que puede afectar positivamente la medición. Como alternativa o de manera adicional, el espermatozoide se puede dirigir en el líquido, especialmente aplicando fuerzas dielectroforéticas sobre el espermatozoide. Por ende, en una realización adicional, se proporciona un campo eléctrico no uniforme en la zona de enfoque, y enfocar el espermatozoide comprende proporcionar un campo eléctrico no uniforme en el espermatozoide para dirigir el espermatozoide en el flujo de fluido. Especialmente, un campo eléctrico no uniforme comprende una fuerza dielectroforética.

Especialmente, también se puede usar un campo eléctrico no uniforme para dirigir un espermatozoide en la zona de clasificación a cualquiera de las salidas del canal de flujo de fluido. Por ende, en una realización adicional de la invención, dirigir el espermatozoide en la zona de clasificación comprende proporcionar un campo eléctrico no uniforme en el espermatozoide para redirigir el espermatozoide en la zona de clasificación.

De acuerdo con la invención, el método comprende medir la impedancia (eléctrica) (señal) en dos ubicaciones en el canal de flujo de fluido y usar la señal de las dos ubicaciones para clasificar los espermatozoides. Por ende, la invención proporciona el método, en donde el flujo de fluido que comprende un espermatozoide se proporciona en el canal de flujo y el canal de flujo comprende el primer par de electrodos y un segundo par de electrodos, y en donde el método comprende además proporcionar una señal eléctrica al segundo par de electrodos y medir una segunda impedancia en función del tiempo del fluido entre el segundo par de electrodos; y proporcionar los datos de impedancia dependientes del tiempo en función de la primera impedancia y la segunda impedancia.

Cuando se usan dos pares de electrodos, es ventajoso que los datos de impedancia dependientes del tiempo comprendan una señal diferencial (curva) (véase también lo expuesto anteriormente) y que se clasifiquen en función de (datos) la señal diferencial (curva). Por ende, los datos de impedancia dependientes del tiempo comprenden datos de señal diferencial (curva) en donde los datos de señal diferencial (curva) se proporcionan restando la segunda impedancia en función del tiempo de la primera impedancia en función de dicho (mismo) tiempo y los datos de referencia predefinidos comprenden datos de referencia basados en datos de señal diferencial (curva) de espermatozoides normales y datos de referencia basados en datos de señal diferencial (curva) de espermatozoides anormales.

Sorprendentemente, se ha descubierto que al procesar sistemáticamente los datos de la curva de señal diferencial, los espermatozoides anormales en cuanto a morfología, que comprenden especialmente una gota citoplasmática, se separan de los espermatozoides normales en cuanto a morfología. Se ha descubierto que, especialmente después de procesar la curva de señal diferencial (proporcionando una curva de señal diferencial procesada), un área debajo de la curva de señal diferencial procesada de los espermatozoides que comprende una gota citoplasmática difiere significativamente del área bajo la curva de señal diferencial procesada de los espermatozoides normales. Tal y como se ha mencionado anteriormente, en el presente documento se hace referencia a una curva de medición y a un área; tal y como se entenderá, también se puede usar la señal de medición (puntos de datos), procesarse e integrarse en un tiempo de medición específico para terminar con un valor comparable al área mencionada anteriormente. Sin embargo, para explicar la invención, se da una interpretación más gráfica utilizando los términos curva, pico, etc. La comparación del área bajo la señal diferencial procesada (curva) como se menciona en la realización del método comprende las siguientes etapas:

- restar la señal medida (valores absolutos de la impedancia) (puntos de datos) del segundo par de electrodos en un cierto tiempo (medición) de la señal medida (valores absolutos de la impedancia) (puntos de datos) del primer par de electrodos al mismo tiempo (de medición), durante un período de tiempo relevante (en donde se selecciona el período de tiempo relevante y puede ser el período de tiempo en el que el primer y/o el segundo par de electrodos mide la presencia de un espermatozoide) para proporcionar datos (impedancia) dependientes del tiempo de la señal diferencial (impedancia frente al tiempo de medición) (representados gráficamente por una curva de señal diferencial que comprende un pico positivo y un pico negativo);
- determinar Y_B en donde Y_B es el valor de señal mínimo (impedancia) (o la "altura" pico del pico negativo) de los datos dependientes del tiempo de la señal diferencial;
- determinar el (segundo) tiempo de medición donde el valor de impedancia dependiente del tiempo de la señal diferencial es igual a cero (gráficamente el tiempo donde termina el primer pico (positivo) y comienza el segundo pico (negativo)) y el tiempo de medición correspondiente en Y_B (el tiempo de medición al mínimo del valor de impedancia diferencial dependiente del tiempo de la señal diferencial); y calcular X_B , como la diferencia de estos valores de tiempo;
- procesar los datos dependientes del tiempo de la señal diferencial dividiendo todos los valores de impedancia por Y_B y todos los valores de tiempo medidos por X_B , proporcionando los datos de la señal diferencial procesada y gráficamente la curva diferencial procesada;
- calcular el área bajo la curva de señal diferencial procesada (del pico negativo) como la integral desde el tiempo de medición procesado donde la impedancia es igual a cero (por segunda vez) (es decir, al comienzo del segundo pico) a la medición procesada tiempo donde la impedancia es igual a cero por tercera vez (es decir, el final del segundo pico) de todos los valores de señal de impedancia diferencial procesados.

Especialmente, comparar el área bajo la curva de señal diferencial procesada (tal y como se ha definido

anteriormente) como datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia (conocidos) para el área bajo la curva de señal diferencial procesada para espermatozoides normales (en cuanto a morfología) y anormales (en cuanto a morfología) es la base del método para clasificar los espermatozoides.

- 5 Adicionalmente, el método puede comprender el uso de un sensor óptico y/o un sensor acústico para detectar una característica del fluido (que comprende un espermatozoide) para proporcionar información (adicional) para clasificar el espermatozoide (usando medios ópticos y/o acústicos). Los términos tales como "sensor" y "dispositivo" también pueden referirse a una pluralidad de sensores o dispositivos, respectivamente.
- 10 En otro aspecto, la invención también proporciona un método para analizar un espermatozoide en un fluido, comprendiendo el método: (i) proporcionar un flujo de fluido que comprende el espermatozoide en un canal de flujo de fluido, en donde el canal de flujo de fluido comprende un primer par de electrodos y un segundo par de electrodos; (ii) proporcionar una señal eléctrica al primer par de electrodos y al segundo par de electrodos y medir una primera impedancia en función del tiempo del fluido (que fluye) entre el primer par de electrodos y una segunda impedancia en función de tiempo del fluido (que fluye) entre el segundo par de electrodos para proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo; y (iii) comparar los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos en una fase de comparación.

- 20 En otro aspecto de la invención, el método tal y como se describe en este documento se usa para mejorar la viabilidad de los espermatozoides, especialmente en donde los datos de referencia contienen información sobre la presencia y/o ausencia de una gota citoplasmática. Especialmente, el método puede usarse para mejorar la viabilidad del esperma de los animales de granja, especialmente esperma de ganado porcino (jabalíes) y esperma de ganado bovino (toros). En realizaciones adicionales, se usa una o más características (adicionales) de los espermatozoides para mejorar la viabilidad de los espermatozoides. Especialmente, los datos de referencia pueden contener información sobre una o más características (adicionales).

- 25 Por ende, en otro aspecto, la invención también proporciona esperma purificado de ganado bovino (y porcino) que tiene menos del 10 % de espermatozoides con una gota citoplasmática en relación con el número total de espermatozoides, especialmente esperma purificado de ganado bovino (y porcino) que se puede obtener mediante el método descrito en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

- 35 A continuación, se describirán realizaciones de la invención, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos esquemáticos adjuntos, en los que los símbolos de referencia correspondientes indican las partes correspondientes, y en los que:

- 40 las figuras 1a-1b representan esquemáticamente el sistema para clasificar un espermatozoide;
la figura 2 representa esquemáticamente otras realizaciones del sistema;
las figuras 3a-b representan esquemáticamente algunos aspectos del método para clasificar espermatozoides;
la figura 4 representa esquemáticamente una curva de señal diferencial;
la figura 5 representa esquemáticamente un modelo de circuito eléctrico de una realización del sistema de zona de análisis que comprende dos pares de electrodos.

- 45 Los símbolos de referencia correspondientes utilizados en la descripción y en las figuras indican partes iguales o partes correspondientes. Los dibujos esquemáticos no están necesariamente a escala.

Descripción detallada de las realizaciones

- 50 El método y el sistema de la invención tal y como se describen en el presente documento se basan especialmente en varias funciones que pueden combinarse ventajosamente en diferentes realizaciones. La función principal, especialmente, comprende un sistema y un método para analizar una característica de un espermatozoide que fluye en un canal de fluido, especialmente analizando las células espermáticas para detectar anomalías. Especialmente, el análisis comprende analizar las mediciones de impedancia realizadas con electrodos provistos en el canal de flujo en una zona de análisis, en donde la impedancia de un fluido que fluye que comprende el espermatozoide a lo largo del tiempo se usa para proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo, por ejemplo, que comprenden (una forma de) una curva de medición de impedancia. Los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden proporcionarse usando dos pares de electrodos o usando pares adicionales de electrodos. En el presente documento, la forma de una curva de medición de impedancia puede indicar propiedades morfológicas (u otras características) de la célula individual que pasa por los electrodos o puede indicar otro material (particulado) que pasa por los electrodos. Especialmente, esta funcionalidad se puede combinar con una segunda funcionalidad, es decir, una clasificación para redirigir un espermatozoide (anormal) aguas abajo de la zona de análisis cuando se identifica un parámetro específico (característica) de esa célula espermática, tal como una anomalía (morfológica). Sin embargo, el sistema y el método también pueden usarse para analizar (o identificar)
- 60 únicamente, sin realizar una acción de clasificación o separación. Una tercera funcionalidad comprende el enfoque, en donde un espermatozoide que fluye en el canal de flujo puede ser dirigido a una ubicación específica en el canal
- 65

de fluido, especialmente para estandarizar sustancialmente la ubicación del espermatozoide cuando entra/está presente en la zona de análisis. Este enfoque puede comprender, por ejemplo, ultrasonido, dielectroforesis, o el uso de diferentes corrientes líquidas (enfoque hidrodinámico). El sistema y el método pueden usarse, por ejemplo, para identificar la presencia y/o ausencia de espermatozoides que comprenden una gota citoplasmática en donde el método se utiliza para mejorar la viabilidad de los espermatozoides. El uso del sistema y/o el método descrito en el presente documento puede proporcionar esperma purificado (bovino o porcino) que tenga menos del 10 % de espermatozoides con una gota citoplasmática en relación con el número total de espermatozoides.

La figura 1a representa esquemáticamente una realización del sistema 1 para clasificar un espermatozoide 6 en un fluido 5 de acuerdo con la invención. El sistema 1 comprende un canal de flujo de fluido 2 con una primera dimensión 61 del canal de flujo perpendicular al eje del canal de flujo 63 para el transporte del fluido 5, en donde el canal de flujo de fluido 2 comprende una entrada 10, una zona de análisis 40 aguas abajo de la entrada 10, una zona de clasificación 50 aguas abajo de la zona de análisis 40 y salidas 80, 90, 100, ... configuradas aguas abajo de la zona de clasificación 50. El sistema comprende al menos dos salidas 80, 90 (a veces también denominadas aquí primera salida y segunda salida), especialmente para clasificar entre un espermatozoide normal 6a y un espermatozoide anormal 6b (por ejemplo, que comprende una gota citoplasmática). El sistema también puede comprender ventajosamente al menos una salida adicional 100, representada con líneas discontinuas en la figura 1a. Una tercera salida 100 puede usarse, por ejemplo, para dirigir otro material particulado 8, tal como restos, a la misma. Dirigir un material particulado adicional a una salida adicional 100 puede basarse en una comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos. Los datos de referencia predefinidos pueden basarse en datos para el material particulado adicional 8. Los datos de referencia predefinidos también pueden basarse en datos de espermatozoides 6. Especialmente, para esa comparación, los datos de impedancia dependientes del tiempo pueden comprender comparar los datos con datos de referencia para espermatozoides y determinar la ausencia de espermatozoides. El sistema 1 representado también comprende una zona de enfoque opcional 20 aguas abajo de la entrada 10 y aguas arriba de la zona de análisis 40 y también una zona de orientación opcional 30 para orientar el espermatozoide 6, entre la zona de enfoque (opcional) 20 y la zona de análisis 40, en donde un espermatozoide 6 puede estar orientado, mediante al menos un elemento de restricción 31 tal y como se representa en la realización. En otras realizaciones, la zona de orientación 30 puede comprender otros elementos para orientar el espermatozoide 6. En otras realizaciones más, el enfoque y la orientación se pueden proporcionar en combinación en una zona, por ejemplo si el enfoque es proporcionado por fuerzas dielectroforéticas (véase más adelante). Las realizaciones del sistema 1 pueden comprender dos pares de electrodos 41, 42, respectivamente o aún más (pares de) electrodos, en donde un par de electrodos puede comprender exactamente dos electrodos, pero también más de dos electrodos, que comprenden especialmente un electrodo primario y al menos un electrodo de medición. En realizaciones que comprenden más de un par de electrodos, también el electrodo primario de un par de electrodos puede estar comprendido en más de un par de electrodos. En una realización que comprende un primer par de electrodos 41 y un segundo par de electrodos 42, por ejemplo, el primer par de electrodos puede comprender un electrodo primario y un electrodo de medición, y el segundo par de electrodos puede comprender el mismo electrodo primario y otro electrodo de medición. La realización representada en la figura 1a comprende dos pares de electrodos 41 y 42 en el canal de flujo 2, comprendiendo ambos respectivamente un electrodo primario 41a, 42a y uno de medición 41b, 42b. El primer par de electrodos 41 comprende una primera distancia entre electrodos d_1 (entre el electrodo primario 41a y el de medición 41b) y un segundo par de electrodos 42 que comprende una segunda distancia entre electrodos d_2 , en donde los dos pares de electrodos están configurados a una distancia entre electrodos D_{12} (siendo la distancia más pequeña entre los electrodos 41a y 42a, así como la distancia más pequeña entre los electrodos 41b y 42b) separados entre sí. Especialmente, la primera distancia entre electrodos d_1 puede ser sustancialmente igual a la segunda distancia entre electrodos d_2 . Especialmente, si los electrodos están configurados en la pared del canal de flujo de fluido, la (primera y segunda) distancia entre electrodos d_1 , d_2 también puede ser igual a la primera dimensión 61 del canal de flujo de fluido 2 y/o la segunda dimensión 62 del canal de flujo de fluido 2.

En una realización específica (no mostrada, sin embargo, eso puede explicarse con la realización representada en la figura 1a), el primer par de electrodos 41 y el segundo par de electrodos 42 pueden comprender un electrodo mutuo. Por ejemplo, el primer par de electrodos comprendería un primer electrodo 41a del primer par de electrodos 41 que es el electrodo mutuo y un segundo electrodo 41b del primer par de electrodos 41 y el segundo par de electrodos 42 comprendería un primer electrodo del segundo par de electrodos 42 que es el electrodo mutuo 41a y un segundo electrodo 42b del segundo par de electrodos 42. En dicha realización, la distancia entre electrodos D_{12} se define como la distancia más corta entre los electrodos de los dos pares de electrodos, que no es el electrodo mutuo, especialmente en este ejemplo siendo la distancia entre 41b y 42 b.

Para realizar mediciones de impedancia, una fuente eléctrica 140 está conectada al(a los) electrodo(s) (41 solo o) 41, 42 para proporcionar una señal eléctrica a uno de los electrodos 41a, 42a de un par de electrodos 41, 42 (en realizaciones al menos para el primer par de electrodos 41, pero en otras realizaciones, como la de la figura 1a, también para el segundo par de electrodos 42). Además, un dispositivo de medición 150 está acoplado funcionalmente a los electrodos (41 o) 41, 42 que están provistos de la señal eléctrica para medir una impedancia en función del tiempo del fluido 5 (que comprende opcionalmente el espermatozoide 6) entre el par de electrodos (dependiendo del número de pares de electrodos (41 o) 41, 42 para medir una primera impedancia en función del tiempo o una primera impedancia en función del tiempo y una segunda impedancia en función del tiempo) para

proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo. Cuando se usa solo el primer par de electrodos 41, los datos de impedancia dependientes del tiempo se basan en la impedancia medida en función del tiempo entre el primer par de electrodos 41, mientras que los datos de impedancia dependientes del tiempo se basan en la impedancia medida en función del tiempo entre el primer par de electrodos 41 y la impedancia medida en función del tiempo entre el segundo par de electrodos 42 cuando el sistema comprende dos pares de electrodos 41, 42.

Términos tales como "salidas 80, 90, ..." y "salidas 80, 90, 100 ..." indican especialmente al menos dos salidas, aunque son posibles más, y al menos tres salidas, aunque más son posibles, respectivamente.

El dispositivo de clasificación 51 está especialmente configurado para clasificar los espermatozoides 6 dirigiendo el espermatozoide 6 en la zona de clasificación 50 a una de las salidas 80, 90, 100... en función de una comparación en una fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos. Usando la realización dada en la figura 1a, la clasificación, por ejemplo, se puede hacer comparando los datos de impedancia dependientes del tiempo (basados en la primera impedancia como función del tiempo y una segunda impedancia como función del tiempo) con los datos de referencia (también basados en datos de referencia de los dos pares de electrodos) para clasificar los espermatozoides 6. La clasificación en la zona de clasificación 50 puede proporcionarse de diferentes maneras mediante el dispositivo de clasificación 51. En una realización, el dispositivo de clasificación comprende una válvula, y la válvula puede proporcionar la clasificación controlando el flujo a una de las salidas 80, 90 (o a una de las una o más salidas opcionales adicionales 100). La clasificación también puede comprender la clasificación dielectroforética, donde se aplica un campo eléctrico externo para dirigir el espermatozoide 6 en el flujo de fluido 5. En la realización representada en la figura 1a, la clasificación se proporciona mediante un campo eléctrico proporcionado por el primer dispositivo electromagnético 52, en donde los espermatozoides 6 son dirigidos mediante fuerza dielectroforética. La clasificación se basa en comparar los datos de impedancia dependientes del tiempo con los datos de referencia. Especialmente, los datos de referencia pueden comprender información sobre espermatozoides de características morfológicas normales y de características morfológicas anormales 6, incluyendo información sobre los espermatozoides 6 que comprenden una gota citoplasmática, para clasificar espermatozoides normales (en cuanto a morfología) 6a de espermatozoides anormales (en cuanto a morfología) 6b comparando los datos de referencia con los datos de impedancia dependientes del tiempo en la zona de comparación 50 en la fase de comparación.

Preferentemente, los espermatozoides (que pasan secuencialmente) 6 se encuentran todos en la misma ubicación sustancialmente en el momento en que entran en la zona de análisis 40. Para habilitar el posicionamiento (enfoque), especialmente en el eje 63 del canal de flujo de fluido, los espermatozoides 6 en la zona de enfoque 20 están especialmente dirigidos por un dispositivo de enfoque 21 al eje del canal de flujo de fluido 63. La funcionalidad de enfoque puede proporcionarse mediante fuerzas dielectroforéticas proporcionadas por un segundo dispositivo electromagnético 22 tal y como se representa en la figura 1a. Sin embargo, el enfoque también se puede realizar por medio de un hidroenfoque, en donde el sistema 1 comprende al menos una entrada adicional configurada para proporcionar un flujo de fluido adicional de un material de soporte en el canal de flujo de fluido 2 en la zona de enfoque 20 y el fluido que comprende los espermatozoides 6 está envuelto por el material de soporte en donde el fluido que comprende el espermatozoide 6 se dirige hacia el centro del canal de flujo de fluido 2 (no se muestra en la figura).

La figura 1b representa (una vista superior de) una parte de un ejemplo del sistema 1, en donde el canal de flujo de fluido 2 gira 90° sobre el eje 63 del canal de flujo de fluido con respecto al sistema 1 representado (en una vista lateral) en la figura 1a. Este ejemplo, que no forma parte de la presente invención, comprende solo un primer par de electrodos 41, de los cuales solo un electrodo 41a es visible, conectado a un dispositivo electrónico 140 y a un dispositivo de medición 150 (para fines ilustrativos, se ilustra la conexión aunque el dispositivo de medición se conectará realmente al electrodo de medición 41b que no se muestra en esta figura). El canal de flujo 2 comprende además una entrada 10, una zona de análisis 40 y una zona de clasificación 50. Las salidas 80, 90 (y 100) no se muestran en la figura. La segunda dimensión del canal de flujo perpendicular al eje del canal de flujo de fluido y a la primera dimensión 61 (no visible) se representa esquemáticamente por la referencia 62.

La figura 2 representa esquemáticamente algunos aspectos adicionales de realizaciones del sistema 1 para clasificar un espermatozoide 6. En la figura 2, se representa una realización que comprende un canal de flujo de fluido 2 configurado en (sobre) un chip 1000. Un dispositivo de bombeo 200 puede proporcionar un flujo de fluido que comprende espermatozoides 6. El canal de flujo 2 comprende dos pares de electrodos 41, 42 para analizar el espermatozoide 6 y dos dispositivos electromagnéticos 22, 52, también representados esquemáticamente como electrodos, aunque los dispositivos electromagnéticos 22, 52 pueden comprender más de un electrodo, especialmente para proporcionar un campo eléctrico no homogéneo. En esta realización, la señal eléctrica se proporciona a ambos electrodos primarios 41a, 42a de los pares de electrodos 41, 42 por (una fuente eléctrica 140) un espectroscopio de impedancia 140, en donde un primer canal de salida 142 está conectado a los electrodos primarios 41a y 42a. El espectroscopio de impedancia 140 también funciona como el dispositivo de medición 150, para el cual los electrodos de medición 41b, 42b, de los pares de electrodos 41, 42 están conectados a un primer canal de entrada 151 y un segundo canal de entrada 152 del dispositivo de medición 150. En esta realización, se proporciona la misma señal eléctrica a los electrodos primarios 41a y 42a del primer par de electrodos 41 y el segundo par de electrodos 42. Otras realizaciones pueden comprender solo un electrodo primario 41a que está

comprendido tanto en el primer par de electrodos 41 como en el segundo par de electrodos 42. Especialmente, las dos señales de medición de los dos electrodos 41b y 42b en esta realización se amplifican por separado con un preamplificador 155. Para mediciones en estado diferencial, los datos de impedancia absoluta del segundo par de electrodos 42 se restan de la señal del primer par de electrodos 41 antes de la detección y el almacenamiento de picos. También se representa un sistema de control opcional 300, en donde el sistema de control puede controlar el dispositivo de bombeo 200 y, si es relevante, el dispositivo de clasificación (a través de una fuente eléctrica 140) y un dispositivo de enfoque 21 (no representado). El sistema de control 300 también puede aplicarse para procesar la señal medida y el sistema de control 300 también puede comprender opciones para presentar gráficamente el análisis. En la figura también se representan realizaciones del dispositivo de enfoque 21 y el dispositivo de clasificación 51. Especialmente, el dispositivo de enfoque está configurado como un segundo dispositivo electromagnético 22, en donde la funcionalidad de enfoque en un espermatozoide 6 (no mostrado) es proporcionada por un campo eléctrico proporcionado por el segundo dispositivo electromagnético 22 que está conectado a un generador de forma de onda 120. El dispositivo de clasificación 51 está configurado como un primer dispositivo electromagnético 52, en donde un espermatozoide 6 puede dirigirse a una de las salidas 80, 90 (dentro de un primer recipiente 85 o dentro de un segundo recipiente 95) en función de la identificación en la zona de análisis y por medio de un campo eléctrico proporcionado por el primer dispositivo electromagnético 52 que está conectado a un segundo canal de salida 141 de la fuente electrónica 140. Especialmente, el dispositivo de clasificación puede estar dispuesto en el canal de flujo de fluido 2, tal y como se muestra en la figura 1a. En una realización específica, el dispositivo de clasificación, que comprende especialmente el primer dispositivo electromagnético 52 está configurado fuera del canal de flujo de fluido 2. Especialmente, también el dispositivo de enfoque 21 puede estar dispuesto en el canal de flujo de fluido 2. En una realización específica, el dispositivo de enfoque 21, que comprende especialmente el segundo dispositivo electromagnético 22, está configurado fuera del canal de flujo de fluido 2.

En la figura 2 se muestra esquemáticamente un sistema que usa dos pares de electrodos 41, 42 y se explica anteriormente para medir en un estado diferencial. El sistema 1, sin embargo, también puede usarse, aplicando solo el primer par de electrodos 41 (y desconectando el segundo par de electrodos 42) (de igual manera, se puede aplicar una realización del sistema 1 que comprende solo el primer conjunto de electrodos 41) y midiendo en un estado no diferencial. Especialmente, para eso se puede realizar una medición de 4 puntos, en donde el primer electrodo 41a del primer par de electrodos está conectado tanto al primer canal de salida 142 como al segundo canal de entrada 152, mientras que el segundo electrodo 41b del primer par de electrodos está conectado directamente al segundo canal de entrada 142 y al mismo tiempo el segundo electrodo 41b del primer par de electrodos está conectado a través del preamplificador 155 al primer canal de entrada 151 del dispositivo de medición 150. Esta configuración permite medir la tensión diferencialmente en el segundo canal de entrada 152 conectando el primer y el segundo electrodo al segundo canal de entrada 152 y medir la corriente amplificada conectando el primer electrodo 41a al primer canal de salida 142 y el segundo electrodo 41b al primer canal de entrada 151 (a través del preamplificador 155). Todas las demás conexiones pueden mantenerse tal y como se ha descrito anteriormente. Por supuesto, una medición no diferencial también se puede realizar mediante una medición de 2 puntos, en donde (solo) la corriente entre los electrodos 41a, 41b de un par de electrodos 41 se mide y la tensión se ajusta (conectando el canal de salida 142 al electrodo primario 41a, y el canal de entrada 151 a través del preamplificador 155 al electrodo de medición 41b).

En las figuras 3a y 3b, se representan algunos ejemplos típicos (representados gráficamente) para una curva de medición de un espermatozoide normal (figura 3a) y un espermatozoide que comprende una gota citoplasmática (figura 3b). En las figuras, los datos de medición diferencial se representan gráficamente, mostrando un primer pico positivo A y un segundo pico negativo B. Especialmente, la gota se puede identificar porque proporciona una punta adicional D en los picos, gráficamente más pronunciada en el segundo pico (negativo) B.

La figura 4 muestra una realización para analizar los datos de impedancia dependientes del tiempo, especialmente aquí también proporcionada por una (representación gráfica de) los datos de curva de señal diferencial, mostrando un primer pico positivo A y un segundo pico negativo B. La clasificación de los espermatozoides 6 puede basarse en el área procesada bajo la curva de medición, especialmente bajo el pico negativo B comparando dicha área con datos de referencia del área (procesada) bajo la curva para espermatozoides normales en cuanto a morfología y espermatozoides anormales en cuanto a morfología. El área procesada debajo de la curva puede proporcionarse normalizando primero la curva de medición en función de la altura máxima Y_B y el ancho del pico X_B . Especialmente, después de normalizar la curva, se encontró una diferencia significativa para un área bajo la curva de medición procesada causada por un espermatozoide anormal 6 (que comprende una gota citoplasmática) y un área bajo la curva de medición procesada causada por un espermatozoide normal 6.

La figura 5 representa esquemáticamente un modelo de circuito eléctrico (ECM, por su siglas en inglés) de una realización de la zona de análisis 40 que comprende dos pares de electrodos para análisis de impedancia diferencial. Sin una célula 6 entre el par de electrodos 41, 42 (representada en el segundo par de electrodos 42), el sistema 1 se describe mediante una interfaz electrodo-electrolito (doble capa) (C_{dl}), electrolito (que comprende una resistencia R_{el} y una capacidad C_{el}) del fluido 5, los efectos parasitarios de los microelectrodos (C_{par}) y la resistencia de los cables (R_w). Un espermatozoide que pasa 6 añade una capacitancia de membrana celular (C_{mem}) y resistencia al citoplasma (R_{cyto}) al ECM, considerando el ECM simplificado de Foster y Schwan para un esferoide en suspensión de una sola cubierta (representada en el primer par de electrodos 41).

EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

5

Fabricación de chips

Los chips microfluidicos se fabricaron utilizando un grabado húmedo de fotolitografía de rutina, pulverización y técnicas de unión. Después de limpiar dos obleas de vidrio borofloat (BF33, 100 mm de diámetro, 500 y 1100 μm de grosor), se fabricaron microelectrodos después de una deposición de una capa protectora, su exposición y desarrollo, grabado en húmedo de óxido tamponado, deposición de capas de titanio/platino (grosor de capa de 30 y 120 nm, respectivamente) y despegue de una capa protectora. Posteriormente, los insertos para conexiones fluidicas y eléctricas se pulverizaron en polvo a través de ambas obleas (tamaño de partícula 30 μm). Después de limpiar las obleas con ultrasonido y HNO_3 , una capa de película (20 μm , PerMX3020, Dupont) se laminó sobre las obleas de 500 μm a 80 °C. Después de la laminación, las obleas fueron precocidas (5 min a 50 °C, 5 min a 65 °C y 10 min a 85 °C) para mejorar la adhesión de la película al vidrio. La exposición se realizó utilizando una fuente UV de 12 mW/cm². Posteriormente, se realizó una cocción posterior a la exposición (5 min a 50 °C, 5 min a 65 °C y 10 min a 85 °C). La capa de polímero se desarrolló usando un recubrimiento por rotación. Después de alinear las obleas de 500 μm con respecto a las obleas de 1100 μm utilizando un plato de unión, se unieron entre sí mediante un enlace anódico. Posteriormente, la pila de obleas fue horneada en una prensa caliente. Después de cortarse en dados, los chips estaban listos para su uso. Se usaron dos diseños de chips diferentes en los experimentos descritos. Para el análisis eléctrico de las características morfológicas de los espermatozoides, las mediciones de impedancia diferencial se realizaron en un canal de 20 μm de alto y 20 μm de ancho que contenía dos pares de electrodos con un ancho de electrodo de 10 μm y una separación de 20 o 40 μm . Los experimentos de clasificación celular basados en la impedancia se realizaron en un canal de 20 μm de alto y 100 μm de ancho usando un solo par de electrodos con un ancho de 20 o 50 μm .

Preparación de muestras y chips

Se obtuvo semen fresco de jabalí de un centro local de inseminación artificial a una concentración de 20×10^6 células/ml⁻¹. Las muestras se diluyeron con solución descongeladora Beltsville (BTS) a una concentración de 5×10^6 células/ml⁻¹. Antes de cada experimento, el canal microfluidico se revistió con poli(L-lisina) grabada con poli(etilenglicol) (PLL-g-PEG) para evitar la adhesión celular. La PLL-g-PEG se enjuagó a través del canal a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ en agua desionizada durante al menos 15 min a un caudal de 0,5-1 $\mu\text{l}/\text{min}$ con una bomba de jeringa. La solución de BTS se enjuagó durante al menos 15 minutos a un caudal de 0,5-1 $\mu\text{l}/\text{min}$ para eliminar la solución de recubrimiento restante. Posteriormente, la solución de esperma se hizo pasar por el canal a un caudal de 0,5-1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tras la visualización en el canal microfluidico, el caudal se cambió a 0,013 - 0,75 $\mu\text{l}/\text{min}$ antes de la adquisición de impedancia.

40 *Detección y análisis de impedancia*

La impedancia se registró utilizando un espectroscopio de impedancia Zurich HF2IS equipado con un preamplificador HF2TA (también representado en la figura 2). Se utilizaron dos modos diferentes de operación en los experimentos. En estado diferencial, se generó una señal de CA con una amplitud de 0,5 V en la salida 1 y se aplicó al par de electrodos diferenciales del dispositivo bajo prueba (DUT, por sus siglas en inglés). Los dos electrodos correspondientes del par de electrodos diferenciales se conectaron a la entrada 1 y a la entrada 2 del espectroscopio de impedancia a través de dos canales de amplificación de corriente separados del preamplificador HF2TA. En estado no diferencial, se realizó una medición de 4 puntos. La corriente se amplificó utilizando el canal 1 del amplificador de corriente HF2TA conectado a la entrada 1 del espectroscopio de impedancia. La tensión se midió diferencialmente en la entrada 2. En ambos estados, la impedancia se registró utilizando una excitación sinusoidal de 1 MHz con una amplitud de 0,5 V, un ancho de banda de 200 Hz y una frecuencia de muestra de 3598 Hz a menos que se mencione lo contrario. Los datos de impedancia registrados se importaron y procesaron en Matlab (R2013a, MathWorks). Para mediciones en estado diferencial, los datos de impedancia absoluta de la entrada 2 se restaron de la señal 1 antes de la detección y almacenamiento de picos. En estado no diferencial, la deriva y el desplazamiento se eliminaron mediante el uso de un filtro de media móvil. Posteriormente, los picos fueron detectados y almacenados.

Enfoque y clasificación celular mediante dielectroforesis

60 La orientación y ubicación de los espermatozoides dentro de los microcanales se procesó utilizando dielectroforesis (DEP). El enfoque celular se realizó mediante la aplicación de una excitación sinusoidal de 10 MHz, 6 V_{pp} en los electrodos de enfoque (Agilent X) a menos que se mencione lo contrario. De manera similar, la clasificación celular se realizó por excitación idéntica usando la salida Aux1 del espectroscopio de impedancia.

65 *Análisis de imagen*

El seguimiento de los espermatozoides se realizó utilizando la función "seguimiento de objetos múltiples en función del movimiento" de la caja de herramientas del sistema de visión por ordenador en Matlab. Esta función procesa cada cuadro uno por uno y detecta objetos en comparación con un fondo estático. Estos objetos se rastrean con el tiempo y se asignan a trayectorias de objetos. Esta función fácilmente disponible en Matlab fue adaptada para permitir el almacenamiento de datos de tiempo de objetos, así como ubicación y tamaño. Para investigar el efecto de la ubicación y el tamaño de los espermatozoides en la impedancia, estos datos se combinaron con los datos de impedancia adquiridos.

Adquisición de datos integrada y clasificación por DEP usando LabVIEW

La clasificación de los espermatozoides usando DEP en función de datos de impedancia requiere un sistema de control que combine ambas técnicas. Asimismo, este sistema debe permitir el control sobre la bomba de jeringa y la adquisición de datos ópticos para fines de verificación. Por suerte, los controladores de instrumentos virtuales (IV) están disponibles para todos los equipos involucrados. Estos controladores se encargan de la comunicación de bajo nivel entre el ordenador (LabVIEW) y los instrumentos, y contienen funciones de alto nivel para controlarlos. Al inicio del programa de control de LabVIEW, el espectroscopio de impedancia, la bomba y la cámara se inicializan cuando se seleccionan en la interfaz de usuario. Después de la configuración de los instrumentos y el inicio del experimento, los datos experimentales (vídeo e impedancia) y los informes del instrumento se guardan automáticamente. Dado que las mediciones de vídeo e impedancia tienen una marca de tiempo dentro del programa, los archivos de datos correspondientes están sincronizados. En modo de clasificación, el programa de control supervisa la impedancia en el tiempo. Con el paso de partículas o células, se produce un cambio en la impedancia.

Simulación

La respuesta eléctrica de la configuración microfluídica se investigó mediante la construcción de un modelo numérico del circuito en Matlab. Este modelo está sobradamente descrito en la literatura y se basa en el modelo de circuito eléctrico simplificado (ECM) de Foster y Schwan para un esferoide en suspensión de una sola cubierta. En simulaciones, se modeló una configuración de electrodo paralelo sin franjas de campo en los bordes del electrodo. Asimismo, los espermatozoides se modelaron como esferoides con igual volumen celular ($1,21 \times 10^{-15} \text{ m}^3$).

Resultados

Modelo de circuito eléctrico

La espectroscopía de impedancia es una herramienta de uso común para el análisis sin etiquetas de células adherentes o células en suspensión. Esta técnica se ha utilizado ampliamente para investigar las propiedades dieléctricas de las células en los sistemas microfluídicos. La construcción de un modelo de circuito eléctrico (ECM) es una forma sencilla de obtener información sobre la respuesta eléctrica de la configuración microfluídica (figura 5). Las propiedades capacitivas de la configuración del microelectrodo están determinadas predominantemente por la interfaz electrodo/electrolito (C_{dl}), el electrolito (C_{el}) y los efectos parasitarios de los microelectrodos (C_{par}). La respuesta resistiva se ve influida por los cables conductores (R_w) y la conductividad del electrolito (R_{el}). Cuando se introduce un espermatozoide entre los microelectrodos, las propiedades capacitivas y resistivas serán alteradas por la membrana celular (C_{mem}) y el citoplasma de la célula (R_{cyt}), respectivamente. La simulación mostró un gran efecto de la doble capa en la impedancia absoluta. Debido a una pequeña área superficial del electrodo y una pequeña C_{dl} correspondientemente, la impedancia disminuyó continuamente en un amplio intervalo de frecuencia. A una frecuencia de aproximadamente 1,3 MHz, se formó una meseta resistiva. Un barrido de frecuencia de la configuración del electrodo mostró un comportamiento similar en comparación con la simulación, indicando que una frecuencia de medición de 1,3 MHz es una opción apropiada para el análisis de impedancia de esperma en esta configuración. A esta frecuencia, la simulación mostró un aumento de la impedancia de aproximadamente 800 Ω al introducir un espermatozoide entre los electrodos.

Análisis de impedancia de la orientación y morfología celular

El análisis de impedancia se realizó mediante el flujo de espermatozoides a través de un canal microfluídico de 20 μm de alto y 100 μm de ancho con una restricción de canal de 20 μm de ancho a un caudal entre 0,013 y 0,02 $\mu\text{l}/\text{min}^{-1}$. La impedancia se registró diferencialmente con dos pares de electrodos con un ancho de electrodo de 10 μm y una separación de electrodos de 20. Después de calcular la diferencia entre las respuestas eléctricas de ambos pares de electrodos, se realizaron corrección de valores de referencia y detección de picos. La distribución de altura de pico resultante mostró un buen acuerdo con el cambio simulado de impedancia en caso de que un solo espermatozoide pasase los electrodos. Sin embargo, esta distribución mostró una gran difusión en los datos, en valores entre 200 y 2500 Ω . Los factores que influyen en el ancho de esta distribución son, por ejemplo, la orientación de la célula, su ubicación y las propiedades celulares. Debido a estos factores, el cambio de impedancia absoluta no es un parámetro adecuado para caracterizar las diferencias morfológicas. Un enfoque diferente es el análisis de la forma del pico a lo largo del tiempo. Un espermatozoide tiene una forma muy distinta y su longitud típica es mayor en comparación con las geometrías de microcanales (ancho y largo) y el ancho de los microelectrodos. Cuando un espermatozoide fluye a través de este microcanal, la célula se alineará sobre su eje

longitudinal con respecto a la pared del canal. En consecuencia, las distintas partes de los espermatozoides (cabeza, pieza media y flagelo) pasarán el campo eléctrico entre los microelectrodos en diferentes puntos en el tiempo y afectarán la impedancia registrada, en consecuencia. Como resultado, la forma del pico puede contener información sobre la orientación celular y su morfología.

5 Para probar esta hipótesis, se investigó la forma del pico de impedancia de los espermatozoides que pasan (usando una separación de electrodos de 20 μm). Los espectros mostraron un pico positivo y negativo (figura 3), correspondiente a los espermatozoides que pasan a través del primer y segundo par de electrodos, respectivamente. En el cruce por cero, la impedancia registrada en las entradas 1 y 2 es igual, en cuyo punto la cabeza del espermatozoide se posiciona entre los dos pares de electrodos, aproximadamente. Los espectros mostraron un claro efecto de la orientación celular en la forma del pico. Cuando un espermatozoide pasó los electrodos con la cabeza primero, la impedancia registrada en el tiempo mostró un pico positivo, pico negativo y una ligera diferencia de impedancia antes de volver a cero, este último correspondiente a la presencia del flagelo del espermatozoide entre los electrodos. En orientación con la cola primero, esta pequeña diferencia de impedancia se observó antes de que la cabeza del espermatozoide llegara al primer par de electrodos. Asimismo, la información sobre la morfología celular pudo extraerse de los datos. El contenido de gotas citoplasmáticas en el flagelo dio como resultado la ampliación de los picos medidos. Un claro ejemplo aparece ilustrado en la figura 3b, en la que se observa una clara protuberancia en la señal entre el mínimo de pico y el pequeño cambio de impedancia correspondiente al flagelo del espermatozoide.

20 Una forma de extraer información sobre el contenido de gotas citoplasmáticas de los datos de impedancia es analizar el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés). En total, se seleccionaron 18 espermatozoides de características morfológicas normales y 18 espermatozoides que contienen gotas para el análisis. Usando Matlab, se determinó el máximo (figura 4, A), el mínimo (B) y el punto de cruce por cero (C). Posteriormente, se calculó el AUC del pico positivo y negativo. Al comparar las medias del AUC de los picos negativos de las dos poblaciones utilizando una prueba t (muestra pareada), no se encontró ninguna diferencia estadística ($p = 0,52$). Una explicación plausible es el efecto de la orientación celular, su ubicación y velocidad en el AUC. La orientación (inclinación de la célula) y la ubicación influyen en la altura del pico y la velocidad de la célula tiene un efecto en el ancho del pico. Después de la corrección para la altura del pico (Y_B) y ancho de pico (X_B), se encuentra una diferencia significativa entre los AUC de ambas poblaciones ($p = 0,003$), véase la siguiente tabla:

	AUC	Estándar	AUC _{normal}	Estándar _{normal}
Control	2,96e4	1,50e4	5,05e3	7,25e2
Gota	2,6e4	1,58e4	6,98e4	2,36e3
		$p = 0,52$		$p = 0,003^*$
* $\alpha = 0,01$				

Efecto del enfoque dielectroforético en la ubicación y velocidad de la célula

35 La ubicación y la velocidad de la célula son parámetros importantes que controlar en el diseño de un sistema de clasificación de células. La ubicación y velocidad definidas de la célula son necesarias para realizar mediciones precisas de las características morfológicas de los espermatozoides y para controlar la clasificación celular después del análisis. El enfoque dielectroforético se utiliza para controlar estos parámetros. Para mostrar el efecto de DEP centrándose en la ubicación de la célula, los espermatozoides se hicieron fluir a través del canal microfluídico con y sin excitación por DEP. Sin excitación por DEP, la distribución de los espermatozoides dentro del canal es aleatoria. 40 Con excitación por DEP, los espermatozoides se desviaron claramente al medio del canal, lo cual es confirmado por una pequeña distribución de la ubicación Y. La velocidad de los espermatozoides se investigó cerca de los electrodos de impedancia. La ubicación y la velocidad de la célula se determinaron justo después de pasar el par de electrodos de 20 μm . Los datos de impedancia se combinaron con los datos de vídeo para investigar el efecto de la velocidad, orientación y ubicación. En primer lugar, se investigó la velocidad y la ubicación de la célula con y sin enfoque por DEP. Sin enfoque, el análisis de imagen mostró amplias distribuciones en la ubicación y velocidad de la célula (la mitad del canal se posicionó a aproximadamente 64 μm ; los bordes del canal se posicionan a aproximadamente 12 y 116 μm). Con enfoque, el ancho de estas distribuciones se redujo ampliamente, como se puede observar especialmente a partir de pequeñas diferencias entre el valor medio y los valores del primer y tercer cuartil (es decir, la distancia intercuartil) encontrados después del enfoque en comparación con la diferencia observada sin enfocar, véase la tabla siguiente: Cabe destacar que no se observaron efectos significativos de la 50 velocidad y ubicación media de la célula sobre la impedancia registrada.

		Mediana	Primer cuartil	Tercer cuartil	Mín.	Máx.
Enfocado (n=456)	Ubicación (μm)	61,3	59,1	63,1	18,4	101,7
	Velocidad ($\mu\text{m/s}$)	322,4	299,7	338,1	0,7	393,5
No enfocado (n=392)	Ubicación (μm)	51,3	37,7	66,0	15,0	101,7
	Velocidad ($\mu\text{m/s}$)	286,4	232,1	329,0	0,3	397,6

Clasificación controlada por impedancia de espermatozoides

La siguiente etapa en el desarrollo de un sistema de clasificación de células sin etiquetas es el diseño de un algoritmo que pueda clasificar activamente los espermatozoides en función de la detección de impedancia. Como un experimento de prueba de concepto, las microesferas y los espermatozoides se han clasificado en función de la impedancia. LabVIEW fue elegido como plataforma de desarrollo. Después del enfoque y la detección, las microesferas y los espermatozoides deben clasificarse activamente. El programa LabVIEW supervisa la impedancia continuamente. Cada vez que se registra un cambio en la impedancia, a partir de la cual la forma del pico coincide con la plantilla del pico, se determina el ancho y la altura del pico. El ancho del pico se utiliza para calcular la velocidad de la partícula con el fin de predecir el tiempo estimado de llegada (ETA, por sus siglas en inglés) en los electrodos de clasificación. La altura máxima total determina si una partícula está ordenada o no. Esta selección se basa en la ventana de impedancia de interés (WOI, por sus siglas en inglés). En este ejemplo, las microesferas de poliestireno de 3 μm se clasificarán respecto de los espermatozoides. Se hizo fluir una mezcla de espermatozoides y microesferas a través del canal microfluídico a un caudal de aproximadamente $0,025 \mu\text{l}/\text{min}^{-1}$. La impedancia de la WOI se estableció en 4-8 Ohm, que coincide con el cambio de impedancia cuando una microesfera pasa por los electrodos. El cambio promedio de impedancia de los espermatozoides es de aproximadamente 17 ohmios, que está por encima de la WOI. Cada vez que se detecta un cambio de impedancia de una partícula, que encaja dentro de la WOI, los electrodos de DEP se activan para clasificar la partícula en el canal superior. Cuando las microesferas pasan por los electrodos, los picos de impedancia se registraron dentro de la WOI, consecuentemente clasificando las microesferas activamente en el canal superior en la división del canal. Cada vez que los espermatozoides o los restos pasan por los electrodos de detección, la impedancia registrada fue superior o inferior a la WOI. Como resultado, los espermatozoides y los restos fueron dibujados en el canal inferior sin ser desviados por los electrodos de clasificación. La velocidad de clasificación en el experimento descrito fue baja ($< 1 \text{ espermatozoides}^{-1}$) debido a las bajas concentraciones de microesferas y espermatozoides y a los pequeños caudales. Asimismo, la velocidad de clasificación de este sistema está limitada a aproximadamente $5 \text{ células}/\text{s}^{-1}$ debido a limitaciones en la velocidad computacional del *software* LabVIEW. Sin embargo, la clasificación fue aproximadamente 100 % eficaz.

El término "esencialmente" en el presente documento, tal como en "consiste esencialmente en", será entendido por el experto en la materia. El término "esencialmente" también puede incluir realizaciones con "enteramente", "completamente", "todo/as", etc. Por este motivo, en algunas realizaciones, también se puede omitir el término esencialmente. Cuando sea aplicable, el término "esencialmente" también puede referirse al 90 % o más, tal como al 95 % o más, en especial, al 99 % o más, incluso más en especial, al 99,5 % o más, incluyendo el 100 %. El término "comprender" también incluye las realizaciones en donde el término "comprende/n" significa "consiste/n en". El término "y/o" se refiere, en especial, a uno o más de los elementos mencionados antes y después de "y/o". Por ejemplo, una locución "elemento 1 y/o elemento 2" y locuciones similares pueden referirse a uno o más de los elementos 1 y 2. La expresión "que comprende/n" puede, en una realización, referirse a "que consiste/n en", pero en otra realización también puede referirse a "que contiene/n al menos" las especies definidas y, opcionalmente, una o más especies diferentes".

Asimismo, los términos primero/a, segundo/a, tercero/a y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares, y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así usados son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden funcionar en otras secuencias distintas a las descritas o ilustradas en el presente documento.

El uso del verbo "comprender" y sus conjugaciones no excluye la presencia de elementos o etapas distintos de los establecidos en una reivindicación. El artículo "un" o "una" precediendo a un elemento no excluye la presencia de una pluralidad de dichos elementos.

La invención puede implementarse por medio de *hardware* que comprenda varios elementos distintos y por medio de un ordenador programado adecuadamente. En la reivindicación del dispositivo que enumera varios medios, varios de estos medios pueden ser incorporados por el mismo elemento de *hardware*. El simple hecho de que determinadas medidas se indiquen en reivindicaciones dependientes diferentes entre sí no indica que una combinación de estas medidas no pueda aprovecharse.

La invención se aplica además a un dispositivo que comprende una o más de las características de caracterización descritas en la descripción y/o mostradas en los dibujos adjuntos.

La invención se refiere además a un método o proceso que comprende una o más de las características de caracterización descritas en la descripción y/o mostradas en los dibujos adjuntos.

Los diversos aspectos analizados en la presente patente pueden combinarse para proporcionar ventajas adicionales. Además, el experto en la materia comprenderá que las realizaciones se pueden combinar y que también se pueden combinar más de dos realizaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (1) para realizar análisis y selección de espermatozoides en función de la morfología de los espermatozoides (6) en un fluido (5), comprendiendo el sistema (1):

- (i) un canal de flujo de fluido (2) para el transporte de dicho fluido (5), comprendiendo el canal de flujo de fluido (2) una entrada (10), una zona de análisis (40) configurada aguas abajo de dicha entrada (10) que comprende (i) un primer par de electrodos (41), que comprende una primera distancia entre electrodos (d_1), y (ii) un segundo par de electrodos (42) que comprende una segunda distancia entre electrodos (d_2), y configurada a una distancia entre electrodos (D_{12}) del primer par de electrodos (41), una zona de clasificación (50) configurada aguas abajo de dicha zona de análisis (40) y salidas (80, 90, ...) configuradas aguas abajo de dicha zona de clasificación (50);
- (ii) una fuente eléctrica (140), configurada para proporcionar una señal eléctrica al primer par de electrodos (41) y para proporcionar una señal eléctrica al segundo par de electrodos (42);
- (iii) un dispositivo de medición (150), acoplado funcionalmente al primer par de electrodos (41) y acoplado funcionalmente al segundo par de electrodos (42), y configurado para medir una primera impedancia en función del tiempo del fluido (5) entre el primer par de electrodos (41) y para medir una segunda impedancia en función del tiempo del fluido (5) entre el segundo par de electrodos (42) y configurado para proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo basados en la primera impedancia y la segunda impedancia; en donde los datos de impedancia dependientes del tiempo comprenden datos de curva de señal diferencial, en donde los datos de curva de señal diferencial se proporcionan restando la segunda impedancia en función del tiempo de la primera impedancia en función de dicho tiempo;
- (iv) un sistema de control (300)
- (v) un dispositivo de clasificación (51), configurado para clasificar espermatozoides (6) entre espermatozoides normales en cuanto a morfología y espermatozoides anormales en cuanto a morfología dirigiendo el espermatozoide (6) en la zona de clasificación (50) hacia una de las salidas (80, 90, ...) en función de una comparación en una fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos utilizando el sistema de control (300), en donde un área bajo una curva de señal diferencial procesada se compara con un área bajo una curva de señal diferencial procesada de espermatozoides normales y un área bajo una curva de señal diferencial procesada de espermatozoides anormales, en donde las áreas procesadas bajo las curvas se proporcionan normalizando la curva de señal diferencial respectiva en función de una altura de pico (Y_B) y un ancho de pico (X_B), en donde la altura de pico (Y_B) es un valor de señal de impedancia mínimo de un pico negativo de la curva respectiva y el ancho del pico (X_B) es el tiempo de medición correspondiente a la altura de pico (Y_B) menos el tiempo de medición correspondiente al inicio del pico negativo,
- en donde un espermatozoide anormal se dirige a una de las salidas (80, 90, ...) por el dispositivo de clasificación (51) y un espermatozoide normal se dirige a otra salida (80, 90, ...).

2. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde (i) el primer par de electrodos (41) está configurado en dos lados opuestos del canal de flujo (2), con el canal de flujo (2) entre medias y el segundo par de electrodos (42) está configurado en dos lados opuestos del canal de flujo (2), con el canal de flujo (2) entre medias.

3. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera distancia entre electrodos (d_1) y la segunda distancia entre electrodos (d_2) son sustancialmente las mismas.

4. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el fluido (5) comprende, además, un material particulado adicional (8), en donde el sistema comprende una salida adicional (100), y en donde el dispositivo de clasificación (51) está configurado, además, para clasificar el material particulado adicional (8) dirigiendo el material particulado adicional (8) en la zona de clasificación (50) hacia una de las salidas (80, 90, 100, ...) en función de una comparación en la fase de comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con datos de referencia predefinidos.

5. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además una zona de enfoque (20), configurada aguas arriba de dicha zona de análisis (40) y aguas abajo de dicha entrada (10), y un segundo dispositivo electromagnético (22) para proporcionar un campo eléctrico en la zona de enfoque (20), en donde el dispositivo de clasificación (51) comprende un primer dispositivo electromagnético (52) para proporcionar un campo eléctrico en la zona de clasificación (50), y el primer dispositivo electromagnético (52) está configurado para dirigir el espermatozoide (6) mediante fuerza dielectroforética hacia una de las salidas (80, 90, ...), y el segundo dispositivo electromagnético (22) está configurado para dirigir el espermatozoide (6) en la zona de enfoque mediante fuerza dielectroforética.

6. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde una primera dimensión (61) seleccionada entre la altura y el ancho del canal de flujo de fluido (2) se selecciona del intervalo de 5 - 400 μm y una segunda dimensión (62) seleccionada entre el ancho y la altura del canal de flujo de fluido se selecciona en el intervalo de 5 - 400 μm , y en donde se selecciona un área de sección transversal del intervalo de 100 - 10.000 μm^2 .

7. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde los datos de referencia contienen información sobre la presencia y/o ausencia de una gota citoplasmática.
- 5 8. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la distancia entre electrodos (D12) se selecciona del intervalo de 10 - 100 μm y los datos de impedancia dependientes del tiempo se basan en una diferencia entre un valor absoluto de la primera impedancia en un tiempo y un valor absoluto de la segunda impedancia en dicho tiempo.
- 10 9. Un método para clasificar espermatozoides (6) en un fluido (5) entre espermatozoides normales en cuanto a morfología y espermatozoides anormales en cuanto a morfología, comprendiendo el método:
- (i) proporcionar un flujo de fluido que comprende los espermatozoides (6) en un canal de flujo de fluido (2), en donde el canal de flujo de fluido (2) comprende un primer par de electrodos (41) y un segundo par de electrodos (42), que comprende una segunda distancia entre electrodos (d_2) y configurado a una distancia entre electrodos (D12) del primer par de electrodos (41);
- 15 (ii) proporcionar una señal eléctrica en el primer par de electrodos (41) y medir una primera impedancia en función del tiempo del fluido (5) entre el primer par de electrodos (41) y proporcionar una señal eléctrica en el segundo par de electrodos (42) y medir una segunda impedancia en función del tiempo del fluido (5) entre el segundo par de electrodos (42), y proporcionar datos de impedancia dependientes del tiempo basados en la primera impedancia y la segunda impedancia, en donde los datos de impedancia dependientes del tiempo comprenden datos de curva de señal diferencial, en donde los datos de curva de señal diferencial se proporcionan restando la segunda impedancia en función del tiempo de la primera impedancia en función de dicho tiempo;
- 20 (iii) clasificar los espermatozoides (6) en función de la comparación de los datos de impedancia dependientes del tiempo con los datos de referencia predefinidos en una fase de comparación utilizando un dispositivo de procesamiento, comparando un área procesada bajo la curva de señal diferencial con los datos de referencia de un área procesada bajo la curva de señal diferencial para espermatozoides normales en cuanto a morfología y para espermatozoides anormales en cuanto a morfología, en donde las áreas procesadas bajo las curvas se proporcionan normalizando la curva de señal diferencial respectiva en función de una altura de pico (Y_B) y un ancho de pico (X_B), en donde la altura de pico (Y_B) es un valor de señal de impedancia mínimo de un pico negativo de la curva respectiva y el ancho de pico (X_B) es el tiempo de medición correspondiente a la altura de pico (Y_B) menos el tiempo de medición correspondiente a un inicio del pico negativo.
- 25 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además enfocar el espermatozoide (6) en el canal de flujo de fluido (2) en una ubicación aguas arriba del primer par de electrodos (41) y en donde enfocar el espermatozoide (6) comprende (i) proporcionar un flujo de fluido adicional de un material de soporte en el canal de flujo de fluido (2) para envolver el espermatozoide (6) con el flujo de fluido adicional o (ii) proporcionar un campo eléctrico no uniforme en el espermatozoide (6) para dirigir el espermatozoide (6) en el flujo de fluido.
- 35 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9-10, en donde medir la impedancia comprende medir la impedancia a una frecuencia seleccionada del intervalo de 10 kHz - 100 MHz.
- 40 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9-11, en donde el fluido (5) comprende espermatozoides (6) en una concentración de $2 \cdot 10^3$ - $2 \cdot 10^8$ células/ml y en donde los espermatozoides se seleccionan del grupo de espermatozoides de ganado que consiste en espermatozoides de jabalí (6) y espermatozoides de toro.
- 45

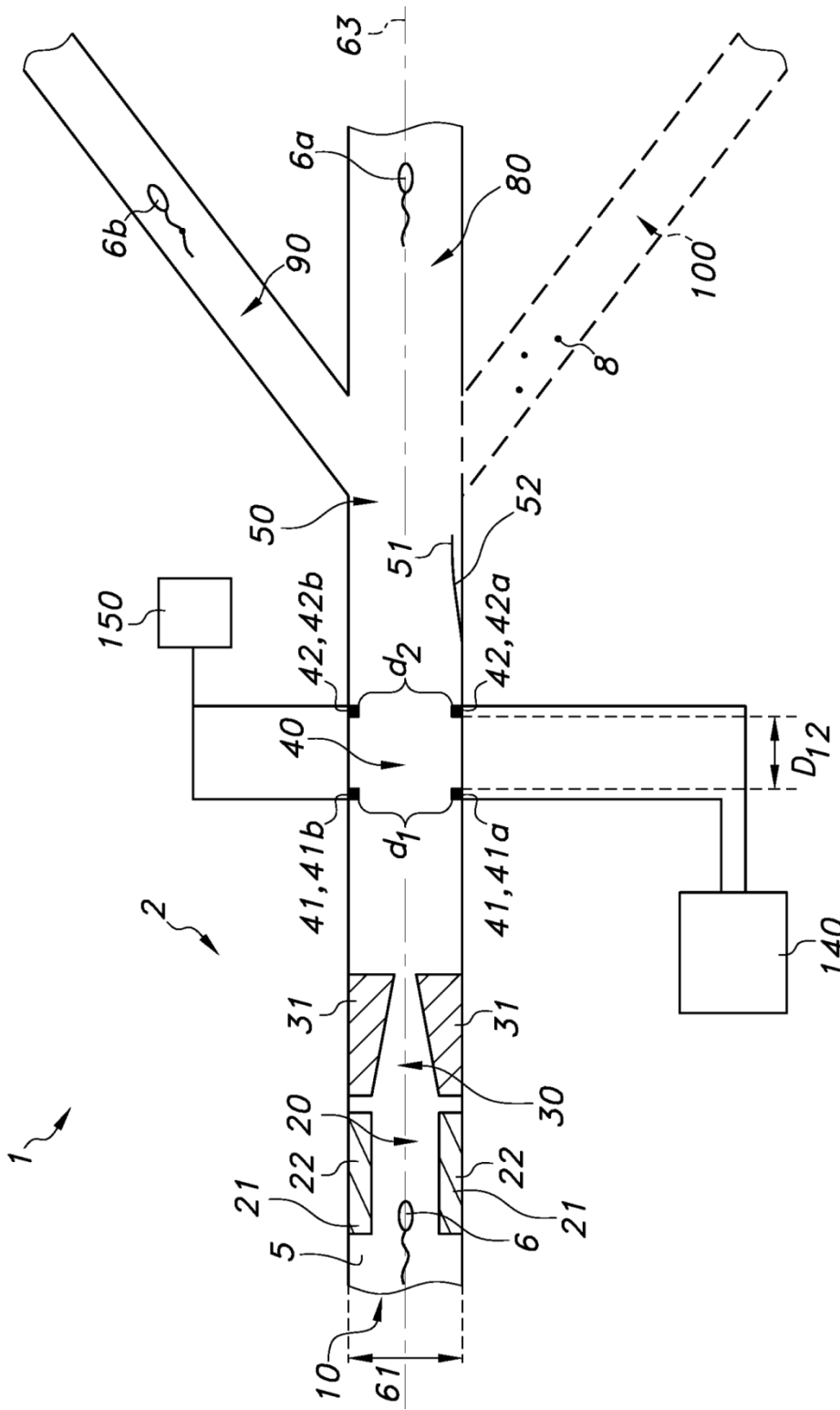


FIG. 1A

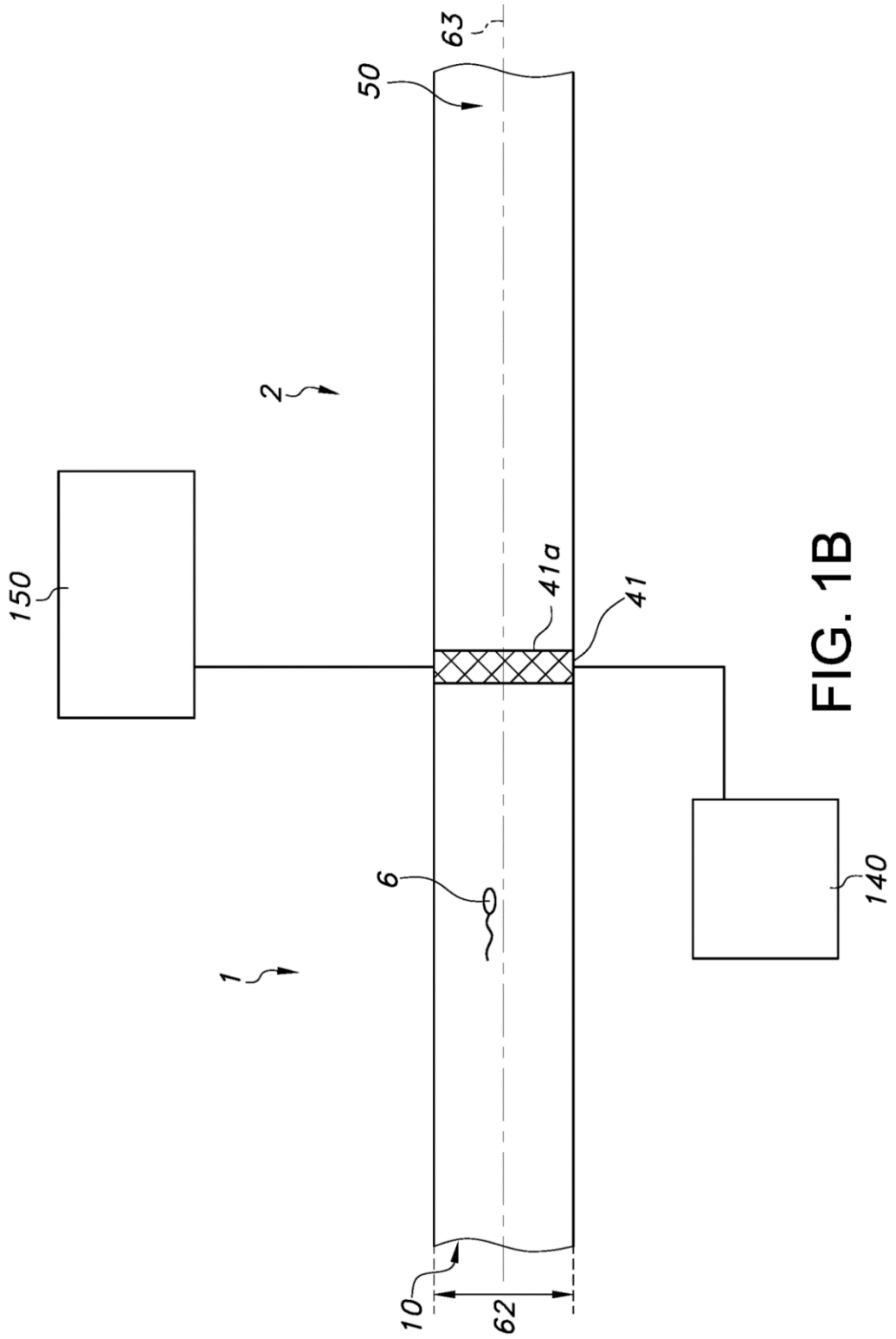


FIG. 1B

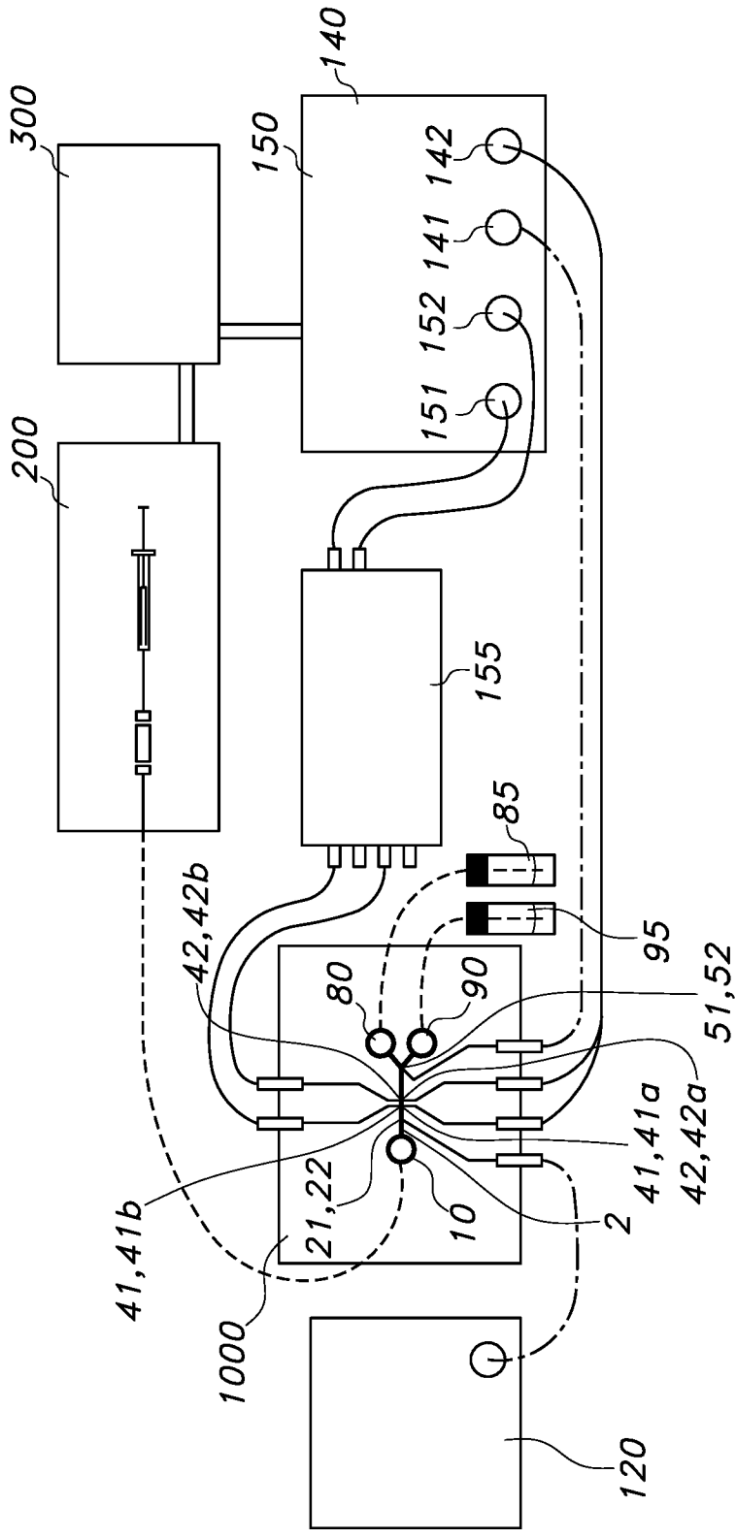


FIG. 2

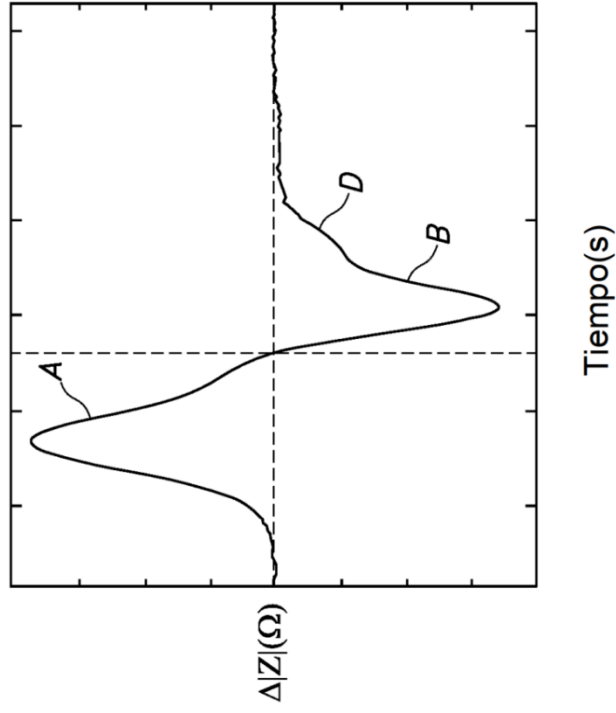


FIG. 3B

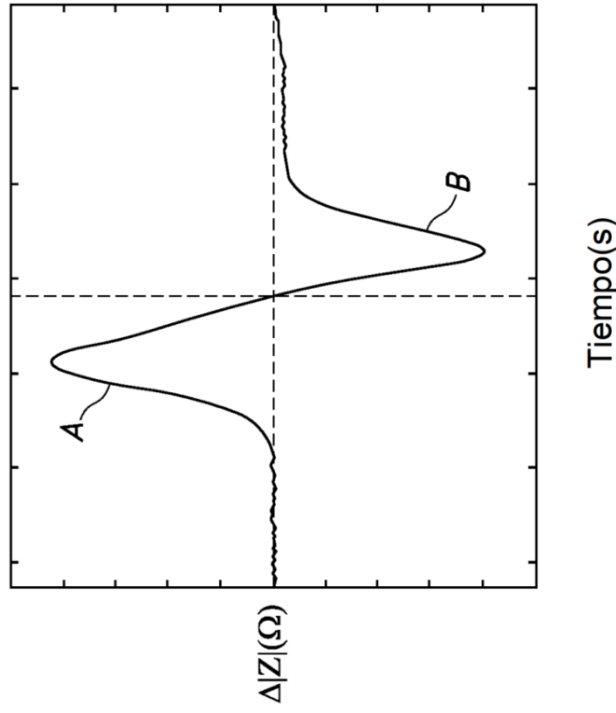


FIG. 3A

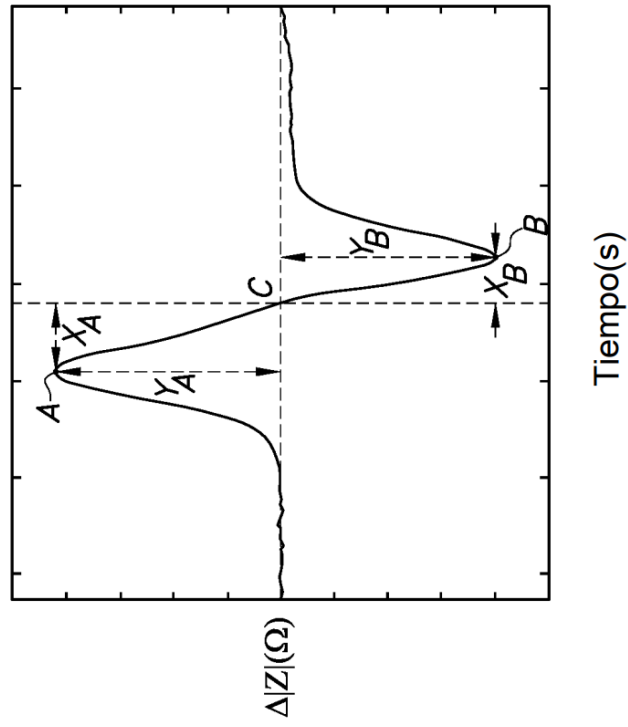


FIG. 4

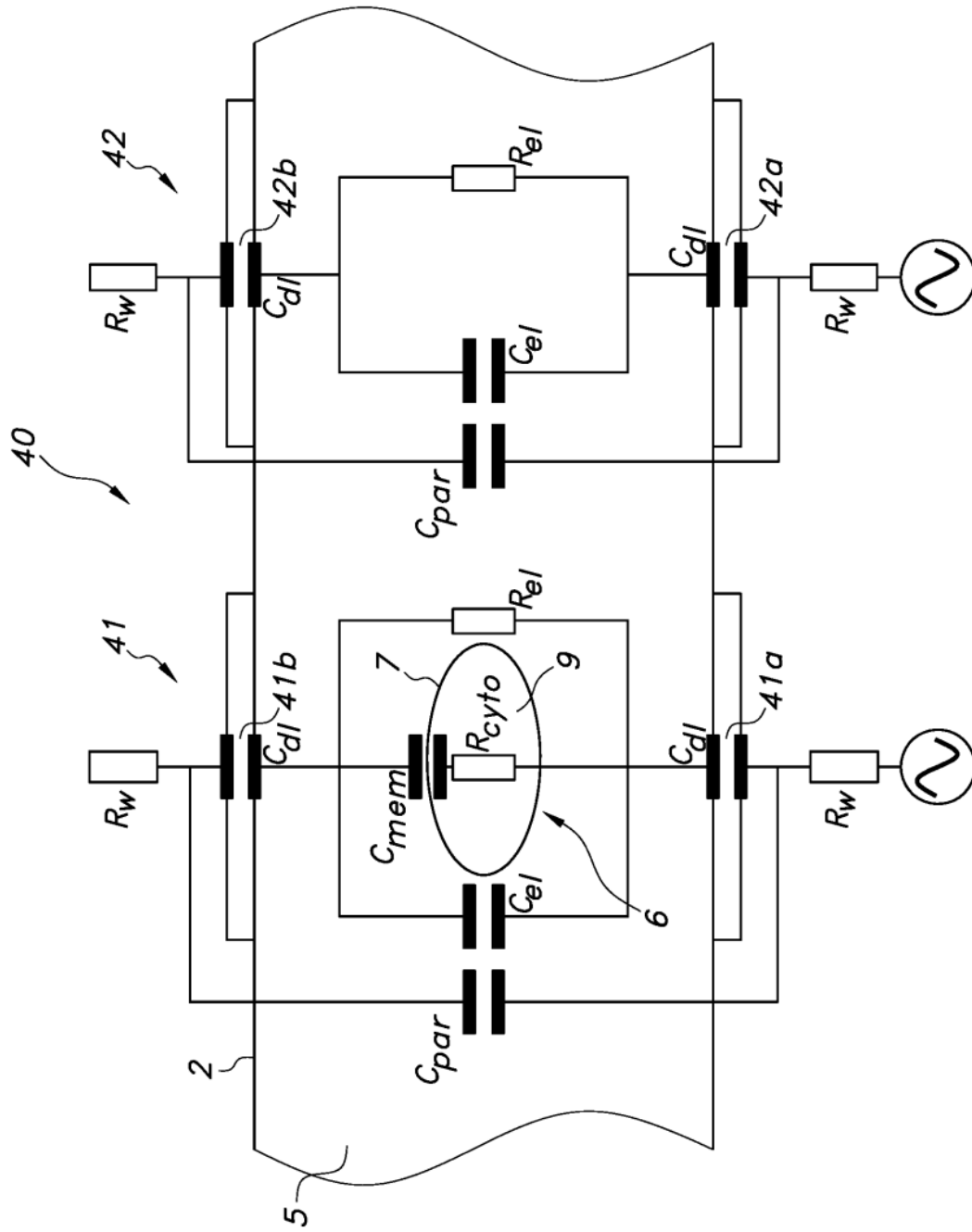


FIG. 5