República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0607095-7 B1

(22) Data do Depósito: 01/02/2006

(45) Data de Concessão: 21/11/2017

(54) Título: "APARELHO DE DISPOSITIVO DE FLUXO PARA CLASSIFICAÇÃO E ORIENTAÇÃO DE CÉLULAS"

(51) Int.Cl.: G01N 21/01; G01N 33/00

(30) Prioridade Unionista: 01/02/2005 US 11/046,896

(73) Titular(es): PREMIUM GENETICS (UK) LIMITED

(72) Inventor(es): DANIEL MUETH; AMY L. ANDERSON; CHRISTOPHER R. KNUTSON; JOSEPH PLEWA

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"APARELHO DE DISPOSITIVO DE FLUXO PARA CLASSIFICAÇÃO E ORIENTAÇÃO DE CÉLULAS".**

[001] A presente invenção refere-se a um controlador de fluxo que emprega um sistema de detecção e de formação de imagem de discriminação multiangular, para a classificação de células. Um outro aspecto da invenção refere-se a um método e a um aparelho para detecção ótica e para formação de imagem de objetos.

[002] Os sistemas de formação de imagem conhecidos tendem a ser simétricos de forma azimutal, aceitando a luz em uma certa faixa de ângulos estabelecida pela abertura numérica (NA) do sistema de formação de imagem. Toda a luz vindo do plano do objeto na NA é idealmente transferida para o plano de formação de imagem uniformemente, na ausência de aberrações ou vinhetagem por óticas ou aberturas as quais sejam pequenas demais. A razão para este projeto é que é desejável ter uma eficiência de coleta de luz razoavelmente alta (isto é, uma NA alta) e as variações angulares na intensidade freqüentemente não portam uma informação importante.

[003] Um sistema de formação de imagem de exemplo é uma lente redonda única ou um par de lentes redondas. Para casos em que uma eficiência de coleta alta é desejada, tal como em sistemas de formação de imagem os quais sejam turvos, um sistema de NA alta é projetado pelo uso de um elemento ótico o qual é grande, se comparado com o tamanho do objeto, e o qual é próximo comparado com seu tamanho. Desta forma, a lente captura uma fração grande da luz. Uma NA alta também é importante para a maximização da resolução e para a obtenção de uma profundidade focal estreita.

[004] Os citômetros de fluxo são dispositivos os quais usam uma dispersão ótica e uma fluorescência para discriminar entre células ou outros objetos pequenos, tais como contas fluorescentes, e para clas-

sificá-los com base nas medições óticas discriminadas. Conforme os objetos correm através de um jato estreito, a luz de laser de entrada se dispersa, impingindo sobre os objetos, e incita a fluorescência. Os sinais de luz dispersa e fluorescente são detectados em ângulos variáveis, para a caracterização e a discriminação de objetos com propriedades diferentes.

[005] Uma dificuldade na classificação de esperma por gênero é o formato muito plano de esperma, especialmente esperma bovino. O formato plano combinado com o índice de refração mais alto de DNA em relação ao ambiente aquoso causa um efeito de lente de luz e uma reflexão interna, incluindo luz fluorescente, a qual se origina na cabeça do espermatozóide. Este efeito de lente faz com que a luz seja emitida preferencialmente através das bordas do esperma, com uma emissão muito mais baixa através das duas faces planas da cabeça do espermatozóide. Assim, a detecção de uma intensidade de luz e a determinação de conteúdo cromossômico X ou Y do esperma é dependente do alinhamento confiável do esperma e da capacidade de visualização da fluorescência de esperma a partir de múltiplos ângulos.

[006] Os sistemas de alinhamento conhecidos empregam um dispositivo no qual as células de esperma são orientadas e aspergidas em uma zona de detecção por meio de um bocal, tal como ilustrado em Rens et al., Patente U.S. Nº 5.985.216. Em um dispositivo como esse, o bocal de classificação tem uma seção transversal elíptica para orientação de células aplainadas. Uma desvantagem de Rens é que se a taxa de fluxo estiver acima de 5000 células espermáticas por segundo, as células não podem ter a imagem formada de modo confiável e caracterizadas. Uma taxa de fluxo de esperma de 5000 células espermáticas por segundo é ineficiente e consome tempo. Uma taxa de fluxo mais prática para classificação de esperma é de em torno de 100.000 células por segundo ou mais alta.

[007] Um tipo de sistema de formação de imagem usado para manipulação de partículas pequenas é descrito no Pedido de Patente U.S. Nº de Série 10/974.976, intitulado "SYSTEM AND METHOD FOR MANIPULATING AND PROCESSING NANOMATERIALS USING HOLOGRAPHIC OPTICAL TRAPPING", depositado em 28 de outubro de 2004, e no Pedido de Patente U.S. Nº de Série 10/934.597, depositado em 3 de setembro de 2004, intitulado "MULTIPLE LAMINAR FLOW-BASED PARTICLE AND CELLULAR SEPARATION WITH LASER STEERING", cujos ensinamentos de ambos são incorporados aqui como referência.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] A presente invenção refere-se a um controlador de fluxo que emprega um sistema de detecção e de formação de imagem de discriminação multiangular, para a classificação de células. Um aspecto da invenção refere-se a um método e a um aparelho para detecção ótica e para formação de imagem de objetos. Em particular, a presente invenção é dirigida a um método e um aparelho para a caracterização e a classificação de esperma bovino por gênero. Contudo, deve ser compreendido que outros tipos de células espermáticas mamíferas e similares podem ser classificados pelo uso da presente invenção.

[009] A presente invenção é baseada na descoberta que um controlador de fluxo para classificação e orientação de células emprega um canal de fluxo que tem uma entrada, uma saída, uma zona de detecção intermediária e, opcionalmente, uma zona de classificação. A entrada recebe cada uma de correntes espaçadas alternadas de fluido de revestimento ("sheath fluid") de entrada e uma corrente de amostra contendo as células a serem classificadas entre as correntes de revestimento ("sheath streams"). As correntes de revestimento e a corrente de amostra têm respectivas vazões ou pressões na câmara de fluxo, de modo que a corrente de amostra seja restrita desse modo formando

uma corrente de amostra relativamente estreita na região de detecção, segundo o que as células são orientadas em uma direção selecionada em relação à luz de entrada. Um detector empregando uma configuração de formação de imagem de ângulo múltiplo ou de vetor K é focalizado na zona de detecção para discriminação entre as células desejadas e as indesejadas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0010] A Figura 1 é um fluxograma de etapas para classificação de células as quais foram tingidas com um corante fluorescente.

[0011] A Figura 2 é uma ilustração esquemática em perspectiva de um dispositivo de fluxo ou cartucho de acordo com a invenção.

[0012] A Figura 3 é uma ilustração esquemática de um dispositivo de fluxo de canal único para classificação.

[0013] A Figura 4 é uma vista lateral de um dispositivo de fluxo de canal múltiplo para classificação.

[0014] A Figura 4A é uma vista em plano de topo (borda), voltada para as entradas, do sistema de canal múltiplo mostrado na Figura 4.

[0015] A Figura 5 é uma representação esquemática de um sensor de canal único para a detecção de luz dispersa (isto é, um sistema ótico para formação de imagem de vetor K).

[0016] As Figuras 5A a 5D ilustram elementos óticos alternativos empregados no arranjo da Figura 5.

[0017] A Figura 6 é uma representação esquemática de um sensor de canal único para a detecção da luz fluorescente e dispersa usando-se uma formação de imagem de vetor K.

[0018] A Figura 7 é um dispositivo de canal múltiplo para formação de imagem de vetor K com excitação e detecção de luz dispersa e fluorescente.

[0019] A Figura 8 é uma representação esquemática de um atuador externo ajustando as velocidades de fluxo em um canal ou disposi-

tivo para classificação de células.

[0020] A Figura 9 é uma representação esquemática de uma vista de topo de um dispositivo de canal múltiplo ou cartucho para detecção e classificação de células.

[0021] As Figuras 10A a 10D mostram várias formas alternativas de direcionamento de células usando-se três atuadores em M, W, F (Figura 10A), dois atuadores em S1, S2 (Figura 10B), um atuador em S1 (Figura 10C) e dois atuadores em M, F (Figura 10D).

[0022] As Figuras 11A a 11B mostram várias formas alternativas de extermínio de células por extermínio ou ativação a laser (Figura 11A), e extermínio ou ativação (Figura 11B).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0023] A Figura 1 ilustra um fluxograma que estabelece as etapas para caracterização, classificação e processamento de objetos, para preservação criogênica, particularmente de células de esperma bovino.

[0024] O primeiro estágio da coleta 100, a extensão 101, para resfriamento lento 102 é o assunto de vários procedimentos, alguns dos quais sendo novos e outros dos quais sendo conhecidos.

[0025] Um novo sistema para preparação de células para classificação é estabelecido no Pedido co-pendente de Patente U.S. Número de Série (a ser atribuído), intitulado "Novel Method For In Vivo Staining of Cells for Identification and Sorting", depositado em 1 de fevereiro de 2005, cujos ensinamentos são incorporados aqui como referência.

[0026] As etapas incluem o carregamento de uma amostra em uma lâmina descartável 200; a filtração da amostra para remoção de material agregado grande 201, tais como agregados de vitelo; o emprego de um alinhamento baseado em fluxo 202, conforme estabelecido aqui adiante; o emprego de etapas em paralelo de detecção de gênero 203, discriminação (isto é, uma descriminação de gênero 204), e

atuação (isto é, atuação de gênero 205); a concentração passiva e o equilíbrio 206, e o envio para um reservatório de saída 207. O método também pode opcionalmente eliminar algumas etapas e incluir uma etapa de discriminação e exterminação para remoção de esperma vivo indesejado.

[0027] As etapas de classificação de gênero 103 as quais incluem o dito acima, então, são seguidas pelas etapas de resfriamento lento para 4℃ e deposição 104; extensão final 105; acond icionamento em canudos 106; deposição 107 e congelamento 108.

[0028] As Figuras 2 a 3 ilustram em várias formas um citômetro de fluxo 300 de acordo com a invenção. O dispositivo pode ser um sistema de canal único. Contudo, a invenção é bem adequada para aplicações de canal múltiplo, particularmente em aplicações de classificação de célula espermática, onde grandes números de células espermáticas devem ser classificados em uma quantidade de tempo razoável.

[0029] Nas Figuras 2 a 3, o dispositivo 300 compreende um corpo ou uma câmara de fluxo 312 formada por um par de paredes confrontantes 314 e paredes de extremidade 316 (apenas uma das quais sendo mostrada na Figura 1), um topo aberto ou entrada 318 e um fundo aberto ou saída 320.

[0030] A entrada 318 é dividida em três seções, incluindo entradas externas 322 e uma entrada central ou de amostra 324. As entradas externas 322 são para o recebimento de um fluido de revestimento 326 ali e a entrada central 324 é para o recebimento de um fluido de amostra 328 contendo um meio líquido e células 330 dispersas ali.

[0031] A saída 320 tem seções de saída externas 332 e canais de coleta de amostra centrais, especificamente, o canal de amostra de saída esquerdo 334L, o canal de amostra de saída central 334C e o canal de amostra de saída direito 334R. O canal 334L é para uma primeira amostra classificada, 334C é para uma segunda amostra classi-

ficada e 334L é para ainda uma outra amostra classificada.

[0032] O fluido de revestimento 326 é introduzido nas entradas externas 322 em uma taxa de fluxo selecionada. O fluido de amostra 326 é introduzido em uma entrada central 324 em uma taxa ou pressão de fluxo selecionada em relação à taxa ou pressão de fluxo de revestimento, de modo que os fluidos de revestimento se comprimam e restrinjam o fluxo de amostra para um percurso de fluxo de amostra relativamente estreito 336, conforme mostrado. Em uma modalidade de exemplo, a largura do percurso de fluxo de amostra 336 é de em torno de 10% ou menos da largura da corrente do fluido de amostra na entrada central 324, por exemplo, de em torno de 50 mícrons.

[0033] As células 330 são circulares, mas aplainadas. Como resultado, uma restrição do fluido de amostra faz com que as células 330 se orientem de modo que seus lados planos estejam aproximadamente paralelos às paredes confrontantes 314. A intensidade de luz irradiada por uma célula é diferente em orientações diferentes. De modo a se comparar a intensidade de duas ou mais células, elas devem ter a mesma orientação. Assim, células alinhadas reduzem o ruído ou erro sistemático causado por se ter um emissor de luz anisotrópico em orientações aleatórias.

[0034] As entradas alternadas de fluido de revestimento 326 e solução de amostra ou de objeto de entrada 328 (veja a Figura 3) entram no sistema, criando uma pequena quantidade de restrição (em relação à restrição na direção ortogonal) 401, o que causa um cisalhamento, e o fluxo de cisalhamento alinha as células 400. Este padrão de fluxo alternado é comprimido mais severamente entre os dois longos fluxos de fluido de revestimento de entrada, o que obtém o alinhamento necessário. Este arranjo pode ser combinado com uma detecção aqui adiante, para a provisão de um sistema paralelo, onde múltiplos fluxos podem ser interrogados.

[0035] Especificamente, o fluxo de restrição move os objetos para o plano focal 402, e acelera o movimento através da região de detecção 403. A curva 404 no sistema mostra a fronteira de fluido 404, e a região de detecção 405 permite uma caracterização. O cone de luz 406 permite uma interrogação e a posição de corrente padrão 407 pode ser direcionada entre múltiplas saídas.

[0036] Pela variação da taxa de fluxo através dos três canais de saída 409 a 411, células ou outros objetos na solução podem ser classificados em uma de múltiplas correntes de saída. A atuação pode ser feita de várias formas, conforme enumerado acima. Uma comutação de fluxo à alta velocidade pode ser realizada por piezodispositivos, os quais podem ser intrínsecos à máquina ou intrínsecos ao cartucho de canal de fluxo descartável. A região de comutação de fluxo 408 controla a taxa de fluxo precisa, a qual varia ao longo do tempo para comutação entre os canais de saída 409 a 411 (onde $V2 < V1$ e $V4 \sim V2$).

[0037] O detector 340 (Figura 2) compreende um laser 342 ou outra fonte adequada produzindo um feixe de saída 344 dirigido para o percurso de fluxo de amostra 336 em uma zona de detecção 338 intermediária à entrada e à saída. O feixe 344 impinge sobre a célula 330 na zona de detecção 338 e se dispersa, formando um feixe de saída 346. A célula contém um fluoróforo e, assim, produz luz fluorescente também, a qual está contida no feixe de saída 346. Respectivos componentes de dispersão e de fluorescência 346S, 346F do feixe de saída 346 são introduzidos em um detector ótico contendo um sistema ótico 348 e um sistema de detector eletrônico 350. O sistema ótico e o sistema de detector eletrônico são discutidos aqui adiante.

[0038] O feixe de saída 346 transporta uma informação para o detector 340, o qual discrimina dentre as células 330 e produz uma saída 354 para um classificador 356. O classificador 356 controla os condutores 358 em uma relação operativa com os canais de saída 334, de

modo a se variarem as vazões relativas, de modo que cada célula 330 seja classificada em um canal apropriado. Alternativamente, as células podem ser classificadas como desejadas ou indesejadas, e as células desejadas podem ser coletadas e as células indesejadas podem ser destruídas.

[0039] A Figura 3 mostra um sistema de canal único que tem apenas dois fluxos de revestimento 326 e um fluxo de amostra 328. A Figura 4 mostra um sistema de canal múltiplo com quatro fluxos de amostra 328 e fluxos de revestimento compartilhados 326. A Figura 4A mostra a câmara de fluxo e os percursos de fluxo em um plano de topo.

[0040] As Figuras 4 a 4A mostram uma forma possível de paralelização do projeto para se terem muitas correntes paralelas 500 de solução de entrada. O fluxo pode restringir no plano e de forma normal ao plano. Contudo, para casos em que um alinhamento de células é necessário, tal como com esperma bovino, um cisalhamento ao longo da direção da luz entrando deve ser muito maior, para garantia do alinhamento normal em relação à luz entrando. A região de investigação ótica 502 é onde a dispersão do laser e a fluorescência ocorrem.

[0041] No exemplo, cada corrente de revestimento tem um sistema de lente dedicado, múltiplos elementos de PMT, cada um dos quais sendo dedicado a uma corrente correspondente. Deve ser compreendido que o sistema pode ter um sistema de detector de lente para todos os canais e um sistema ótico a laser para todos os canais também. Há múltiplos canais de saída possíveis 503 para cada corrente de fluxo.

[0042] Uma vista plana simplificada do sistema ótico do detector 640 é mostrada na Figura 5. Uma amostra 660 fica em um plano de objeto 662. Nesta ilustração, o feixe de saída ou os raios de luz 646 emanam a partir da amostra 660 como pequenos feixes 646C, 646L,

646R. Os pequenos feixes 646C representam feixes agrupados centralmente próximos do eixo geométrico ótico central C; e os pequenos feixes 646L e 646R são agrupados para a esquerda e a direita do eixo geométrico central C. Os pequenos feixes provêem vistas diferentes da amostra 660. Uma lente de coleção 664 (a qual pode ser uma lente objetiva de um microscópio) é posicionada a uma distância do plano de objeto 662, o qual é igual ao comprimento focal efetivo (EFL) da lente. A lente 664 pode ser uma lente composta, se desejado, mas, por simplicidade, ela é descrita como uma lente única com um EFL. Pelo posicionamento da lente 664 e, assim, da luz 646 a partir das saídas de objeto, a lente de coleção 664 é colimada como pequenos feixes 666, divididos da mesma forma como 666R, 666C, 666L, conforme mostrado. Isto cria um espaço infinito no sistema de formação de imagem. Embora a presente invenção não requeira este espaço infinito, ele é um arranjo conveniente. O posicionamento lateral de cada raio de luz colimado é determinado predominantemente pelo seu ângulo vindo a partir do plano de objeto. Os pequenos feixes 666L, 666R e 666C seguem os respectivos pequenos feixes 642L, 642R e 642C.

[0043] Os pequenos feixes centrais 666C saem da lente 664 ao longo do eixo geométrico central C para a lente de focalização 676C, a qual focaliza a luz no plano de imagem para frente 678C. Espelhos 672L, 672R separam os pequenos feixes fora de eixo geométrico 666L e 666R saindo da lente de coleção 664. Note que isto também pode ser feito com o posicionamento do detector 674A (Figura 5A) ou de uma fibra ótica 674B (Figura 5B) nesta região, os quais são pequenos, se comparado com o tamanho do feixe neste espaço. Note também que elementos óticos adicionais podem ser inseridos neste espaço, tais como lentes adicionais 674C (Figura 5C) ou um pequeno orifício de pino 674D (Figura 5D), para restrição da faixa de ângulos diodo emissor de luz utilização saindo da lente de coleção 664, ou para con-

trole (recomeço ou expansão) da profundidade focal a partir da qual a luz é coletada como em medições de microscopia homofocais. Em algumas circunstâncias, um par de lentes adicionais, com um pequeno orifício de pino, pode ser usado. Em outros casos, uma máscara com tamanho, formato ou posição controlável pode ser usada para o controle da luz atingindo um dado detector.

[0044] A luz de pequenos feixes 666L é refletida pelo espelho 672L para a lente de focalização esquerda 676L; e a partir do pequeno feixe 666R, a luz é dirigida pelo espelho 672R para a lente 676R e para o plano de imagem direito 678R. Os detectores de luz 689L, 680R e 680C podem estar localizados em respectivos planos focais de imagem 678L, 678R e 678C para a detecção das respectivas imagens. Estes detectores de luz podem ser CCD, fotodiodos, tubos fotomultiplicadores, tubos fotomultiplicadores de anodo múltiplo, ou outros sensores.

[0045] Em muitos casos, é desejável coletar a luz dispersa e a luz fluorescente, onde pelo menos uma das imagens ou detecções feitas requer uma faixa reduzida de ângulos e raio a partir da amostra. A Figura 6 ilustra como isto pode ser feito, usando-se uma configuração de Formação de Imagem de Vetor K, conforme descrito acima, mas com filtros e divisores de feixe adicionais, conforme necessário. Os elementos similares têm os mesmos números de referência.

[0046] Na Figura 6, a luz de iluminação e de excitação 800 passa através de uma lente de coleção 801 e é refletida pelos espelhos 802, 803 através de filtros de emissão 688EL, 688ER para lentes de focalização 804, 805 e para fotodetectores 690L, 690R, respectivamente, os quais formam os planos de imagem fluorescente esquerdo e direito.

[0047] O divisor de feixe em 686C redireciona a luz no campo central 666C através de um filtro de emissão 688E para a lente de focalização 676FC. A saída 689E de filtro de emissão 688E corresponde a

uma emissão de fluorescência a partir da célula. O filtro de linha de laser 688L no eixo geométrico ótico central filtra a luz de laser dispersa para a lente 676C e o fotodetector 690C, onde é formado o plano de imagem dispersa para frente.

[0048] Para melhoria da produção e das capacidades gerais de um dispositivo, uma paralelização é desejada. A Figura 7 mostra como isto é realizado. O laser 642 produz um feixe de laser de entrada 644, o qual excita a fluorescência, é dividido em N múltiplos feixes por um divisor de feixe 690 (por exemplo, uma rede de difração ou um holograma). Os feixes 692A e 692N se espalham em leque e cada um é dirigido para a zona de detecção de um revestimento ("sheath) de amostra correspondente (veja a Figura 4). Os pequenos feixes 692A a 692N são colimados em feixes paralelos pela lente de colimação 694. A saída 696 da lente de colimação 694 é dirigida através da lente cilíndrica 698, a qual focaliza os feixes individuais 700A a 700N sobre as correntes de amostra no plano de objeto 701. Conforme mostrado (Figura 4), a corrente de entrada é dividida em muitas correntes. A luz de um ou de todos os pequenos feixes 700A a 700N no exemplo mostrado e correntes de amostra entram na lente de coleção 702K e é manipulada conforme descrito na Figura 6 acima. Aqui, contudo, dispositivos de arranjo de detector (tais como, PMTs de anodo múltiplo) 720 (720C, 720R, 720L, 720CF...), um para cada grupo de feixes de detecção, são usados. A detecção é mais bem realizada não pela colocação de um detector único em cada posição de formação de imagem, mas pelo uso de detectores de arranjo, tal como um arranjo de PMT linear de 32 elementos 720.

[0049] A produção de um sistema o qual forma imagens ou faz medições em muitos objetos dependerá, em parte, do número de detectores e da sua velocidade. Para muitas aplicações, um detector único, tal como um tubo fotomultiplicador (PMT) é usado em cada plano

de imagem. Isto é adequado para casos em que os objetos passam através do plano de objeto em uma linha de fila única.

[0050] O classificador 856 é descrito a partir deste ponto em detalhes. Um classificador de canal único é mostrado na Figura 8. O classificador 856 compreende um membro estrutural 812; uma camada de definição de canal 816 formada com uma fenda 818 definindo um canal de fluxo 820; uma camada de membrana flexível 822 no topo da camada de definição de canal 816, e um membro estrutural 824 completando o arranjo. O atuador piezoelétrico ou de outro tipo 826 é acoplado a um controlador 828. Um pistão 860 atuado pelo atuador 826 é encaixado na membrana flexível 822 oposta ao canal de fluxo 820 para mudança do padrão de fluxo no canal, de acordo com o suprimento de voltagem para o piezoelétrico. Uma pluralidade dessas estruturas pode ser miniaturizada de modo a estar localizada na janela de atuador, segundo o que múltiplas correntes de amostras podem ser classificadas.

[0051] Um ou mais atuadores 826 podem incluir: um transdutor piezoelétrico para conversão de sinais elétricos em atuação mecânica das vazões; um aquecedor térmico para aquecimento de uma região para expansão rápida de um fluido, material ou bolha; uma geração de bolha térmica para a criação de uma bolha para redução do fluxo da solução; um dispositivo de movimento capacitivo para uma membrana; um dispositivo ótico para aquecimento ou movimento de material, parede, membrana, bolha ou outro material ou objeto para impactar a velocidade de fluxo em um ou mais dos canais de saída 934. A atuação pode ser intrínseca para o dispositivo ou pode ser externamente aplicada. Por exemplo, o atuador 826 e o pistão 860 podem ser um equipamento externo, separado do dispositivo de fluxo descartável 856 (isto é, uma lâmina descartável com um atuador não descartável / externo).

[0052] A Figura 9 ilustra o arranjo paralelo de múltiplos canais no qual os canais de entrada 900 alimentam as correntes de revestimento para canais de fluxo e os canais de saída 901 recebem as várias células espermáticas classificadas. A janela 930 é provida para acoplamento de uma luz de interrogação a cada um dos canais de amostra de detector paralelos. A janela de classificador 932 recebe uma pluralidade de atuadores e elementos descartáveis de classificador. Os pinos de alinhamento de lâmina do dispositivo 100 são designados como 940.

[0053] As Figuras 10A a 10R ilustram modalidades alternativas para direcionamento de células, empregando uma variedade de atuadores 934 em um dispositivo de fluxo para classificação de esperma. Em cada caso, um ou mais atuadores são usados, onde cada atuador poderia ser baseado em dispositivos piezoelétricos (intrínsecos ou extrínsecos ao cartucho), atuadores capacitivos, expansão térmica ou outras tecnologias, conforme descrito nas exposições anteriores. Na maioria dos casos, pelo menos dois atuadores 934 são desejados e, possivelmente, mais de dois atuadores, para o controle de para qual canal de saída 936 uma célula ou um objeto em particular vai. Os atuadores permitem que se controlem e variem os fluxos a taxas muito altas. Apenas perturbações menores no fluxo são necessárias para se fazer com que uma corrente temporariamente se mova de uma saída para uma outra.

[0054] As Figuras 11A a 11B mostram exemplos de configurações de extermínio ou ativação sem uma classificação para a obtenção de um resultado desejado. Na Figura 11A, um laser 940 impinge sobre a corrente de objeto / esperma 942. Este laser é controlado para impingir apenas energia letal sobre certo(s) esperma(s) ou objeto(s), dependendo do resultado da interrogação. Por exemplo, este laser pode exterminar um certo esperma ou outras células, conforme desejado. Por

exemplo, ele pode exterminar todo o esperma de um dado gênero ou um incerto. Alternativamente, o laser pode não exterminar diretamente as células, mas pode de outra forma "ativá-las". Por exemplo, ele poderia ativar algum produto químico o qual tivesse sido previamente introduzido no esperma, tendo o resultado final de exterminação dele ou de outra forma prejudicando a fertilização. Em aplicações mais gerais, uma ativação pode ter uma faixa muito mais ampla de atividades.

[0055] A Figura 11B mostra uma exterminação ou ativação usando-se pulsos elétricos letais, introduzidos através de eletrodos 944, os quais são inseridos no fluxo, de modo a terem acesso localmente à corrente central 942. Como com a solução de laser, os eletrodos podem ser rapidamente pulsados ligados ou desligados, dependendo do resultado da interrogação.

[0056] Uma direção também pode ser obtida oticamente, quando as células forem manipuladas por um aparelho de aprisionamento ótico. Alternativamente, o processo de atuação pode ser uma eletroporação das células, a qual pode ser letal ou ter outro efeito sobre as células.

[0057] A técnica a seguir alinha células espermáticas usando-se um fluxo de compressão:

[0058] Três fluxos são alimentados em uma lâmina de fluxo usando-se uma bomba peristáltica. A corrente contendo espermas flui entre as correntes de topo e de fundo, as quais são águas. Enquanto a velocidade do fluxo de topo e de fundo é mantida a mesma, pela mudança da relação daquelas para o fluxo de esperma, é possível ver uma compressão do fluxo de esperma.

	orientação de esperma (%)			
	ângulo a partir da direção de fluxo (graus)			
Re	< 3	< 15	< 45	> 45
0,066	51,35	29,73	13,51	5,41

	orientação de esperma (%)			
	ângulo a partir da direção de fluxo (graus)			
1,35	61,11	14,81	22,22	1,85
2,13	66,67	16,67	16,67	0

[0059] É esperado que o fluxo comprimido ajude o esperma a ser orientado para a direção de fluxo.

[0060] As imagens do esperma no fluxo foram feitas usando-se uma câmera de CCD equipada em nosso microscópio.

[0061] A tabela acima mostra o grau de orientação no fluxo, onde Re é o número de Reynolds definido como Dur/m, onde D é o diâmetro do canal de fluxo, U é a velocidade, r é a densidade de fluido e m é a viscosidade.

[0062] Re indica se o fluxo é laminar ou não. Embora um Re abaixo de 1000 seja considerado um fluxo laminar, em algumas aplicações, um Re muito pequeno, tal como abaixo de 1, é requerido.

[0063] Conforme a velocidade do fluxo de esperma aumenta, o Re na entrada de canal aumenta, mas ainda permanece na região laminar, indicando que a corrente de fluxo não é perturbada em nossa região experimental.

[0064] A orientação do esperma foi quantificada pela numeração daqueles como uma função de alinhamento de grau de cabeça de espermatozóide com a direção de fluxo.

[0065] Na faixa do experimento, em torno de 80% dos espermas com a imagem formada foram orientados em menos de 15 graus com a direção de fluxo.

[0066] Um melhor alinhamento da direção de fluxo foi mostrado a uma velocidade mais alta, mas espermas perturbados também foram encontrados.

[0067] Os resultados mostram que o sistema poderia alinhar espermas usando esta técnica.

[0068] Deve ser compreendido que o controle de temperatura do fluido envolvente e do fluido de amostra pode ser empregado para prolongamento da vida do esperma. Em uma modalidade de exemplo, a temperatura dos fluidos no dispositivo de fluxo pode ser mantida em torno de 2 a 10 ºC, de modo a se imobilizarem as células espermáticas e, desse modo, estender o tempo de vida.

REIVINDICAÇÕES

1. Aparelho de dispositivo de fluxo (300) para classificação e orientação de células (330) compreendendo:

um par de paredes (314), em relação confrontante, formando uma câmara de fluxo (312) que tem uma entrada (322, 324), uma saída a jusante (320, 332, 334) e uma região de detecção intermediária (338) formando um canal de fluxo, a entrada (322, 324) sendo para o recebimento de uma primeira corrente (326) e de uma segunda corrente (326), espaçadas entre si, de fluido de revestimento de entrada e uma terceira corrente de fluido de amostra (328) contendo as células a serem classificadas entre as primeira e segunda correntes de fluido de revestimento, as primeira e segunda correntes de revestimento (326) tendo respectivas vazões ou pressões na câmara de fluxo (312), em relação à vazão ou pressão da terceira corrente (328), de modo que a terceira corrente (328) seja restrita entre elas, formando uma corrente de amostra relativamente estreita, pelo menos na região de detecção (338), que orienta as células (330) em uma direção selecionada com respeito às paredes (314); e

um detector (340) na região de detecção (338) para a detecção das células desejadas e a produção de uma saída indicativa das mesmas;

caracterizado pelo fato de que as primeira, segunda e terceira correntes (326, 328), a partir da entrada (322, 324) até a saída (320, 332, 334) dentro do aparelho de dispositivo de fluxo (300), formam uma configuração de fluxo predominantemente paralela.

2. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de incluir ainda um classificador (356) a jusante do detector (340) para a classificação das células desejadas a partir da terceira corrente (328).

3. Aparelho de acordo com a reivindicação 2, **caracteriza-**

do pelo fato de que o classificador (356) inclui uma porção da câmara (312), a jusante do detector (340), que é formada com primeira e segunda regiões espaçadas, pelo menos uma das quais recebendo as células desejadas (330).

4. Aparelho de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o classificador (356) inclui um transdutor de pressão (826) que responde ao detector (340) para a aplicação seletiva de pressão a uma ou mais regiões de modo a dirigir as células desejadas (330) para uma primeira região e as células indesejadas para uma segunda região.

5. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que incluir um classificador (356) para separação das células desejadas das células indesejadas (330).

6. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as paredes (314) compreendem membros planos.

7. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as primeira, segunda e terceira correntes (326, 328) compreendem um meio líquido, a terceira corrente (328) compreendendo partículas nela suspensas.

8. Aparelho de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a taxa de fluxo ou pressão das primeira e segunda correntes (326) em relação à terceira corrente (328) restringe a terceira corrente (328) pelo menos na região de detecção (338), de modo que seja de em torno de 10 por cento ou menos da largura das primeira e segunda correntes (326), desse modo orientando as células (330) entrando na região de detecção (338) para uma direção geralmente paralela, uma à outra e às paredes (314).

9. Aparelho de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a região de detecção (338) compreende uma região relativamente estreita para focalização de todo sinal de luz de en-

trada.

10. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a referida saída é formada por primeira e uma segunda regiões espaçadas, a primeira região para recebimento de uma célula desejada (330) e a segunda região para recebimento de células (330) de um tipo indesejado.

11. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o detector (340) compreende uma fonte ótica (342) para iluminação de forma ótica das células (330) na região de detecção (338) com uma luz de entrada (344).

12. Aparelho de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que as células (330) respondem para produzir uma luz de saída (346), em resposta à luz de entrada (344), e o detector (340) compreende um detector ótico (350) que responde à luz (346) produzida pelas células (330).

13. Aparelho de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a luz de saída (346) compreende pelo menos uma luz (346S) dispersa a partir das células (330) e uma luz fluorescente (346F) produzida pelas células (330).

14. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o detector (340) compreende um trem ótico (348) para recebimento da luz de saída (346) das células (330), incluindo um primeiro elemento ótico para a coleta da luz de saída (346) e para a produção de pequenos feixes de luz coletados da mesma, os referidos pequenos feixes representando várias imagens angulares da célula (330), produzidas de acordo com uma interação da célula com a luz de entrada (344).

15. Aparelho de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o detector (340) ainda compreende um detector ótico (350) em alinhamento com um eixo geométrico ótico central do

trem ótico (348), para direcionamento de pequenos feixes selecionados, alinhados com o eixo geométrico central para detectores óticos correspondentes (350).

16. Aparelho de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o detector (340) ainda compreende pelo menos um detector ótico (350) fora de eixo geométrico que posui uma trajetória ótica fora de eixo correspondente para a detecção de pequenos feixes fora de eixo geométrico, que possuem tendo trajetórias óticas orientadas fora de eixo, em relação ao eixo geométrico ótico central.

17. Aparelho de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que ainda compreende um divisor ótico na trajetória ótica do pelo menos um detector ótico fora de eixo geométrico (350), o qual dirige pequenos feixes, selecionados a partir dos pequenos feixes de luz coletados, para o detector fora de eixo geométrico correspondente (350).

18. Aparelho de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que os pequenos feixes de luz coletados incluem luz difundida e luz fluorescente, e o detector (340) ainda compreende filtros óticos (688) para a filtração de pelo menos uma dentre a luz difundida (346S) e a luz fluorescente (346F) a partir da luz coletada.

19. Aparelho de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o classificador (356) compreende um canal para cada tipo de célula (330), e um membro de acionamento (358) acoplado ao canal de fluxo para modificação da taxa de fluxo de fluido em localizações selecionadas na terceira corrente de amostra (328) para direcionamento das células (330) para canais selecionados.

20. Aparelho de acordo com a reivindicação 19, on **caracterizado** pelo fato de que de o membro de acionamento (358) compreende um transdutor de pressão (826) para variação da pressão aplicada ao canal de fluxo.

21. Aparelho de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que o membro de acionamento (358) compreende pelo menos um dentre um transdutor piezoelétrico, uma unidade de aquecimento térmico, uma membrana capacitiva e um aquecedor ótico.

FIG. 1

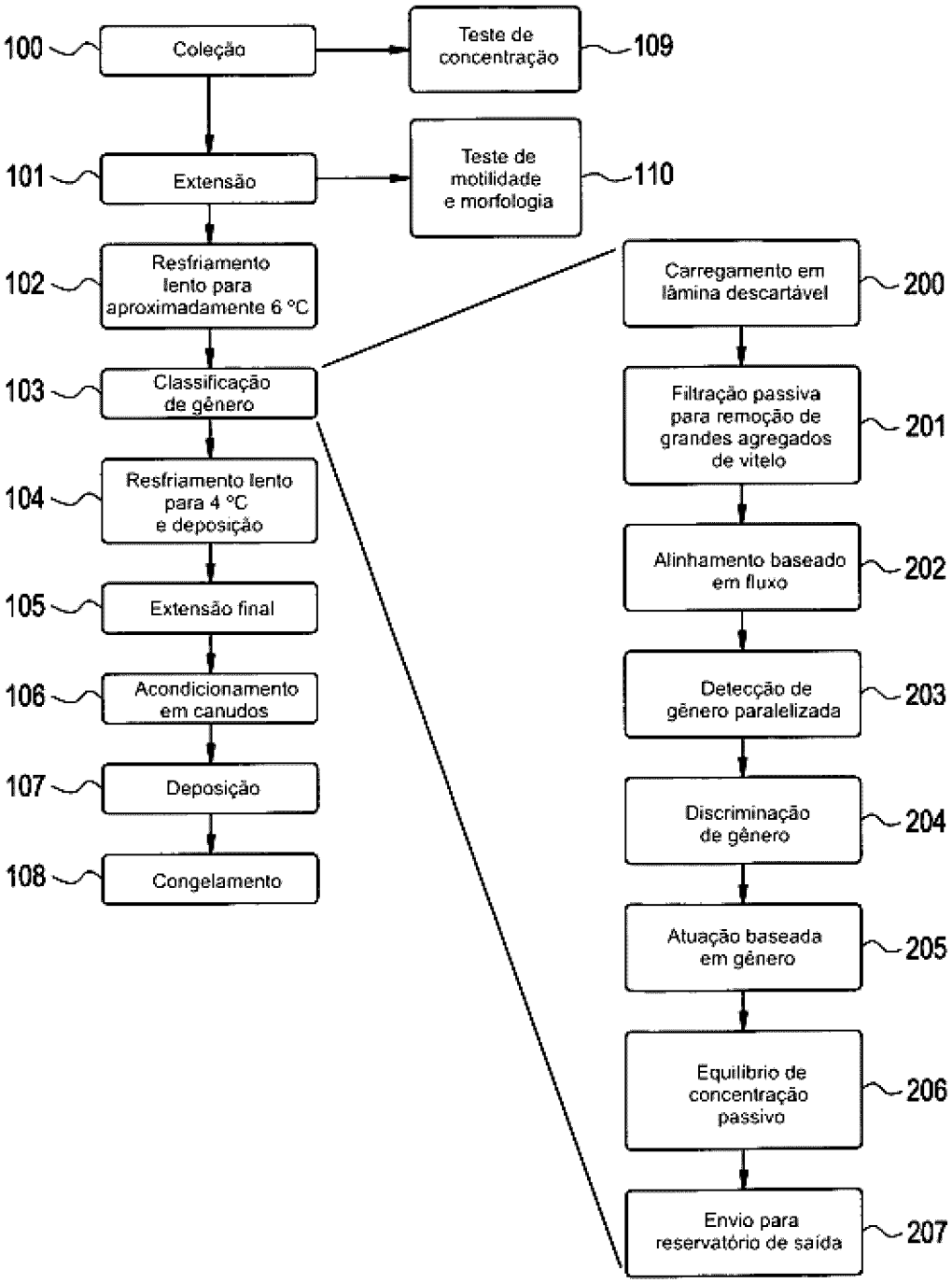

100
Coleção
Teste de concentração
109
101
Extensão
Teste de motilidade e morfologia
110
102
Resfriamento lento para aproximadamente 6 °C
103
Classificação de gênero
104
Resfriamento lento para 4 °C e deposição
105
Extensão final
106
Acondicionamento em canudos
107
Deposição
108
Congelamento
Carregamento em lâmina descartável
200
Filtração passiva para remoção de grandes agregados de vitelo
201
Alinhamento baseado em fluxo
202
Detecção de gênero paralelizada
203
Discriminação de gênero
204
Atuação baseada em gênero
205
Equilíbrio de concentração passivo
206
Envio para reservatório de saída
207

FIG. 2

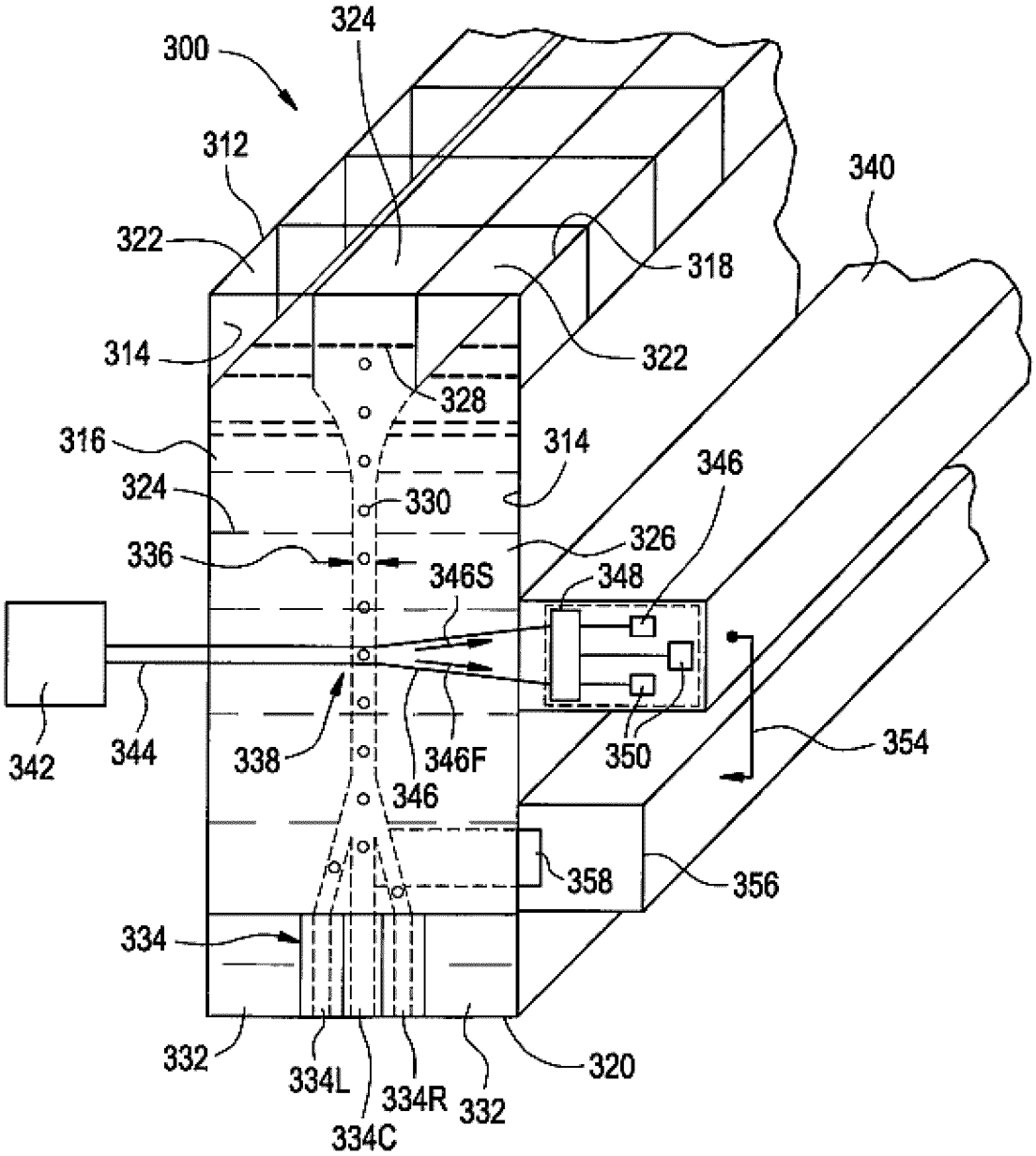

300
324
312
322
340
318
322
314
328
316
314
346
324
330
326
336
346S
348
342
344
338
346F
350
354
346
358
356
334
332
334L
334C
334R
332
320

FIG. 3

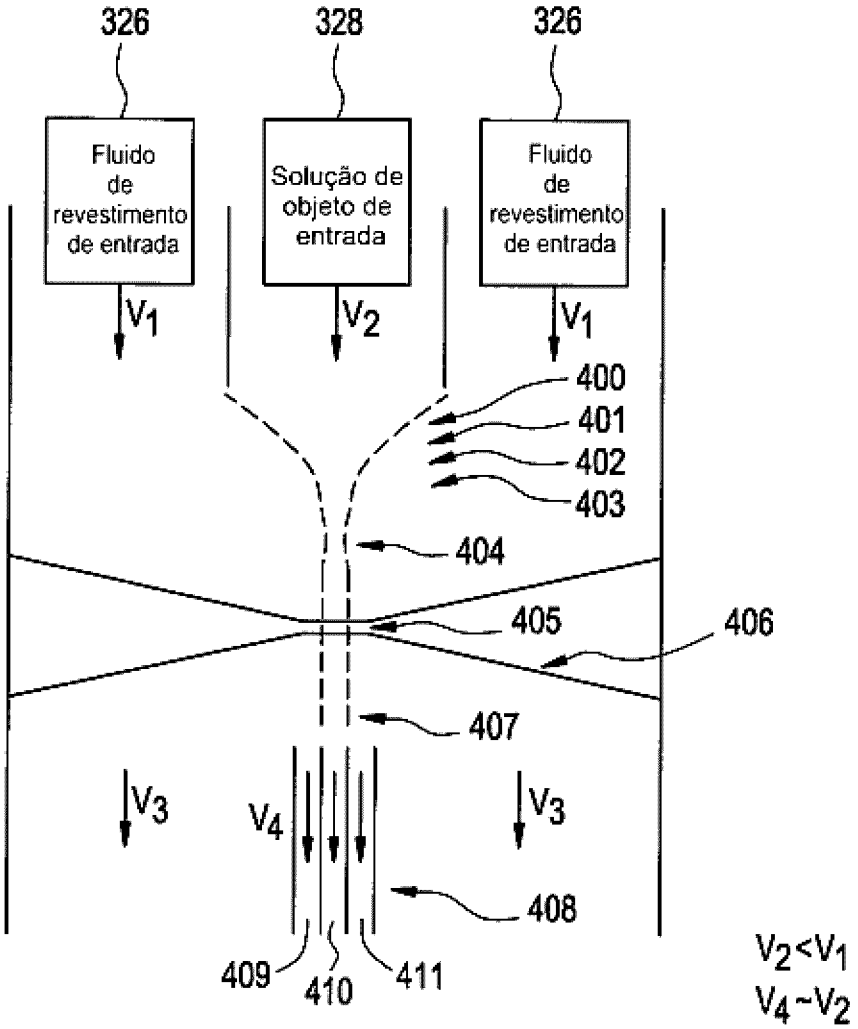

326
328
326
Fluido de revestimento de entrada
Solução de objeto de entrada
Fluido de revestimento de entrada
V1
V2
V1
400
401
402
403
404
405
406
407
V3
V4
V3
408
409
410
411
V2<V1
V4~V2

FIG. 4

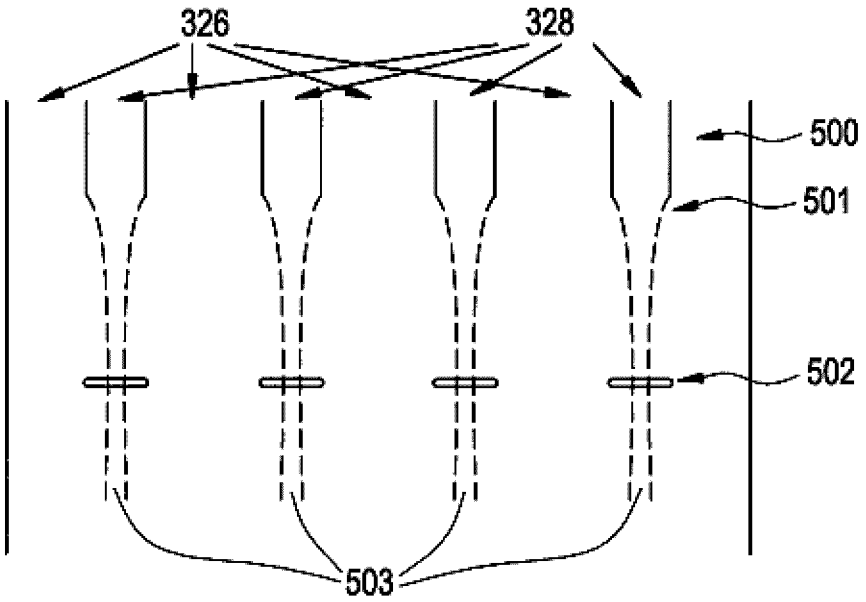


FIG. 4A

Fluido de revestimento de entrada								
SF	IS	SF	IS	SF	IS	SF	IS	SF
Fluido de revestimento de entrada								

FIG. 5

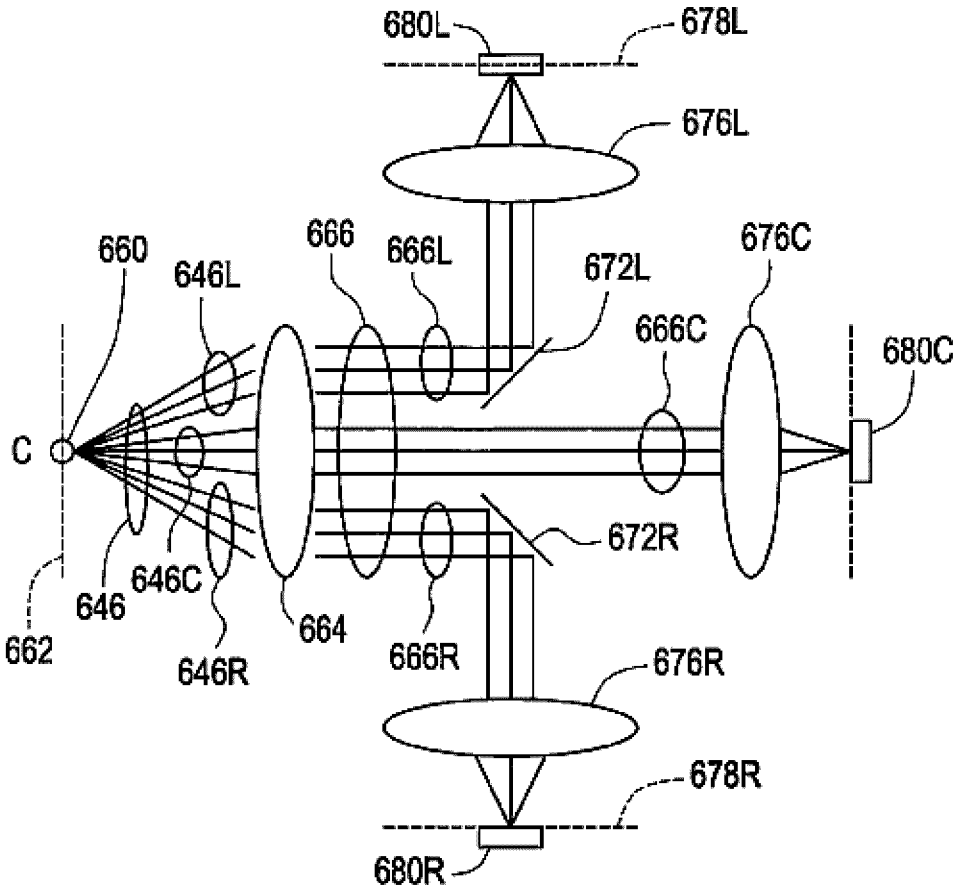


FIG. 5A

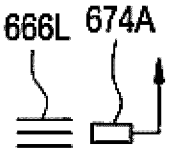


FIG. 5B

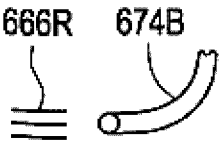


FIG. 5C

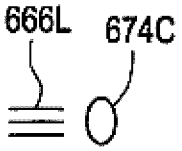


FIG. 5D

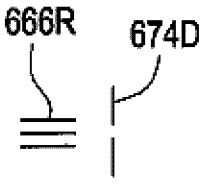


FIG. 6

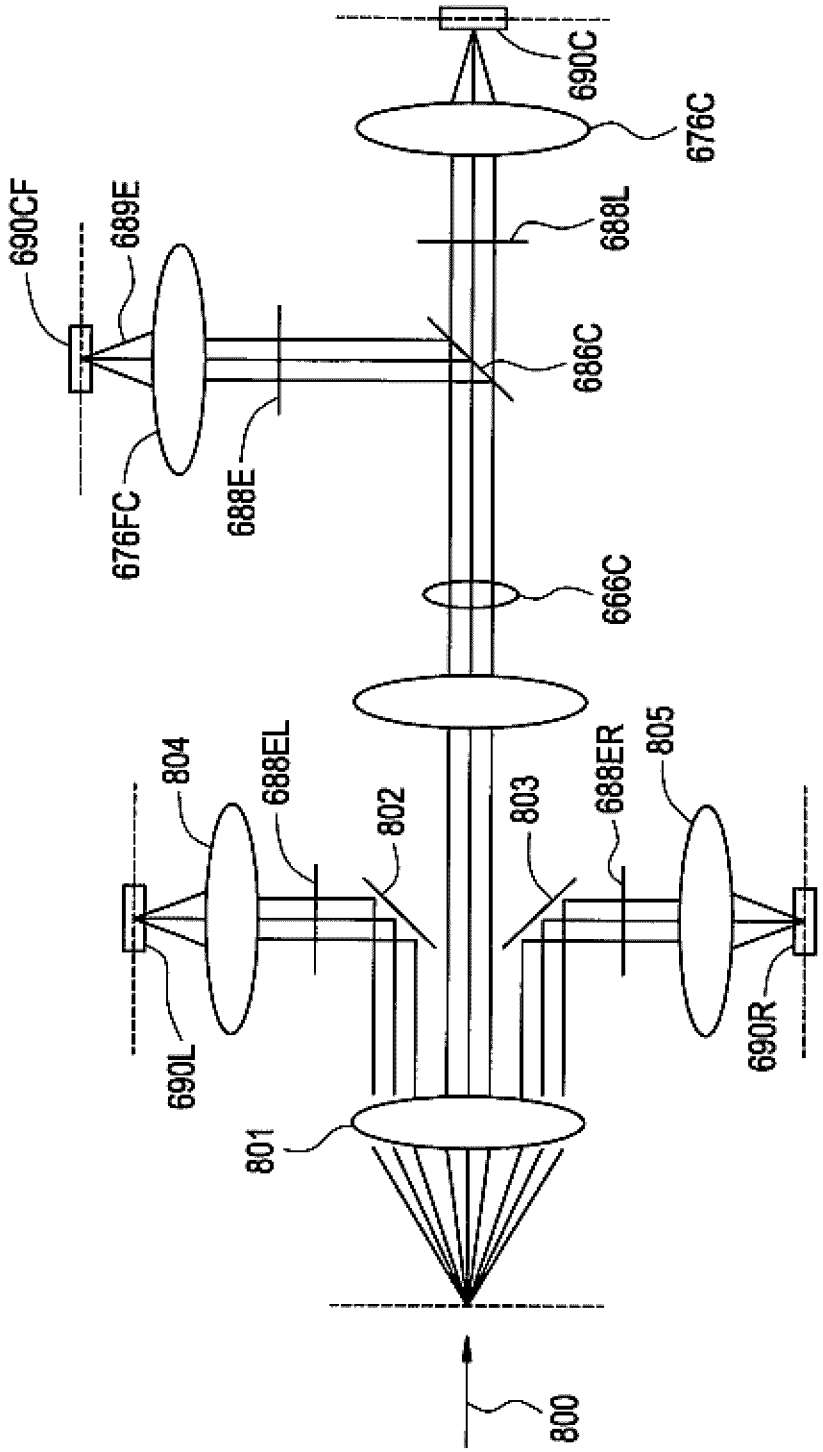

690C
676C
688L
690CF
689E
686C
676FC
688E
666C
804
688EL
802
803
688ER
805
690L
690R
801
800

FIG. 7

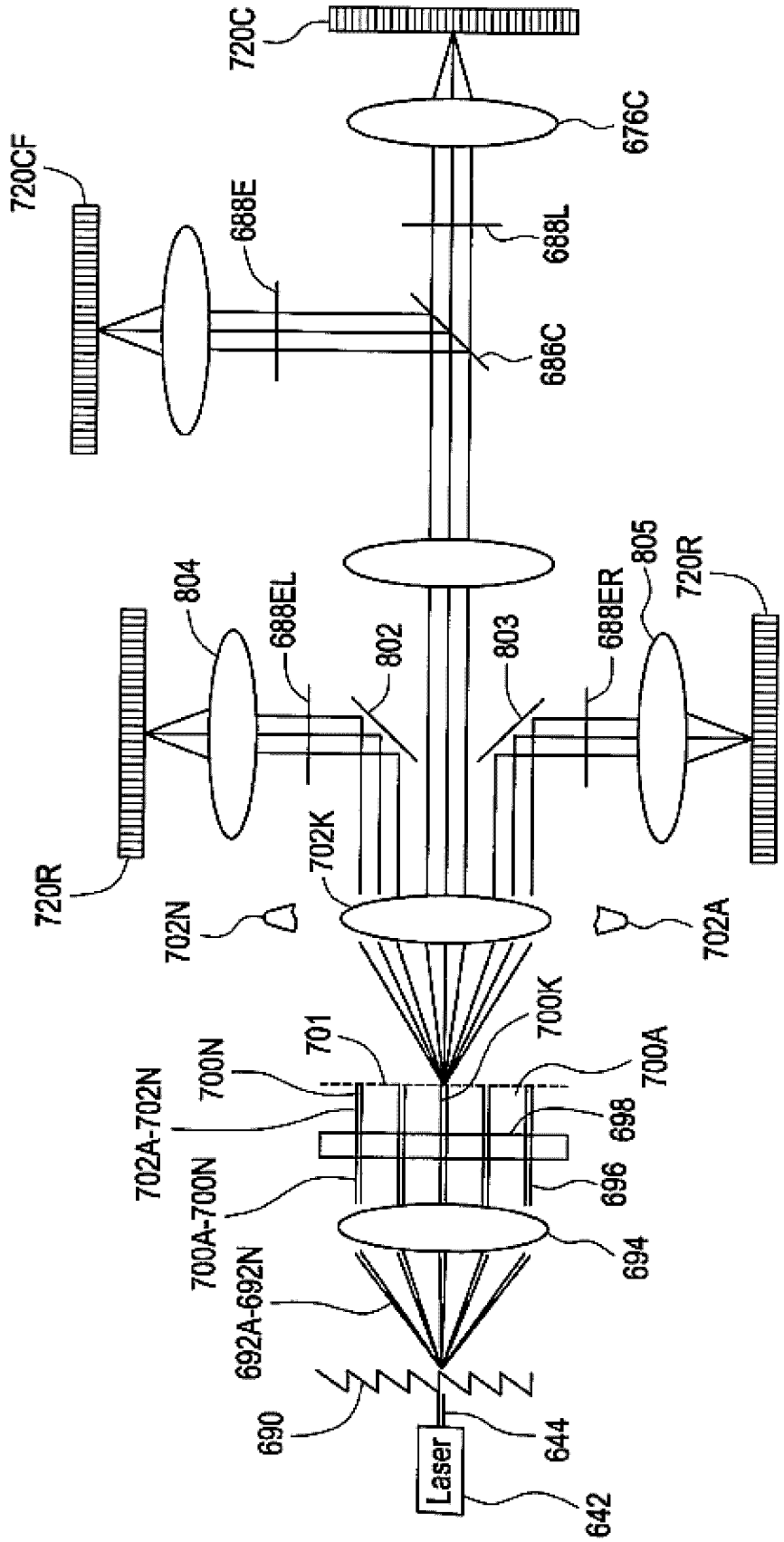

720C
676C
720CF
688E
688L
686C
804
688EL
802
803
688ER
805
720R
720R
702K
702N
702A
701
700K
700N
700A
702A-702N
698
700A-700N
696
694
692A-692N
690
644
Laser
642

FIG. 8

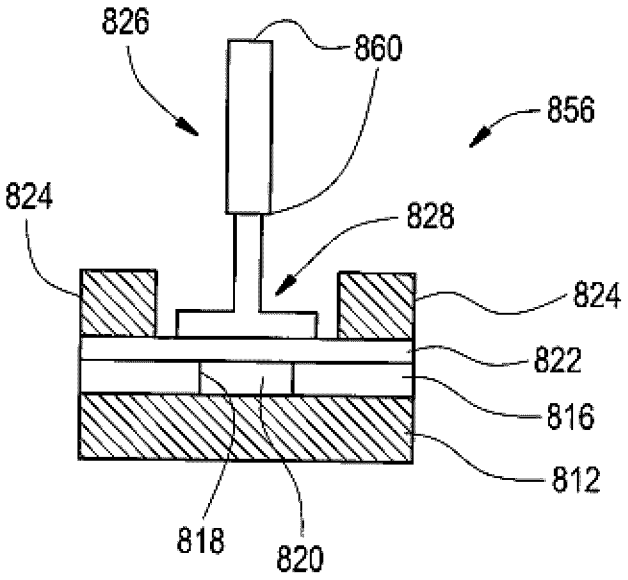

826
860
856
824
828
824
822
816
812
818
820

FIG. 9

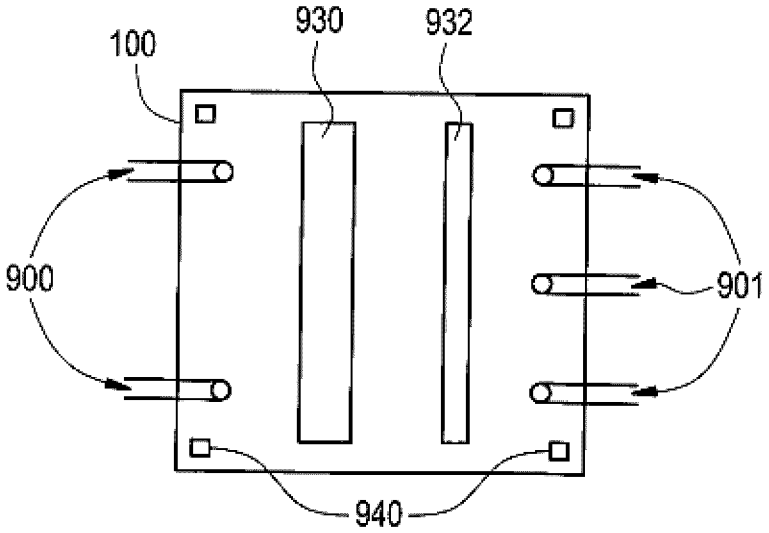
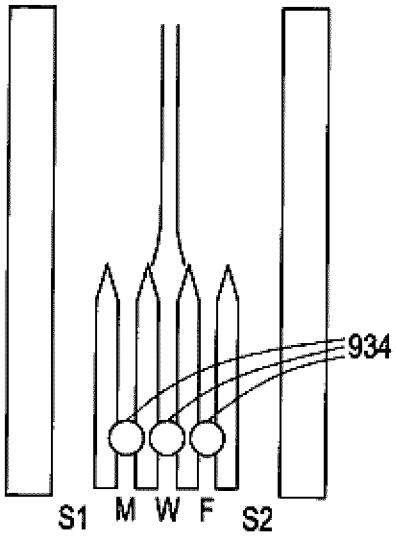
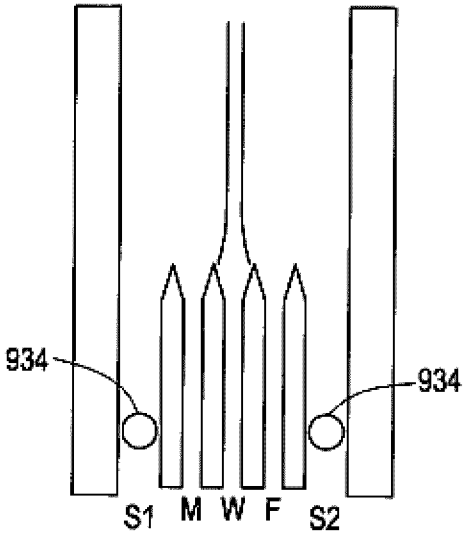

100
930
932
900
901
940

FIG. 10A



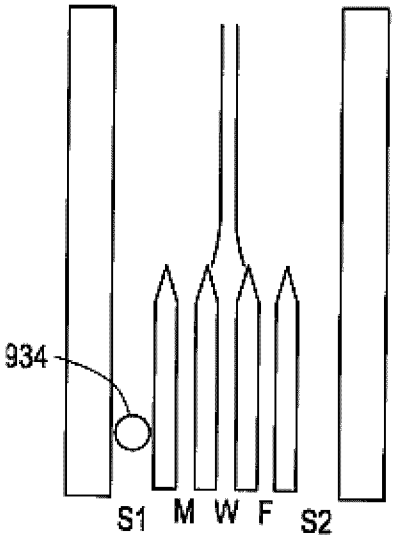
Usando três atuadores em M, W, F

FIG. 10B



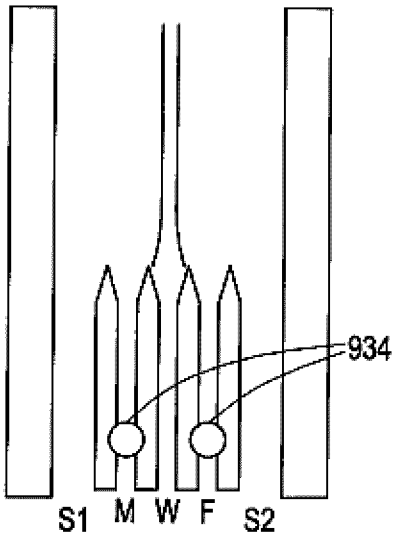
Usando dois atuadores em S1, S2

FIG. 10C



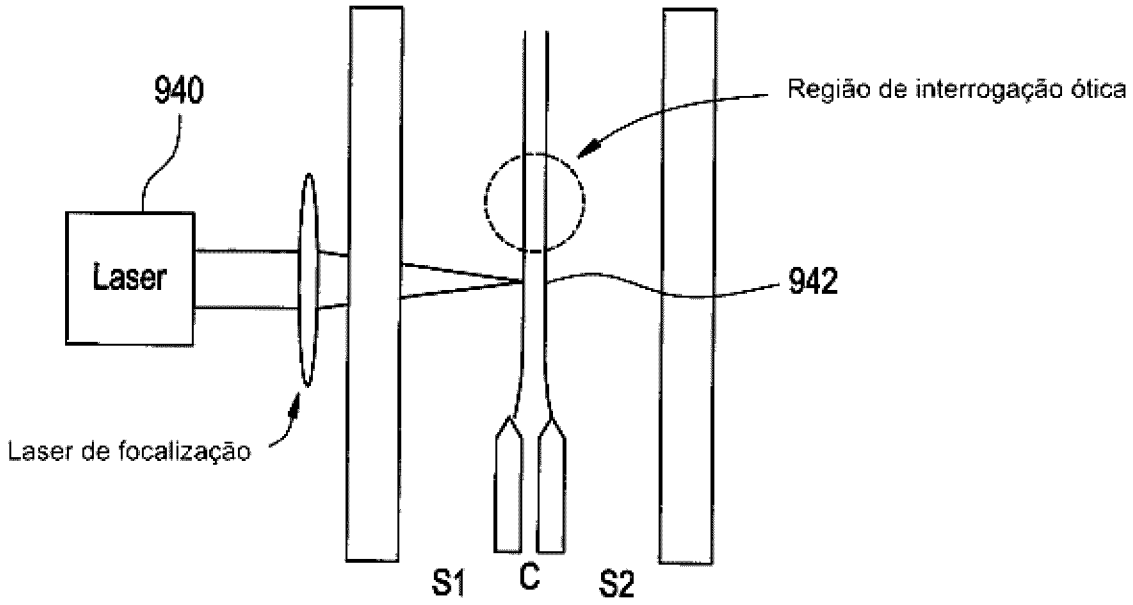
Usando um atuador em S1

FIG. 10D



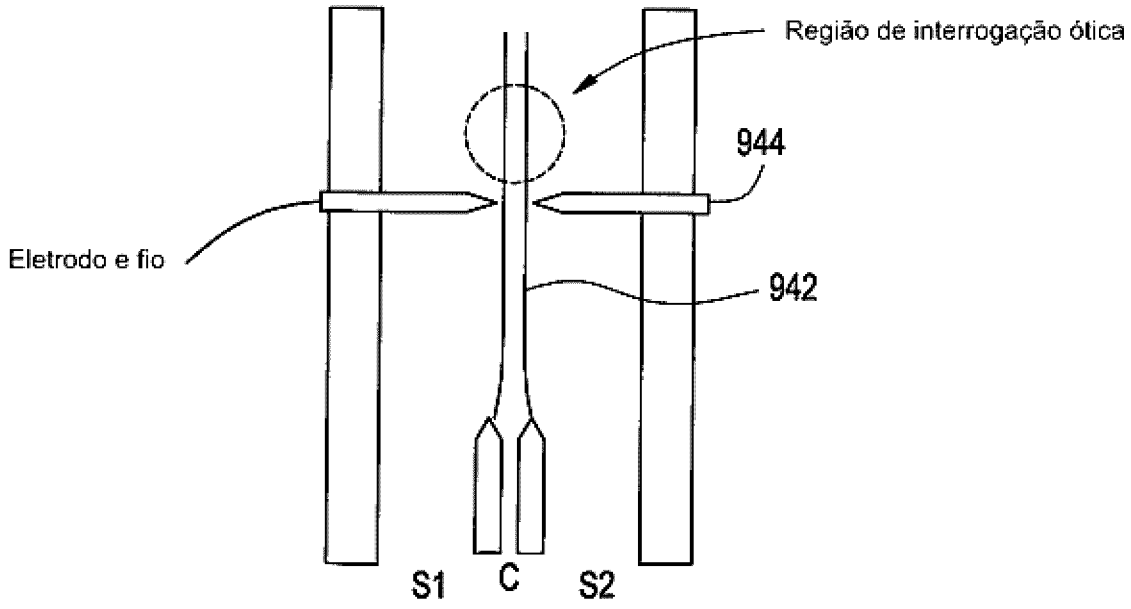
Usando dois atuadores em M, F

FIG. 11A



Usando exterminação ou ativação a laser

FIG. 11B



Usando exterminação ou ativação elétrica